

Multigenska tipizacija izolata fitoplazme 'Candidatus Phytoplasma solani' s područja Istre

Delač, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:880446>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Magdalena Delač

**Multigenska tipizacija izolata fitoplazme
'*Candidatus Phytoplasma solani*' s područja
Istre**

Diplomski rad

Zagreb, 2023

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Martini Šerugi Musić, na podršci, strpljenju, stručnom vodstvu i dragocjenim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i mojoj obitelji, prijateljima i dečku na nevjerojatnoj i nesebičnoj potpori koju su mi pružali tijekom svih uspona i padova ovih studijskih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Multigenetska tipizacija izolata fitoplazme '*Candidatus Phytoplasma solani*' s područja Istre

Magdalena Delač

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fitoplazme (rod '*Candidatus Phytoplasma*') su unutarstanične biljne patogene bakterije čiji su domaćini i vektori kukci koji se hrane floemom biljaka. Nemoguće ih je kultivirati u čistoj kulturi *in vitro* te su stoga istraživanja otežana. Imaju veliku ekonomsku važnost te su povezane s velikim gubicima u proizvodnji mnogih usjeva diljem svijeta. Uzročnici su bolesti žutica vinove loze (eng. *grapevine yellows*; GY) i ozbiljno ugrožavaju europske vinograde. Povezane su sa zarazom fitoplazmama *bois noir* (BN; ribosomska podskupina 16SrXII-A; '*Ca. P. solani*') i *flavescence dorée* (ribosomska skupina 16SrV). Cilj ovog diplomskog rada bila je multigenetska tipizacija izolata fitoplazme '*Ca. P. solani*' dobivenih iz uzoraka vinove loze, koprive i brijesta s dva odabrana lokaliteta na području Istre. Prisutnost fitoplazmi sam potvrdila testom *triplex real-time PCR*, nakon čega sam filogenetski analizirala sekvence gena *secY*, *stamp*, *vmp1* i *tufB* koji su prethodno umnoženi PCR-om. Veća raznolikost genotipova uočena je kod gena *secY* i *stamp*, a manje varijabilni bili su *vmp1* i *tufB*. Po prvi puta je napravljena multigenetska analiza nekog izolata BN fitoplazme iz brijesta. Navedene analize omogućile su detaljniji uvid u epidemiologiju fitoplazmi na području Istre te dale podatke o prisutnosti do sada nezabilježenih skupnih genotipova fitoplazme '*Ca. P. solani*' u Hrvatskoj.

Ključne riječi: fitoplazma, filogenetska analiza, genotipizacija, PCR, MLST

(62 stranice, 14 slika, 16 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Izv. prof. dr. sc. Sunčica Bosak

Prof. dr. sc. Sven Jelaska

Rad prihvaćen: 7.9.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Multilocus sequence typing of '*Candidatus* Phytoplasma solani' phytoplasma isolates from Istria

Magdalena Delač

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Phytoplasmas (genus '*Candidatus* Phytoplasma') are intracellular plant pathogenic bacteria whose hosts and vectors are insects that feed on the phloem of plants. It is not possible to cultivate them in pure culture *in vitro*, and therefore research is difficult. They are of great economic importance and are associated with major losses in the production of many crops worldwide. They are the causative agents of grapevine yellows (GY) and seriously threaten European vineyards. They are associated with infection with phytoplasmas *bois noir* (ribosomal subgroup 16SrXII-A; '*Ca. P. solani*') and *flavescence dorée* (ribosomal group 16SrV). The aim of this thesis was the multigene typing of phytoplasma isolates '*Ca. P. solani*' obtained from grapevine, nettle, and elm samples from two selected locations in Istria. I confirmed the presence of phytoplasmas by using triplex real-time PCR test, followed by phylogenetic analyses *secY*, *stamp*, *vmp1* and *tufB* gene sequences which were previously amplified by PCR. A greater diversity of genotypes was assessed for the *secY* and *stamp* genes, while *vmp1* and *tufB* were less variable. A multigene analysis of an isolate of BN phytoplasma from elm was done for the first time. These analyses enabled a more detailed insight into the epidemiology of phytoplasma in Istria and further data on the presence of yet unrecorded collective genotypes of phytoplasma '*Ca. P. solani*' in Croatia.

Keywords: MLST, phytoplasma, PCR, phylogenetic analysis
(62 pages, 14 figures, 16 tables, 56 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Martina Šeruga Musić, PhD,

Reviewers:

Prof. Martina Šeruga Musić, PhD,
Assoc. Prof. Sunčica Bosak, PhD
Prof. Sven Jelaska, PhD

Thesis accepted: 7.9.2023.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Fitoplazme	1
1.2. Evolucija fitoplazmi	2
1.3. Detekcija i klasifikacija fitoplazmi	3
1.4. Domaćini fitoplazmi	4
1.4.1. Kukci – domaćini i vektori fitoplazmi	4
1.4.2. Biljni domaćini	6
1.5. Genom fitoplazmi	9
1.6. Molekularni markeri u tipizaciji ' <i>Ca. P. solani</i> '	10
1.6.1. Gen <i>secY</i>	11
1.6.2. Gen <i>stamp</i>	12
1.6.3. Gen <i>vmp1</i>	12
1.6.4. Gen <i>tufB</i>	13
1.7. Metode detekcije, identifikacije i klasifikacije fitoplazmi	13
1.7.1. Multigenska tipizacija	14
1.7.2. PCR	14
2. Cilj istraživanja	16
3. Materijali i metode	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Područje istraživanja	17
3.1.2. Uzorci biljaka	17
3.1.3. Referentni sojevi	19
3.1.4. Komercijalni kompleti	19
3.1.5. Marker	19
3.1.6. Početnice	19
3.1.7. Pribor i uređaji	22
3.1.8. Pufferi i otopine	22
3.2. Metode	23
3.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA	23

3.2.2.	Spektrofotometrijska mjerenja	24
3.2.3.	PCR	24
3.2.3.1.	Detekcija fitoplazme ' <i>Ca. P. solani</i> ' <i>triplex real-time</i> PCR testom	25
3.2.3.2.	Umnažanje neribosomskih gena <i>secY</i> , <i>stamp</i> , <i>vmp1</i> i <i>tufB</i>	25
3.2.4.	Elektroforeza	29
3.2.5.	Sekvenciranje po Sangeru	30
3.2.6.	Računalne analize.....	30
4.	Rezultati	31
4.1.	<i>Triplex real-time</i> PCR test.....	31
4.2.	Multigenska analiza.....	33
4.2.1.	Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena <i>secY</i>	33
4.2.2.	Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena <i>stamp</i>	35
4.2.3.	Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena <i>vmp1</i>	37
4.2.4.	Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena <i>tufB</i>	39
4.2.5.	Konkatenacija sekvenci.....	41
5.	Rasprava	44
6.	Zaključak	47
7.	Literatura.....	48
8.	Životopis.....	54

POPIS KRATICA

ATP – adenzin-5'-trifosfat

BN – fitoplazme *bois noir*

Ca. – *Candidatus*

CTAB – cetiltrimetilamonijev bromid

dH₂O – deionizirana voda

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksiribonukleotid

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FD – fitoplazme *flavescence dorée*

GY – žutice vinove loze (eng. *grapevine yellows*)

map – gen za metionin-aminopeptidazu

MLST – multigenaska tipizacija (eng. *multilocus sequence typing*)

NJ - metoda susjednog povezivanja (eng. *neighbour-joining*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

PMU – potencijalne mobilne jedinice (eng. *potential mobile units*)

rDNA – ribosomska deoksiribonukleinska kiselina

RFLP – poliformizam duljine restrikcijskih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*)

RNA – ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

secY – gen koji kodira za podjedinicu proteinske translokaze

stamp – gen koji kodira za antigenski membranski protein

TBE-pufer – otopina Tris-a, borne kiseline i EDTA

TE-pufer – otopina Tris-a i EDTA

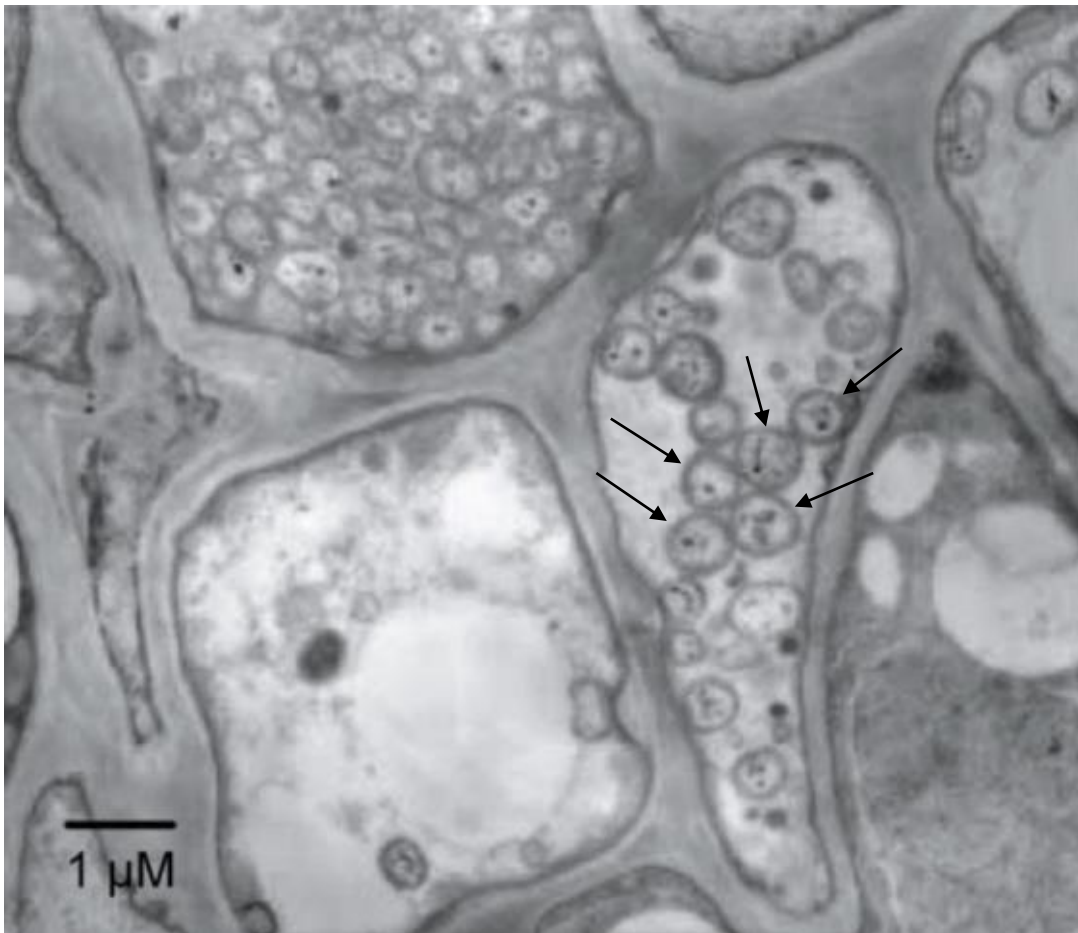
tufB – gen koji kodira za elongacijski faktor Tu

vmp1 – gen koji kodira za varijabilni membranski protein

1. Uvod

1.1. Fitoplazme

Fitoplazme (genus '*Candidatus Phytoplasma*') su patogene unutarstanične bakterije koje nastanjuju floem biljaka i hemocel tj. hemolimfu njihovih kukaca-vektora, a njihova prisutnost povezana je s velikim ekonomskim gubitcima u poljoprivrednom sektoru diljem svijeta (Namba 2019). Otkrivene su tek prije 50-ak godina kada su Doi i suradnici (1967) u tankim prerezima floema zaraženih biljaka otkrili okruglaste strukture nalik na mikoplazme, bakterijske patogene zajedničke životinjama i ljudima (Slika 1). Do tada se smatralo da je uzročnik fitoplazmatskih bolesti virusnog porijekla jer se nije mogao uzgojiti *in vitro* i mogao je proći kroz filter koji zaustavlja bakterije (Lee i sur. 2000).



Slika 1. Elektronsko-mikroskopska snimka poprečnog presjeka tkiva floema biljke zaražene fitoplazmom '*Candidatus Phytoplasma asteris*' (preuzeto iz Oshima i sur. 2013). Strelicama su označene neke fitoplazmatske stanice.

Doi i suradnici (1967) opisali su te novootkrivene organizme kao pleomorfne strukture raspona veličina od 80 do 800 nm. Nisu imali staničnu stijenku već samo jednu vanjsku membranu i bili su osjetljivi na tetraciklinske antibiotike. Zbog tih morfoloških i bioloških sličnosti s mikoplazmama nazvali su ih MLO (od eng. *mycoplasma-like organisms*). Tek se 1994. godine na IOM kongresu (eng. *International Organisation for Mycoplasmaology*) usvojio naziv fitoplazma (od grčkih riječi *phyto* – biljka i *plasma* – tvorba) (IRPCM 2004). Iako na prerezima fitoplazme izgledaju pleomorfno, u nekim istraživanjima potvrđena je njihova filamentozna građa (Haggis i Sinha 1978; Lee i sur. 2000). Filamentozne fitoplazme u najvećem broju su prisutne u zaraženim tkivima tijekom ranih stadija infekcije (Lee i sur. 2000).

Fitoplazme imaju veliku ekonomsku važnost jer je njihova prisutnost povezana s velikim gubicima u proizvodnji mnogih poljoprivrednih kultura diljem svijeta. Žutice vinove loze (eng. *grapevine yellows*; GY) su bolesti koje uzrokuju fitoplazme *flavescence dorée* (FD) i *bois noir* (BN; '*Candidatus* *Phytoplasma solani*') i predstavljaju ozbiljnu prijetnju vinogradima diljem Europe (Belli i sur. 2010; Jeger i sur. 2016). Fitoplazme parazitiraju na nekoliko stotina biljnih vrsta, a među njima se nalaze i mnoge važne poljoprivredne kulture, ukrasne biljke i stabla, a broj bolesti koje uzrokuju stalno raste (Lee i sur. 2000).

Jedini slučaj u kojem je zaraza fitoplazmom poželjna je kod božićne zvijezde (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch), koja zbog zaraze ima grmoliki i patuljasti rast te crvene listove. Upravo te značajke zaraze čine tu biljku poželjnom dekoracijom, pogotovo tijekom Božićnih blagdana (Lee i sur. 1997).

1.2. Evolucija fitoplazmi

Bakterije razreda Mollicutes (lat. *mollis* – mekano; lat. *cutis* – koža), u koje ubrajamo i fitoplazme, odvojile su se od svog Gram-pozitivnog predka koji je vjerojatno bio pripadnik rodova *Clostridium* ili *Lactobacillus* te im se tijekom evolucije znatno reducirao genom zbog prelaska na parazitski način života. Imaju mali udio GC baza, a zbog redukcijske evolucije izgubile su staničnu stijenku te su pleomorfne (Razin i sur. 1998; Hogenhout i sur. 2008).

Unutar razreda Mollicutes, nakon redukcijske evolucije, bakterije su se razdvojile na granu AAA (*Asteroleplasma*, *Anaeroplasma* i *Acholeplasma*) i granu SEM (*Spiroplasma*, *Entomoplasma* i *Mycoplasma*). Grana SEM sadrži nekoliko rodova, uključujući rodove *Spiroplasma*,

Entomoplasma, *Mesoplasma*, *Mycoplasma* i *Ureaplasma*. Ubrzo nakon razdvajanja dviju grana, u SEM grani se UGA kodon promijenio iz stop kodona u kodon za triptofan. Spiroplazme su evolucijski mlađe i nisu pretrpjele toliko gubitaka gena kao pripadnici drugih rodova (Razin i sur. 1998). Također, aholeplazmama i fitoplazmama nedostaje funkcionalni fosfotransferazni transportni sustav za unos šećera, dok ga mikoplazme i spiroplazme imaju (Hogenhout i sur. 2008).

Iako spiroplazme i fitoplazme imaju slične ekološke niše i obrasce infekcije, razdvojene su u različite grane unutar razreda Mollicutes. Na temelju 16S ribosomske DNA (rDNA) i gena *tufB*, korištenih kodona, metabolizma i sastava membrane, spiroplazme su grupirane u SEM granu, dok su fitoplazme grupirane u AAA granu (Razin i sur. 1998; Bai i sur. 2004). Iako fitoplazme zbog obligatornog parazitizma imaju reduciraniji genom od genoma mikoplazmi i spiroplazmi, imaju dva rRNA operona, dok mikoplazme imaju samo jedan (Jung *et al.*, 2003).

1.3. Detekcija i klasifikacija fitoplazmi

Prije razvoja molekularnih metoda, bilo je teško razlikovati fitoplazmatske bolesti samo na temelju simptoma i raspona domaćina jer u nekim slučajevima čak i različite vrste fitoplazmi uzrokuju vrlo slične simptome kod biljaka. Napredci u molekularnoj biologiji tijekom prijašnjih desetljeća omogućili su detekciju fitoplazmatske DNA pomoću DNA-DNA hibridizacije, lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*; PCR) te kloniranja i sekvenciranja 16S rDNA (Lee i sur. 1998; Namba 2019). Razvijanjem univerzalne metode za PCR amplifikaciju 16S rDNA otkriveno je da fitoplazme čine monofiletsku skupinu koja se evolucijski razlikuje od mikoplazmi te su stoga 2004. godine dodane u zaseban rod '*Candidatus Phytoplasma*' unutar razreda Mollicutes (IRPCM 2004). Za imenovanje nove vrste unutar razreda Mollicutes potreban je opis te vrste u čistoj kulturi, ali kako se fitoplazme ne mogu uzgojiti na taj način, za njih se koristi privremeni sustav klasifikacije tj. kategorija *Candidatus*.

Otkrićem poliklonalnih i monoklonalnih antitijela 80-ih godina prošlog stoljeća poboljšale su se tehnike detekcije fitoplazmi. Često su se kao jednostavan i pouzdan način detekcije i identifikacije nekih sojeva fitoplazmi koristile metode poput enzimski vezanog imunosorbentnog testa (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA) i imunofluorescentne mikroskopije korištenjem monoklonalnih antitijela. *Dot-blot* i *Southern blot* testovi omogućili su proučavanje genetskih međuodnosa fitoplazmi te su pomoću njih otkrivene nove grupe (klasteri genoma sojeva) i podgrupe (podklasteri). Diferencijacija soja unutar nekog klastera lako se može odrediti *Southern*

blot testom ili analizom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*; RFLP) fitoplazmatske genomske DNA (Lee i sur. 1998; Lee i sur. 2000).

U početku su se nepoznati sojevi fitoplazmi pokušali identificirati i klasificirati pomoću filogenetske analize 16S rDNA za što je potrebno sekvenciranje, a kasnije se za diferencijaciju sojeva počela koristiti RFLP analiza amplificiranih 16S rDNA sekvenci što je jednostavnija, pouzdanija i praktičnija metoda (Lee i sur. 2000). Klasifikacija fitoplazmi temeljena na RFLP-u koristi mjesta prepoznavanja 17 restrikcijskih enzima za razlikovanje različitih fitoplazmi. U tradicionalnoj RFLP analizi potrebno je napraviti gel-elektroforezu i vizualno usporediti različite uzorke. Danas se češće koristi pouzdanija virtualna RFLP analiza gdje se koriste podaci sekvencirane DNA te se pomoću njih računalno generiraju virtualni uzorci gela simuliranom RFLP analizom (Wei i Zhao 2022).

Prema 16S rDNA (16Sr) sekvencama, fitoplazme su podijeljene u tri klastera. Prvi klaster (Cluster I) sačinjavaju ribosomske skupine fitoplazmi 16SrI (*Aster yellows*; AY) i 16SrXII (stolbur; STOL). Drugi klaster (Cluster II) sačinjava ribosomska skupina 16SrX (*Apple proliferation*; AP), a treći (Cluster III) sadrži najveći broj ribosomskih skupina, uključujući skupine 16SrIII (*Western X*; WX), 16SrIV (*Palm Lethal Yellowing*; LY) te 16SrV (*Elm Yellows*; EY) (Hogenhout i Šeruga Musić 2010). Trenutno ima 37 16Sr ribosomskih skupina i preko 150 podskupina fitoplazmi (Wei i Zhao 2022).

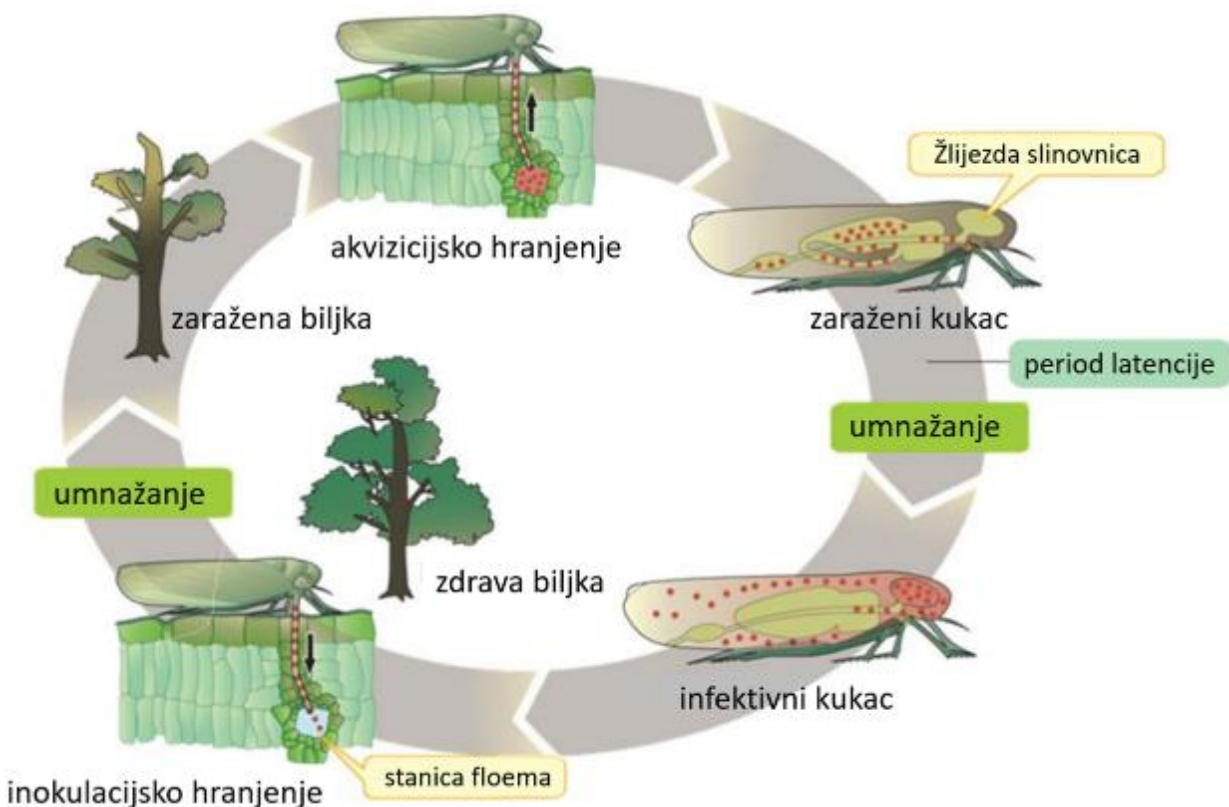
Budući da sama molekularna analiza sekvence 16S rDNA nekada nije dovoljna za preciznije razlikovanje sojeva fitoplazmi, za genotipizaciju sojeva koriste se dodatni *housekeeping* geni zajedno sa specifičnim varijabilnim genima koji kodiraju površinske proteine. Ta metoda naziva se multigenetska tipizacija (eng. *multi-locus sequence typing*; MLST) i koristi se u populacijskim, evolucijskim i epidemiološkim istraživanjima patogenih bakterija diljem svijeta (Jung i sur. 2003; Plavec i sur. 2015).

1.4. Domaćini fitoplazmi

1.4.1. Kukci – domaćini i vektori fitoplazmi

Fitoplazme parazitiraju u floemu biljaka te se stoga prenose od biljke do biljke pomoću kukaca-vektora koji se hrane floemom poput lisnih buha i cvrčaka. Životni ciklus fitoplazmi prikazan je na Slici 2. Svi kukci-vektori fitoplazmi pripadaju redu *Hemiptera*, a najviše vektora,

njih oko 200, ima u porodicama *Cicadellidae* i *Membracidae* (Weintraub i sur. 2019). Najčešći kukac-vektor fitoplazme '*Ca. P. solani*' je *Hyalesthes obsoletus* Signoret koji ju prenosi uglavnom s koprive na lozu, dok je za epidemiologiju bolesti na kukuruzu odgovoran kukac *Reptalus panzeri* Loew, a neki od ostalih poznatih vrsta kukaca-vektora ove fitoplazme su i *Anaceratagallia ribauti* Ossiannilsson, *Reptalus quinquecostatus* Dufour i *Pentastiridius beieri* Wagner (EPPO 2023). Kukci-vektori fitoplazmi hrane se sokom iz floema i ksilema te mezofilnim tkivom te imaju tanke usne aparate i ne ostavljaju očite tragove na mjestu hranjenja na biljci (Hogenhout i sur. 2008).



Slika 2. Životni ciklus fitoplazmi u kukcu-vektoru i biljci domaćinu (prilagođeno iz Oshima i sur. 2011)

Nakon ulaska u usni aparat kukca, fitoplazme se pričvrste za membranu epitelnih stanica srednjeg crijeva, između ili na mikrovile, te počnu ulaziti u srednje crijevo kroz stijenku crijevnog trakta (Hogenhout i sur. 2008). Zatim uđu u hemocel i hemolimfu, pa u žlijezde slinovnice. Kada se zaraženi kukci hrane na novim biljkama, injektiraju fitoplazme u sitaste stanice floema zajedno s izlučevinama žlijezda slinovnica gdje se fitoplazme dalje razmnožavaju (Oshima i sur. 2013; Namba 2019). Iako su možda hranjenjem odmah zarazili biljku fitoplazmom, nekada mogu proći tjedni ili čak mjeseci prije nego se pojave simptomi na biljci domaćinu (Weintraub i sur. 2019).

Floemom se zatim prenose iz tkiva zaraženog lista do drugog lišća, stabljike i korijena te tako potpuno koloniziraju biljku (Namba 2019). Kada uvjeti za razmnožavanje fitoplazmi nisu povoljni, mogu prezimiti u biljkama trajnicama i u zaraženim kukcima-vektorima. Ne mogu se prenositi sjemenkama na novu generaciju biljaka, no mogu se prenositi s biljke na biljku cijepljenjem, reznicama i preko rizoma (Lee i sur. 2000).

Budući da fitoplazme nemaju staničnu stijenu, njihovi membranski proteini igraju bitnu ulogu u interakciji s kukcima i biljkama, a na površinu stanice ih donosi Sec translokacijski sustav (Kakizawa i sur. 2004), o kojem će biti riječi kasnije. Dokazano je da se fitoplazmatski membranski protein IMP (eng. *immunodominant membrane protein*) veže na aktinski citoskelet biljaka. Pošto fitoplazme nemaju gene za kretanje, može se pretpostaviti da im to vezanje na aktin pomaže pri kretanju po sitastim stanicama (Boonrod i sur. 2012).

1.4.2. Biljni domaćini

Biljke zaražene fitoplazmama pokazuju razne simptome koji ukazuju na poremećaje u normalnoj ravnoteži faktora rasta ili biljnih hormona. Neki od tih simptoma su virescencija (gubitak normalnih cvjetnih pigmenata tj. ozelenjivanje floralnih dijelova zaražene biljke), filodija (razvoj listova umjesto cvjetnih elemenata, Slika 3), sterilnost cvjetova, uvijanje listova, proliferacija pomoćnih ili pazušnih izdanaka (u obliku “vještice metle“), zakržljaloost raznih dijelova biljke (cvjetova, listova i internodija), obezbojenje listova ili izdanaka, grozdasti rast na krajevima stabljike te općenito propadanje dijelova biljke (nizak rast, žućenje ili crvenjenje listova) (Lee i sur. 2000; Hogenhout i sur. 2008). Oblik i jačina simptoma ovisi o vrsti fitoplazme koja je zarazila biljku i o stadiju zaraze. Fitoplazme u biljci mogu uzrokovati velike nekroze floema i stvarati višak floemskog tkiva, dok su neke vrste tolerantne ili čak otporne na infekcije fitoplazmom. Takve biljke mogu imati vrlo blage simptome ili mogu biti asimptomatske (Lee i sur. 2000).



Slika 3. Simptomi zaraze fitoplazmom (filodija) kod hortenzije. Zdrava biljka prikazana je lijevo, a zaražena desno (preuzeto iz Oshima i sur. 2013).

Izazivanjem simptoma filodije i “vještije metle“ na biljci raste više kratkih grana i malih mladih listova koji imaju i dulji vijek trajanja. Takve listove preferiraju insekti koji se hrane floemom koji time ujedno i prenose fitoplazme. Ozelenjeni cvjetovi također imaju dulji vijek trajanja te opstaju čak i kad normalni cvjetovi uvenu, čime postaju privlačniji kukcima-vektorima (Namba 2019).

Fitoplazma '*Ca. P. solani*' parazitira na širokom spektru kultiviranih i korovnih biljaka diljem Europe i Mediterana, poput biljaka porodice *Solanaceae* (zbog toga je i dobila ime “*solani*“), vinove loze, celera, šećerne repe, jagode i lavande. U Europi najviše STOL fitoplazme ima u Francuskoj, Italiji i Njemačkoj i to u korovima poput obične koprive (*Urtica dioica* L.) i poljskog slaka (*Convolvulus arvensis* L.) (Foissac i Wilson 2010). Ove korovne biljke služe kao rezervoari fitoplazma, pridonoseći širenju bolesti (Johannesen i sur. 2012).

Obična kopriva i poljski slak igraju ključnu ulogu u epidemiologiji BN fitoplazme u Europi jer se često nalaze u blizini polja gdje ih kukci-vektori prenose na druge korove ili kultivirane biljke tj. usjeve. Za razliku od poljskog slaka, obična kopriva ne pokazuje nikakve simptome i često se nalazi na rubovima vinograda, stoga se stvara gradijent vinove loze zahvaćene BN bolešću, s višim stopama infekcije na granicama vinograda (Bressan i sur. 2007; Constable 2010). Kukca *H. obsoletus* ne privlači gusta vegetacija pa zato ljeti, kada se u vinogradu uklone korovi, uđe u vinograd i primoran je hraniti se vinovom lozom jer više nema dovoljno vrsta kojima se inače hrani (Bressan i sur. 2007). Kako je vinova loza usputna žrtva pravog sustava domaćina i fitoplazmi tj. “slijepi domaćin“ (eng. *dead-end host*), ne igra bitnu ulogu u epidemiologiji stolbur fitoplazme (Constable 2010).

Širok spektar domaćina fitoplazmi čini izbijanje epidemija nepredvidivim. Zbog dugog perioda inkubacije fitoplazmi u kukcima-vektorima, epidemije se često prekasno otkriju. To se dogodi obično blizu berbe čime je još teže prekinuti ciklus bolesti (Hogenhout i sur. 2008). Sadnja pokrovnog usjeva, koji nije domaćin ni kukcu-vektoru ni STOL fitoplazmi, mogla bi smanjiti učestalost i broj kukaca-vektora u vinogradima, a time i količinu zaraženih biljaka (Constable 2010). No, najučinkovitiji način kontrole širenja fitoplazmatskih bolesti je pomoću fizičke zaštite tj. pokrivanjem usjeva tankim mrežama koje propuštaju vodu (Weintraub i Wilson 2010).

Dugo se smatralo da je tetraciklin jedini antibiotik koji suzbija razmnožavanje fitoplazmi, no otkriveno je da i kloramfenikol, tiamfenikol i rifampicin djeluju na sličan način. Rifampicin ima najbolje djelovanje jer, osim što je prvi antibiotik koji djeluje samo na fitoplazme (tetraciklin djeluje i na mikoplazme), nema fitotoksično djelovanje pa biljke tretirane rifampicinom rastu jednako dobro kao i netretirane (Tanno *et al.*, 2018). Unatoč tim novim otkrićima, potrebna su dodatna istraživanja o tvarima koje suzbijaju rast fitoplazmi kako bi se mogli očuvati usjevi i kako bi se olakšala sigurna trgovina biljkama.

Infekcije biljaka fitoplazmama često su smrtonosne te uzrokuju velike gubitke u poljoprivrednoj proizvodnji diljem svijeta. Primjerice, 2001. godine epidemija fitoplazme u Njemačkoj na stablima jabuke uzrokovala je gubitak od oko 25 milijuna eura, a u Italiji oko 100 milijuna eura (Strauss 2009). Osim toga, očekuje se porast stope bolesti povezanih s fitoplazmama jer globalno zatopljenje pogoduje kukcima vektorima osjetljivim na hladnoću. Tada će zaražene biljke vjerojatno ranije razviti simptome, koji će možda biti ozbiljniji, budući da veći broj

fitoplazmi u biljci može rezultirati težim oblikom bolesti (Hogenhout i sur. 2008; Foissac i Wilson 2010).

1.5. Genom fitoplazmi

Genom fitoplazmi vrlo je malen u usporedbi s veličinom genoma ostalih biljnih patogena, ali je sličan genomu mikoplazmi. Slično kao i ostali članovi razreda Mollicutes, fitoplazme imaju jedan kružni kromosom (Neimark i Kirkpatrick 1993) koji varira u veličini. Genom im je raspona od 530 do 1350 kilobaznih parova (kbp), što je slično kao i kod ostalih članova roda *Mycoplasma* (580-1300 kbp), ali je manji od roda koji im je najrodniji, *Acholeplasma* (cca 1600 kbp) (Razin i sur. 1998). Iako imaju mali genom, fitoplazme imaju velik broj otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frame*; ORF) u više kopija te nekad čine čak i 70% genoma (Oshima i sur. 2004). Kromosom fitoplazmi ima nizak udio GC parova (oko 28%), slično kao i druge bakterije razreda Mollicutes i druge endosimbiontske bakterije prisutne u insektima (Hogenhout i sur. 2008).

Prvi sekvencirani genom fitoplazme bio je *Onion yellows* (OY) soja M te je objavljen 2004. godine (Oshima i sur. 2004), a trenutno je dostupno više od 55 sekvenci genoma koje predstavljaju manje od 20% vrsta s objavljenim imenima. Od toga, samo je 20 genoma potpuno sekvencirano (Kirdat *et al.*, 2023). Budući da su fitoplazme unutarstanični paraziti dvaju carstava, biljaka i životinja (insekata), bitno je da se mogu prilagoditi na dva različita seta okolišnih uvjeta. Analiza soja OY-M otkrila je da se mijenja ekspresija približno 33% gena tijekom promjene domaćina. To je dramatična promjena kojom fitoplazme mogu koristiti transportere, izlučene proteine i metaboličke enzime na način specifičan za svakog domaćina (Oshima i sur. 2013).

Fitoplazmatski genomi bogati su ponavljajućim regijama. To su regije s više kopija istih gena i elementima sličnim transpozonomima koji se nazivaju potencijalne mobilne jedinice (eng. *potential mobile units*; PMU) (Bai i sur. 2006; Oshima i sur. 2013). Smatra se da PMU-ovi imaju ulogu u regulaciji ekspresije gena i da, zbog utjecaja na promjenu veličine genoma, imaju ulogu u evoluciji fitoplazmi (Bai i sur. 2006). Pretpostavlja se da PMU-ovi omogućuju i prilagodbu fitoplazmi na domaćine, no ne daju uvijek tako pozitivne ishode. Ako se PMU-ovi umetnu između metaboličkih gena, tada je fitoplazma u nepovoljnom položaju jer je veća vjerojatnost da će izgubiti esencijalne gene zbog rekombinacije između PMU-ova (Hogenhout i Šeruga Musić 2010).

Fitoplazme imaju i kratke kružne DNA molekule tj. plazmide za koje je moguće da su porijeklom iz geminivirusa (Hogenhout i Šeruga Musić 2010). Veličine su oko 1,7-7,4 kbp te su pronađeni u svim fitoplazmama skupina AY i stolbur te kod nekih pripadnika ribosomskih skupina 16SrIII i 16SrVI (Lee i sur. 2000).

Genom fitoplazmi pokazuje znakove redukcijske evolucije koja je često prisutna kod unutarstaničnih parazita i simbiotskih bakterija koje su također izgubile bitne metaboličke gene jer se oslanjaju na unos hranjivih tvari iz okoliša tj. domaćina (Oshima i sur. 2004; Oshima i sur. 2013). Iako fitoplazme imaju gene za osnovne stanične funkcije poput replikacije, transkripcije i translacije DNA te translokaciju proteina, nemaju gene potrebne za ciklus limunske kiseline, transport elektrona, oksidativnu fosforilaciju te biosintezu masnih kiselina, nukleotida i aminokiselina. Uz navedene gene, fitoplazmama nedostaju i geni za koje se prije smatralo da su esencijalni geni za život poput gena za put pentoza fosfata, fosfotransferazni transportni sustav te čak i geni za adenzin trifosfat (ATP) sintazu F_0F_1 -tipa (Hogenhout i sur. 2008; Oshima i sur. 2013; Namba 2019). Soj OY-M prvi je primjer prirodnog organizma bez gena za ATP sintazu (Oshima i sur. 2004). Sintaza ATP-a se kod fitoplazmi vjerojatno događa preko glikolize i puta malata (Namba 2019), ali umjesto F_0F_1 -tipa ATP sintaze, fitoplazme imaju pet gena koji kodiraju ATPaze P-tipa koje su slične animalnim natrij-kalij pumpama. Takve ATPaze stvaraju elektrokemijski gradijent preko membrane te su vjerojatno kod fitoplazmi uključene u sustave za dobivanje energije. Fitoplazme također sadrže manje gena povezanih sa standardnim putem rekombinacije i SOS odgovorom (sustav popravka DNA) od genoma mikoplazmi. Iz toga se može pretpostaviti da fitoplazme imaju oskudan mehanizam homologne rekombinacije te da se takva izmjena genoma vjerojatno rijetko događa (Hogenhout i sur. 2008).

1.6. Molekularni markeri u tipizaciji '*Ca. P. solani*'

Multigenska tipizacija (MLST) je koristan i informativan alat za stjecanje uvida u raznolikost i rasprostranjenost genotipova koji pripadaju istoj vrsti fitoplazme. Za procjenu genetske raznolikosti sojeva BN fitoplazme ('*Ca. P. solani*') se uz manje varijabilne gene *tufB* i *secY* koriste i geni specifični za pojedinu vrstu, geni *vmp1* i *stamp* (Cimerman i sur. 2009; Pacifico i sur. 2009; Fabre i sur. 2011).

1.6.1. Gen *secY*

Kod bakterija postoji barem pet sustava za izlučivanje proteina, koji im omogućuju ne samo da izgrade svoje membrane, već i da izlučuju mnoštvo toksina, adhezina i hidrolitičkih enzima (Economou 1999). Od tih pet sustava, samo je Sec translokacijski sustav (od eng. *secretion*, izlučivanje) esencijalan za život mnogih bakterija. Fitoplazme imaju dva sustava za izlučivanje. YidC sustav koriste za integraciju novo sintetiziranih membranskih proteina, a Sec sustav za integraciju i izlučivanje proteina u citoplazmu stanica domaćina.

Gen *secY* ima varijabilniju sekvencu od sekvence gena za 16S rRNA te je stoga koristan za diferencijaciju blisko povezanih, ali različitih sojeva fitoplazmi koji se ne mogu lako razlučiti pomoću visoko konzerviranog gena za 16S rRNA (Lee i sur. 2006). Koristi se i kao marker za klasifikaciju sojeva fitoplazmi unutar skupina 16SrXII-A (Lee i sur. 2006) i 16SrV (Arnaud i sur. 2007).

Sec proteinski translokacijski sustav najbolje je opisan kod bakterije *Escherichia coli*. Sastoji se od barem 11 proteina i jedne vrste RNA. Među tim proteinima su SecA, SecE, SecG i SecY, koji čine kompleks translokaze. Proteini SecA, SecE i SecY potrebni su za translokaciju proteina i vijabilnost bakterije *E. coli* (Economou, 1999). Translokacijska aktivnost proteina može se replicirati *in vitro* samo s ova tri proteina (Akimaru *et al.*, 1991).

Djelovanje Sec sustava može se podijeliti u tri različite, ali uzastopne i međusobno ovisne faze: ciljanje, translokaciju i otpuštanje. U prvoj fazi preproteini se vode do izlaznih mjesta u membrani. U drugoj fazi, jedan dio lanca prolazi kroz lipidni dvosloj, vjerojatno kroz translokazu. Naposljetku, u trećoj fazi, translocirani lanac se oslobađa te zatim poprima svoju nativnu strukturu. Protein SecY igra bitnu ulogu u drugoj fazi, koju katalizira preprotein translokaza. Translokaza ima domenu koja sadrži heterotrimere membranskih proteina SecY, SecE i SecG koji tvore pore koje se protežu kroz membranu. Od navedena tri proteina, samo je SecY esencijalan za život većine sojeva bakterije *E. coli* (Economou 1999).

Proteini koji su supstrati Sec sustava imaju signalni peptid na svom N-kraju. Protein SecB je šaperon specifičan za Sec sustav koji prepoznaje te sekvence i usporava savijanje proteina koji se izlučuje. Protein SecA veže taj protein vođen šaperonom i dovodi ga do SecYEG pore. SecA koristi svoju ATPaznu aktivnost za postupno poticanje lučenja proteina (Economou 1999). Antigenski membranski protein (Amp), važan površinski membranski protein kod fitoplazmi,

supstrat je Sec sustava. Ima signalni slijed na svom N-kraju kojeg cijepa Sec sustav u OY fitoplazmi, kao i kod drugih bakterijskih Sec sustava (Kakizawa i sur. 2004).

Sec sustav vrlo je čest kod fitoplazmi. Geni koji kodiraju proteine SecA, SecY i SecE pronađeni su u soju OY '*Ca. P. asteris*' (Kakizawa i sur. 2004) te u genomu AY-WB fitoplazme (Bai i sur. 2006), a geni za protein SecY klonirani su iz nekoliko fitoplazmi (Lee i sur. 2006).

1.6.2. Gen *stamp*

Gen *stamp* varijabilniji je od *housekeeping* gena *secY* i kodira jedinstveni antigenski membranski protein velik 16 kDa. *In situ* imunofluorescencija je pokazala da je protein STAMP izložen površini fitoplazme i obrađuje se cijepanjem signalnog peptida na 32. aminokiselini (Fabre i sur. 2011). Gen *stamp* u '*Ca. P. solani*' kodira ortologni protein antigenskog membranskog proteina AMP u '*Ca. P. asteris*', koji specifično prepoznaje aktinski mikrofilament svog kukcavektora (Suzuki i sur. 2006). Kao i kod '*Ca. P. asteris*', gen *stamp* je u vrsti '*Ca. P. solani*' podvrgnut pozitivnom selekcijskom pritisku koji ukazuje na njegovu važnu ulogu u interakciji s domaćinima (Fabre i sur. 2011).

1.6.3. Gen *vmp1*

Drugi gen jedinstven za '*Ca. P. solani*' je *vmp1* i također je varijabilniji od *housekeeping* gena *tufB* i *secY*. On kodira transmembranski protein od 557 aminokiselina i 57,8 kDa, ali promjenjive je veličine zbog varijacija u ponavljajućim domenama (Cimerman i sur. 2009). Cimerman i suradnici (2009) dokazali su da je gen *vmp1* prisutan u nekoliko (vjerojatno različitih) kopija na kromosomima svih analiziranih izolata stolbur fitoplazme. Također, čini se da protein VMP1 nije neophodan za razmnožavanje stolbur fitoplazmi u poljskom slaku, budući da neki izolati nisu uopće imali taj gen (Cimerman i sur. 2009).

Protein VMP1 ima signalni peptid s N-terminalnom hidrofobnom regijom od 20 aminokiselina koja vjerojatno ima mjesto cijepanja na glicinu 27. Ima i alfa zavojnicu od 22 hidrofobne aminokiseline blizu C-kraja koja omogućuje usidrenje proteina u staničnu membranu fitoplazme, izlažući tako veliki hidrofilni zreli protein staničnoj površini sa samo sedam aminokiselina smještenih unutar stanice. Gen *vmp1* vjerojatno je uključen u prilagodbu fitoplazme na različite uvjete u domaćinima te je stoga izložen snažnom selektivnom pritisku (Cimerman i sur. 2009).

1.6.4. Gen *tufB*

Gen *tufB* imaju svi pripadnici razreda Mollicutes i sve Gram-pozitivne bakterije. Schneider i suradnici (1997) pokazali su da se gen *tufB* može koristiti za diferencijaciju i klasifikaciju fitoplazmi. Analizom *Southern blot* otkrili su da je gen *tufB* prisutan u jednoj kopiji u genomu fitoplazme. Ovaj visoko konzervirani gen kodira faktor elongacije Tu (EF-Tu) i ima središnju ulogu u procesu translacije. Gen *tufB* znatno je varijabilniji od gena za 16s rRNA, a ta varijabilnost korisna je pri multigenskoj tipizaciji fitoplazmi (Schneider i sur. 1997).

Tri tipa *tufB* gena kod '*Ca. P. solani*', *tufB*-a, *tufB*-b i *tufB*-c, identificirane su na temelju RFLP analize *tufB* gena pomoću restriktivnog enzima *HpaII* (Langer i Maixner 2004). Pretpostavlja se da su ove vrste gena *tufB* povezane s različitim epidemijskim ciklusima stolbur fitoplazme. Dok se tip *tufB*-a uglavnom povezuje s običnom koprivom (*Urtica dioica* L.) (Langer i Maixner 2004; Bressan i sur. 2007), *tufB*-b se nalazi u nizu drugih korovnih biljaka (Credi i sur. 2006), uključujući i poljski slak (*Convolvulus arvensis* L.) (Langer i Maixner 2004; Credi i sur. 2006; Johannesen i sur. 2012), koji je ujedno i dominantan domaćin fitoplazme '*Ca. P. solani*' u gotovo cijeloj Europi (Ember i sur. 2011). Tip *tufB*-c povezan je s običnim ladoležom (*Calystegia sepium* (L.) R. Br.) (Langer i Maixner, 2004).

Aryan i suradnici (2014) otkrili su i *tufB*-b podtip, *tufB*-b2, koji se razlikuje u *HpaII* restrikciji, a ima i drugačija ekološka svojstva. Otkrili su i da genotipovi *tufB*-a i *tufB*-b2 povezani s koprivom imaju zajedničko podrijetlo i da su monofiletski, dok genotip *tufB*-b2 ima različite oblike koji su polifiletski.

1.7. Metode detekcije, identifikacije i klasifikacije fitoplazmi

U ranim danima su se koristila fenotipska obilježja za klasifikaciju fitoplazmi poput simptoma, vektora i seroloških analiza. Taj pristup se više ne koristi jer u puno slučajeva različiti fitoplazmatski sojevi izazivaju slične simptome ili imaju iste vektore. Nakon 90-ih godina prošlog stoljeća, utvrđena je klasifikacijska shema 16Sr grupa i podgrupa temeljena na RFLP profilima 16S rRNA gena (Wei i Zhao 2022).

Kako fitoplazme ne mogu biti uzgojene *in vitro*, njihova detekcija i karakterizacija uvelike se oslanjaju na molekularne dijagnostičke tehnike. Njihovim brzim razvojem pojavile su se različite brze, osjetljive i isplative metode detekcije fitoplazmi poput PCR-a, ugniježđenog PCR-

a, *real-time* PCR-a, *droplet digital* PCR-a (ddPCR), petljom posredovanog izotermalnog umnažanja (eng. *loop-mediated isothermal amplification*; LAMP) te čak metoda temeljenih na CRISPR tehnologiji. Ove metode su osmišljene na temelju visoko očuvanih sekvenci gena 16S rRNA te *rp*, *secY* i *tufB* gena (Wei i Zhao 2022).

1.7.1. Multigenaska tipizacija

Multigenaska tipizacija (eng. *multilocus sequence typing*; MLST) je metoda tipizacije koja se koristi za karakterizaciju i klasifikaciju mikroorganizama, posebno bakterija, a u ovom slučaju fitoplazmi, na temelju DNA sekvenci više *housekeeping* i varijabilnih gena (Arnaud i sur. 2007). Multigenaska tipizacija uključuje umnažanje i sekvenciranje nekoliko konzerviranih gena željenog mikroorganizma, čime se mogu odrediti tipovi i podtipovi za svaki gen. Ova metoda korisna je za proučavanje struktura populacija, evolucijskih odnosa, praćenje širenja infekcije i istraživanje genske raznolikosti. Osim preciznosti identifikacije i dosljednosti rezultata, zbog lakog dijeljenja podataka omogućuje suradnju na globalnoj razini.

1.7.2. PCR

Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*; PCR) omogućuje precizno umnožavanje određenih segmenata DNA. Za uspjeh ove metode zaslužan je enzim Taq polimeraza koji je otporan na visoke temperature. PCR je najčešća metoda detekcije i tipizacije raznih sojeva fitoplazmi. Napredci u toj metodi dovode do boljeg i bržeg shvaćanja ekologije i epidemiologije fitoplazmi (Mackay 2004; Foissac i sur. 2013).

PCR proces uključuje mehanizam termalnog cikliranja koji se sastoji od denaturacije, prijanjanja i elongacije i izvodi se u uređaju nazvanom termalni cikler ili termocikler (eng. *thermal cycler*). Reakcijska smjesa za PCR sadrži DNA uzorak, početnice (eng. *primers*), enzim Taq polimerazu i nukleotidne gradivne blokove (dNTP-ovi).

Prvi korak reakcije je denaturacija gdje se uzorak DNA zagrijava na visoke temperature (od 94 do 98°C) kako bi se razbile vodikove veze između dva lanca DNA molekule. Drugi korak je prijanjanje početnica (eng. *annealing*) na komplementarne sekvence jednolančane DNA i odvija se na 50 do 65°C. Treći i posljednji korak PCR-a je korak elongacije koji se izvodi na temperaturi od oko 72°C, optimalnoj temperaturi za Taq polimerazu. U ovom koraku Taq polimeraza produžuje početnice dodavajući komplementarne nukleotide u 5' → 3' smjeru, čime se sintetiziraju novi lanci

DNA. Tri navedena koraka čine jedan ciklus PCR-a te se ponavljanjem ovih ciklusa (obično 20 do 40 puta) ciljna DNA eksponencijalno umnaža rezultirajući milijunima kopija.

Ugniježđeni (eng. *nested*) PCR je varijacija standardne PCR metode koja omogućuje dodatnu amplifikaciju ciljanog DNA segmenta. Ova tehnika se koristi kada je potrebna veća specifičnost i osjetljivost, posebno kod uzoraka s malim količinama DNA ili prisutnošću niskih koncentracija neželjenih kontaminanata. Te prednosti čine ovu metodu jednom od glavnih metoda za umnažanje DNA fitoplazmi.

U klasičnom PCR-u, isti set početnica se koristi i za denaturaciju i za amplifikaciju ciljanog segmenta DNA. U ugniježđenom PCR-u, umnažanje se provodi u dva uzastopna ciklusa. U prvom ciklusu, primarne (vanjske) početnice vezuju se na šire područje ciljnog segmenta, čime se smanjuje mogućnost vezivanja na nespecifične regije. Nakon toga, uzorak iz prvog ciklusa služi kao kalup za drugu fazu umnažanja. U drugom ciklusu, unutarnje (*nested*) početnice ciljaju vrlo specifične regije unutar prvobitno amplificiranog produkta, povećavajući specifičnost i pouzdanost rezultata. Jedan od nedostataka ugniježđenog PCR-a je prisutnost lažnih pozitivnih rezultata zbog moguće kontaminacije iz prvog amplifikacijskog koraka.

Real-time PCR, također poznat kao qPCR (eng. *quantitative* PCR), koristi se za mjerenje količine DNA ili RNA u uzorku praćenjem umnažanja DNA u stvarnom vremenu. To se postiže korištenjem fluorescentnog bojila ili sonde koje fluorescira kada se veže na umnoženu DNA te je tada povećanje fluorescencije proporcionalno količini sintetizirane DNA.

Korištenje *real-time* PCR-a eliminira potrebu za dodatnom analizom nakon umnažanja DNA jer se podaci prikupljaju u stvarnom vremenu tijekom samog procesa. To smanjuje rizik od kontaminacije i lažnih pozitivnih rezultata, a ima i veću osjetljivost i preciznost u kvantifikaciji željene DNA. Na tom principu napravljen je i *triplex real-time* PCR test pomoću kojega se mogu detektirati tri različite molekule DNA u jednoj reakcijskoj smjesi. Svaki od tri ciljna gena ima svoju specifičnu fluorescentnu probu koja se veže na određenu fluorescentnu boju te se korištenjem tri različite fluorescentne boje omogućuje istovremeno praćenje amplifikacije sva tri gena. Ova metoda koristi se i za istovremenu detekciju fitoplazmi ribosomske skupine 16SrXII-A i 16SrV (Pelletier i sur. 2009).

2. Cilj istraživanja

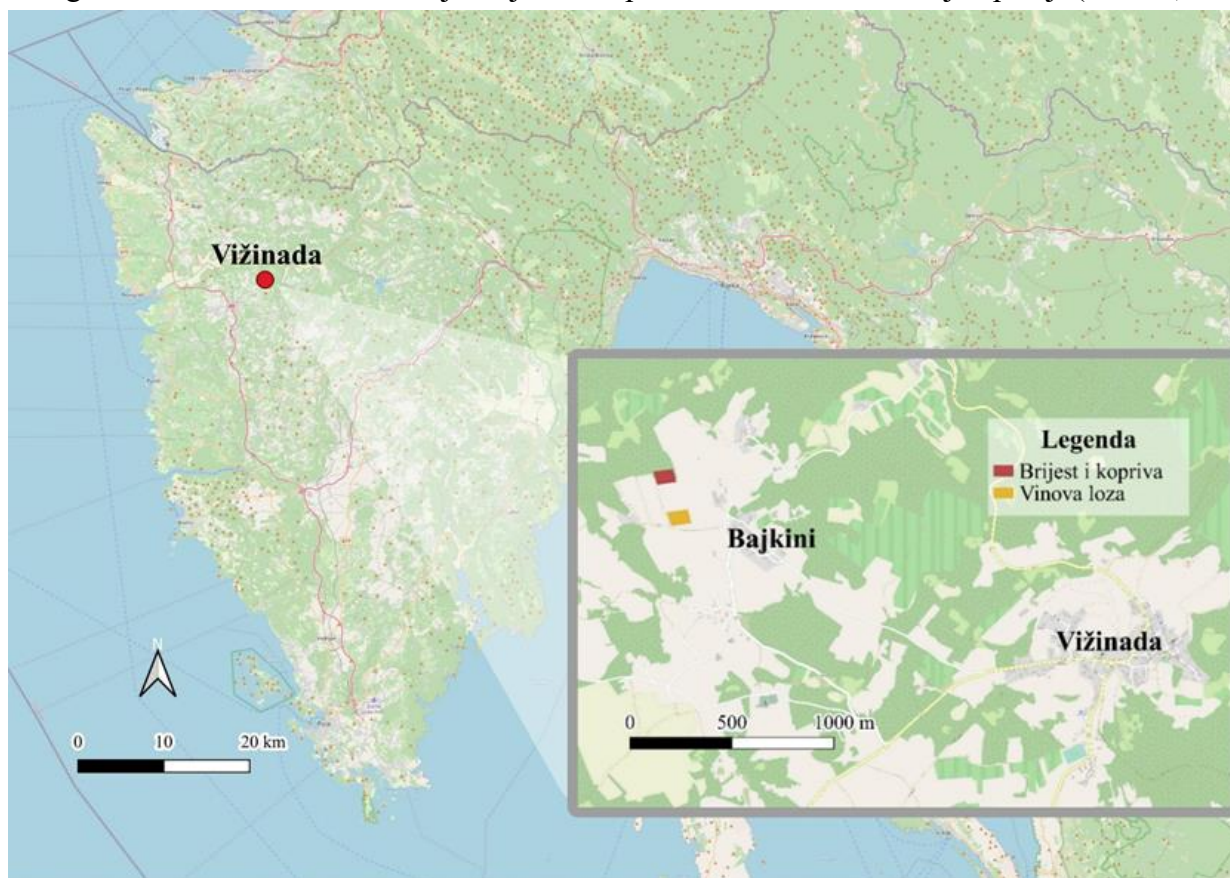
Cilj ovog istraživanja bio je provesti multigensku tipizaciju izolata fitoplazme '*Ca. P. solani*' s dva odabrana lokaliteta na području Istre analizom gena *secY*, *stamp*, *vmp1* i *tufB* izoliranih iz uzoraka vinove loze (*Vitis vinifera* L.), brijesta (*Ulmus* sp.) i koprive (*Urtica dioica* L.). Dobiveni rezultati pridonijet će boljem razumijevanju epidemiologije ove bolesti, što je potrebno kako bi se bolje moglo kontrolirati širenje fitoplazmi i ekonomske štete koju nanose.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Područje istraživanja

Za ostvarivanje ciljeva ovog rada, koristila sam uzorke sakupljene 2019., 2020. i 2021. godine na području Istre u sklopu bilateralnog hrvatsko-srpskog projekta „Epidemiologija, genetičke specifičnosti i kukci-vektori fitoplazme *Flavescence dorée* u vinogradima Hrvatske i Srbije“ (voditeljica izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić). Uzorci su sakupljeni na dva susjedna vinograda, Arman i Rossi, u naselju Bajkini u Općini Vižinada u Istarskoj županiji (Slika 4).



Slika 4. Karta Istre i istraživanog područja s označenim lokacijama gdje su uzeti uzorci (crveno – brijest i kopriva; žuto – vinova loza).

3.1.2. Uzorci biljaka

Na navedenom području sakupljeni su uzorci vinove loze (*Vitis vinifera* L.), brijesta (*Ulmus* sp.) i obične koprive (*Urtica dioica* L.). Simptomatični uzorci vinove loze prikupljeni su u

vinogradu Arman, dok su uzorci brijesta i koprive prikupljeni u vinogradu Rossi. Uzorci koje sam koristila za multigenSKU tipizaciju prikazani su u Tablici 1. Uzorci 11 i 12 su replike uzoraka 4 i 6, redom, a napravljene su jer je iz tkiva brijesta teško izolirati visokokvalitetnu DNA te je zbog toga izolacija ponavljana više puta.

Tablica 1. Uzorci korišteni za multigenSKU tipizaciju.

Redni broj uzorka	Oznaka uzorka	Domaćinska vrsta	Lokacija	Godina uzorkovanja
1.	1T-2	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Bajkini, vinograd Arman	2022
2.	1T-10	<i>Urtica dioica</i> L.	Bajkini, vinograd Rossi	2022
3.	2T-5	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Bajkini, vinograd Arman	2022
4.	2T-8	<i>Ulmus</i> sp.	Bajkini, vinograd Rossi	2022
5.	3T-3	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Bajkini, vinograd Arman	2021
6.	3T-8	<i>Ulmus</i> sp.	Bajkini, vinograd Rossi	2022
7.	4T-3	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Bajkini, vinograd Arman	2021
8.	8/20	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Bajkini, vinograd Arman	2020
9.	9/20	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Bajkini, vinograd Arman	2020
10.	54/19	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Bajkini, vinograd Arman	2019
11.	23	<i>Ulmus</i> sp.	Bajkini, vinograd Rossi	2022
12.	25	<i>Ulmus</i> sp.	Bajkini, vinograd Rossi	2022

3.1.3. Referentni sojevi

Kao pozitivnu kontrolu u PCR reakcijama koristila sam soj SA-1 dobiven od prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić (Šeruga Musić i sur. 2019), dok je u *triplex real-time* PCR testu dodatno korišten i soj FD70 dobiven iz laboratorija prof. dr. Xaviera Foissaca (Inrae Bordeaux-Aquitaine, Francuska).

3.1.4. Komercijalni kompleti

Za izolaciju ukupne genomske DNA koristila sam komercijalni komplet *OmniPrep™ for Plant* (*G-Biosciences*).

3.1.5. Marker

Za elektroforetske provjere PCR produkata u agaroznom gelu koristila sam molekularni marker *1 kb Plus DNA Ladder* (New England Biolabs, SAD) s 19 fragmenata raspona 100 - 10000 parova baza (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 i 10000 bp).

3.1.6. Početnice

Za detekciju zaraze fitoplazmom *triplex real-time* PCR-om koristila sam tri para početnica. Prvi par početnica koje sam koristila je par početnica za unutrašnju kontrolu vinove loze VITIS-F i VitisR koji umnaža *tRNAL-F spacer* kloroplasta vinove loze. Drugi par početnica bio je mapFD-F i mapFD-R koji umnaža gen *map* ribosomskih podskupina fitoplazmi 16SrV-C, D i E, a treći par korištenih početnica bio je mapBN-F i mapBN-R koji umnožava isti gen, ali kod ribosomske podskupine 16SrXII-A (Pelletier i sur. 2009). Kao probe koristila sam VITIS-NED, mapFD-FAM i mapBN-VIC *TaqMan® MGB™* (Applied Biosystems, SAD) probe. Nukleotidni sljedovi navedenih početnica i proba nalaze se u Tablici 2.

Tablica 2. Slijedovi nukleotida početnica za detekciju zaraze fitoplazmom '*Ca. P. solani*'.

Početnica/proba	Slijed nukleotida
VITIS-F	5'-AAATTCAGGGAAACCCTGGAA-3'
VITIS-R	5'-CCCTTGGTTGTTTTTCGGAAA-3'
mapFD-F	5'-TCAAGGCTTCGGBGGTTATA-3'
mapFD-R	5'-TTGTTTTAGAAAGGTAATCCGTGAACTAC-3'
mapBN-F	5'-ATTTGATGAAACACGCTGGATTAA-3'
mapBN-R	5'-TCCCTGGAACAATAAAAGTYGCA-3'
VITIS-NED	NED -5'-CTGAGCCAAATCC-3'
mapFD-FAM	FAM -5'-TTGTATTTTCAGTGAATGAAG-3'
mapBN-VIC	VIC -5'-AAACCCACAAAATGC-3'

Za umnažanje genske regije *secY* u direktnom PCR-u koristila sam specifične početnice PosecF1 i PosecR1 (Fialová *et al.*, 2009), a u ugniježđenom PCR-u koristila sam specifične početnice PosecN2 (Foissac *et al.*, 2013) i PosecR3 (Fialová *et al.*, 2009). Za sekvenciranje su korištene iste početnice kao za ugniježđeni PCR. Nukleotidni slijedovi prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Slijedovi nukleotida početnica za umnažanje i sekvenciranje genske regije *secY*.

Početnica	Slijed nukleotida
PosecF1	5'-TCTGCTTTGCCTTTGCCTTT-3'
PosecR1	5'-ATTAGTAAACTAGTTCCTCC-3'
PosecN2	5'-CCATCAAAACTTTTTGGTTTAGGC-3'
PosecR3	5'-GCCCCTATAACGGTGATTTTGA-3'

Za umnažanje gena *stamp* u direktnom PCR-u koristila sam specifične početnice StampF i StampR0, a u ugniježđenom PCR-u sam koristila specifične početnice StampF1 i StampR1 (Fabre, Danet and Foissac, 2011). Za sekvenciranje su korištene iste početnice kao i za ugniježđeni PCR. Nukleotidni slijedovi početnica prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Sljedovi nukleotida početnica za umnažanje i sekvenciranje gena *stamp*.

Početnica	Slijed nukleotida
StampF	5'-GTAGGTTTTGGATGTTTTAAG-3'
StampR0	5'-AAATAAAAGAACAAGTATAGACGA-3'
StampF1	5'-TTCTTTAAACACACCAAGAC-3'
StampR1	5'-AAGCCAGAATTTAATCTAGC-3'

Za umnažanje genske regije *vmp1* u direktnom PCR-u koristila sam specifične početnice StolH10F1 i StolH10R1, za ugniježđeni PCR koristila sam specifične početnice TYPH10F i TYPH10R (Fialová *et al.*, 2009), a za sekvenciranje su korištene iste početnice kao za ugniježđeni PCR. Nukleotidni slijedovi početnica prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Sljedovi nukleotida početnica za umnažanje i sekvenciranje gena *vmp1*.

Početnica	Slijed nukleotida
StolH10F1	5'-AGGTTGTAAAATCTTTTATGT-3'
StolH10R1	5'-GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC-3'
TYPH10F	5'-AACGTTCAACAATCAGTC-3'
TYPH10R	5'-CACTTCTTTCAGGCAACTTC-3'

Za umnažanje genske regije *tufB* u direktnom PCR-u koristila sam specifične početnice fTuf1 i rTuf1, a u ugniježđenom PCR-u koristila sam specifične početnice fTufAY i rTufStol (Schneider, Gibbl and SeemUller, 1997). Za sekvenciranje su korištene iste početnice kao i za ugniježđeni PCR, a nukleotidni slijedovi početnica prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Sljedovi nukleotida početnica za umnažanje i sekvenciranje gena *tufB*.

Početnica	Slijed nukleotida
fTuf1	5'-CACATTGACCACGGTAAAAC-3'
rTuf1	5'-CCACCTTACGAATAGAGAAC-3'
fTufAY	5'-GCTAAAAGTAGAGCTTATGA-3'
rTufStol	5'-CGTTGTCACCTGGCATAACC-3'

3.1.7. Pribor i uređaji

- Mikropipete: Biohit (Finska), Eppendorf (Njemačka)
- Mikroeprevete i nastavci: Eppendorf, Njemačka
- Vaga: *Precisa 62 A* (Precisa Instruments AG, Švicarska)
- Vodena kupelj: *SW22* (Julabo, Njemačka)
- Inkubator: *Incubator Hood TH 15* (Edmund Bühler GmbH, Njemačka)
- Centrifuge: *Centrifuge 5804 R* (Eppendorf, Njemačka), *Mikro-242* (Tehtnica Železniki, Slovenija), *Multi-Spin* (Biosan, Latvija)
- Vrtložne miješalice: *EV-100* (Tehtnica Železniki, Slovenija), *Bio Vortex VI* (Kisker-Biotech, Njemačka)
- Spektrofotometar: *Nanodrop 2000* (Thermo Fischer Scientific, SAD)
- PCR uređaji: *GeneAmp PCR system 2700* (Applied Biosystems, SAD), *ProFlex PCR System* (Applied Biosystems, SAD), *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems, SAD)
- *real-time* PCR uedaj: *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD)
- Kadice za elektroforezu: *Mini-Sub[®] Cell GT* (Bio-Rad, SAD)
- Uređaj za napajanje elektroforeze: *Power Pac 300* (Bio-Rad, SAD)
- Sustav za dokumentaciju gela: *Amersham ImageQuant[™] 800* (Cytiva, SAD)

3.1.8. Pufferi i otopine

- CTAB-pufer (2%)
 - 2% CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid), 0.1M Tris, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 1% PVP-40, pH podešen na 8,0 s konc. HCl
- TE-pufer, pH 7,6
 - za 200 ml pufera; 2 ml Tris 10 mM, 0,4 ml EDTA 1 mM
- 0,5xTBE-pufer pripremljen razrjeđenjem 10X TBE s deioniziranom vodom
 - Tris 90 mM
 - borna kiselina 90 mM
 - EDTA 1 mM
- Taq-polimeraze, pufer i otopine za PCR reakcije

- *real-time* PCR: *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD)
- direktni i ugniježđeni PCR neribosomskih gena: *EmeraldAmp® GT PCR Master Mix* (Takara Bio Inc., Japan)
- Fluorescirajuća boja *SYBR™ Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Tekućina za dekontaminaciju površina: *DNA AWAY™ Surface Decontaminant* (Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA

Za izolaciju ukupne genomske DNA iz uzoraka brijesta i koprive koristila sam komercijalni komplet *OmniPrep™ for Plant*, a za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina iz loze i također iz brijesta koristila sam CTAB (eng. *cetyltrimethylammonium bromide*) metodu.

Prvi korak postupka izolacije genomske DNA korištenjem komercijalnog kompleta *OmniPrep™ for Plant* je homogeniranje oko 80 mg biljnog tkiva u prethodno ohlađenim tarionicima dodatkom tekućeg dušika, 500 µL pufera za lizu (*Genomic Lysis Buffer*) i 5 µL otopine proteinaze K. Nakon toga sam prebacila homogenate u mikroeprovete od 2 mL i miješala na vrtložnoj miješalici oko pet sekundi. Zatim sam inkubirala uzorke dva sata na temperaturi od 60°C uz povremeno okretanje mikroeprove s uzorcima. Nakon što su se uzorci ohladili na sobnu temperaturu, dodala sam 200 µL kloroforma i lagano promiješala mikroeprovete okretanjem nekoliko puta, a zatim sam ih centrifugirala 10 minuta na 14000 g u ohlađenoj centrifugi. Gornju vodenu fazu pažljivo sam otpipetirala u čistu mikroeprovetu od 1,5 mL i dodala 50 µL otopine za odvajanje komponenata (*DNA Stripping Solution*). Ponovno sam uzorke promiješala okretanjem mikroeprove, a nakon toga sam ih ponovno inkubirala u vodenoj kupelji 10 minuta pri 60°C. Zatim sam u uzorke dodala 100 µL otopine za precipitaciju (*Precipitation Solution*), čime nastaje bijeli talog, pa sam ih miješala na vrtložnoj miješalici oko 20 sekundi. Potom sam uzorke centrifugirala pet minuta na 14000 g u ohlađenoj centrifugi. Supernatant sam prebacila u čistu mikroeprovetu od 1,5 mL, dodala 500 µL izopropanola, 2 µL glikogena dagnji (*Mussel Glycogen*) i promiješala uzorke okretanjem. Nakon toga sam uzorke centrifugirala 15 minuta na 14000 g, čime se istaložila DNA. Supernatant sam zatim pažljivo uklonila i talogu dodala 1 mL 70%-tnog etanola. Uzorke sam zatim centrifugirala jednu minutu pri 140000 g, ponovno pažljivo uklonila supernatant

i talog ostavila sušiti oko 30 minuta. Nakon što je ispario etanol, talogu sam dodala 50 μ L TE-pufera i 1 μ L RNAze i inkubirala uzorke u inkubatoru 10 minuta na 37°C kako bi se talog izolirane DNA rehidrirao i dobro otopio u puferu. Uzorak izolirane DNA čuvala sam pri -20°C.

Uzorke vinove loze izolirala sam CTAB metodom za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina. Izvagala sam oko 250 mg tkiva i homogenirala u prethodno ohlađenom tarioniku dodatkom tekućeg dušika, 3,5 mL CTAB-pufera. Kad se homogenat otopio, odpipetirala sam 1 mL u mikroeprevete od 2 mL i inkubirala uzorke 30 minuta na 65°C. Nakon toga sam uzorke centrifugirala pet minuta na 13000 g u prethodno ohlađenoj centrifugi. Supernatant sam prebacila u novu epruvetu od 2 mL, dodala 1 mL smjese kloroforma i izoamil alkohola u omjeru 24:1 i dobro promiješala na vrtložnoj miješalici. Potom sam ponovo centrifugirala uzorke 10 minuta na 13000 g u prethodno ohlađenoj centrifugi. Nakon centrifugiranja, vodenu fazu sam prebacila u novu mikroeprevetu od 2 mL te dodala oko 0,6 puta volumena izopropanola u odnosu na volumen vodene faze i dobro promiješala. Zatim sam uzorke inkubirala 20 minuta na -20°C i centrifugirala 20 minuta pri 13000 g u prethodno ohlađenoj centrifugi. Nakon toga sam ocijedila izopropanol pazeći da ne izađe i talog. Talog sam zatim oprala s 1 mL 70%-tnog etanola, centrifugirala 10 minuta na 13000 g, ocijedila i ostavila ga da se suši na zraku sve dok se ne izgubi miris etanola (oko sat vremena). Potom sam otopila uzorke u 50-100 μ L sterilne vode, resuspendirala talog i inkubirala 30 minuta pri 37°C uz dodatak RNAze. Uzorak ovako izolirane DNA čuvala sam u hladnjaku na 4°C.

3.2.2. Spektrofotometrijska mjerenja

Različite molekule mogu se razlikovati ako imaju različite maksimume apsorpcije pri specifičnim valnim duljinama (λ), stoga sam koncentraciju i čistoću izolirane DNA odredila spektrofotometrijski. Nukleinske kiseline maksimalno apsorbiraju pri 260 nm, a proteini i organske nečistoće pri 280 nm. Čistoću izolirane DNA odredila sam omjerom tih dviju apsorbanacija (A_{260}/A_{280}), a nakon mjerenja sam uzorke razrijedila na 40 ng/ μ L.

3.2.3. PCR

Koristila sam metodu lančane reakcije polimerazom za potvrdu infekcije fitoplazmom '*Ca. P. solani*' i za umnažanje neribosomskih gena *secY*, *stamp*, *vmp1* i *tufB*.

3.2.3.1. Detekcija fitoplazme '*Ca. P. solani*' triplex real-time PCR testom

Koristila sam metodu *triplex real-time* PCR (Pelletier i sur. 2009) za potvrdu infekcije uzoraka fitoplazmom '*Ca. P. solani*'. *Triplex real-time* PCR je specifična i precizna metoda koja omogućuje istovremeno detektiranje i kvantifikaciju tri različita ciljna gena ili sekvenci DNA u jednoj reakciji kombiniranjem *real-time* PCR-a s principom hibridizacije.

Za umnažanje gena *map* metodom *triplex real-time* PCR koristila sam *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, a reakcijska smjesa nalazi se u Tablici 7. Amplifikaciju sam provela na sljedećim uvjetima: 10 minuta na 95°C (jedan ciklus), jedna minuta na 94°C (45 ciklusa) i jedna minuta i 30 sekundi na 59°C (jedan ciklus). Reakcija je provedena u uređaju *7300 Real Time PCR System*.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za *triplex real-time* PCR reakciju. Kratice: c_0 – početna koncentracija, c_k – konačna koncentracija, V – volumen dodanog reagensa.

REAGENS	Triplex real-time PCR		
	c_0	c_k	V/ μ L
TaqMan® Universal PCR Master Mix	2x	1x	6,25
Početnica VITIS-F	5 μ M	0,2 μ M	0,5
Početnica VITIS-R	5 μ M	0,2 μ M	0,5
Početnica mapFD-F	5 μ M	0,2 μ M	0,5
Početnica mapFD-R	5 μ M	0,2 μ M	0,5
Početnica mapBN-F	5 μ M	0,2 μ M	0,5
Početnica mapBN-R	5 μ M	0,2 μ M	0,5
Proba VITIS-NED	10 μ M	0,2 μ M	0,25
Proba mapFD-FAM	10 μ M	0,2 μ M	0,25
Proba mapBN-VIC	10 μ M	0,2 μ M	0,25
Kalup (izolirana DNA)	-	40 ng	2,5
UKUPNO			12,5

3.2.3.2. Umnažanje neribosomskih gena *secY*, *stamp*, *vmp1* i *tufB*

Za umnažanje neribosomskih gena koristila sam *EmeraldAmp® GT PCR Master Mix*. Reakcijske smjese razlikuju se po korištenim početnicama te količinama reagensa i nalaze se u Tablicama 8, 10 i 13. Za umnožavanje gena *secY* ugniježđenim PCR-om prvo sam koristila početnicu PosecF3, no nije dala očekivane rezultate, pa sam ju zamijenila početnicom PosecN2.

Uvjeti PCR reakcija različiti su za sve gene i nalaze se u Tablicama 9, 11, 12 i 14. Ponovno sam kao pozitivnu kontrolu koristila uzorak referentnog soja, kao negativnu autoklaviranu destiliranu vodu, a reakcije sam provela u uređajima *SimpliAmp Thermal Cycler*, *GeneAmp PCR system 2700* i *ProFlex PCR System*.

Kod gena *vmp1* napravila sam još nekoliko ponavljanja direktnog i ugniježđenog PCR-a uzoraka 1, 4, 6, 9, 11 i 12 s istim reagensima i na istim uvjetima, ali uz izmjene količina sterilne dH₂O i kalupa DNA. U direktnom PCR-u nisam stavila sterilnu dH₂O jer sam stavila 2,5 µL kalupa, a u ugniježđenom PCR-u stavila sam 1,5 µL vode i 1 µL kalupa iz direktnog PCR-a.

Tablica 8. Reakcijska smjesa za PCR reakciju umnažanja gena *secY*. Kratice: c₀ – početna koncentracija, c_k – konačna koncentracija, V – volumen dodanog reagensa.

REAGENS	DIREKTNI PCR			UGNIJEŽĐENI PCR		
	c ₀	c _k	V/µL	c ₀	c _k	V/µL
Sterilna dH ₂ O	-	-	1	-	-	7
<i>EmeraldAmp</i> [®] <i>Master Mix</i>	1x	0,5x	12,5	5x	1x	12,5
PosecF1	5 µM	1 µM	5	-	-	-
PosecR1	5 µM	1 µM	5	-	-	-
PosecN2	-	-	-	5 µM	0,5 µM	2,5
PosecR3	-	-	-	5 µM	0,5 µM	2,5
Kalup (izolirana DNA)	-	40 ng	1,5	-	-	-
Kalup (<i>nested</i> PCR produkt)	-	-	-	-	-	0,5
UKUPNO			25			25

Tablica 9. Uvjeti za reakcije direktnog i ugniježdenog PCR-a za umnažanje gena *secY*.

Korak	Direktni PCR			Ugniježdeni PCR		
	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	1	94°C	3 min	1	94°C	4 min
Denaturacija DNA	35	94°C	30 sec	35	94°C	30 sec
Prijanjanje početnica	35	54°C	30 sec	35	55°C	30 sec
Elongacija DNA	35	72°C	1 min	35	68°C	1,5 min
Završna elongacija	1	72°C	10 min	1	68°C	7 min

Tablica 10. Reakcijska smjesa za PCR reakciju umnažanja gena *stamp* i *vmp1*. Korištene početnice su navedene u poglavlju 3.1.6. Kratice: c_0 – početna koncentracija, c_k – konačna koncentracija, V – volumen dodanog reagensa.

REAGENS	DIREKTNI PCR			UGNIJEŽĐENI PCR		
	c_0	c_k	V/ μ L	c_0	c_k	V/ μ L
Sterilna dH ₂ O	-	-	1	-	-	2
<i>EmeraldAmp</i> [®] <i>Master Mix</i>	1x	0,5x	12,5	5x	1x	12,5
<i>Forward</i> početnica (<i>direct</i>)	5 μ M	1 μ M	5	-	-	-
<i>Reverse</i> početnica (<i>direct</i>)	5 μ M	1 μ M	5	-	-	-
<i>Forward</i> početnica (<i>nested</i>)	-	-	-	5 μ M	1 μ M	5
<i>Reverse</i> početnica (<i>nested</i>)	-	-	-	5 μ M	1 μ M	5
Kalup (izolirana DNA)	-	40 ng	1,5	-	-	-
Kalup (<i>nested</i> PCR produkt)	-	-	-	-	-	0,5
UKUPNO			25			25

Tablica 11. Uvjeti za reakcije direktnog i ugniježdenog PCR-a za umnažanje gena *stamp*.

Korak	Direktni PCR			Ugniježdeni PCR		
	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	1	94°C	4 min	1	94°C	4 min
Denaturacija DNA	35	94°C	30 sec	35	94°C	30 sec
Prijanjanje početnica	35	56°C	30 sec	35	52°C	30 sec
Elongacija DNA	35	72°C	1,5 min	35	72°C	1,5 min
Završna elongacija	1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

Tablica 12. Uvjeti za reakcije direktnog i ugniježdenog PCR-a za umnažanje gena *vmp1*.

Korak	Direktni PCR			Ugniježdeni PCR		
	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	1	94°C	4 min	1	94°C	4 min
Denaturacija DNA	35	94°C	30 sec	35	94°C	30 sec
Prijanjanje početnica	35	52°C	30 sec	35	55°C	30 sec
Elongacija DNA	35	72°C	1,5 min	35	72°C	1,5 min
Završna elongacija	1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

Tablica 13. Reakcijska smjesa za PCR reakciju umnažanja gena *tufB*. Kratice: c_0 – početna koncentracija, c_k – konačna koncentracija, V – volumen dodanog reagensa.

REAGENS	DIREKTNI PCR			UGNIJEŽĐENI PCR		
	c_0	c_k	$V/\mu\text{L}$	c_0	c_k	$V/\mu\text{L}$
Sterilna dH_2O	-	-	7	-	-	7
<i>EmeraldAmp[®] Master Mix</i>	1x	0,5x	12,5	5x	1x	12,5
Početnica <i>fTufI</i>	5 μM	0,5 μM	2,5	-	-	-
Početnica <i>rTufI</i>	5 μM	0,5 μM	2,5	-	-	-
Početnica <i>fTufAY</i>	-	-	-	5 μM	0,5 μM	2,5
Početnica <i>rTufStol</i>	-	-	-	5 μM	0,5 μM	2,5
Kalup (izolirana DNA)	-	40 ng	1	-	-	-
Kalup (<i>nested</i> PCR produkt)	-	-	-	-	-	0,5
UKUPNO			25			25

Tablica 14. Uvjeti za reakcije direktnog i ugniježdenog PCR-a za umnažanje gena *tufB*.

Korak	Direktni PCR			Ugniježđeni PCR		
	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	1	94°C	3 min	1	94°C	4 min
Denaturacija DNA	35	94°C	30 sec	35	94°C	30 sec
Prijanjanje početnica	35	45°C	30 sec	35	53°C	30 sec
Elongacija DNA	35	72°C	1 min	35	72°C	1 min
Završna elongacija	1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

3.2.4. Elektroforeza

Uspješnost PCR reakcija provjerila sam elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu. Prvo sam izvagala 350 mg agaroze i otopila je u 35 mL 0,5xTBE-pufera zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici u intervalima od 10 sekundi i laganim miješanjem. Nakon što se tikvica ohladila na sobnu temperaturu, u otopinu sam dodala 0,7 μL *SYBR[™] Safe DNA Gel Stain* boju i lagano promiješala. Zatim sam gel izlila u prethodno pripremljen kalup za gel, stavila češljic s 15 zubića i ostavila ga da se polimerizira. Nakon 20 minuta gel sam prenijela u kadicu za elektroforezu i ulila 0,5xTBE-pufera dovoljno da prekrije čitav gel. Potom sam na gel nanijela 7 μL markera *1 kb Plus DNA*

Ladder u prvu jažicu i po 5 µL uzorka u druge jažice. U predzadnju jažicu stavila sam negativnu kontrolu, a u zadnju sam stavila pozitivnu.

Elektroforezu sam provela 30 minuta pri konstantnom naponu od 100 V na uređaju *Power Pac 300*. Gel sam potom dokumentirala na uređaju *Amersham ImageQuantTM 800*.

3.2.5. Sekvenciranje po Sangeru

Svi uzorci umnoženih gena *secY*, *stamp*, *vmp1* i *tufB* poslani su na sekvenciranje po Sangeru u tvrtku *GENEWIZ* (Azenta Life Sciences, <https://www.genewiz.com/en-GB/>). Uzorke sam pripremila s istim početnicama koje sam koristila za ugniježđeni PCR.

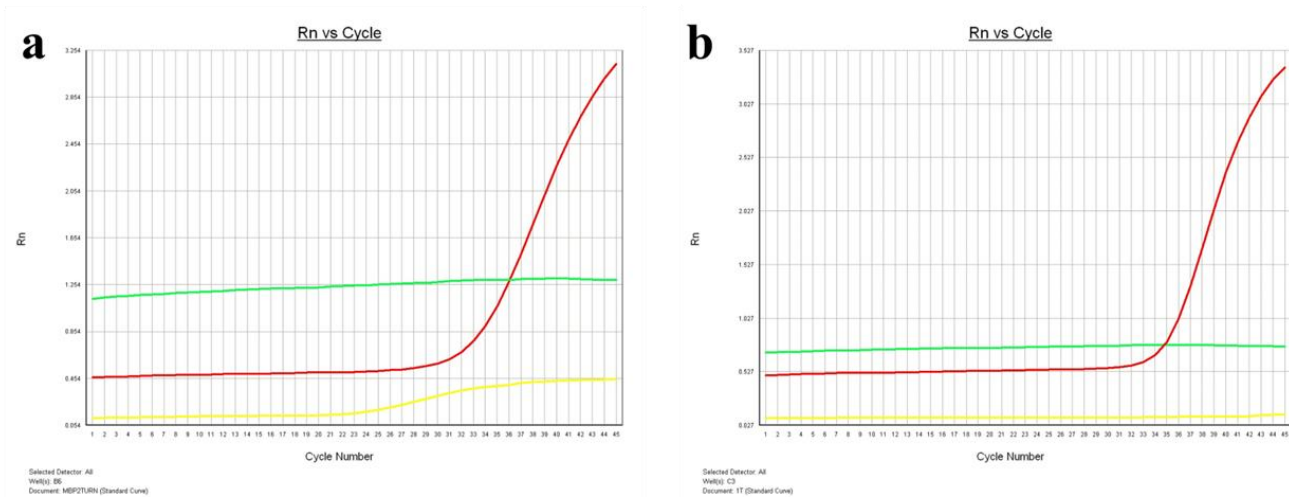
3.2.6. Računalne analize

Dobivene podatke obradila sam u programu *Geneious Prime* (<https://www.geneious.com/>) kako bih dobila informacije o njihovoj genskoj varijabilnosti. Svaku sekvencu sam skratila na duljinu odgovarajućeg gena jer su nukleotidni sljedovi dulji od samog gena, a otvorene okvire čitanja proteina za koji kodira svaki gen provjerila sam *in silico* korištenjem *on-line* programa za translaciju (<http://web.expasy.org/translate/>). Tako uređene sekvence sravnala sam korištenjem programa ClustalX 2.1 (Thompson i sur., 1997; <http://www.clustal.org/clustal2/>). Nakon toga napravila sam filogenetske analize u programu MEGA 11 (Tamura et al., 2007 <https://www.megasoftware.net/>) metodama susjednog povezivanja (eng. *neighbor joining*; NJ), maksimalne vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*) i maksimalne parsimonije (eng. *maximum parsimony*). Koristila sam statističku metodu *bootstrap analysis* uz 500 ponavljanja za procjenu pogreške modela. Metodu *number of differences* koristila sam za računanje udaljenosti nukleotidnih slijedova, a u analize sam uključila i referentne sekvence dostupne u bazi podataka *GenBank*.

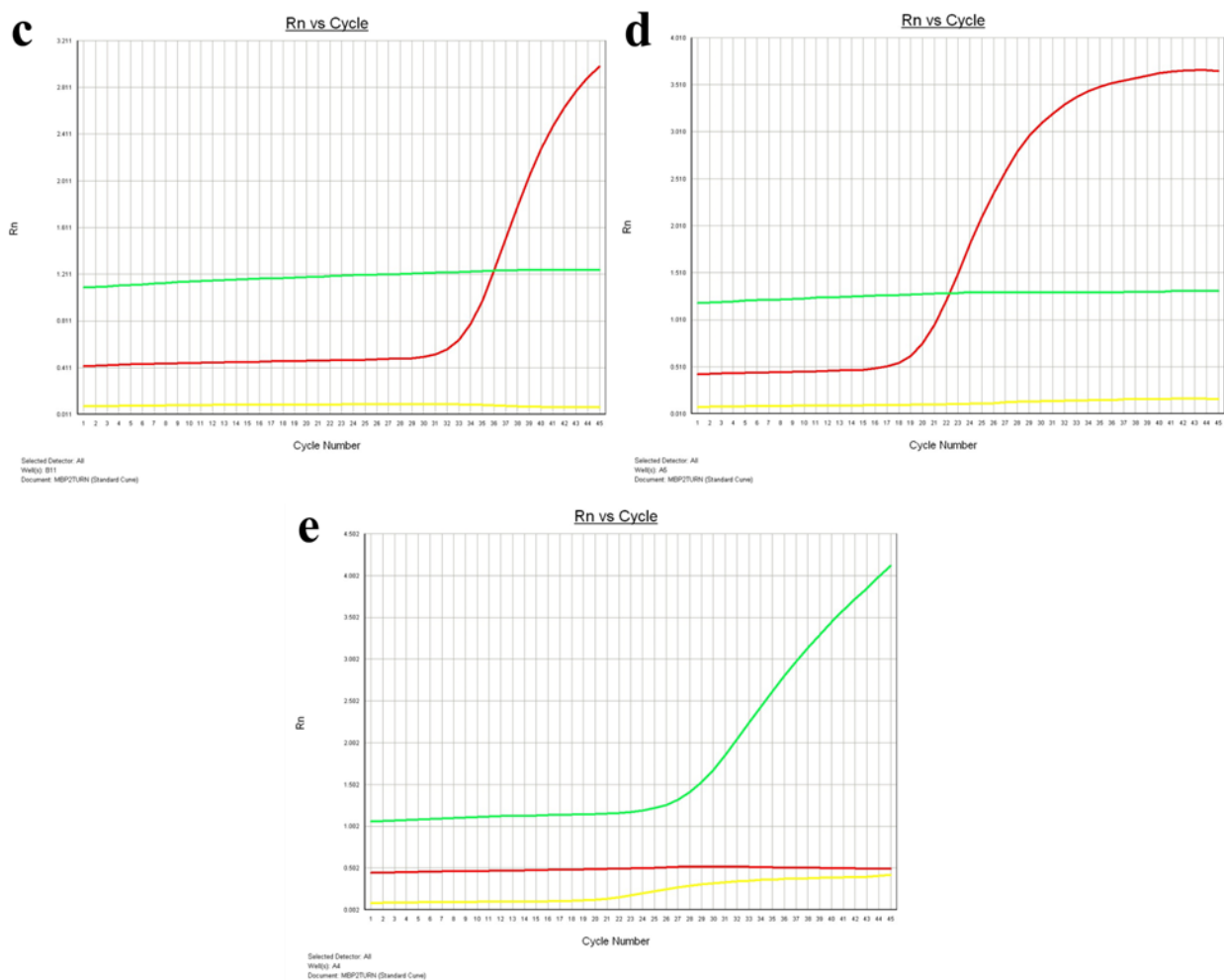
4. Rezultati

4.1. *Triplex real-time PCR test*

Triplex real-time PCR testom potvrđena je zaraza uzoraka fitoplazmom '*Ca. P. solani*' u svim uzorcima vinove loze, koprive i brijesta, a reprezentativne amplifikacijske krivulje prikazane su na Slici 5. Kao pozitivnu kontrolu za FD fitoplazmu koristila sam soj FD70, a za BN fitoplazmu koristila sam soj SA-1.



Slika 5a. Reprezentativne *triplex real-time PCR* amplifikacijske krivulje za uzorke loze (uzorak broj 3; slika a) i koprive (uzorak broj 2; slika b). Crvena amplifikacijska krivulja prikazuje amplifikaciju gena *map* kod ribosomske podskupine 16SrXII-A (BN fitoplazma), zelena amplifikacijska krivulja također prikazuje amplifikaciju gena *map*, ali kod ribosomskih podskupina fitoplazmi 16SrV-C, D i E (FD fitoplazma), a žuta amplifikacijska krivulja prikazuje amplifikaciju *tRNAL-F spacer* kloroplasta vinove loze.



Slika 5b. Reprezentativne *triplex real-time* PCR amplifikacijske krivulje za uzorke brijesta (uzorak broj 4; slika c), pozitivne kontrole za BN fitoplazmu, soj SA-1 (d) i pozitivne kontrole za FD fitoplazmu, soj FD70 (e). Crvena amplifikacijska krivulja prikazuje amplifikaciju gena *map* kod ribosomske podskupine 16SrXII-A (BN fitoplazma), zelena amplifikacijska krivulja također prikazuje amplifikaciju gena *map*, ali kod ribosomskih podskupina fitoplazmi 16SrV-C, D i E (FD fitoplazma), a žuta amplifikacijska krivulja prikazuje amplifikaciju *tRNAL-F spacer* kloroplasta vinove loze.

Svaki uzorak je imao po jednu repliku te su u Tablici 15 prikazane srednje C_t (eng. *cycling threshold*) vrijednosti za svaki uzorak. C_t vrijednost označava broj ciklusa amplifikacije potrebnih da se dosegne detekcijski prag za svaku ciljnu sekvencu. Ova vrijednost označava trenutak kada je fluorescentni signal prešao preko praga detekcije i signalizira prisutnost ciljne DNA sekvence. C_t vrijednost se koristi za kvantifikaciju i usporedbu količine ciljne DNA između različitih uzoraka. Niža C_t vrijednost ukazuje na veću početnu količinu ciljne DNA u uzorku, dok viša C_t vrijednost ukazuje na manju početnu količinu. Kod uzoraka loze 1 i 7 je također trebala biti zabilježena C_t

vrijednost za probu VITIS-NED, no moguće je da se radilo o lošijim izolatima te je to razlog zašto nije detektiran signal probe VITIS-NED.

Tablica 15. C_t vrijednosti za sve tri probe detektirane u pozitivnim kontrolama i nekim uzorcima. Oznaka “nd“ znači da nije bilo detekcije signala.

Uzorak	C_t (proba mapBN-VIC)	C_t (proba mapFD-FAM)	C_t (proba VITIS-NED)
1.	37,58	Nd	nd
2.	33,14	Nd	nd
3.	34,33	Nd	32,92
4.	34,61	Nd	nd
5.	35,41	Nd	30,09
6.	36,22	Nd	nd
7.	31,25	Nd	nd
SA-1	22,64	Nd	nd
FD92	nd	25,88	nd

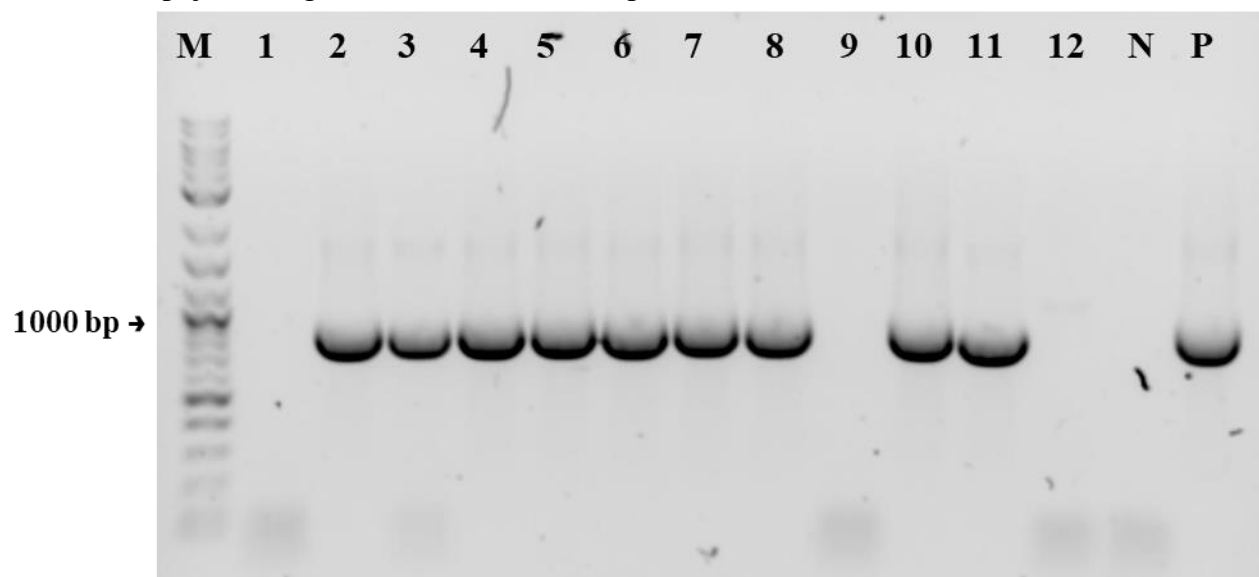
4.2. Multigenska analiza

Multigenska tipizacija napravljena je na 12 uzoraka među kojima je jedan uzorak obične koprive, četiri uzorka brijesta i sedam uzoraka vinove loze.

4.2.1. Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena *secY*

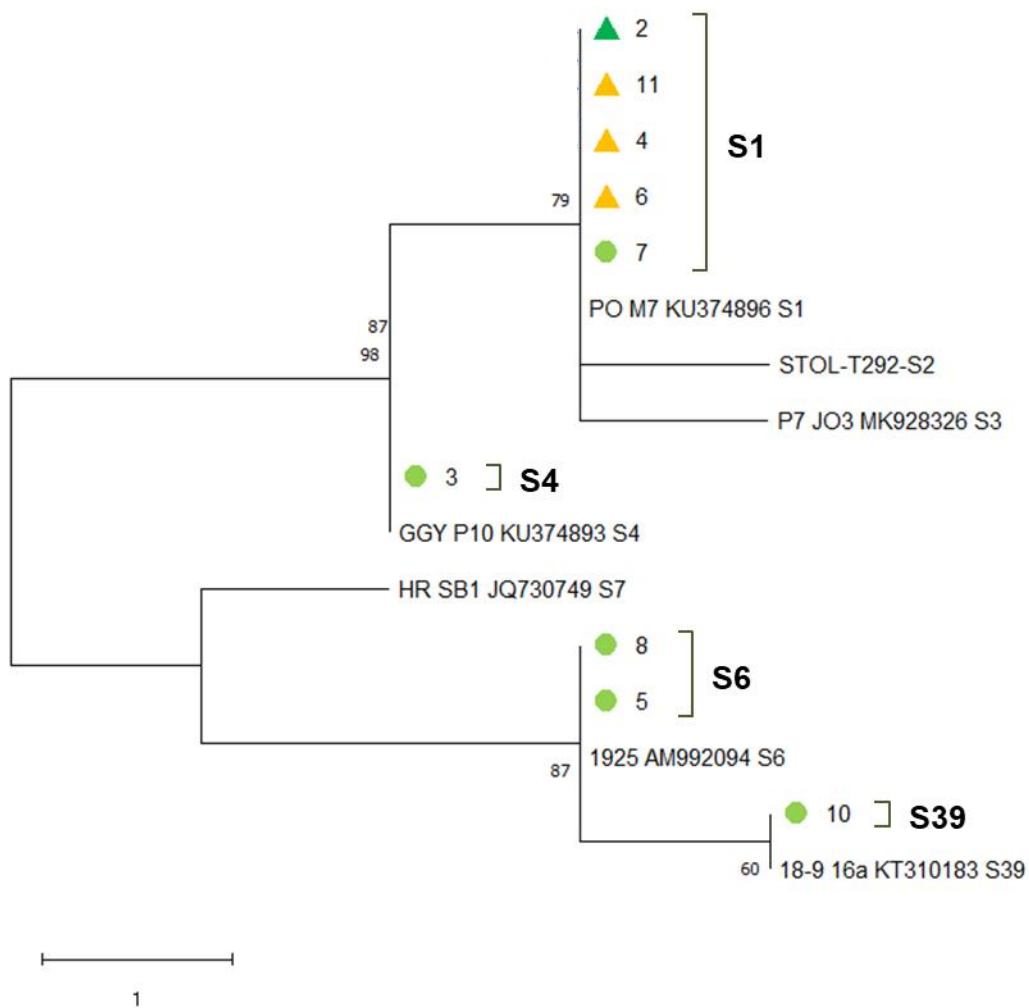
Za umnažanje gena *secY* ugniježđenim PCR-om prvo sam koristila početnicu PosecF3, no nisam dobila očekivane rezultate. Na 1%-tnom agaroznom gelu nakon elektroforeze došlo je do razmazivanja DNA zbog visokog GC sadržaja na 3' kraju početnice PosecF3 (Foissac *et al.*, 2013) te sam ju stoga zamijenila početnicom PosecN2, koja je dala zadovoljavajuće rezultate. Nakon elektroforeze uzoraka iz direktnog PCR-a uobičajeno je da zbog niske koncentracije amplikoni

nisu vidljivi na agaroznom gelu, no nakon elektroforeze uzoraka iz ugniježdenog PCR-a kod većine uzoraka se pojavio fragment veličine oko 900 bp (Slika 6).



Slika 6. Reprezentativni prikaz 1%-tnog agaroznog gela nakon elektroforeze produkata ugniježdenog PCR-a gena *secY*. Kratice: M – marker, 1, 3, 5, 7-10 – uzorci vinove loze, 2 – uzorak obične koprive, 4, 6, 11, 12 – uzorci brijesta, N – negativna kontrola, P – pozitivna kontrola.

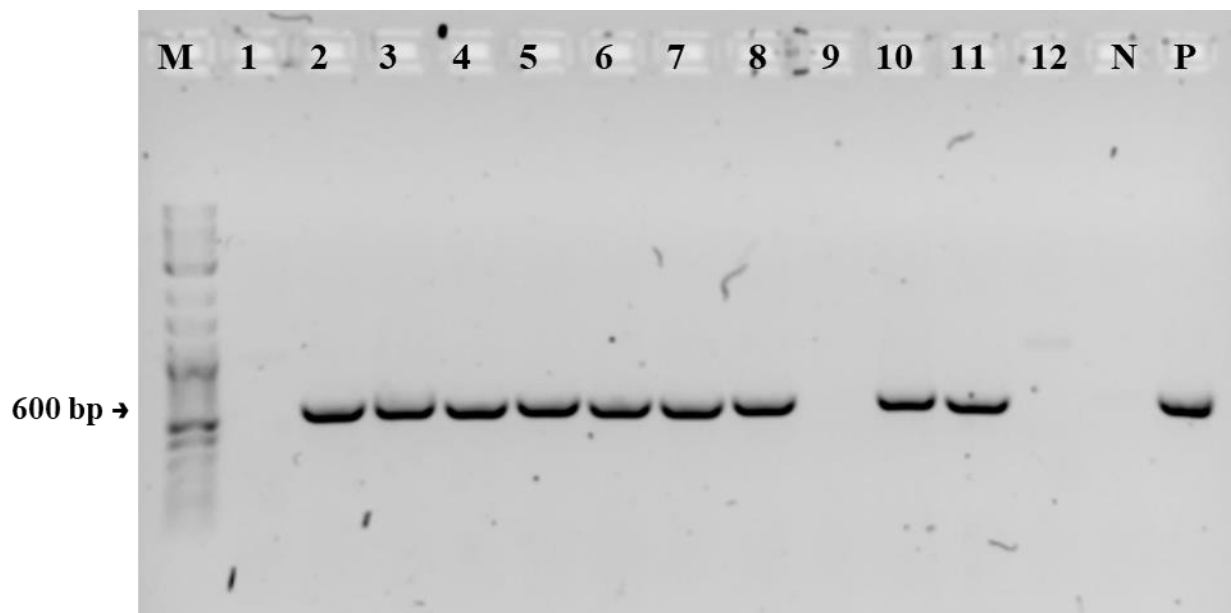
Nakon što sam uzorke 2-8 te 10 i 11 poslala na sekvenciranje i dobila njihove sekvence, napravila sam filogenetsku analizu prema poglavlju 3.2.7. Rezultati su prikazani na Slici 7 koja pokazuje da su se uzorci raspodijelili u četiri grane, a svaka grana označava jedan genotip. Najzastupljeniji genotip je S1 zabilježen kod tri brijesta, koprive i jednog uzorka loze. Genotip S6 prisutan je kod dva uzorka loze, a genotipovi S4 i S39 prisutni su svaki kod jednog uzorka loze.



Slika 7. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno NJ metodom na temelju sekvence gena *secY*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postotcima (*bootstrap* vrijednost), a pripadnost različitim genotipovima prikazana je s desne strane. Zeleni trokut označava uzorak obične koprive, narančasti trokuti označavaju uzorke brijesta, a zelene točke označavaju uzorke vinove loze. Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz baze podataka navedeni su ispred oznake genotipa.

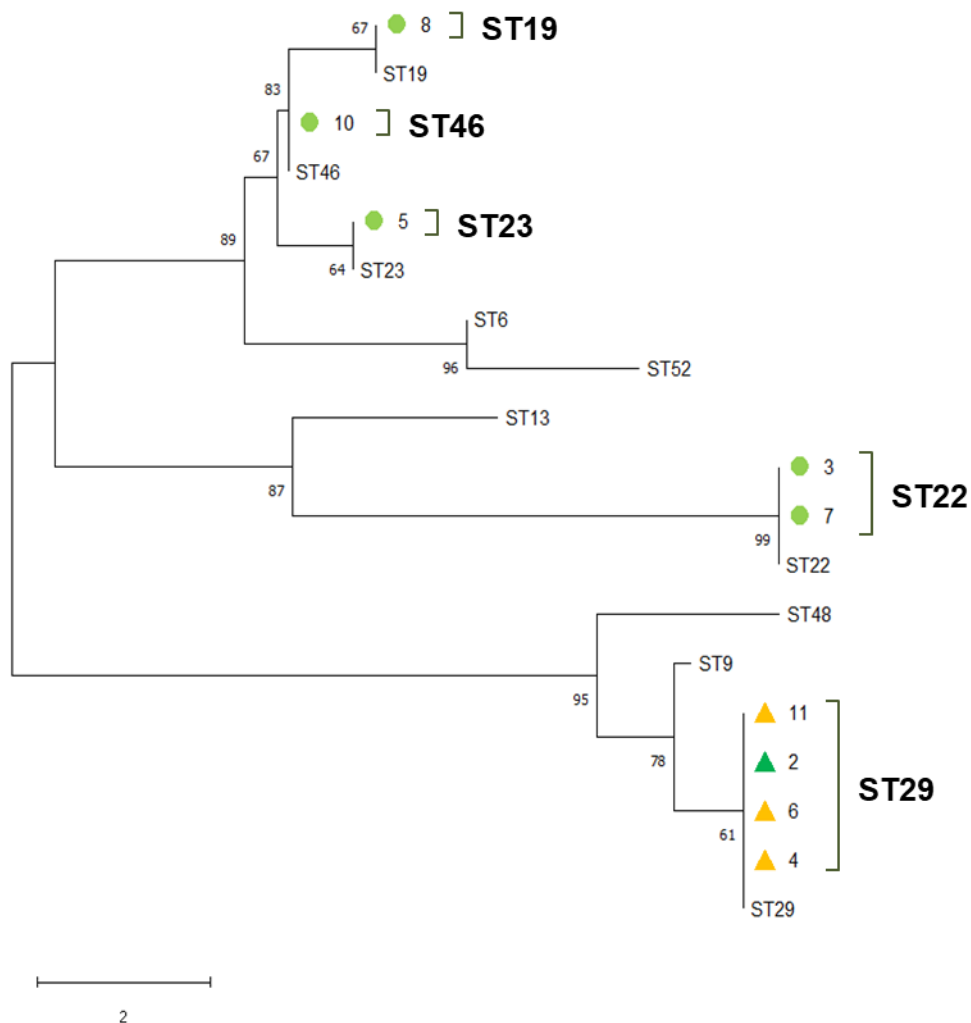
4.2.2. Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena *stamp*

Prisutnost produkata direktnog i ugniježđenog PCR-a gena *stamp* provjerila sam elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Elektroforeza produkata direktnog PCR-a ni u ovom slučaju nije dala vidljive amplikone, dok je devet uzoraka iz ugniježđenog PCR-a dalo fragmente očekivane veličine tj. 600 bp (Slika 8).



Slika 8. Reprezentativni prikaz 1%-tnog agaroznog gela nakon elektroforeze produkata ugniježdenog PCR-a gena *stamp*. Kratice: M – marker, 1, 3, 5, 7-10 – uzorci vinove loze, 2 – uzorak obične koprive, 4, 6, 11, 12 – uzorci brijesta, N – negativna kontrola, P – pozitivna kontrola.

Uzorke 2-8 te 10 i 11 poslala sam na sekvenciranje te sam napravila filogenetsku analizu dobivenih sekvenci prema poglavlju 3.2.7. čiji su rezultati prikazani na Slici 9. Najzastupljeniji je genotip ST29 kojem pripadaju tri brijesta i kopriva, genotipu ST22 pripadaju dva uzorka loze, a genotipovima ST19, ST23 i ST46 pripada po jedan uzorak loze.

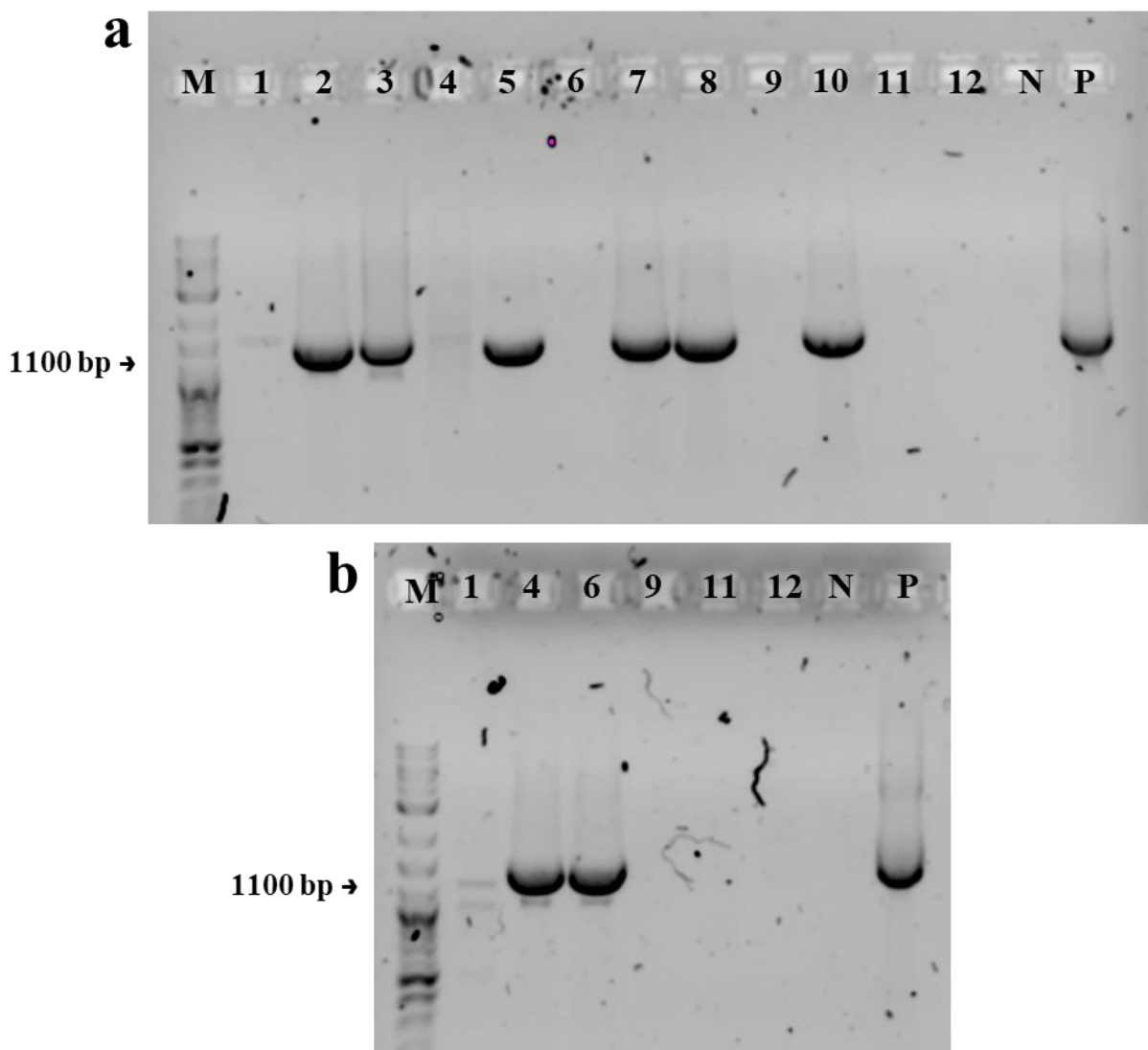


Slika 9. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno NJ metodom na temelju sekvence gena *stamp*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima, a pripadnost različitim genotipovima prikazana je s desne strane. Zeleni trokut označava uzorak obične koprive, narančasti trokuti označavaju uzorke brijesta, a zelene točke označavaju uzorke vinove loze. Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz baze podataka navedeni su ispred oznake genotipa.

4.2.3. Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena *vmp1*

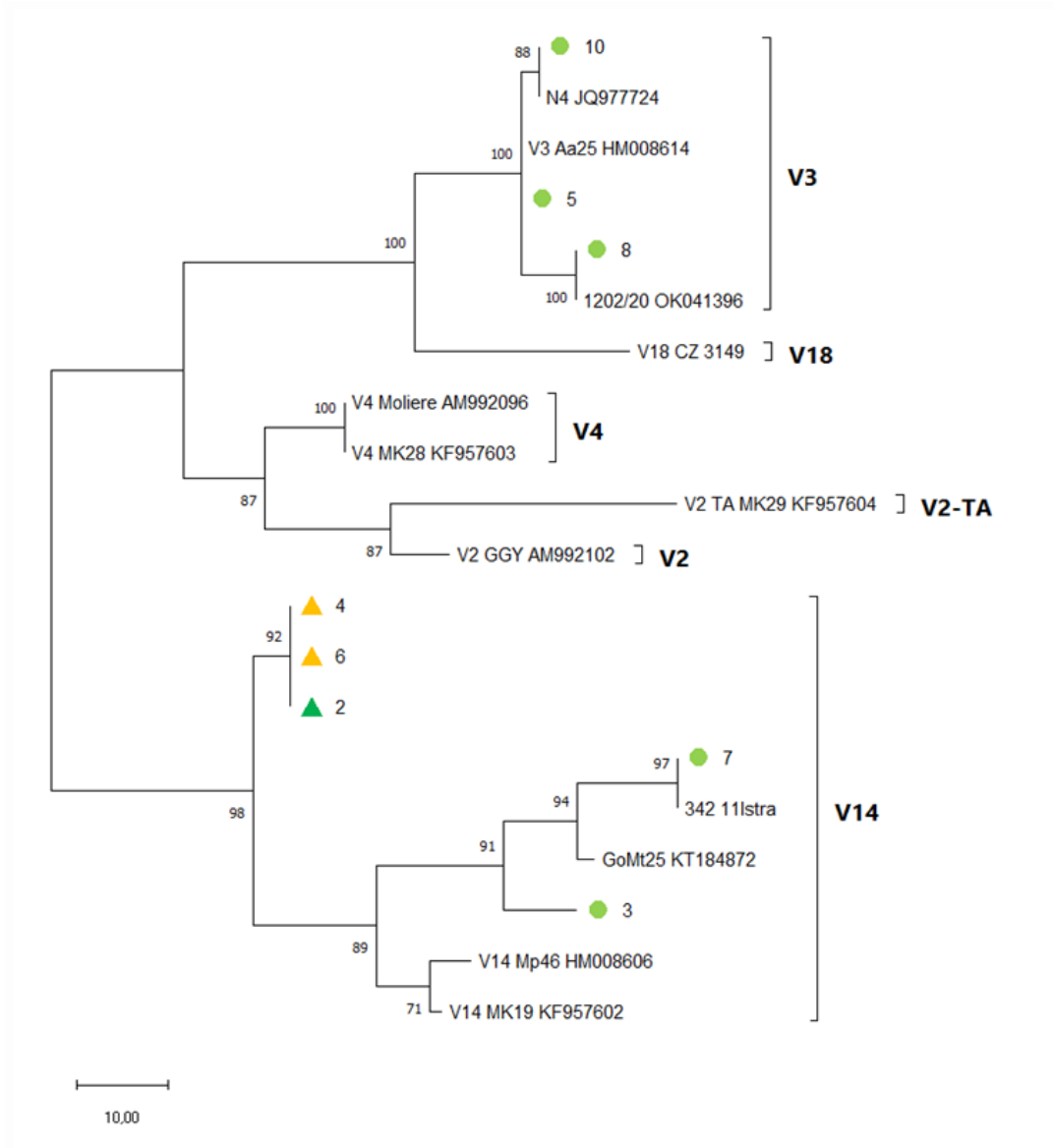
Veličinu amplificiranih fragmenata gena *vmp1* direktnim i ugniježđenim PCR-om provjerila sam elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Na gelu se nisu vidjele vrpce kod uzoraka iz direktnog PCR-a niti kod uzoraka 1, 4, 6, 9, 11 i 12 iz ugniježđenog PCR-a, stoga sam direktni i ugniježđeni PCR ponovila još nekoliko puta prema uputama u poglavlju 3.2.3.2.

Reprezentativne slike gelova nalaze se na Slici 10 koja pokazuje fragmente veličine od oko 1100 bp.



Slika 10. Reprezentativni prikaz 1%-tnog agaroznog gela nakon elektroforeze produkata ugniježdenog PCR-a gena *vmp1* (a – prva analiza; b – ponavljanje neuspjelih uzoraka). Kratice: M – marker, 1, 3, 5, 7-10 – uzorci vinove loze, 2 – uzorak obične koprive, 4, 6, 11, 12 – uzorci brijesta, N – negativna kontrola, P – pozitivna kontrola.

Podatke sekvenciranih uzoraka 2-8 i 10 filogenetski sam obradila prema poglavlju 2.3.7., a rezultati su prikazani na Slici 11. Genotip V14 je najzastupljeniji s pet uzoraka među kojima su kopriva, dva uzorka brijesta te jedan uzorak vinove loze, a ostala tri uzorka vinove loze pripadaju genotipu V3.

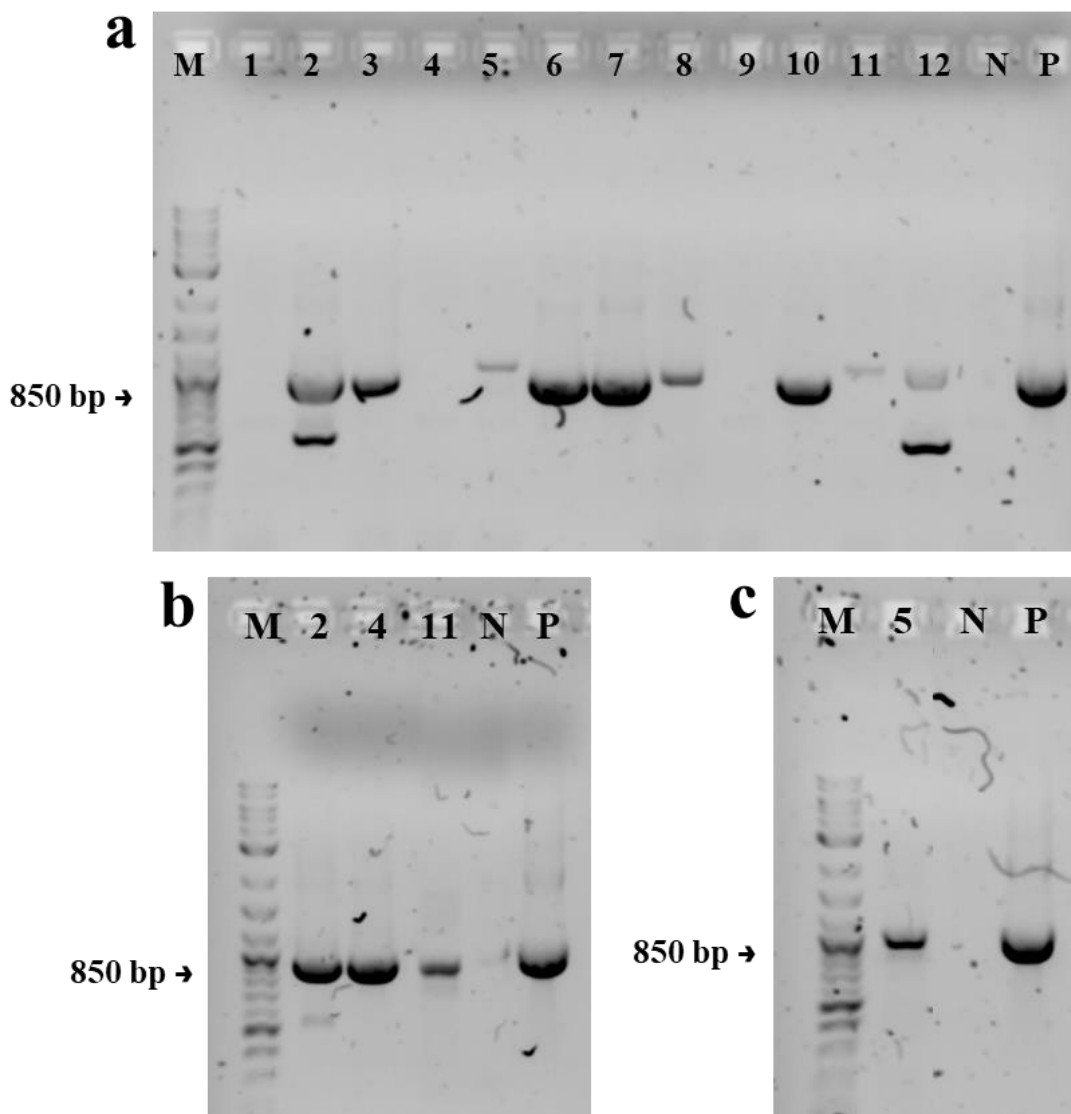


Slika 11. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno NJ metodom na temelju sekvence gena *vmp1*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima, a pripadnost različitim genotipovima prikazana je s desne strane. Zeleni trokut označava uzorak obične koprive, narančasti trokuti označavaju uzorke brijesta, a zelene točke označavaju uzorke vinove loze. Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz baze podataka navedeni su ispred oznake genotipa.

4.2.4. Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza gena *tufB*

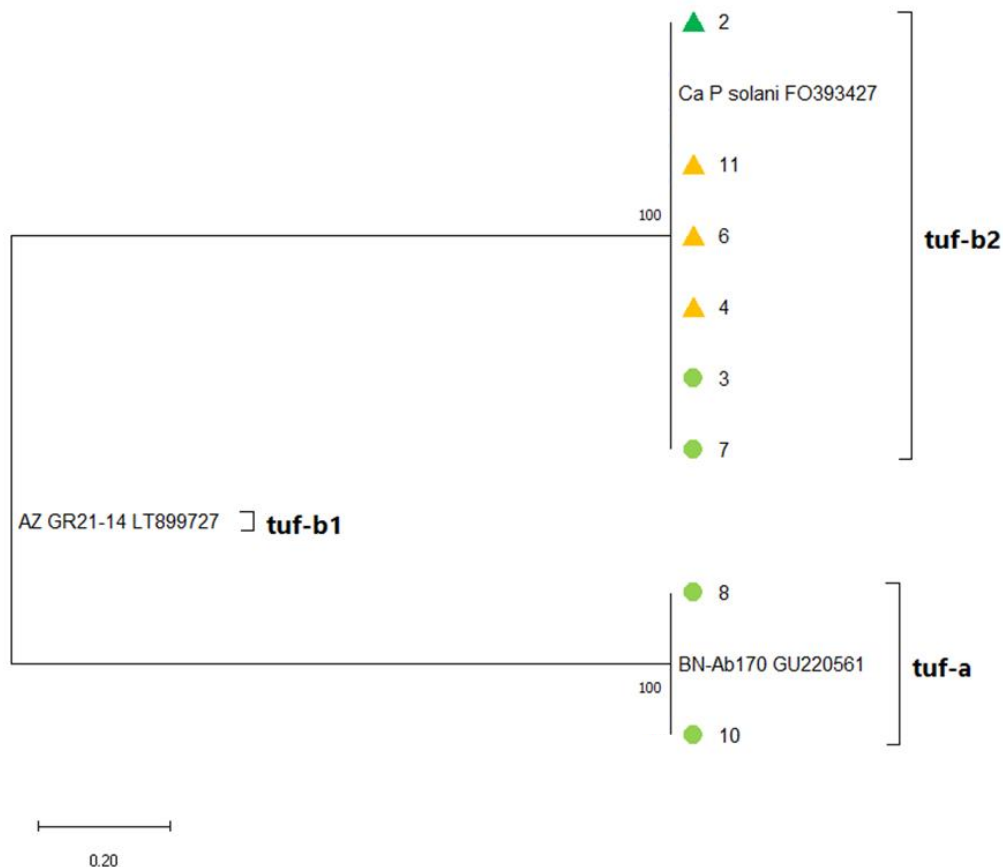
Prilikom amplifikacije gena *tufB*, trebala sam ponoviti reakcije nekoliko puta kako bih pronašla optimalne uvjete jer se vrpce nisu pojavljivale ili fragmenti nisu bili odgovarajuće veličine. Kao i kod prijašnjih uzoraka iz direktnog PCR-a, ni kod uzoraka gena *tufB* se nisu vidjele

vrpce na 1%-tnom agaroznom gelu, a slike gelova na koje su nanesen uzorci ugniježdenog PCR-a prikazani su na Slici 12 koja prikazuje fragmente veličine oko 850 bp.



Slika 12. Reprezentativni prikaz 1%-tnog agaroznog gela nakon elektroforeze produkata ugniježdenog PCR-a gena *tufB* (a – prvi gel na kojem su se vidjele vrpce; b, c – ponavljanja neuspjelih uzoraka). Kratice: M – marker, 1, 3, 5, 7-10 – uzorci vinove loze, 2 – uzorak obične koprive, 4, 6, 11, 12 – uzorci brijesta, N – negativna kontrola, P – pozitivna kontrola.

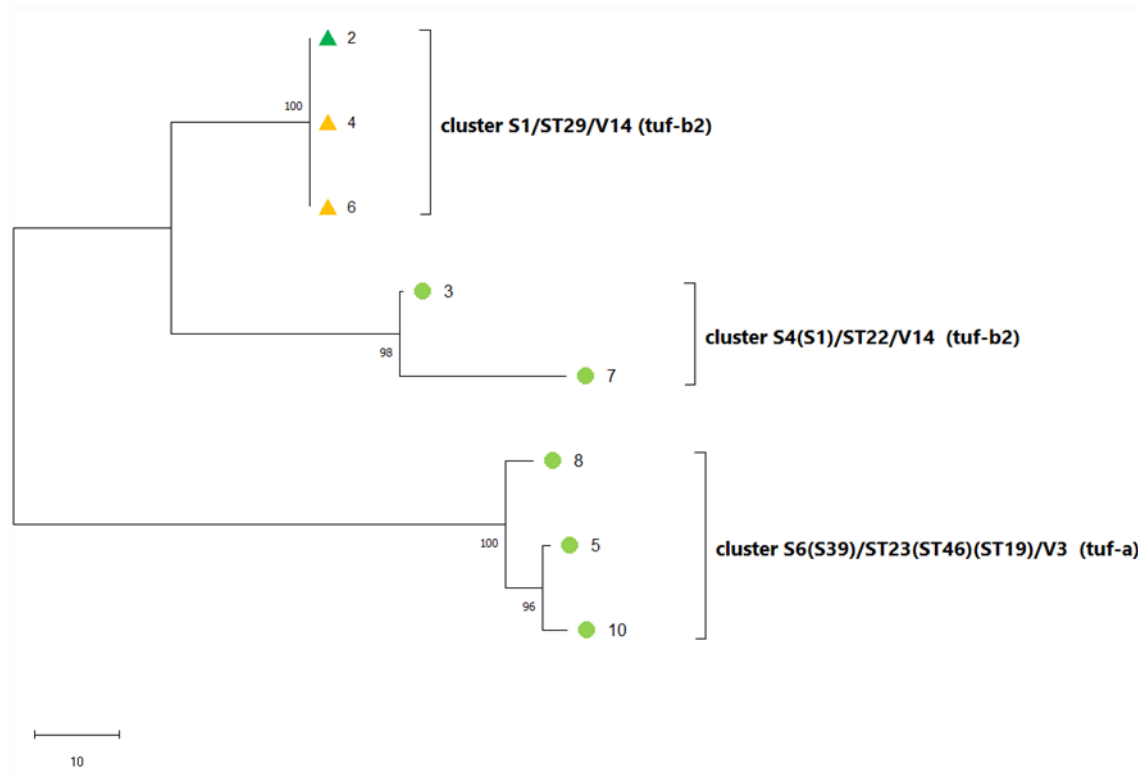
Nakon sekvenciranja, uzorke 2-4, 6-8, 10 i 11 filogenetski sam obradila prema poglavlju 2.3.7., a rezultati su prikazani na Slici 13. Samo uzorci 8 i 10 pripadaju genotipu *tufB*-a, a ostali sekvencirani uzorci pripadaju genotipu *tufB*-b2.



Slika 13. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno NJ metodom na temelju sekvence gena *tufB*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima, a pripadnost različitim genotipovima prikazana je s desne strane. Zeleni trokut označava uzorak obične koprive, narančasti trokuti označavaju uzorke brijesta, a zelene točke označavaju uzorke vinove loze. Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz baze podataka navedeni su ispred oznake genotipa.

4.2.5. Konkatencija sekvenci

Slika 14 prikazuje filogenetski odnos konkatenciranih (spojenih) sekvenci gena *secY*, *stamp* i *vmp1*. Uzorci su se odvojili u tri klastera genotipova, S1/ST29/V14/*tuf*-b2, S4(S1)/ST22/V14/*tuf*-b2 i S6(S39)/ST23(ST46)(ST19)/V3/*tuf*-a. U Tablici 16 prikazani su svi tipizirani uzorci i njihovi genotipovi.



Slika 14. Neukorijenjeno filogenetsko stablo filogenetskog odnosa konkateniranih sekvenci gena *secY* (S), *stamp* (ST) i *vmp1* (V) dobiveno NJ metodom. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postotcima, a pripadnost različitim klasterima genotipova prikazana je s desne strane. Zeleni trokut označava uzorak obične koprive, narančasti trokuti označavaju uzorke brijesta, a zelene točke označavaju uzorke vinove loze.

Tablica 16. Popis svih tipiziranih uzoraka, lokacija uzorkovanja i odgovarajućih genotipova.

Redni broj uzorka	Domaćinska vrsta	Lokacija	<i>secY</i>	<i>stamp</i>	<i>vmp1</i>	<i>tufB</i>
1.	vinova loza	Bajkini, vinograd Arman	N/A	N/A	N/A	N/A
2.	obična kopriva	Bajkini, vinograd Rossi	S1	ST29	V14	<i>tuf-b2</i>
3.	vinova loza	Bajkini, vinograd Arman	S4	ST22	V14	<i>tuf-b2</i>
4.	brijest	Bajkini, vinograd Rossi	S1	ST29	V14	<i>tuf-b2</i>
5.	vinova loza	Bajkini, vinograd Arman	S6	ST23	V3	N/A
6.	brijest	Bajkini, vinograd Rossi	S1	ST29	V14	<i>tuf-b2</i>
7.	vinova loza	Bajkini, vinograd Arman	S1	ST22	V14	<i>tuf-b2</i>
8.	vinova loza	Bajkini, vinograd Arman	S6	ST19	V3	<i>tuf-a</i>
9.	vinova loza	Bajkini, vinograd Arman	N/A	N/A	N/A	N/A
10.	vinova loza	Bajkini, vinograd Arman	S39	ST46	V3	<i>tuf-a</i>
11.	brijest	Bajkini, vinograd Arman	S1	ST29	N/A	<i>tuf-b2</i>
12.	brijest	Bajkini, vinograd Arman	N/A	N/A	N/A	N/A

5. Rasprava

Fitoplazme su obligatorni unutarstanični bakterijski patogeni koji parazitiraju u floemu biljaka, a prenose ih kukci-vektori koji se hrane floemskim sokom. Gotovo sve bolesti žutica vinove loze izazivaju jednake simptome poput nejednakog žućenja ili crvenjenja, nekroze žutih dijelova lista te uvijanja listova unazad kao i sušenja te propadanja trsova. Ekonomski gubitci koje uzrokuju infekcije fitoplazmama variraju od djelomičnog do gotovo potpunog gubitka usjeva diljem svijeta. Bolest BN povezana je sa stolbur fitoplazmama tj. podskupinom fitoplazmi 16SrXII-A, odnosno vrstom '*Ca. P. solani*'.

U ranim danima su se koristila fenotipska obilježja za klasifikaciju fitoplazmi poput simptoma, vektora i seroloških analiza. Taj pristup se više ne koristi jer u puno slučajeva različiti fitoplazmatski sojevi izazivaju slične simptome ili imaju iste vektore. Nakon 90-ih godina prošlog stoljeća, utvrđena je klasifikacijska shema 16Sr grupa i podgrupa temeljena na RFLP profilima gena za 16S rRNA. Taj je napredak olakšao istraživanja o ekologiji i genomskoj raznolikosti fitoplazmi te epidemiologiji i fiziologiji fitoplazmatskih bolesti.

Kako fitoplazme ne mogu biti uzgojene *in vitro*, njihova detekcija i karakterizacija uvelike se oslanjaju na molekularne dijagnostičke metode. Njihovim brzim razvojem pojavile su se različite osjetljive, brze i isplative metode detekcije fitoplazmi poput PCR-a, *real-time* PCR-a, ugniježdenog PCR-a, petljom posredovanog izotermalnog umnažanja (eng. *loop-mediated isothermal amplification*; LAMP) te čak metoda temeljenih na CRISPR tehnologiji. Ove metode su osmišljene na temelju visoko očuvanih sekvenci gena za 16S rRNA te *rp*, *secY* i *tufB* gena (Wei i Zhao 2022). Uz to, poželjno je poznavati i biološke karakteristike fitoplazmi kako bi se lakše suzbijalo širenje zaraze. Zarazu ne šire samo kukci, već i ljudi slučajnim transportom kukaca i asimptomatičnih biljaka. Rana identifikacija fitoplazmi i dijagnoza fitoplazmatskih bolesti stoga su ključne za planiranje i provedbu brzih mjera kontrole njihovog širenja.

U Hrvatskoj su prvi puta uočeni simptomi bolesti žutica vinove loze 1994. godine u blizini Zagreba. Od tada se kontinuirano prate i proučavaju, a 1997. godine je prvi puta identificirana podskupina fitoplazmi 16SrXII-A na vinovoj lozi i korovnim biljkama (Škorić i sur. 1998). Postoji i značajna genetska varijabilnost među do sada analiziranim sojevima FD i BN fitoplazmi iz vinove loze u Hrvatskoj. U ovom diplomskom radu napravljena je multigenetska tipizacija izolata '*Ca. P.*

solani' iz uzoraka vinove loze, koprive i brijesta iz Istre, za koju nema puno podataka o rasprostranjenosti genotipova.

Ribosomska skupina 16SrXII-A, odnosno vrsta '*Ca. P. solani*', vrlo je varijabilna te se zbog toga za karakterizaciju genetske raznolikosti uzoraka koriste genetski markeri različite konzerviranosti (Langer i Maixner 2004; Cimerman i sur. 2009; Pacifico i sur. 2009). U euro-mediterranskom području se za te potrebe pristupima multigeniskog sekvenciranja '*Ca. P. solani*' najčešće koriste sekvence gena *tufB*, *secY*, *vmp1* i *stamp* (Cimerman i sur. 2009; Pacifico i sur. 2009; Fabre i sur. 2011). Posljednja dva gena kodiraju membranske proteine i pokazalo se da imaju veću varijabilnost sekvenci od konzerviranih gena *secY* i *tufB* (Cimerman i sur. 2009; Fabre i sur. 2011; Johannesen i sur. 2012).

Multigenaska analiza pokazala je značajnu varijabilnost među izolatima te je utvrđena prisutnost dva *tufB* (*tuf-a* i *tuf-b2*) i *vmp1* (V3 i V14) genotipa te četiri *secY* (S1, S4, S6 i S39) i pet *stamp* (ST19, ST22, ST23, ST29, ST46) genotipova. Ukupno je otkriveno šest različitih skupnih genotipova fitoplazme '*Ca. P. solani*', od čega su tri već ranije zabilježena na području Istre (Plavec 2015) dok su tri pronađena skupna genotipa nova za područje Istre. Najzastupljeniji je genotip S1/ST29/V14/*tuf-b2* pronađen u tri uzorka (koprivi i brijestovima), a svaki od uzoraka vinove loze, kultivara 'Chardonnay' imao je različiti skupni genotip.

Gen *secY*, jedan od genetskih markera koji je koristan za detaljnije diferenciranje sojeva fitoplazmi, kodira podjedinicu proteinske translokaze i sudjeluje u transportu proteina na površinu fitoplazme, a time i u stanice domaćina te je stoga pod velikim selekcijskim pritiskom. Uzorci su se razdvojili na četiri genotipa i pokazuju veću raznolikost od gena *tufB*, što je očekivano. Ono što je iznenađujuće jest da je gen za varijabilni membranski protein, *vmp1*, pokazao manju varijabilnost od ovog *housekeeping* gena. Najzastupljeniji *secY* genotip je bio S1 genotip, što nije neobično pošto je jako rasprostranjen i zastupljen.

Budući da je *tufB housekeeping* gen, ima nisku varijabilnost, što je i potvrđeno pronalaskom samo dva *tufB* genotipa. Tip *tuf-a* i *tuf-b* najčešće se otkrivaju u vinovoj lozi i prenose se različitim ekotipovima kukca *H. obsoletus* koji živi na običnoj koprivi (*Urtica dioica*) ili poljskom slaku (*Convolvulus arvensis*). Tip *tuf-a* najčešće se povezuje s običnom koprivom, a *tuf-b* s poljskim slakom (Pacifico i sur. 2009; Fabre i sur. 2011). U drugim istraživanjima čest je genotip *tuf-b1* (Plavec 2015; Plavec i sur. 2018), a u ovom radu pronađeni su samo genotipovi *tuf-b2* i *tuf-a*, od

kojih je *tuf*-b2 bio dominantan. No, između genotipova *tuf*-b1 i *tuf*-b2 razlika je samo u jednom nukleotidu i nema nikakav značaj za aminokiselinski slijed.

Svi uzorci vinovih loza odvojili su se na jednu granu na filogenetskom stablu, a uzorci brijestova i koprive na drugu. Uzorci brijesta i koprive s ruba vinograda koji nema loze zaražene fitoplazmom '*Ca. P. solani*' čine jedan klaster genotipova (S1/ST29/V14/*tuf*-b2), dok su se uzorci loza razdvojili na dva klastera genotipova. Klaster genotipova S4(S1)/ST22/V14/*tuf*-b2 čine uzorci 3 i 7, a klaster genotipova S6(S39)/ST23(ST46)(ST19)/V3/*tuf*-a čine uzorci 8, 5 i 10.

Od navedenih genotipova, tri skupna genotipa su već ranije zabilježena u Istri. Skupni genotip S39/ST46/V3/*tuf*-a je pronađen u Istri, u blizini Umaga, a genotip S1/ST22/V14 u blizini Motovuna (Plavec 2015) te genotip S4/ST22/V14/*tuf*-b2 (neobjavljeni rezultati), svi u vinovoj lozi. Vrlo visoka rasprostranjenost specifičnih genotipova ST23 i V3 unutar skupine *tuf*-a opisana je u Hrvatskoj i Sloveniji (Johannesen *et al.*, 2012), a ta kombinacija genotipova pronađena je i u ovom radu. Pronađena su i tri nova genotipa za ovo područje u Istri, skupni genotipovi S1/ST29/V14/*tuf*-b2 i S6/ST19/V3/*tuf*-a, koji do sada nisu zabilježeni niti drugdje u Hrvatskoj te skupni genotip S6/ST19/V3. Također, prvi puta je napravljena i multigenetska analiza nekog izolata fitoplazme BN iz brijesta.

Učinak diverzifikacije genoma fitoplazmi posljedica je snažne pozitivne selekcije do koje dolazi zbog nužne prilagodbe fitoplazmi njihovom promjenjivom okolišu. Rezultati postignuti u ovom radu pokazali su postojanje različitih genotipova značajne genetske varijabilnosti među relativno malim brojem analiziranih sojeva stolbur fitoplazme. Svaki izolat vinove loze kultivara 'Chardonnay' imao je drugačiji skupni genotip, što ide u prilog činjenici da je potrebno kontinuirano praćenje širenja zaraze i rasprostranjenosti genotipova BN fitoplazme u svrhu kontrole i prevencije pojave bolesti žutica vinove loze. Također, ovi rezultati doprinose boljem razumijevanju epidemiologije GY bolesti u Hrvatskoj i omogućavaju lakše praćenje širenja sojeva fitoplazmi u budućnosti. Potrebno je što bolje dodatno istražiti interakcije fitoplazmi i njihovih kukaca-vektora te biljaka domaćina kako bi se razjasnila epidemiologija zaraze fitoplazmom '*Ca. P. solani*'.

6. Zaključak

U ovom diplomskom radu sam u uzorcima brijesta (*Ulmus* sp.), vinove loze (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) i obične koprive (*Urtica dioica* L.) iz Istre potvrdila zarazu fitoplazmom '*Candidatus* Phytoplasma solani' te sam napravila multigensku tipizaciju koristeći sekvence gena *secY*, *stamp*, *vmp1* i *tufB*. Utvrđena je značajna genska varijabilnost. Potvrđena je prisutnost dva *tufB* (*tufB*-a i *tufB*-b2) i *vmp1* (V3 i V14) genotipa te četiri *secY* (S1, S4, S6 i S39) i pet *stamp* (ST19, ST22, ST23, ST29, ST46) genotipova. Geni *secY* i *stamp* pokazali su se varijabilnijima, a geni *vmp1* i *tufB* manje varijabilnima. Najzastupljeniji je bio skupni genotip S1/ST29/V14/*tuf*-b2 iz uzoraka brijestova i koprive. Dokazana je prisutnost različitih skupnih genotipova značajne genetske varijabilnosti te su pronađena tri nova skupna genotipa fitoplazme '*Ca. P. solani*' (skupni genotipovi S1/ST29/V14/*tuf*-b2, S6/ST19/V3/*tuf*-a i S6/ST19/V3). Uz to, po prvi puta je napravljena multigenska analiza izolata BN fitoplazme iz brijesta. U buduću je potrebno pratiti epidemiologiju BN fitoplazme kako bi se spriječila i smanjila pojava bolesti žutica vinove loze.

7. Literatura

- Akimaru J., Matsuyama S., Tokuda H., Mizushima S. (1991): Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 6545-6549.
- Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-Padieu E., Foissac X. (2007): Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct *flavescence dorée* phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. Appl. Environ. Microbiol. 73(12): 4001–4010.
- Aryan A., Brader G., Mörtel J., Pastar M., Riedle-Bauer M. (2014): An abundant '*Candidatus* Phytoplasma solani' *tuf-b* strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. Eur. J. Plant Pathol. 140(2): 213–227.
- Bai X., Zhang J., Holford I. R., Hogenhout S. A. (2004): Comparative genomics identifies genes shared by distantly related insect-transmitted plant pathogenic mollicutes. FEMS Microbiol. Lett. 235(2): 249–258.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Radek A. J., Shevchenko D. V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J. W., Hogenhout S. A. (2006): Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. J. Bacteriol. 188(10): 3682–3696.
- Belli G., Bianco P. A., Conti M. (2010): Grapevine yellows in Italy: past, present and future. J. Plant Pathol. 92(2): 303-326.
- Boonrod K., Munteanu B., Jarausch B., Jarausch W., Krczal G. (2012): An immunodominant membrane protein (Imp) of '*Candidatus* Phytoplasma mali' binds to plant actin. MPMI. 25(7): 889–895.
- Bressan A., Turata R., Maixner M., Spiazzi S., Boudon-Padieu E., Girolami V. (2007): Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: A case study. Ann. Appl. Biol. 150(3): 331–339.

Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac X. (2009): Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(9): 2951–2957.

Constable F. E. (2010): Phytoplasma epidemiology: grapevines as a model. U: Weintraub P. G., Jones P. (ur.) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford, CABI, str. 188-212.

Credi R., Terlizzi F., Milanesi L., Bondavalli R., Cavallini G., Montermini A., Dradi D. (2006): Wild host plants of stolbur phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of grapevine *bois noir* occurrence in Emilia-Romagna, Italy. 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 182–183.

Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. (1967): Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem elements of plants infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows or Pawlownia Witches' Broom. *JJP*, 33: 259–266.

Economou A. (1999): Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol.* 7(8): 315–320.

Ember, I. Acs Z., Munyaneza J., Crosslin J., Kolber M. (2011): Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *Eur. J. Plant Pathol.* 130(3): 367–377.

EPPO (2023) '*Candidatus* Phytoplasma solani'. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int> (pristupljeno 3.9.2023.).

Fabre A., Danet J. L., Foissac X. (2011): The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene *stamp* is submitted to diversifying positive selection. *Gene*, 472: 37–41.

Fialová R., Válová P., Balakishiyeva G., Danet J., Šafářová D., Foissac X., Navrátil M. (2009): Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in South Moravia (Czech Republic). *J. Plant Pathol.* 91(2): 411–416.

Foissac X., Wilson M. R. (2010): Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. U: Weintraub P. G., Jones P. (ur.) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford, CABI, str. 188-212.

Foissac X., Danet J., Malembic-Maher S., Salar P., Šafářová D., Válová P., Navrátil M. (2013): *Tuf* and *secY* PCR amplification and genotyping of phytoplasmas. U: Hodggetts J., Dickinson M. (ur.) *Phytoplasma: methods and protocols*. Springer New York, str. 189–204.

Haggis G. H., Sinha R. C. (1978): Scanning electron microscopy of mycoplasma like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *J Phytopathol.* 68: 677–680.

Hogenhout S. A., Šeruga Musić M. (2010): *Phytoplasma* genomics, from sequencing to comparative and functional genomics – what have we learnt? U: Weintraub P. G., Jones P. (ur.) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford, CABI, str. 19-37.

Hogenhout S. A., Oshima K., Ammar E., Kakizawa S., Kingdom H., Namba S. (2008): *Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects*. *Mol. Plant Pathol.* 9(4): 403–423.

Jeger M., Bragard C., Caffier D., Candresse T., Chatzivassiliou E., Dehnen-Schmutz K., Gilioli G., Jaques Miret J. A., Macleod A., Navarro M. N., Niere B., Parnell S., Potting R., Rafoss T., Rossi V., Urek G., Van Bruggen A., Van Der Werf W., West J., Winter S., Bosco D., Foissac X., Strauss G., Hollo G., Mosbach-Schulz O., Grégoire J. C. (2016): Risk to plant health of *Flavescence dorée* for the EU territory. *EFSA J.* 14(12):4603.

Johannesen J., Foissac X., Kehrl P., Maixner M. (2012): Impact of vector dispersal and host-plant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. *PLOS ONE.* 7(12):e51809

Jung H.-Y., Miyata S., Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Wei W., Suzuki S., Ugaki M., Hibi T., Namba S. (2003): First complete nucleotide sequence and heterologous gene organization of the two rRNA operons in the phytoplasma genome. *DNA Cell Biol.* 22: 209-215.

Kakizawa S., Oshima K., Nishigawa H., Jung H. J., Wei W., Suzuki S., Tanaka M., Miyata S. I., Ugaki M., Namba S. (2004): Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 150(1): 135–142.

Kirdat K., Tiwarekar B., Sathe S., Yadav A. (2023): From sequences to species: Charting the phytoplasma classification and taxonomy in the era of taxogenomics. *Front. Microbiol.* 14: 1123783.

- Langer M., Maixner M. (2004): Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*. 43(4): 191-199.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Bertaccini A. (1998): Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *J. Phytopathol.* 88: 1359-1366.
- Lee I.-M., Davis R. E., Gundersen-Rindal D. E. (2000): Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 221-255.
- Lee I.-M., Zhao Y., Bottner K. D. (2006): *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol. Cell. Probes.* 20(2): 87–91.
- Lee I.-M., Klopmeier M., Bartoszyk I. M., Gundersen-Rindal D. E., Chou T., Thomson K., Eisenreich R. (1997): Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nat. Biotechnol.* 15(2): 178–182.
- Mackay I. M. (2004): Real-time PCR in the microbiology laboratory. *CMI.* 10(3): 190–212.
- Musić M., Š., Samaržija I., Hogenhout S. A., Haryono M., Cho S.-T., Kuo C.-H. (2019): The genome of '*Candidatus* Phytoplasma solani' strain SA-1 is highly dynamic and prone to adopting foreign sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* 42(2): 117–127.
- Namba S. (2019): Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 95(7): 401-418.
- Neimark H., Kirkpatrick B. C. (1993): Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic Mycoplasma-like organisms. *Mol. Microbiol.* 7(1): 21-28.
- Oshima K., Maejima K., Namba S. (2013): Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Front. Microbiol.* 4: 230.
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H. Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S. I., Ugaki M., Namba S. (2004): Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.* 36(1): 27–29.

- Oshima K., Ishii Y., Kakizawa S., Sugawara K., Neriya Y., Himeno M., Minato N., Miura C., Shiraishi T., Yamaji Y., Namba S. (2011): Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLOS ONE*. 6(8): e23242.
- Pacifico D., Alma A., Bagnoli B., Foissac X., Pasquini G., Tessitori M., Marzachi C. (2009): Characterization of *Bois noir* isolates by restriction fragment length polymorphism of a Stolbur-specific putative membrane protein gene. *J. Phytopathol.* 99(6): 711–715.
- Pelletier C., Salar P., Gillet J., Cloquemin G., Very P., Foissac X., Malembic-Maher S. (2009): Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*. 48(2): 87-95.
- Plavec J. (2015): Molecular epidemiology of grapevine phytoplasma pathosystems: multilocus sequence typing approach. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Plavec J., Križanac I., Budinščak Ž., Škorić D., Šeruga Musić M. (2015): A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. *Eur. J. Plant Pathol.* 142(3): 591–601.
- Plavec J., Budinščak Ž., Križanac I., Ivančan G., Samaržija I., Škorić D., Foissac X., Šeruga Musić M. (2018): Genetic diversity of ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ strains associated with “*Bois Noir*” disease in Croatian vineyards. *Plant Pathol.*
- Razin S., Yogev D., Naot Y. (1998): Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4): 1094-1156.
- Schneider B., Gibbl K. S., Seemüller E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *J. Microbiol.* 143: 3381-3389.
- Škorić D., Šarić A., Vibio M., Murari E., Krajačić M., Bertaccini A. (1998): Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. *Vitis*. 37(4): 171-175.
- Strauss E. (2009): Phytoplasma research begins to bloom. *J. Sci.* 325: 388–390.

Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H. Y., Yamaji Y., Nishigawa H., Ugaki M., Namba S. (2006): Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *PNAS*. 103(11): 4252-4257.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8): 1596–1599.

Tanno K., Maejima K., Miyazaki A., Koinuma H., Iwabuchi N., Kitazawa Y., Nijo T., Hashimoto M., Yamaji Y., Namba S. (2018): Comprehensive screening of antimicrobials to control phytoplasma diseases using an in vitro plant–phytoplasma co-culture system. *J. Microbiol.* 164(8): 1048–1058.

The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004): '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 54(4): 1243–1255.

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24): 4876-4882.

Wei W., Zhao Y. (2022): Phytoplasma taxonomy: nomenclature, classification, and identification. *J. Biol.* 11: 1119.

Weintraub P. G., Wilson M. R. (2010): Control of phytoplasma diseases and vectors. U: Weintraub P. G., Jones P. (ur.) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford, CABI, str. 233-249.

Weintraub P. G., Trivellone V., Krüger K. (2019): The biology and ecology of leafhopper transmission of phytoplasmas. U: Bertaccini A., Weintraub P. G., Rao G. P., Mori N. (ur.) *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II: Transmission and Management of Phytoplasma - Associated Diseases*. Springer Singapore. str. 27–51.

8. Životopis

Rođena sam 25. svibnja 1999. godine u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Silvija Strahimira Kranjčevića, a potom sam upisala Drugu gimnaziju. Nakon završetka srednje škole, 2018. godine upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu i dobila sam državnu stipendiju u STEM područjima znanosti. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić završila sam preddiplomski studij završnim radom „Biodegradacija polimera: uloga bakterija i njihovih enzima“ 2021. godine. Iste godine upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul botanika. Tijekom studiranja imala sam dvije stručne prakse (na Zavodu za biokemiju i Zavodu za botaniku), sudjelovala sam u Noći biologije, volontirala sam na *Brain-Gut Axis* konferenciji i aktivno sudjelovala na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja izlaganjem postera i vođenjem radionice za izradu prirodne kozmetike. Autorica sam sažetka '*Bryophyte collection within Herbarium Croaticum (ZA) saved from oblivion*' u knjizi sažetaka 7. Hrvatskog botaničkog simpozija s međunarodnim sudjelovanjem (Zagreb, 2022.) i znanstvenog rada 'Vaskularna flora Borongajskog luga (Zagreb, Hrvatska)' objavljenog u Glasniku Hrvatskog botaničkog društva 2023. godine.

Od malih nogu aktivno se posvećujem raznim kreativnim hobijima, a u posljednje vrijeme su to uglavnom šivanje, heklanje, pletenje i izrada prirodne kozmetike i sapuna. Tijekom srednje škole radila sam kao tehničar za nokte, a tijekom studija kao vizažist, hostesa na Zagrebačkom Sajmu Nautike te vodič u Botaničkom vrtu Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu. Posjedujem vozačku dozvolu za brod (B kategorija) i automobil (B kategorija). Odlično se služim engleskim jezikom u govoru i pisanju, talijanskim se služim vrlo dobro, a njemački i grčki poznajem na bazičnoj razini.