Usporedba metoda izolacije DNA u detekciji fitoplazmi ribosomskih skupina 16SrV i 16SrXII-A iz vinove loze (Vitis vinifera L.)

Haluška, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:348442

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Haluška

Usporedba metoda izolacije DNA u detekciji fitoplazmi ribosomskih skupina 16SrV i 16SrXII-A iz vinove loze (*Vitis vinifera* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj rad, izrađen u laboratoriju Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Martine Šeruge Musić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Neizmjerno zahvaljujem doc. dr. sc. Martini Šerugi Musić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za rad i stjecanje iskustva, zatim za vodstvo, pomoć i savjete prilikom izrade rada, te za beskrajno strpljenje i potporu.

Najljepše zahvaljujem prof. dr. sc. Dijani Škorić na pomoći i vremenu izdvojenom za mene kad god je to bilo potrebno.

Zatim zahvaljujem dipl. inž. Marinu Ježiću, Darinki Kajić i svim djelatnicima Botaničkog Zavoda.

Također zahvaljujem mr. sc. Ivani Križanac i dipl. inž. Jeleni Plavec sa Zavoda za zaštitu bilja Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci i ljubavi tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Usporedba metoda izolacije DNA u detekciji fitoplazmi ribosomskih skupina 16SrV i 16SrXII-A iz vinove loze (*Vitis vinifera* L.*)*

Ivana Haluška
Biološki odsjek, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb
Prirodoslovno-matematički fakultet

SAŽETAK

Fitoplazme (*Candidatus* 'Phytoplasma') su bakterije bez stanične stijenke iz razreda *Mollicutes* čiji se životni ciklus sastoji od replikacije u biljkama i kukcima. Uzročnici su nekoliko stotina bolesti na različitim biljkama, uključujući važne poljoprivredne vrste. Budući da ih nije moguće uzgajati *in vitro*, njihova klasifikacija predstavlja problem, no razvojem molekularnih metoda, poput ugniježđene lančane reakcije polimerazom (PCR) i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR), omogućena je njihova detekcija i identifikacija. Ukupna genomska DNA biljke može se izolirati različitim metodama pa je cilj ovog rada bio usporediti osjetljivost detekcije fitoplazmi ugniježđenim i *real-time* PCR-om, ovisno o metodi izolacije DNA. Ukupne nukleinske kiseline 6 uzoraka fitoplazmama zaražene vinove loze (*Vitis vinifera* L.) izolirane su kratkom CTAB-metodom za izolaciju TNA i komercijalnim kompletima *OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit*. Prisutnost fitoplazmi dokazana je umnažanjem gena za 16S rRNA ugniježđenim PCR-om, te gena *map* metodom *real-time* PCR. Kako bi se ispitala osjetljivost detekcije, korištene su različite koncentracije kalupa izolirane DNA. Kod 5 analiziranih uzoraka dokazana je prisutnost fitoplazmi ribosomske skupine 16SrXII-A dok je kod jednog uzorka detektirana fitoplazma skupine 16SrV. Usporedba rezultata ukazala je da se izoliranjem ukupne DNA kratkom CTAB-metodom kod većine analiziranih uzoraka dobiva najveća osjetljivost detekcije fitoplazmi pomoću obje korištene metode.

(57 stranica, 17 slika, 14 tablica, 78 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: fitoplazme, izolacija DNA, PCR, *real-time* PCR

Voditeljica: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, doc.
Dr. sc. Ivana Ivančić-Baće, doc.
Dr. sc. Dubravka Hranilović, prof.

Rad prihvaćen: 30. lipnja 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduate Thesis

Comparison of DNA isolation methods in detection of 16SrV and 16SrXII-A ribosomal group phytoplasmas from grapevine (*Vitis vinifera* L.)

Ivana Haluška
Division of Biology, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb
Faculty of Science

ABSTRACT

Phytoplasmas (*Candidatus* 'Phytoplasma') are wall-less bacteria from the class *Mollicutes*. Their life cycle involves replication in plants and insects. They cause several hundred diseases in various plants, including important agricultural species. Since phytoplasmas cannot be cultivated *in vitro*, their classification is problematic, but with development of molecular methods, such as nested and real-time polymerase chain reaction (PCR), phytoplasma detection and identification was made possible. Total genomic DNA can be isolated from the plant by various methods.The aim of this thesis was to compare sensitivity of phytoplasma detection by nested and real-time PCR, depending on DNA isolation method. Total nucleic acids of 6 phytoplasma infected grapevine (*Vitis vinifera* L.) samples were isolated by short CTAB method for TNA isolation, and by commercial kits OmniPrep™ for Plant and DNeasy Plant Mini Kit. Presence of phytoplasmas was detected by nested PCR amplifying 16S rRNA gene and real-time PCR amplifying *map* gene. Different concentrations of DNA template were used in order to compare the sensitivity of detection. In 5 of the analyzed samples presence of phytoplasmas belonging to 16SrXII-A ribosomal group was detected, while in one sample we detected 16SrV group phytoplasma. Comparison of the results indicated that DNA isolation using short CTAB method gave the highest sensitivity of phytoplasma detection in most of the analyzed samples by both nested and real-time PCR.

(57 pages, 17 figures, 14 tables, 78 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: phytoplasmas, DNA isolation, PCR, real-time PCR

Supervisor: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.
Dr. sc. Ivana Ivančić-Baće, Asst. Prof.
Dr. sc. Dubravka Hranilović, Prof.

Thesis accepted: June 30, 2010

SADRŽAJ

SADRŽAJ ..... **I**

POPIS KRATICA ..... **III**

1. UVOD **1**

1.1. Fitoplazme 2

1.1.1. Klasifikacija fitoplazmi 2

1.1.2. Evolucija fitoplazmi 4

1.1.3. Genom fitoplazmi 5

1.1.4. Životni ciklus 7

1.1.5. Simptomi bolesti uzrokovane fitoplazmama 8

1.1.6. Fitoplazme vinove loze 9

1.2. Lančana reakcija polimerazom 10

1.2.1. Općenito o lančanoj reakciji polimerazom 10

1.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu 11

1.3. Cilj istraživanja 15

2. MATERIJALI I METODE **16**

2.1. Materijali 17

2.1.1. Uzorci vinove loze i korova 17

2.1.2. Referentni sojevi fitoplazmi 18

2.1.3. Komercijalni kompleti 19

2.1.4. Puferi i otopine 19

2.1.5. Enzimi i pripadajući puferi i otopine 20

2.1.6. Početnice i sonde 20

2.1.7. Standardi za određivanje molekulske mase DNA 21

2.1.8. Kemikalije 22

2.1.9. Pribor i uređaji 22

2.2. Metode 24

2.2.1. Izolacija genomske DNA 24

2.2.1.1. Izolacija genomske DNA korištenjem komercijalnog kompleta OmniPrep™ for Plant 24

2.2.1.2. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina (TNA) kratkom CTAB- metodom 25

2.2.1.3. Izolacija genomske DNA korištenjem komercijalnog kompleta DNeasy Plant Mini Kit 25

2.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA 26
2.2.3. Umnažanje fitoplazmatskog gena za 16S rRNA lančanom reakcijom polimerazom 26
2.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu 28
2.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu 28
3. REZULTATI 30
3.1. Izolacija genomske DNA komercijalnim kompletom *OmniPrep™ for Plant* 31
3.2. Analiza produkata ugniježđene lančane reakcije polimerazom elektroforezom u agaroznom gelu 32
3.3. Izolacija genomske DNA kratkom CTAB-metodom i komercijalnim kompletom *DNaEsy Plant Mini Kit* 35
3.4. Usporedba osjetljivosti detekcije fitoplazmi metodom ugniježđene lančane reakcije polimerazom 35
3.5. Usporedba osjetljivosti detekcije fitoplazmi metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu 38
3.6. Analiza genomske DNA vinove loze elektroforezom u agaroznom gelu 41
4. RASPRAVA 43
5. ZAKLJUČAK 46
6. LITERATURA 48

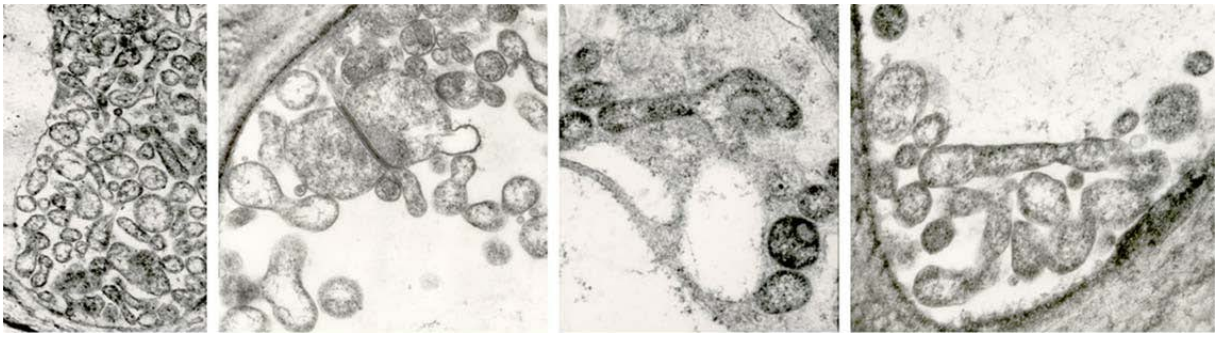
POPIS KRATICA

CTAB	-	cetiltrimetilamonijev bromid
dATP	-	deoksiadenozin-5’-trifosfat
dCTP	-	deoksicitidin-5’-trifosfat
dGTP	-	deoksigvanozin-5’-trifosfat
DNA	-	deoksiribonukleinska kiselina
dNTPs	-	deoksiribonukleotidi
dTTP	-	deoksitimidin-5’-trifosfat
EDTA	-	etilendiamintetraoctena kiselina
PCR	-	lančana reakcija polimerazom
RNA	-	ribonukleinska kiselina
TNA	-	ukupne nukleinske kiseline

1. UVOD

1.1. FITOPLAZME

Japanski znanstvenici su tek 1960-ih godina (Doi i sur., 1967) u prerezima floema biljaka sa simptomima žućenja otkrili mikroorganizme koji su nalikovali mikoplazmama, po čemu su i dobili naziv mikoplazmama slični organizmi (*mycoplasma-like organisms*, MLOs). Do tada se smatralo da su bolesti žućenja listova, poznate još od početka 20.-tog stoljeća, uzrokovane virusima, jer uzročnike nije bilo moguće uzgojiti na umjetnim podlogama. Danas se te bakterije bez stijenke nazivaju fitoplazme (grč. *phyto* – biljka; grč. *plasma* – uobličena tvar). Fitoplazme su biljni patogeni koji se prenose vektorima – kukcima. To su pleomorfne bakterije bez stanične stijenke promjera 200-800 nm (slika 1) (Bertaccini, 2007; Hogenhout i sur., 2008) koje imaju jednostruku membranu, genom veličine 530-1350 kb (Marcone i sur., 1999), a sadržaj baza G + C je 23-29% (Kollar i Seemüller, 1989; Sears i sur., 1989). Njihov genom je reduciran i neki geni koji su prije bili smatrani obaveznim za žive organizme u njima nisu otkriveni ili nisu funkcionalni. Stoga se pretpostavlja da fitoplazme tvari neophodne za život, a koje ne mogu same sintetizirati, uzimaju iz domaćina. Uzročnici su nekoliko stotina biljni bolesti i čine velike štete u poljoprivredi. Još uvijek ih niije moguće uzgajati *in vitro* na hranjivoj podlozi, što uvelike otežava njihovo istraživanje.



Slika 1. Snimka presjeka sitastih cijevi dobivena elektronskim mikroskopom. Primjećuju se fitoplazme različitih veličina i oblika (Bertaccini, 2007).

1.1.1. Klasifikacija fitoplazmi

Domena: *Bacteria*
Koljeno: *Tenericutes*
Razred: *Mollicutes*
Red: *Acholeplasmatales*

Porodica: *Acholeplasmataceae*

Rod: *Candidatus* Phytoplasma

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=33926&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f

Fitoplazme su bakterije bez stanične stijenke svrstane u razred *Mollicutes* (Lim i Sears, 1989; Kuske i Kirkpatrick, 1992; Sears i Kirkpatrick, 1994). Žive u floemu biljaka i u kukcima. Službeno ime roda u koji se svrstavaju fitoplazme je *Candidatus* (*Ca*.) Phytoplasma. '*Candidatus*' označava da se fitoplazme ne mogu uzgajati *in vitro*, tj. da nisu zadovoljeni Kochovi postulati. Budući da se ne mogu uzgajati *in vitro*, njihovo istraživanje i klasifikacija su otežani. Razvojem raznih molekularnih tehnika poput korištenja monoklonalnih i poliklonalnih antitijela (Clark i sur., 1989; Chen i sur., 1992a; Fos i sur., 1992; Lee i Davis, 1992;), kloniranih DNA sonda fitoplazmi (Kirkpatrick i sur., 1987; Chen i sur., 1992b; Daire i sur., 1992; Nakashima i sur., 1993), a posebno metode PCR korištenjem univerzalnih početnica specifičnih za fitoplazme ili određene skupine fitoplazmi (Deng i Hiruki, 1991; Lee i sur., 1993; Gundersen i Lee, 1996; Smart i sur., 1996) omogućena je detekcija i identifikacija fitoplazmi.

Visoko konzervirani slijed gena za 16S rRNA služi kao glavni parametar klasifikacije fitoplazmi. Slijedovi gena za 16S rRNA različitih fitoplazmi su uspoređeni. Fitoplazme su svrstane u ribosomske 16Sr skupine, a dosad je identificirano 15 različitih 16Sr fitoplazmatskih skupina (16SrI – 16SrXV) i 48 podskupina (npr. 16SrV-A, 16SrV-B, 16SrV-C, itd) (Lee i sur., 1993; Lee i sur., 1998; Montano i sur., 2001). Svaka 16Sr skupina ima specifični RFLP-profil (*restriction fragment length polymorphism*, polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata).

Nakon što je uveden naziv *Candidatus* Phytoplasma predložena su pravila nomenklature. Neka fitoplazma čini zasebnu vrstu ukoliko je njen gen za 16S rRNA manje od 97,5% identičan bilo kojem 16S-genu svih drugih opisanih vrsti fitoplazmi. Ukoliko je homologija slijeda 16S rRNA gena manja od 97,5% organizmi najvjerojatnije nemaju više od 60 – 70% slične DNA, odnosno ne pripadaju istoj vrsti (Stackebrandt i Goebel, 1994). Iako neki organizmi imaju više od 97,5% identičnosti u slijedu gena za 16S rRNA, njihove ukupne DNA imaju manje od 70% identičnosti pa oni ne pripadaju istoj vrsti (Fox i sur., 1992; Stackebrandt i Goebel, 1994; Stackebrandt i sur., 2002; Botti i Bertaccini, 2003). Tako neke

fitoplazme koje imaju više od 97,5% sličnosti u genu za 16S rRNA izazivaju različite bolesti kod biljaka, odnosno različite simptome, prenose se različitim vektorima, imaju različite biljke domaćine. Stoga su pravila za opis vrsta fitoplazmi sljedeća (IRPCM, 2004):

1. Fitoplazma čini zasebnu vrstu ukoliko se njen gen za 16S rRNA razlikuje više od 2,5% od 16S rRNA gena svih dosad opisanih vrsta fitoplazmi.

2. Ako dvije fitoplazme imaju gen za 16S RNA koji u svom slijedu posjeduje više od 97,5% identičnosti, one pripadaju različitim vrstama ukoliko je zadovoljen barem jedan od sljedećih uvjeta:

    a. Prenose se različitim vektorima.
    b. Imaju različitog biljnog domaćina, ili im se ponašanje unutar istog domaćina značajno razlikuje (različiti simptomi bolesti).
    c. Jako se razlikuju na molekularnoj razini.

Osim 16S rRNA gena, postoje i drugi molekularni biljezi značajni za klasifikaciju i varijabilost fitoplazmi, kao što su: 16S – 23S rRNA *spacer* regija (Kirkpatrick i sur., 1994), gen za 23S rRNA (Guo i sur., 1998), geni za ribosomske proteine (Jomantiene i sur., 1998; Lee i sur., 1998), gen za transkripcijski faktor Tu (Schneider i sur., 1997), itd.

1.1.2. Evolucija fitoplazmi

Fitoplazme pripadaju razredu *Mollicutes* (lat. *mollis* – mekano; lat. *cutis* – koža), zajedno sa mikoplazmama, spiroplazmama i ostalim bakterijama bez stanične stijenke. Osim što nemaju staničnu stijenku, zajednička svojstva su im mala veličina, niski sadržaj G + C, reducirani genom, pojednostavljeni metabolički putevi, itd (Bové, 1997). Bakterije razreda *Mollicutes* su se razvile iz Gram-pozitivnih bakterija sa niskim sadržajem G + C, a najvjerojatnije dijele pretke s rodovima *Clostridium* i *Lactobacillus* (Weisburg i sur., 1989; Woese, 1987). Tijekom evolucije razreda *Mollicutes* došlo je do redukcije genoma – osim izostanka stanične stijenke, nema gena za Krebsov ciklus, biosintezu masnih kiselina, *de novo* sintezu nukleotida, biosintezu većine aminokiselina, pa pripadnici razreda *Mollicutes* dobivaju produkte tih puteva od domaćina (Oshima i sur., 2004). Budući da su ta svojstva zajednička svim rodovima unutar razreda *Mollicutes*, pretpostavlja se da je do redukcije

genoma došlo rano u evoluciji ovog razreda. Geni koji više nisu potrebni se tijekom evolucije gube ili delecijom cijelog gena ili postupnom erozijom (Sirand-Pugnet, 2007).

Prije oko 470 milijuna godina unutar razreda Mollicutes došlo je do podjele u dva ogranka: ogranak AAA (*Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*) u koji pripada i rod *Ca*. Phytoplasma, te ogranak SEM (*Spiroplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma*) (Razin i sur., 1998; Bai i sur., 2004; Maniloff, 2002). Fitoplazme su biljni patogeni koji se prenose kukcima, dok mikoplazme, kao i većina pripadnika SEM ogranka, žive u ljudima i životinjama. Spiroplazme žive u kukcima, osim tri vrste koje su, kao i fitoplazme, biljni patogeni koji se prenose kukcima – *Spiroplasma kunkelii*, *Spiroplasma citri* i *Spiroplasma phoeniceum* (Gasparich, 2002). Budući da su fitoplazme i spiroplazme filogenetski udaljeni, pretpostavlja se da su ove tri vrste spiroplazmi i fitoplazme primjer konvergentne evolucije.

Većina pripadnika razreda *Mollicutes* koristi UGA-kodon za triptofan, uz standardni UGG-kodon, dok je kod fitoplazmi i aholeplazmi UGA stop-kodon (Lim i Sears, 1992). Fitoplazme imaju dva rRNA operona (Schneider i Seemüller, 1994), dok većina mikoplazmi ima jedan. Mikoplazme i spiroplazme imaju putove spašavanje sinteze nukleotida, a spiroplazme mogu sintetizirati neke aminokiseline (Christensen i sur., 2005). Fitoplazme nemaju gene za te puteve, kao ni gene za ciklus pentoza-fosfata, koji je prisutan kod mikoplazmi. Većina bakterija, među njima i mikoplazme (Razin i sur., 1998), imaju ATP sintazu tipa F_0F_1 kojom dobivaju ATP uz pomoć protonske pumpe. Kod fitoplazmi čiji je genom sekvenciran nije pronađen gen za F_0F_1 ATP-sintazu (Bai i sur., 2006; Oshima i sur., 2004). Fitoplazme također nemaju sustav fosfotransferaze, koji bakterije koriste za unos i fosforilaciju šećera poput saharoze, glukoze i fruktoze. Pretpostavlja se kako fitoplazme kao izvor ugljika koriste fosforiliranu heksozu (Christensen i sur., 2005). Izostanak ovih gena, koji su bili smatrani potrebnim za metabolizam, upućuje na to da su fitoplazme jako ovisne o unosu tvari iz stanice domaćina, što potvrđuje i činjenica da fitoplazme imaju neke gene za transport koji nisu prisutni kod mikoplazmi (Oshima i sur., 2004).

1.1.3. Genom fitoplazmi

Većina fitoplazmi ima cirkularni kromosom, no otkrivene su i tri vrste fitoplazmi koje imaju linearni kromosom - *Ca*. Phytoplasma mali, *Ca*. Phytoplasma prunorum, *Ca*. Phytoplasma pyri (Kube, 2008). Dosad su određene sekvence genoma pet sojeva fitoplazmi:

dva *Ca*. Phytoplasma asteris soja – soj AY-WB (*aster yellows*, soj *witches' broom*, 16SrI-A) (Bai i sur., 2006) i soj OY-M (*onion yellows*, 16SrI-B) (Oshima i sur., 2004); dva *Ca*. Phytoplasma australiense (16SrXII-B) soja – australski (Tran-Nguyen i sur., 2008) i novozelandski (Liefting i sur., 2006); te *Ca*. Phytoplasma mali (16SrX-A) – soj AT (Kube i sur., 2008). Osim kromosoma, fitoplazme imaju i plazmide – OY-M ima dva, a AY-WB četiri plazmida.

Genom fitoplazmi sadrži ponavljajuće gene organizirane u klastere nazvane „moguće pokretne jedinice" ili PMUs (*potential mobile units*), koji u fitoplazme AY-WB čine 14-23% genoma (Bai i sur., 2006). U genomu soja AY-WB veličina PMUs je ~20 kb i sadrži gene za transpozazu (*tra5*), primazu (*dnaG*), DNA-helikazu (*dnaB*), timidilat-kinazu (*tmk*), Zn-ovisnu proteazu (*hflB*), DNA-vezajuće proteine HU (*himA*), proteine koji se vežu za jednolančanu DNA (*ssb*), specijalizirane sigma-faktore (*sigF*) i druge proteine nepoznate funkcije (Bai i sur., 2006). Pretpostavlja se da su neki od tih nepoznatih proteina membranski proteini i služe u interakciji fitoplazme i domaćina. Fitoplazmatske insercijske sekvence *tra5* pripadaju grupi IS*150* porodice IS*3* insercijskih sekvenci (Lee i sur., 2005). Budući da svi PMUs sadrže *dnaG*, *dnaB*, *ssb* i *tmk* gene koji su vezani za replikaciju, pretpostavlja se da su PMUs nalik transponzonima sa replikativnim mehanizmom (Bai i sur., 2006). Analizom genoma sojeva AY-WB i OY-M ustanovljeno je da u područjima koja sadrže PMUs dolazi do preraspodjele genoma, dok u područjima koja ne sadrže PMUs nema preraspodjele (Bai i sur., 2006). To potvrđuje da velike regije ponavljajuće DNA imaju destabilizirajući učinak na genom, budući da dolazi do delecija, inverzija i duplikacija (Achaz i sur., 2003; Hogenhout i sur., 2008). Zbog toga se u genomima sojeva AY-WB i OY-M geni za osnovne životne funkcije, poput gena za replikaciju i metabolizam, nalaze u dijelu genoma (veličine ~250 kb) u kojem nema PMUs (Bai i sur., 2006; Oshima i sur., 2004; Hogenhout i sur., 2008). Dokaz za horizontalni prijenos gena unutar razreda *Mollicutes* je gen *msg1*, koji se nalazi između dva *tra5* gena unutar PMU3 soja AY-WB. Slični *mgs1* gen se nalazi i u *Spiroplasma kunkelii* (Bai i sur., 2004) i u *Ca*. Phytoplasma trifolii (16SrVI) soju BLTVA *(Beet Leafhopper transmitted virescence phytoplasma*) (Hogenhout i sur., 2008).

Bakterije imaju pet sustava za eksport proteina, ali je samo Sec-sustav translokacije proteina potreban za preživljavanje stanice (Economogu, 1999; Tjalsma i sur., 2000). U tom sustavu proteini SecA, SecY i SecE su neophodni za translokaciju proteina i vijabilnost stanice. Geni za SecA, SecY i SecE su pronađeni u fitoplazmamama OY (Kakizawa i sur.,

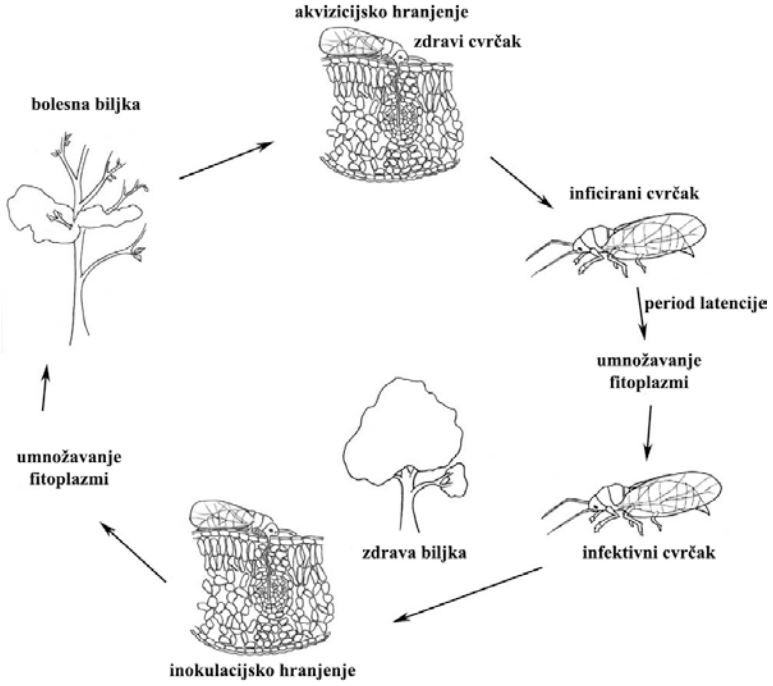
2001) i u AY-WB (Bai i sur., 2006), a geni *secY* su klonirani i iz drugih fitoplazmi (Lee i sur., 2006). Osim Sec-sustava, AY-WB i OY-M sojevi imaju gen i za protein YidC (Bai i sur., 2006; Oshima i sur., 2004), koji sudjeluje u integraciji proteina u membranu (Dalbey i Kuhn, 2000).

1.1.4. Životni ciklus

Fitoplazme žive u biljkama i u kukcima. Kukci su vektori koji prenose fitoplazme s jedne biljke na drugu (slika 2). Fitoplazme nastanjuju sitaste cijevi floema biljaka, koje su bogate hranjivim tvarima. Vektori su kukci koji se hrane sadržajem floema, a pripadaju redu *Hemiptera*, poput porodica *Cicadellidae* (cvrčci), *Psyilloidae* i *Fulgoridae* (Weintraub i Beanland, 2006). Neke fitoplazme imaju nisku specifičnost prema vektoru, pa ih prenosi veliki broj vrsta kukaca, dok su druge fitoplazme visoko specifične i prenose ih samo jedna ili dvije vrste kukaca. Kukci se inficiraju fitoplazmama kada se hrane sokom iz floema zaražene biljke. Fitoplazme prvo nastane probavni sustav kukca, zatim iz srednjeg crijeva odlaze u hemolimfu odakle će nastaniti žlijezde slinovnice (Christensen i sur., 2005; Hogenhout i sur., 2008). Fitoplazme se u žlijezdama slinovnicama umnožavaju do koncentracije koja će omogućiti infekciju zdrave biljke prilikom hranjenja (Webb i sur., 1999). Potrebno je i do 3 tjedna da koncentracija fitoplazmi dosegne inficirajuću razinu. To vrijeme su zove period latencije (Webb i sur., 1999; Carraro i sur., 2001). Jednom inficirani kukac ostaje infektivan cijelog života. Fitoplazme mogu imati negativni učinak na vektore, pa tako neki kukci ugibaju prije nego što postanu infektivni. U drugim slučajevima fitoplazme nemaju nikakvog učinka na kukce ili čak poboljšavaju sposobnost preživljavanja u nedostatku glavnog izvora prehrane ili tijekom prezimljavanja (Hogenhout i sur., 2008; Ebbert i Nault, 1994; Madden i Nault, 1983; Madden i sur., 1984).

Neke fitoplazme imaju veliki raspon biljnih domaćina. Fitoplazme se nalaze i razmnožavaju u sitastim cijevima floema u većini organa biljke, no pronađene su i u stanicama pratilicama i stanicama parenhima (Siller i sur., 1987; Rudzinska-Langwald i Kaminska, 1999), ali nije poznato kako su do tamo došle. Unutar sitastih cijevi fitoplazme nosi tok asimilata, no to ne može objasniti kolonizaciju nekih dijelova biljke. Budući da fitoplazme nemaju gene za citoskelet ni za flagele nije vjerojatno da se same kreću. (Christensen i sur., 2005). Pokazano je da su fitoplazme adheriraju za stanice domaćina (Lefol i sur., 1993), pa je moguće da se adheriraju i rastu usprkos toku asimilata (Christensen

i sur., 2005). U soku floema nema puno fosforilirane heksoze i nukleotida koji su potrebni fitoplazmama, ali tih tvari ima puno u stanicama pratilicama. Moguće je da fitoplazme induciraju povećani protok tvari kroz pore između sitastih cijevi i stanica pratilica (Christensen i sur., 2005). Fitoplazme utječu negativno na biljke pa su one često nižeg rasta, imaju deformirane cvijetove, plodove, itd.



Slika 2. Životni ciklus fitoplazmi. Zdravi cvrčak se inficira fitoplazmama hraneći se floemskim sokom zaražene biljke. Fitoplazme prvo nastane probavilo kukca, a onda odlaze u hemolimfu odakle dospijevaju do žlijezda slinovnica. U slinovnicama se umnožavaju dok ne dosegnu količinu koja će omogućiti inficiranje zdrave biljke prilikom hranjenja. Fitoplazme se umnožavaju u novoinficiranoj biljci i pojavljuju se simptomi bolesti. Novi cvrčak se hrani na toj biljci i ciklus se zatvara (modificirano iz Christensen i sur., 2005).

1.1.5. Simptomi bolesti uzrokovane fitoplazmama

U biljkama, fitoplazme utječu na fiziologiju stanice i ometaju razvoj biljke. Neki od simptoma uzrokovani fitoplazmama su „vještičja metla“ (*witches' broom*, abnormalni razvoj aksilarnih ogranaka) (slika 3), filodija (transformacija cvjetnih dijelova u listove), virescencija (ozelenjivanje cvjetnih dijelova i gubitak normalnih cvjetnih pigmenata), sterilnost cvijetova, promjena boje lišća (žuti ili crveni listovi), skraćivanje internodija, nekroza floema, skraćivanje i sušenje korjenčića, itd. (Lee i sur., 2000).



Slika 3. Neki od simptoma uzrokovani fitoplazmama: vinova loza zaražena fitoplazmom *Flavescence dorée* (A), „vještičja metla“ kod lipe (B), crvenilo listova kruške u kolovozu (C) (Bertaccini, 2007).

1.1.6. Fitoplazme vinove loze

Žutice vinove loze (*grapevine yellows;* GY) su bolesti vinove loze uzrokovane fitoplazmama (Maixner, 2006). Raširene su po čitavom svijetu, a simptomi uključuju žućenje i nekrozu lisnih žila i plojki, savijanje listova prema dolje, nedostatak odrvenjavanja ili nepotpuno odrvenjavanje stabljike, nekrozu stabljike i sušenje plodova.

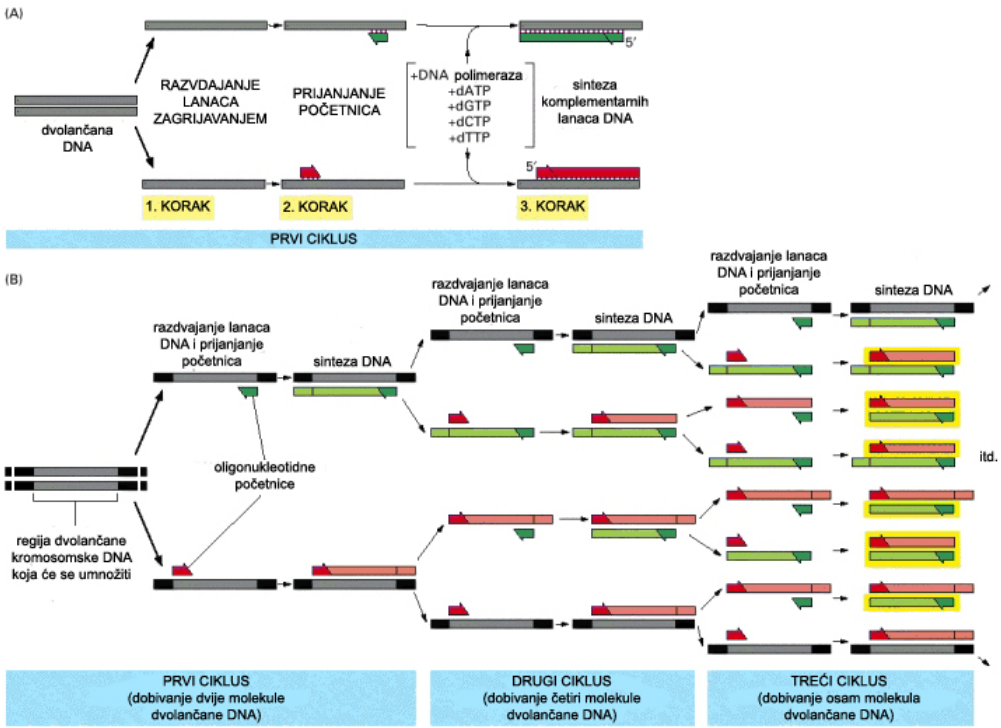
Žuticu vinove loze uzrokuju fitoplazme iz sljedećih skupina/podskupina: *aster yellows* (16SrI-B), *clover phyllody* (16SrI-C), *peanut witches'-broom* (16SrII), *X-disease* (16SrIII), *elm yellows* (16SrV-C, 16SrV-D) i *stolbur* (16SrXII-A, 16SrXII-B).

1.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

Kao što je već spomenuto, razvojem molekularnih metoda omogućeno je bolje detektiranje i identificiranje fitoplazmi. Među tim metodama je i lančane reakcije polimerazom (*polymerase chain reaction*; PCR). U novije vrijeme, od posebne važnosti je i metoda lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR).

1.2.1. Općenito o lančanoj reakciji polimerazom

Lančana reakcija polimerazom omogućuje umnažanje određenog dijela DNA kalupa *in vitro* (Alberts i sur., 2002; Brown i sur., 2002). Poznavajući nukleotidni slijed u blizini 5' i 3'- dijela DNA koji želimo umnožiti, konstruiraju se oligonukleotidne početnice (*forward* i *reverse* početnica). PCR se sastoji od ciklusa, a svaki ciklus se sastoji od denaturacije, prijanjanja početnica i produljivanja lanaca (slika 4A).



Slika 4. Lančana reakcija polimerazom. A) Jedan ciklus se sastoji od denaturacije, prijanjanja početnica i produljivanja lanca. B) U svakom ciklusu broj kopija željenog fragmenta DNA se udvostručuje (modificirano iz Alberts i sur., 2002).

Koraci PCR-ciklusa su:

1. Denaturacija – pri povišenim temperaturama dolazi do razdvajanja lanaca DNA (pri temperaturi ~94 °C)
2. Prijanjanje početnica – početnice se sparuju sa svojim komplementarnim slijedovima na lancima DNA (50 – 60 °C)
3. Produljivanje lanaca – DNA-polimeraza omogućuje produljivanje lanaca uz prisutnost nukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (~72 °C).

Svaki lanac denaturirane DNA služi kao kalup za reakciju pa se tijekom jednog ciklusa broj kopija željenog dijela DNA udvostruči (slika 4B). Broj kopija umnoženih fragmenta se povećava eksponencijalno, a nakon 20 ciklusa dobiva se oko milijun kopija. Broj kopija se udvostručuje u svakom ciklusu sve dok se jedan od sastojaka reakcije ne iscrpi. Budući da su u reakciji prilikom koraka denaturacije prisutne visoke temperature potrebna je termostabilna polimeraza. Takva DNA-polimeraza je izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* (Taq polimeraza). Dobiveni PCR-fragmenti mogu se analizirati, npr. elektroforezom.

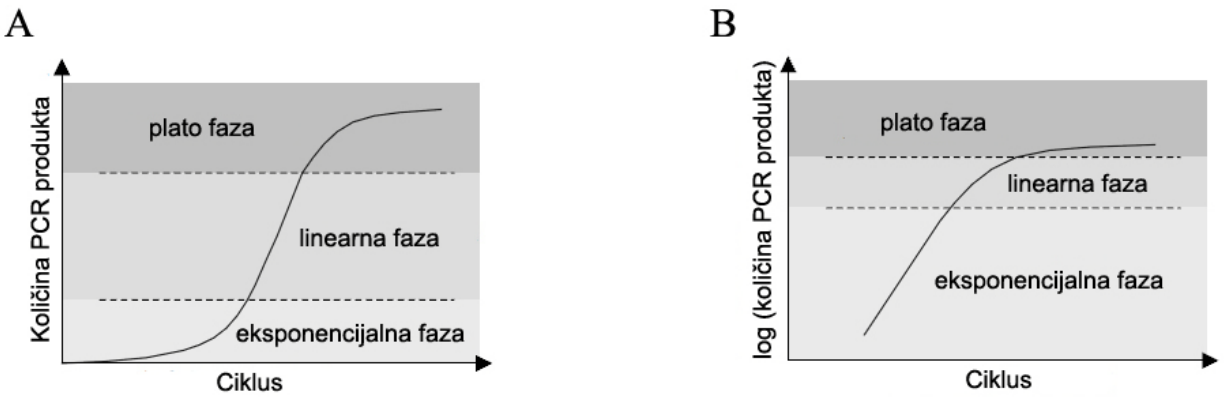
1.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR) se još naziva i kvantitativni PCR (qPCR). To je metoda koja omogućuje određivanje količine istraživane DNA u uzorku. Zasniva se na istom principu kao i tradicionalni PCR, osim što se u smjesu dodaju i fluorescentna tvar, poput boje *SYBR Green I* ili sonda *TaqMan*®, koje omogućuju praćenje reakcije u stvarnom vremenu, dok se kod tradicionalnog PCR analizira samo krajnji produkt.

Tijek lančane reakcije polimerazom sastoji se od tri faze (Applied Biosystems, 2010a):

- Eksponencijalna – broj kopija PCR produkta udvostručuje se u svakom ciklusu.
- Linearna – sastojci reakcije se troše, reakcija se usporava.
- Plato – reakcija se zaustavlja, produkti se počinju razgrađivati.

Tradicionalni PCR analizira produkte iz plato-faze (slika 5), dok *real-time* PCR prikuplja podatke u eksponencijalnoj fazi.

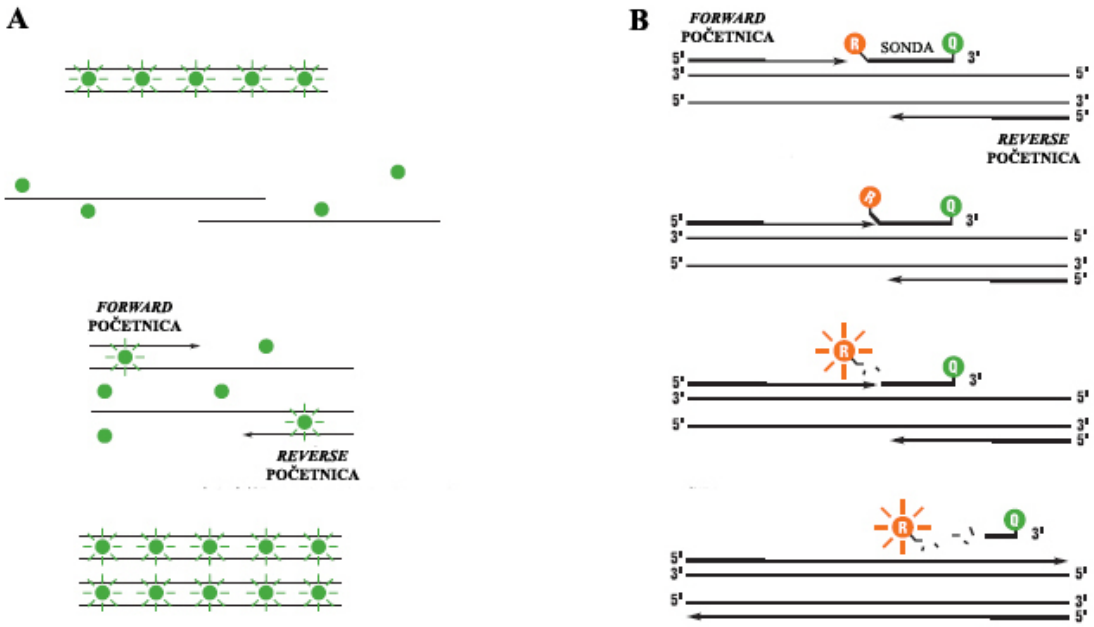


Slika 5. Lančana reakcija polimerazom sastoji se o eksponencijalne, linearne i plato-faze. Grafovi predstavljaju linearnu (A) i logaritamsku (B) ovisnost količine PCR-produkta o ciklusu (modificirano iz Yuan i sur., 2006).

SYBR Green I je mala molekula koja se veže za dvolančanu DNA (dsDNA), ili interkalacijom ili vezanjem za mali utor DNA (Applied Biosystems, 2010b). Važno svojstvo ove molekule je povećana fluoroscencija kada se veže za dsDNA, a također je važno da ne ometa tijek PCR reakcije (slika 6A). Kako se svakim ciklusom povećava broj kopija PCR-produkta, proporcionalno se povećava i razina fluoroscencije. Prednost korištenja *SYBR Green I* boje je nespecifičnost vezanja za dsDNA, odnosno ova molekula se veže za bilo koju dsDNA čije umnožavanje pratimo pa nisu potrebne specifične sonde. Nedostatak je lažno pozitivni signal, budući da se boja veže nespecifično.

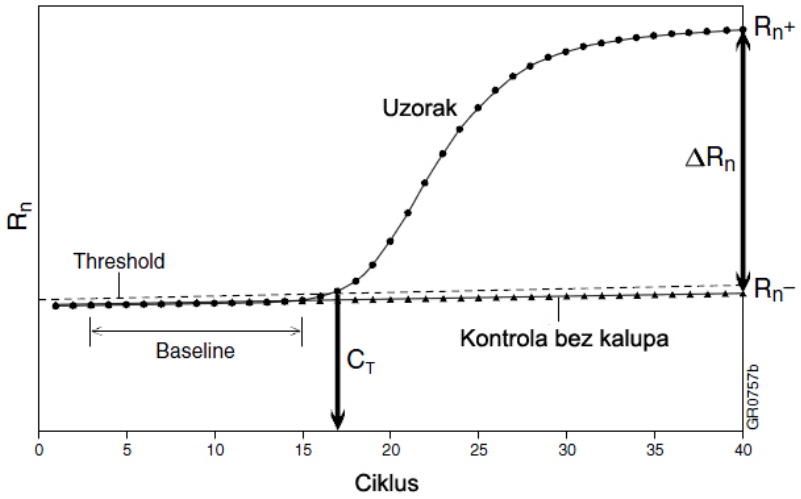
TaqMan®-sonde omogućuju detektiranje specifičnog fragmenta DNA (Applied Biosystems, 2010b). Nedostatak interkalirajućih boja je nespecifično vezanje. *TaqMan*®-sonde su fluorescentne sonde koje koriste 5'-egzonuklearnu aktivnost Taq-polimeraze za praćenje PCR produkata tijekom reakcije (slika 6B). Konstruira se specifična oligonukleotidna sonda koja se sparuje s fragmentom DNA koji želimo istraživati. Na 5' kraju sonde veže se fluorescentna (*reporter*) boja, a na 3' kraj prigušivač (*quencher*). Kada je reporter-boja u blizini prigušivača emitiranje fluorescentne svjetlosti reporter-boje je suprimirano jer dolazi do prijenosa energije zbog fluorescentne rezonancije (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET). *TaqMan*®- sonda se veže sa svojim komplementarnim slijedom na jednom od lanaca denaturirane DNA. Taq-polimeraza produljuje komplementarni lanac počevši od početnice, a kada dođe do sonde razgradi ju 5'-egzonukleaznom aktivnošću. Reporter-boja se odmiče od prigušivača i dolazi do fluorescencije. Kako se sa svakim ciklusom povećava broj kopija ciljane DNA, veže se sve više sondi koje polimeraza razgrađuje, pa se s povećanjem kopija PCR produkta proporcionalno povećava razina

fluorescencije. Vezanjem reporter-boja različitih emisijskih spektara za različite sonde omogućuje se praćenje umnažanja različitih fragmenata u istoj smjesi (*multiplex real-time* PCR).



Slika 6. Dva načina praćenja PCR produkata tijekom reakcije. A) SYBR Green I se veže za dvolančanu DNA pri čemu se povećava fluorescencija. B) Taq-polimeraza razgrađuje sondu vezanu za ciljni fragment DNA, što omogućuje udaljavanje reporter-boje (R) od prigušivača (Q), pa dolazi do povećanja fluorescencije (modificirano iz Applied Biosystems, 2010b).

Praćenje tijeka PCR reakcije vrši se detektiranjem emitirane fluorescencije. Pasivna boja (referentna boja *ROX*) je boja služi za normalizaciju (Applied Biosystems, 2010c; Applied Biosystems, 2010d). Ona ne sudjeluje u PCR reakciji i služi za normalizaciju signala reporter boje. Normalizacija je potrebna zbog pogrešaka pri pipetiranju. Vrijednost R_n je normalizirani reporter, odnosno intezitet emisije fluorescencije reporter boje podijeljen sa intezitetom emisije fluorescencije pasivne boje. R_n+ je R_n vrijednost reakcije koja sadrži kalup, a R_n- je R_n vrijednost ranih PCR ciklusa kada nema detekcije povećane fluorescencije (*baseline*) ili R_n vrijednost *real-time* PCR smjese koja ne sadrži kalup. ΔR_n je razlika R_n+ i R_n- vrijednosti, tj. (R_n+) – (R_n-) (slika 7). *Threshold* je razina pri kojoj je detektirana fluorescencija veća od pozadinske fluorescencije. *Threshold*-linija ili prag, se odabire proizvoljno, a trebala bi biti nešto iznad bazne linije (*baseline*) i u području eksponencijalnog rasta broja kopija PCR produkta (slika 7).



Slika 7. Ovisnost R_n o ciklusu. ΔR_n predstavlja razliku R_n+ i R_n-. Prikazane su *threshold*-linija, *baseline* (nema značajne promjene fluorescencije) i C_t vrijednost (modificirano iz Applied Biosystems, 2010b).

Vrijednost C_t predstavlja sjecište proizvoljne linije praga (*threshold*) i krivulje ovisnosti vrijednosti R_n o ciklusu, odnosno onaj ciklus u kojem dolazi do povećanja fluorescencije iznad pozadinske razine (slika 7). Što je C_t vrijednost niža, početna količina kalupa je veća.

Ako se koristi *SYBR Green* kao reporter-boja potrebno je napraviti krivulju mekšanja zbog stvaranja dimera početnica što utječe na rezultat zbog nespecifičnog vezanja reporter-boje.

Rezultati se mogu analizirati na sljedeći način (Applied Biosystems, 2010c):

- Apsolutna kvantifikacija – određuje se apsolutna količina DNA u uzorku uspoređivanjem sa standardnom krivuljom uzorka poznate koncentracije.
- Relativna kvantifikacija – uspoređuje se ekspresija istraživanog gena sa ekspresijom referentnog gena. Postoje dvije metode relativne kvantifikacije: metoda standardne krivulje i usporedna C_t metoda.

Kontrole korištene u lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu mogu biti endogene (DNA prisutna u svakom uzorku nakon izolacije ukupne DNA) ili egzogena (DNA poznate koncentracije naknadno dodana u uzorak).

1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Za detekciju fitoplazmi koriste se različite molekularne metode. Da bi se fitoplazme mogle detektirati potrebno je izolirati ukupnu genomsku DNA biljke za koju se sumnja da je zaražena, a uspješnost kao i osjetljivost detekcije uvelike ovisi o kvaliteti izolirane DNA. Ukupna DNA može se izolirati različitim metodama pa je moj cilj bio usporediti kako izoliranje DNA različitim metodama - komercijalnim kitovima *OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit*, te kratkom CTAB-metodom za izolaciju ukupne TNA, utječe na osjetljivost detekcije fitoplazmi u vinovoj lozi metodama ugniježđene lančane reakcije polimerazom i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Uzorci vinove loze i korova

Uzorci vinove loze (*Vitis vinifera* L.) s tipičnim simptomima koji odgovaraju simptomima fitoplazmoza te većinom asimptomatični uzorci korova prikupljeni su na različitim lokacijama po čitavoj Hrvatskoj u ljeto i jesen 2009. godine. Podaci o uzorkovanim biljakama nalaze se u tablici 1.

Tablica 1. Popis uzoraka vinove loze i korova analiziranih u ovom diplomskom radu.

Broj uzorka	Uzorkovano	Vrsta/Kultivar	Lokacija
1	4.9.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Železna gora
2	4.9.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Železna gora
3	4.9.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Železna gora
4	7.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Vukanovec
5	7.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Vukanovec
6	7.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Vukanovec
7	1.09.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Vukanovec
8	4.9.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Železna gora
9	4.9.2009.	*Clematis vitalba*	Železna gora
10	4.9.2009.	*Clematis vitalba*	Vukanovec
11	4.9.2009.	*Convolvulus arvensis*	Železna gora
12	4.9.2009.	*Portulaca oleracea*	Vukanovec
13	15.10.2009.	Vinova loza / Muškat	Momjan
14	15.10.2009.	Vinova loza / Muškat	Momjan
15	15.10.2009.	Vinova loza / Pinot	St. Fava
16	15.10.2009.	Vinova loza / Pinot	St. Fava
17	15.10.2009.	Vinova loza / Malvazija	Škudelin
18	15.10.2009.	Vinova loza / Malvazija	Šeget
19	15.10.2009.	Vinova loza / Malvazija	Šeget
20	15.10.2009.	Vinova loza / Merlot	Makale
21	15.10.2009.	Vinova loza / Merlot	Makale
22	15.10.2009.	Vinova loza / Malvazija	Pineta
23	15.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Slavonski brod
24	20.10.2009.	*Clematis vitalba*	Zagreb
25	23.10.2009.	Vinova loza / Graševina	Erdut
26	23.10.2009.	Vinova loza / Graševina	Erdut
27	23.10.2009.	Vinova loza / Graševina	Erdut
28	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Jastrebarsko
29	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Jastrebarsko
30	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Plešivica
31	29.10.2009.	Vinova loza / Pinot crni	Šibice
32	29.10.2009.	Vinova loza / Pinot crni	Šibice
33	29.10.2009.	Vinova loza / Pinot crni	Šibice

Broj uzorka	Uzorkovano	Vrsta/Kultivar	Lokacija
34	29.10.2009.	Vinova loza / Pinot crni	Vrškovac
35	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Vivodina
36	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Vivodina
37	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Ilok
38	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Ilok
39	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Ilok
40	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Ilok
41	29.10.2009.	Vinova loza / Bijeli pinot	Karanac
42	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Kamenac
43	29.10.2009.	Vinova loza / Chardonnay	Kamenac
44	16.7.2009.	*Clematis vitalba*	Novigrad
45	16.7.2009.	*Clematis vitalba*	Novigrad

2.1.2. Referentni sojevi fitoplazmi

U eksperimentalnom radu sam koristila referentne sojeve fitoplazmi kao pozitivne kontrole kod ugniježđene lančane reakcije polimerazom i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Sojevi HYDB, KVI, PLN, GSFY/2, PD, PD44 i SA-1 dobiveni su iz kolekcije Laboratorija za fitoplazmologiju prof. Assunte Bertaccini sa Sveučilišta u Bologni, Italija (http://137.204.42.130/person/collectionseptember_2003.pdf). Sojevi FD70, FD92 i PO dobiveni su iz kolekcije Odjela UMR1090 Génomique Diversité Pouvoir Pathogène Francuskog nacionalnog instituta za poljoprivredna istraživanja (INRA) i Sveučilišta u Bordeauxu 2 (https://www.bordeaux.inra.fr/umr1090/coll_isola.htm) Podaci o referentnim sojevima fitoplazmi nalaze se u tablici 2.

Tablica 2. Referentni sojevi fitoplazmi korišteni tijekom izrade diplomskog rada

Soj	Ribosomska podskupina	
HYDB	16SrI-B	*aster yellows*
KVI	16SrIII-B	*clover yellow edge*
PLN	16SrIII-B	*clover yellow edge*
FD70	16SrV-C	*flavescence dorée*
FD92	16SrV-D	*flavescence dorée*
GSFY/2	16SrX-B	*apple proliferation*
PD	16SrX-C	*pear decline*
PD44	16SrX-C	*pear decline*
PO	16SrXII-A	*stolbur*
SA-1	16SrXII-A	*stolbur*

2.1.3. Komercijalni kompleti

- *OmniPrep™ for Plant* (G-Biosciences, SAD)
    - komplet za izolaciju ukupne genomske DNA
- *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Njemačka)
    - komplet za izolaciju ukupne genomske DNA

2.1.4. Puferi i otopine

- otopina deoksiribonukleotida (dNTPs) 10 mM
    - koncentracija pojedinačnih nukleotida je 2,5 mM (dATP 2,5 mM; dCTP 2,5 mM; dGTP 2,5 mM; dTTP 2,5 mM)
    - otopinu dNTPs 10 mM sam napravila razrjeđenjem matičnih otopina nukleotida (100 mM)
    - za 200 μL dNTPs 10 mM otopine:
        - 180 μL dH_2O (deionizirana voda)
        - 5 μL dATP 100 mM
        - 5 μL dCTP 100 mM
        - 5 μL dGTP 100 mM
        - 5 μL dTTP 100 mM
- TBE-pufer (10x)
    - Tris 90 mM
    - borna kiselina 90 mM
    - EDTA 1 mM
- pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel
    - bromfenol plavo 0,25%
    - ksilencijanol fluorofosfat 0,25%
    - glicerol 30% (u vodi)
- etidijev bromid
    - otopina etidijevog bromida (0,75 μg/mL)
- CTAB-pufer (3%) 100 mL
    - CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid) 3,0 g
    - Tris 12,11 g

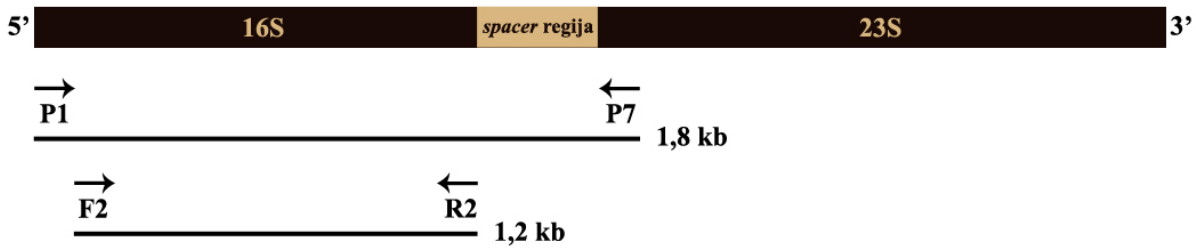
- NaCl 8,18 g
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) 0,5 M 4,0 mL
- nadopuniti s dH_2O do 100 mL
- podesiti pH na 8,0 pomoću konc. HCl

2.1.5. Enzimi i pripadajući puferi i otopine

- Taq-polimeraza i pripadajući pufer i otopina za stanardne lančane reakcije polimeraze
  - *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega, SAD)
  - *5X Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer* (Promega, SAD)
  - $MgCl_2$ 25 mM (Promega, SAD)
- mješavina za izvođenje lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu
  - *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD)

2.1.6. Početnice i sonde

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom sam koristila univerzalne fitoplazmatske početnice P1/P7 i F2/R2. Početnice P1 (Deng i Hiruki, 1991) i P7 (Smart i sur., 1996) koriste se za umnažanje fragmenta veličine 1,8 kb koji obuhvaća gotovo cijeli gen za 16S rRNA i cijelu regiju (eng. *spacer region*) između gena za 16S i 23S rRNA (slika 8), u direktnom PCR-u. Početnice F2/R2 (R16F2n/R2, Gundersen i Lee, 1996) koje umnažaju fragment veličine 1,2 kb unutar gena za 16S rRNA, koristila sam u ugniježđenom (*nested*) PCR-u koji slijedi nakon direktnog PCR-a i koristi kalup dobiven iz iste reakcije. Nukleotidni slijed početnica nalazi se u tablici 3.



Slika 8. Početnice P1/P7 umnažaju fragment veličine 1,8 kb koji obuhvaća dio gena za 16S rRNA i cijelu *spacer* -regiju između gena za 16S i 23S rRNA. Početnice F2/R2 umnažaju fragment veličine 1,2 kb unutar gena za 16S rRNA.

Tablica 3. Slijed nukleotida za početnice P1, P7, F2 i R2.

Početnica	Slijed nukleotida
P1	5’-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3’
P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3’
F2	5’- GAAACGACTGCTAAGACTGG -3’
R2	5’- TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG -3’

Za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu koristila sam tri para početnica (Pelletier i sur. 2009): par početnica za unutrašnju kontrolu vinove loze (*Vitis vinifera* L.*)* VITIS-F/VITIS-R koji umnaža *tRNA*L-F *spacer* kloroplasta vinove loze; par početnica mapFD-F/mapFD-R koji umnaža gen *map* ribosomskih podskupina 16SrV-C, D i E fitoplazmi; te par početnica mapBN-F/mapBN-R koji umnaža gen *map* ribosomske podskupine 16SrXII-A. Nukleotidni slijed početnica nalazi se u tablici 4. Kao sonde koristila sam *TaqMan® MGB™* (Applied Biosystems, SAD) sonde čiji se nukleotidni slijed nalazi u tablici 5. Sonde su otopljene u TE-puferu (8,0 pH).

Tablica 4. Slijed nukleotida za početnice VITIS-F, VITIS-R, mapFD-F, mapFD-R, mapBN-F i mapBN-R.

Početnica	Slijed nukleotida
VITIS-F	5'-AAATTCAGGGAAACCCTGGAA-3'
VITIS-R	5'-CCCTTGGTTGTTTTCGGAAA-3'
mapFD-F	5'-TCAAGGCTTCGGBGGTTATA-3'
mapFD-R	5'-TTGTTTTAGAAGGTAATCCGTGAACTAC-3'
mapBN-F	5'-ATTTGATGAAACACGCTGGATTAA-3'
mapBN-R	5'-TCCCTGGAACAATAAAAGTYGCA-3'

Tablica 5. Slijed nukleotida za sonde.

Sonde	Slijed nukleotida
VITIS-NED	**NED**-5'-CTGAGCCAAATCC-3'
mapFD-FAM	**FAM**-5'-TTGTATTTCAGTGAATGAAG-3'
mapBN-VIC	**VIC**-5'-AAACCCACAAAATGC-3'

2.1.7. Standardi za određivanje molekulske mase DNA

- *DNA Molecular Weight Marker IX* (Roche Diagnostics, Njemačka)
  - 11 fragmenata raspona 72 - 1353 bp (72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 bp)
  - smjesa fragmenata dobivena je razgradnjom DNA faga ΦX-174 restrikcijskom endonukleazom *Hae*III

- *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Fermentas, SAD)
    - 14 fragmenata raspona 250 - 10000 bp (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp)

2.1.8. Kemikalije

- 2-merkaptoetanol (Kemika, Hrvatska)
- agaroza (Sigma Chemical Co., SAD)
- etanol (Kemika, Hrvatska)
- HCl (Kemika, Hrvatska)
- izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- kloroform (Kemika, Hrvatska)

2.1.9. Pribor i uređaji

- mikropipete
    - Biohit, Finska
    - Eppendorf, Njemačka
    - CAPP, Danska
- mikroepruvete i nastavci
    - Eppendorf, Njemačka
- vaga
    - Precisa 62 A (Precisa Instruments AG, Švicarska)
- vodena kupelj
    - SW22 (Julabo, Njemačka)
- centrifuge
    - Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Njemačka)
    - Mikro-242 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
    - Multi-Spin (Biosan, Latvija)
- vrtložne miješalice (vorteksi)
    - EV-100 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
    - Bio Vortex V1 (Kisker-Biotech, Njemačka)

- spektrofotometar
    - BioPhotometer (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za izvođenje lančane reakcije polimerazom
    - 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD)
- uređaj za izvođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu
    - 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD)
- kadice za elektroforezu
    - Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)
    - Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)
- uređaj za napajanje za elektroforezu
    - Power Pac 300 (Bio-Rad, SAD)
- UV-transiluminator
    - T2202 (Sigma, SAD)
- digitalni fotoaparat
    - Panasonic DMC-FZ8 (Panasonic, Japan)

2.2. METODE

2.2.1. Izolacija genomske DNA

Iz dobivenih uzoraka vinove loze i korova izolirala sam ukupnu genomsku DNA izvođenjem tri različite metode: korištenjem 2 različita komercijalna kompleta za izolaciju ukupne genomske DNA (*OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit*) te kratkom CTAB-metodom za izolaciju TNA. Uzorci su prethodno sušeni na kalcijevom kloridu i čuvani pri temperaturi od -20 °C. Prvo sam iz svih uzoraka izolirala DNA pomoću kompleta *OmniPrep™ for Plant* te potom umnožavanjem fitoplazmatskog gena za 16S rRNA ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom utvrdila koji uzorci su zaraženi fitoplazmama. Nakon toga, odabrala sam 17 pozitivnih uzoraka čija je DNA dodatno izolirala kratkom CTAB-metodom te korištenjem kompleta *DNeasy Plant Mini Kit*.

2.2.1.1. Izolacija genomske DNA korištenjem komercijalnog kompleta OmniPrep™ for Plant

Izolirala sam DNA iz biljnog tkiva prateći upute proizvođača (G-Biosciences). Izvagala sam 50 mg isušenog biljnog tkiva čuvanog pri -20°C i stavila uzorak u mikroepruvetu volumena 2 mL te uz dodatak tekućeg dušika samljela tkivo u prah. Zatim sam u istu mikroepruvetu dodala 500 µL pufera za lizu (*Genomic Lysis Buffer*) i 5 µL otopine proteinaze K, dodatno usitnila tkivo, te nakon toga miješala na vrtložnoj miješalici 5 sekundi. Uzorak sam inkubirala 60 minuta pri 65 °C u vodenoj kupelji uz povremeno okretanje mikroepruvete s uzorkom. Nakon inkubacije uzorak sam ostavila da se ohladi na sobnu temperaturu, a zatim dodala 200 µL kloroforma te lagano promiješala okretanjem mikropruvete nekoliko puta. Zatim sam uzorak centrifugirala 10 minuta pri 14000 g u ohlađenoj centrifugi. Gornju fazu sam pažljivo otpipetirala u čistu mikroepruvetu od 1,5 mL, dodala 50 µL otopine za odvajanje komponenata (*DNA Stripping Solution*), uzorak promiješala okretanjem, a zatim ga inkubirala 10 minuta pri 60 °C. Dodala sam 100 µL otopine za precipitaciju (*Precipitation Solution*) uzorku i 20 sekundi miješala na vrtložnoj miješalici. Prilikom dodatka otopine, dolazilo je do stvaranja bijelog taloga, a ako u uzorku nije nastao talog dodala sam još 50 µL iste otopine. Uzorak sam zatim inkubirala 15 minuta na ledu te nakon toga centrifugirala 5 minuta pri 14000 g u ohlađenoj centrifugi. Supernatant sam prebacila u čistu mikroepruvetu od 1,5 mL, dodala 500 µL izopropanola i 2 µL glikogena dagnji (*Mussel Glycogen*) i promiješala okretanjem. Nakon toga, uzorak sam centrifugirala 5

minuta pri 14000 g kako bi se istaložila DNA te pažljivo bacila supernatant i talogu dodala 700 μL 70%-tnog etanola. Uzorak sam zatim dodatno centrifugirala 1 minutu pri 14000 g, ponovno pažljivo dekantirala supernatant i talog ostavila sušiti oko 30 minuta kako bi ispario etanol. Talogu sam dodala 50 μL TE-pufera i inkubirala 5-10 minuta pri 60 °C ili sat vremena na sobnoj temperatura, kako bi se talog izolirane DNA rehidrirao i dobro otopio u puferu. Uzorak izolirane DNA čuva se pri -20 °C.

2.2.1.2. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina (TNA) kratkom CTAB- metodom

Oko 250 mg suhog tkiva izvagala sam i stavila ga u hladni tarionik te tkivo usitnila uz dodatak tekućeg dušika. Zatim sam u isti tarionik dodala 3,5 mL CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid)-pufera (3%), kojem sam neposredno prije dodala 0,2% 2-merkaptoetanola (80 μL 2-merkaptoetanola u 40 mL CTAB-pufera). Tkivo sam homogenirala te 1 mL homogenata prebacila u mikroepruvetu volumena 2 mL. Uzorak sam zatim inkubirala 20 minuta pri 65 °C. Nakon toga, uzorku sam dodala 1 mL kloroforma i dobro promiješala na vrtložnoj miješalici te centrifugirala 10 minuta pri 15557 g (11000 rpm) u ohlađenoj centrifugi. Poslije centrifugiranja, gornju fazu sam pažljivo prebacila u novu mikroepruvetu od 2 mL, dodala 1 mL izopropanola te dobro promiješala. Centrifugirala sam uzorak 15 minuta pri 15557 g (4 °C). Izopropanol sam pažljivo dekantrirala i dodala 1 mL 70%-tnog etanola. Uzorak sam centrifugirala 10 minuta pri 15557 g (4 °C), a nakon toga sam pažljivo dekantirala etanol i ostavila uzorak da se osuši na zraku oko 30 minuta. Talog sam zatim otopila u 50 μL TE-pufera te tako izolirane nukleinske kiseline čuvala pri -20°C.

2.2.1.3. Izolacija genomske DNA korištenjem komercijalnog kompleta DNeasy Plant Mini Kit

Oko 50 mg suhog tkiva izvagala sam i homogenirala ga u tekućem dušiku u mikroepruveti od 1,5 mL. Homogeniranom tkivu sam dodala 400 μL pufera AP1 i 4 μL RNaze A, zatim dobro promiješala na vrtložnoj miješalici te inkubirala 10 minuta u vodenoj kupelji pri 65 °C. Nakon toga, uzorku sam dodala 130 μL pufera AP2 i inkubirala 5 minuta na ledu, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje u trajanju 6 minuta pri 15557 g (11000 rpm). Supernatant sam zatim prebacila u Qiashredder mini spin kolonu stavljenu u čistu mikroepruvetu od 2 mL te centrifugirala 3 minute pri 15557 g. Pažljivo sam otpipetirala supernatant u novu mikroepruvetu od 1,5 mL, odredila volumen (oko 400 μL) te dodala 1,5 volumena (oko 600 μL) pufera AP3/E i odmah promiješala pipetom. Odpipetirala sam 650 μL uzorka u DNeasy mini spin kolonu umetnutu u mikroepruvetu od 2 mL te centrifugirala 1

minutu pri 6000 g (6831 rpm) i bacila sakupljenu tekućinu. Ponovila sam centrifugiranje ostatka uzorka na istoj koloni. Nakon toga, mikroepruvetu za sakupljanje sam bacila, a DNeasy kolonu stavila u novu mikroepruvetu od 2 mL. Dodala sam 500 µL pufera AW i centrifugirala 1 minutu pri 6000 g. Bacila sam sakupljenu tekućinu i ponovno dodala 500 µL istog pufera te centrifugirala 3 minute pri 15557 g. Kolonu sam zatim premjestila u novu mikroepruvetu kako bi eluirala vezane nukleinske kiseline. Na kolonu sam stavila 100 µL pufera AE i inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam uzorak centrifugirala 1 minutu pri 6000 g. Izolirana DNA nalazi se u mikroepruveti te se čuva pri -20°C.

2.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Koncentracije i čistoću izolirane DNA u uzorcima sam odredila spekrofotometrijski, koristeći uređaj BioPhotometer. Iz vrijednosti A_{260}, koja mjeri apsorpciju prolazne svijetlosti valne duljine 260 nm, izračunala sam koncentraciju DNA (Sambrook i sur., 1989), a iz vrijednosti A_{260}/A_{280} (λ) čistoću izoliranih nukleinskih kiselina (nukleinske kiseline imaju maksimum apsorpcije pri 260 nm, a proteini pri 280 nm). Prije mjerenja, uzorke sam razrijedila tako da sam otpipetirala 495 µL deionizirane vode i dodala 5 µL uzorka te izmjerila vrijednosti A_{260} i A_{280} spekrofotometrom. Nakon što sam izračunala koncentracije i čistoće izolirane DNA, uzorke sam razrijedila autoklaviranom vodom na radnu koncentraciju od 20 ng/µL.

2.2.3. Umnažanje fitoplazmatskog gena za 16S rRNA lančanom reakcijom polimerazom

Prisutnost fitoplazmi u uzorcima vinove loze sam provjerila umnažanjem gena za 16S rRNA primjenom lančane reakcije polimerazom korištenjem univerzalnih fitoplazmatskih parova početnica P1/P7 i F2/R2 (tablica 3). Kasnije, istu ovu metodu koristila sam za uspoređivanje osjetljivosti detekcije fitoplazmi iz DNA izoliranih različitim metodama. Kako se fitoplazmatska DNA u smjesi izolirane genomske DNA biljke obično nalazi u relativno niskom udjelu, osjetljivost detekcije ovih patogena povećava se izvođenjem tzv. ugniježđene (*nested*) lančane reakcije polimerazom. U direktnoj lančanoj reakciji polimerazom (1. PCR) korištenjem para početnica P1/P7 umnaža se fragment veličine 1,8 kbp, koji se zatim koristi kao kalup DNA u ugniježđenoj lančanoj reakciji polimerazom (2. PCR), uz korištenje para početnica F2/R2 (slika 1). Reakcijske mješavine i uvjeti za oba PCR-a nalaze se u tablicama

6, 7 i 8, a sve reakcije sam provela u uređaju 2720 Thermal Cycler. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam DNA izoliranu iz referentnih sojeva fitoplazmi, a kao negativnu kontrolu, sterilnu dH_2O umjesto kalupa DNA.

Tablica 6. Početne i konačne koncentracije svih sastojaka mješavine za oba PCR-a, te volumen pojedinog sastojka u mješavini.

	PCR 1			PCR 2		
	$C_{početna}$	$C_{konačna}$	V/µL	$C_{početna}$	$C_{konačna}$	V/µL
Sterilna dH_2O			13,375			13,875
GoTaq Flexi Buffer	5x	1x	5	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	1,5	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs otopina	10 mM	0,2 mM	2	10 mM	0,2 mM	2
Početnica P1	5 µM	0,2 µM	1	-	-	-
Početnica P7	5 µM	0,2 µM	1	-	-	-
Početnica F2	-	-	-	5 µM	0,2 µM	1
Početnica R2	-	-	-	5 µM	0,2 µM	1
GoTaq Flexi polimeraza	5 U/µL	0,625 U	0,125	5 U/µL	0,625 U	0,125
Kalup (izolirana DNA)			1	-	-	-
Kalup (PCR 1 produkt)	-	-	-			0,5
Ukupno			25			25

Tablica 7. Uvjeti direktne lančane reakcije polimerazom (1. PCR).

	Temperatura	Vrijeme	
Početna denaturacija	95°C	2 min	
Denaturacija kalupa	95°C	1 min	35x
Prijanjanje početnica	58°C	1 min	
Produljivanje lanaca	68°C	2 min	
Završno produljivanje	68°C	10 min	

Tablica 8. Uvjeti ugniježđene lančane reakcije polimerazom (2. PCR).

	Temperatura	Vrijeme	
Početna denaturacija	94°C	1 min	
Denaturacija kalupa	94°C	1 min	35x
Prijanjanje početnica	50°C	2 min	
Produljivanje lanaca	72°C	3 min	
Završno produljivanje	72°C	7 min	

2.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Nakon što sam napravila ugniježđenu lančanu reakciju polimerazom (2. PCR) sa uzorcima izolirane DNA, provjerila sam prisutnost umnoženog fitoplazmatskog gena za 16S rRNA elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Agarozu sam otopila u TBE-puferu (0,5x). Za veliku kadicu (Wide Mini-Sub® Cell GT) potrebno je 80 mL otopine agaroze, a za malu (Mini-Sub® Cell GT) 40 mL. U 100 mL TBE-pufera (0,5x) sam otopila 1,0 g agaroze za veliki gel, odnosno 0,5 g agaroze u 50 mL pufera za mali gel. Elektroforeza se također provodi u istom TBE-puferu (0,5x). Po 5 μL molekularnog biljega (markera) *DNA Molecular Weight Marker IX* (razrijeđenog s vodom u omjeru 1:4) i svakog uzorka iz ugniježđenog PCR-a sam pomiješala s 1μL obojenog pufera za elektroforezu i nanijela u jažice na gelu. Elektroforeza je trajala 40 minuta pri konstantnom naponu od 120 V (Power Pac 300). Nakon toga sam gel 10 minuta bojala u otopini etidijevog bromida (0,75 μg/mL), stavila na transiluminator (T2202) i slikala fotoaparatom (Panasonic DMC-FZ8). Slike sam obradila programom Adobe® Photoshop® CS2.

Za elektroforezu genomske DNA sam pripremila 0,7%-tni gel agaroze. U 100 mL TBE-pufera (0,5x) sam otopila 0,8 g agaroze. U jažice sam stavila po ~2 μg genomske DNA odabranih uzoraka tako da sam iz vrijednosti koncetracija izračunala potrebni volumen izolirane DNA koji bi sadržavao ~2 μg. Kao standard molekulske mase koristila sam *1 kb DNA Ladder*. Elektroforeza je trajala 70 minuta pri naponu od 120 V.

2.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Nakon što sam odabrala uzorke za uspoređivanje metoda izolacije DNA u detekciji fitoplazmi, analizirala sam ih lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time PCR*) koristeći uvjete već opisane u radu Pelletier i sur. (2009). Koristila sam parove početnica VITIS-F/VITIS-R, mapFD-F/mapFD-R i mapBN-F/mapBN-R, te sonde VITIS-NED, mapFD-FAM i mapBN-VIC (Tablica 4). Sastav mješavine za *real-time* PCR nalazi se u tablici 9. Reakcije sam provodila u uređaju 7300 Real Time PCR System pod uvjetima iz tablice 10. Metoda *multiplex real-time* PCR omogućava istivremeno detektiranje fitoplazmi različitih skupina.

Tablica 9. Početna i konačna koncentracija, te volumen sastojaka mješavine za *real-time* PCR.

	Real-time PCR		
	$C_{početna}$	$C_{konačna}$	V/µL
TaqMan® Universal PCR Master Mix	2x	1x	12,5
Početnica VITIS-F	5 µM	0,2 µM	1
Početnica VITIS-R	5 µM	0,2 µM	1
Početnica mapFD-F	5 µM	0,2 µM	1
Početnica mapFD-R	5 µM	0,2 µM	1
Početnica mapBN-F	5 µM	0,2 µM	1
Početnica mapBN-R	5 µM	0,2 µM	1
Sonda VITIS-NED	10 µM	0,2 µM	0,5
Sonda mapFD-FAM	10 µM	0,2 µM	0,5
Sonda mapBN-VIC	10 µM	0,2 µM	0,5
Kalup (izolirana DNA)			5
Ukupno			25

Tablica 10. Uvjeti za *real-time* PCR. Dobiveni podaci o uzorcima prikupljaju se u koraku 2 faze 2 reakcije.

	Faza 1	Faza 2	
		Korak 1	Korak 2
Broj ponavljanja	1x	45x	
Temperatura	95°C	94°C	59°C
Vrijeme	10 min	1 min	1:30 min

3. REZULTATI

3.1. IZOLACIJA GENOMSKE DNA KOMERCIJALNIM KOMPLETOM *OMNIPREP™ FOR PLANT*

Iz biljnih materijala sam prvo izolira ukupnu genomsku DNA kompletom *OmniPrep™ for Plant*. Uz prikupljene uzorke vinove loze i korova, ukupnu genomsku DNA sam izolirala i iz referentnih sojeva fitoplazmi – HYDB, PLN i PD44 uzgajanih u kulturi *in vitro* u biljci madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus* L.). Uzorak HYDB uzgajan je uz prisutnost biljnog regulatora rasta indol-3-maslačne kiseline (IBA), dok su ostala dva soja uzgajana na mediju uz dodatak benzil-aminopurina (BAP). Ukupna genomska DNA standardnih uzoraka fitoplazmi je izolirana iz 200 mg svježeg tkiva u dvostrukom volumenu sastojaka protokola za izolaciju. Koncentraciju i čistoću ukupne izolirane DNA uzoraka sam izmjerila spektofotometrom, a zatim sam uzorke razrijedila sterilnom vodom do koncentracije ~20 ng/µL. Koncentracije i čistoće DNA uzoraka nalaze se u tablici 11.

Tablica 11. Izmjerene koncentracije i čistoće izolirane DNA uzoraka.

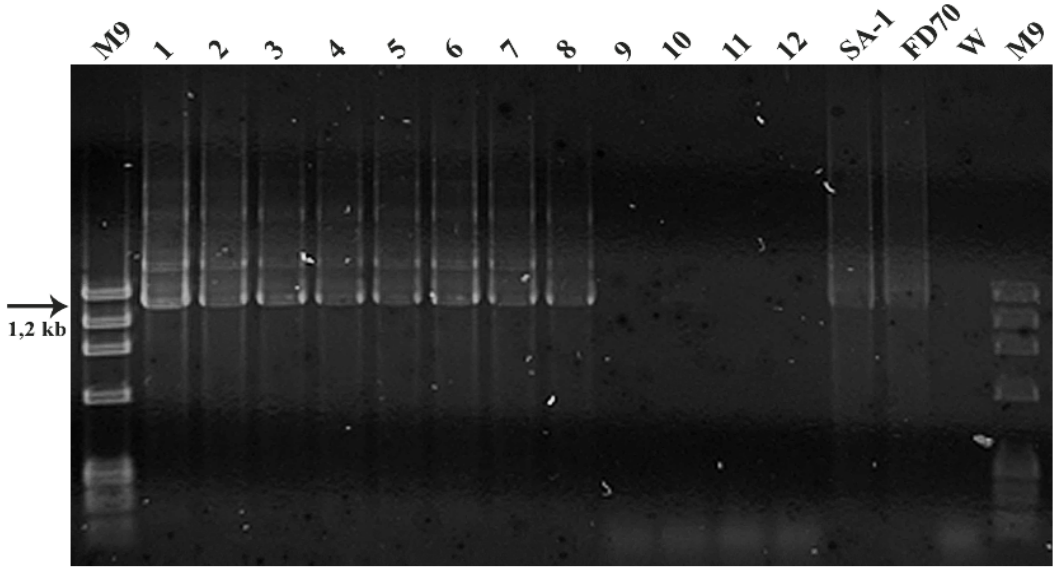
Broj uzorka	$C_{početna}$ / ng μL^{-1}	λ
1	150	1,31
2	156	1,31
3	89	1,11
4	153	1,19
5	118	1,28
6	247	1,46
7	170	1,77
8	125	1,71
9	257	1,84
10	487	1,38
10P*	1539	1,39
11	5	-
11P*	732	178
12	833	1,49
13	157	1,38
14	350	1,34
15	309	1,34
16	701	1,27
17	53	2,58
18	630	1,53
19	347	1,44
20	472	1,47
21	679	1,29
22	413	1,41
23	147	1,02
24	753	1,31

Broj uzorka	$C_{početna}$ / ng μL^{-1}	λ
25	114	1,39
26	1516	1,22
27	537	1,15
28	194	1,49
29	260	1,31
30	150	1,53
31	111	1,23
32	194	1,18
33	225	1,37
34	126	1,18
35	255	1,18
36	204	1,15
37	160	1,28
38	118	1,05
39	209	1,48
40	311	1,50
41	435	1,53
42	418	1,44
43	208	1,69
44	1923	1,18
45	309	1,61
HYDB + IBA	855	1,76
PLN	797	1,74
PD44	909	1,70

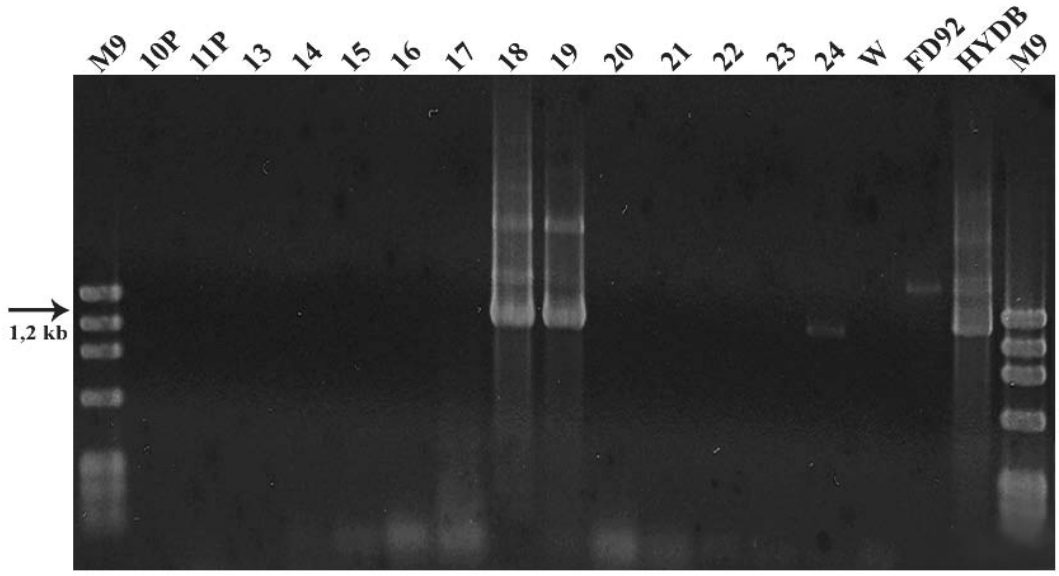
***Za uzorke 10 i 11 izolacija DNA je ponovljena.**

3.2. ANALIZA PRODUKATA UGNIJEŽĐENE LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM ELEKTROFOREZOM U AGAROZNOM GELU

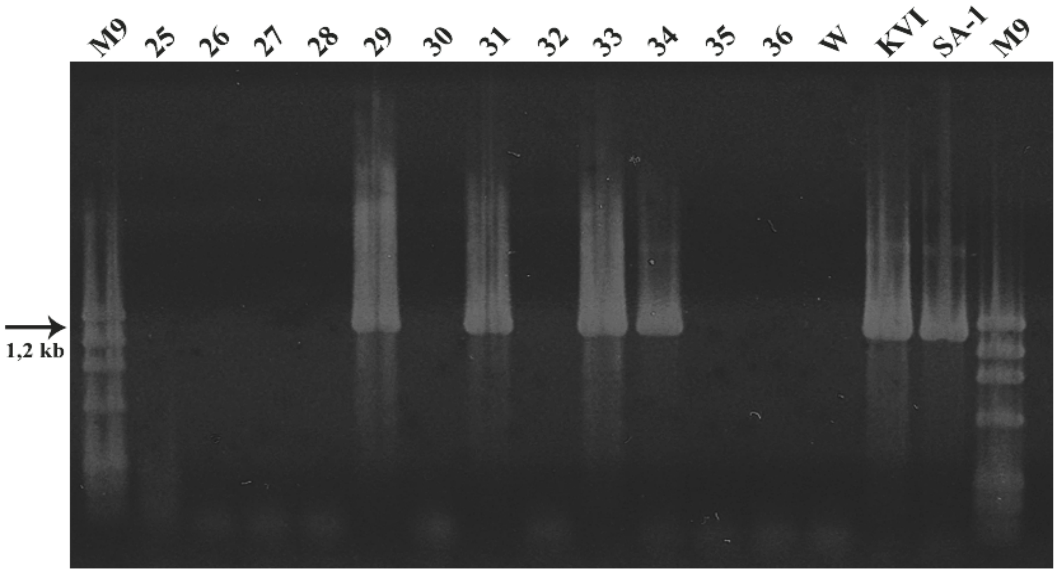
Izoliranu ukupnu genomsku DNA koncentracije ~20 ng/µL sam koristila kao kalup za ugniježđenu lančanu reakciju polimerazom (ugniježđeni PCR) u kojoj sam koristila parove početnica P1/P7 i F2/R2 specifične za fitoplazme. Ukoliko su u biljnom materijalu prisutne fitoplazme, ugniježđeni PCR će dati umnoženi fragment veličine 1,2 kb. Produkt ugniježđenog PCR-a sam analizirala u 1%-tnom agaroznom gelu. Fitoplazme su detektirane u sljedećim uzorcima: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 19, 24, 29, 31, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 42 i 43. Na agaroznom gelu se primjećuje slabo vidljiva vrpca za uzorak 10, pa sam ponovila izolaciju ukupne genomske DNA za taj uzorak. Nakon druge izolacije, analiza produkta ugniježđenog PCR-a uzoraka 10 u agaroznom gelu nije dala vidljivu vrpcu. Agarozni gelovi u kojima su analizirani produkti ugniježđenog PCR-a dani su na slikama 9, 10, 11 i 12.12.



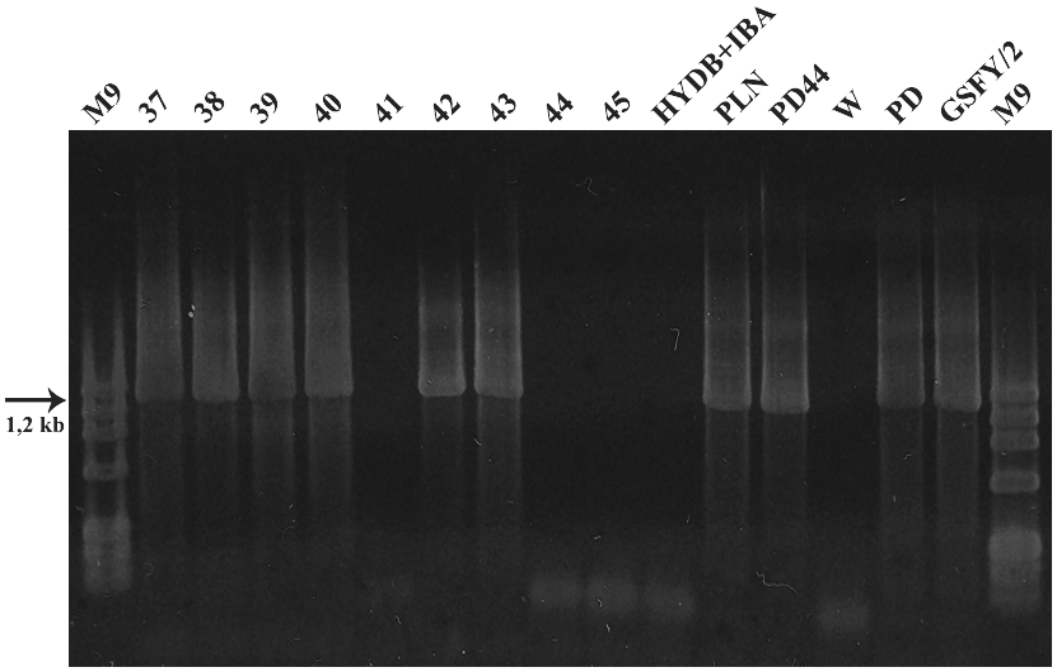
Slika 9. Prikaz rezultata elektroforeze produkata ugniježđenog PCR-a u 1% agaroznom gelu za uzorke 1 - 12. Fragment veličine 1,2 kb umnožila sam parovima početnica P1/P7 i F2/R2. M9 označava biljeg *DNA Molecular Weight Marker IX*. Kao negativnu kontrolu koristila sam vodu (W), a pozitivne kontrole su sojevi fitoplazmi SA-1 i FD70.



Slika 10. Rezultati elektroforeze PCR produkata uzoraka 13 - 24 i ponovljenih izolacija za uzorke 10 i 11 (10P, 11P). Fragment veličine 1,2 kb umnožila sam parovima početnica P1/P7 i F2/R2. Koristila sam biljeg *DNA Molecular Weight Marker IX* (M9). Voda (W) je negativna kontrola, a sojevi fitoplazmi FD92 i HYDB su pozitivne kontrole.



Slika 11. Rezultati elektroforeze PCR produkata uzoraka 25 - 36. Fragment veličine 1,2 kb umnožila sam parovima početnica P1/P7 i F2/R2. Koristila sam biljeg *DNA Molecular Weight Marker IX* (M9). Voda (W) je negativna kontrola, a sojevi fitoplazmi KVI i SA-1 su pozitivne kontrole.



Slika 12. Rezultati elektroforeze produkata ugniježđenog PCR-a uzoraka 37 - 45 i standarda HYDB, PLN i PD44. Fragment veličine 1,2 kb umnožila sam parovima početnica P1/P7 i F2/R2. Koristila sam biljeg *DNA Molecular Weight Marker IX* (M9). Voda (W) je negativna kontrola, a sojevi fitoplazmi PD i GSFY/2 su pozitivne kontrole

3.3. IZOLACIJA GENOMSKE DNA KRATKOM CTAB-METODOM I KOMERCIJALNIM KOMPLETOM *DNAESY PLANT MINI KIT*

Nakon što sam ustanovila koji su uzorci zaraženi fitoplazmama, za odabrane uzorke sam ponovila izolaciju ukupne genomske DNA kratkom CTAB-metodom za izolaciju TNA i kompletom *DNeasy Plant Mini Kit*. Za izolaciju DNA ovim dvijema metodama odabrala sam 17 uzoraka pozitivnih na fitoplazme: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 18, 19, 24, 29, 31, 33, 34, 37, 38, 42 i 43. Nakon izolacije izmjerila sam koncentraciju i čistoću DNA spektofotometrom (tablica 12).

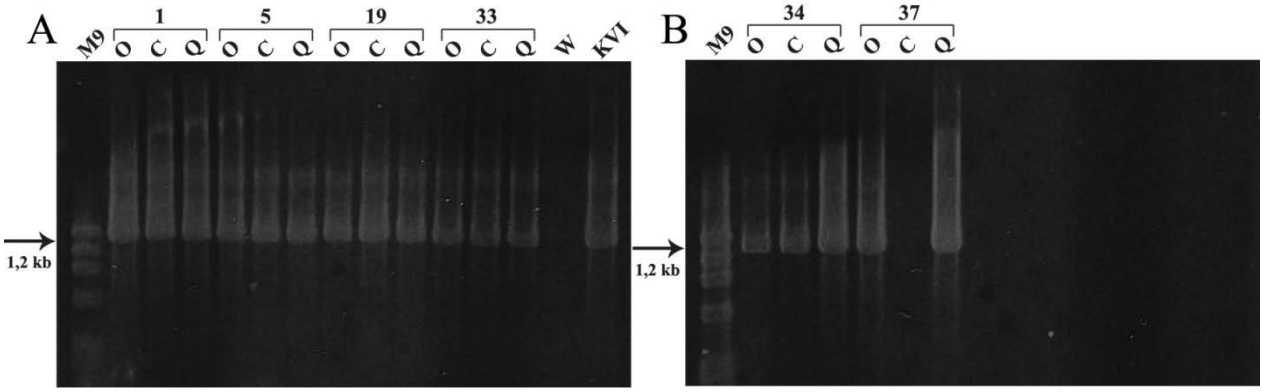
Tablica 12. Koncentracije i čistoće ukupne genomske DNA izolirane kratkom CTAB-metodom za izolaciju TNA (CTAB) i komercijalnim kompletom DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

	CTAB		QIAGEN	
Broj uzorka	**C / ng/µl**	**λ**	**C / ng/µl**	**λ**
1	906	1,72	166	1,28
2	740	1,76	173	1,27
3	791	1,55	126	1,27
4	553	1,38	188	1,25
5	889	1,41	162	1,22
10	1337	1,54	159	1,20
18	417	1,49	155	1,20
19	383	1,51	137	1,21
24	3288	1,16	112	1,30
29	273	1,40	168	1,25
31	513	1,58	125	1,12
33	470	1,50	152	1,28
34	399	1,50	96	1,27
37	1022	1,30	77	1,31
38	755	1,36	56	1,23
42	944	1,31	153	1,20
43	690	1,36	61	1,34

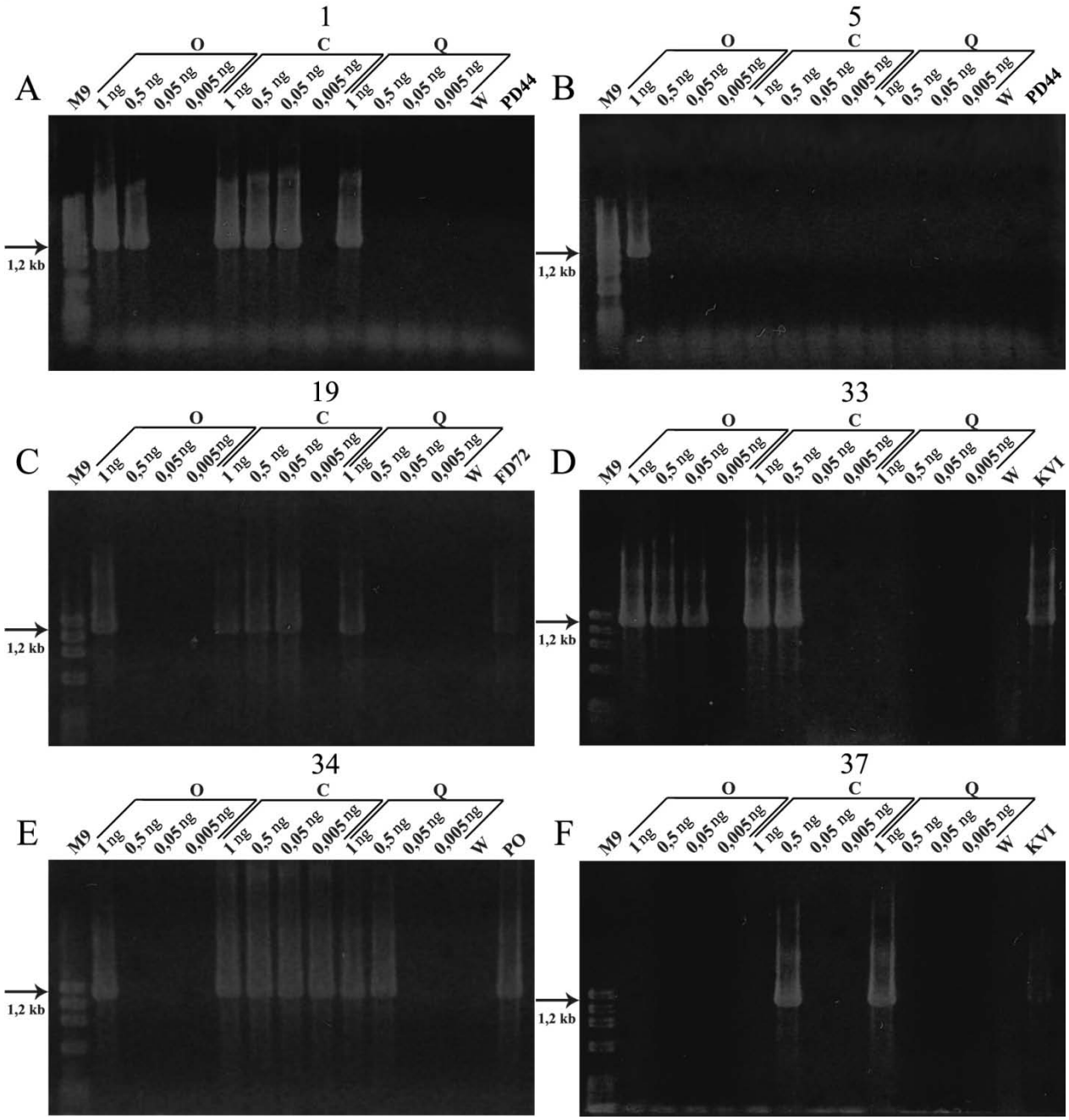
3.4. USPOREDBA OSJETLJIVOSTI DETEKCIJE FITOPLAZMI METODOM UGNIJEŽĐENE LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM

Nakon što sam izolirala DNA svim trima metodama, odabrala sam uzorke na kojima ću uspoređivati osjetljivost detekcije fitoplazmi. Odabrane uzorke vinove loze pozitivne na fitoplazme – 1, 5, 19, 33, 34 i 37, sam koristila za uspoređivanje osjetljivosti detekcije fitoplazmi ovisno metodama kojima je izolirana DNA. Za svih 6 uzoraka sam za

uspoređivanje osjetljivost detekcije koristila sljedeće ukupne količine kalupa DNA: 20 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,05 ng i 0,005 ng. Koncentracije otopina DNA korištenih kao kalup bile su su 20 ng/µL, 1 ng/µL, 0,5 ng/µL, 0,05 ng/µL i 0,005 ng / µL, što omogućuje dobivanje zadanih ukupnih količina DNA u mješavini za ugiježđeni PCR. Za ugniježđeni PCR sam koristila parove početnica P1/P7 i F2/R2 pri uvjetima opisanim u poglavlju **2.2.3.**. Dobivene PCR produkte sam analizirala u 1%-tnom agaroznom gelu (slike 13 i 14). Rezultati elektroforeze pokazuju različitu osjetljivost detekcije fitoplazmi ovisno o metodama izolacije ukupne genomske DNA iz vinove loze. Usporedba osjetljivosti prikazana je u tablici 13.



Slika 13. Analiza produkata ugniježđenog PCR-a u agaroznom gelu. Fragment veličine 1,2 kb umnožila sam parovima početnica P1/P7 te F2/R2 uz prisutnost 20 ng kalupa DNA. Analizirana je DNA uzoraka 1, 5, 19, 33, 34 i 37 dobivena izolacijom pomoću svih triju metoda – *OmniPrep™ for Plant* (O), kratka CTAB-metoda za izolaciju TNA (C) i *DNeasy Plant Mini Kit* (Q).. Koristila sam biljeg *DNA Molecular Weight Marker IX* (M9). Za negativnu kontrolu sam koristila sterilnu vodu (W), a za pozitivnu soj fitoplazmi KVI.



Slika 14. Rezultati elektroforeze produkata ugniježđenog PCR-a za uzorke 1, 5, 19, 33, 34 i 37. Fragment veličine 1,2 kb umnožila sam parovima početnica P1/P7 i F2/R2. Analizirana DNA je izolirana svim trima metodama - *OmniPrep™ for Plant* (O), kratka CTAB-metoda za izolaciju TNA (C) i *DNeasy Plant Mini Kit* (Q), a ukupne količine kalupa DNA su 1 ng, 0,5 ng, 0,05 ng i 0,005 ng. Prikazani su rezultati elektroforeze uzorka 1 (A), uzoraka 5 (B), uzoraka 19 (C), uzoraka 33 (D), uzoraka 34 (E) i uzorak 37 (F). Koristila sam biljeg *DNA Molecular Weight Marker IX* (M9). Za negativnu kontrolu sam koristila sterilnu vodu (W), a za pozitivne sojeve fitolazmi PD44, FD72, KVI i PO.

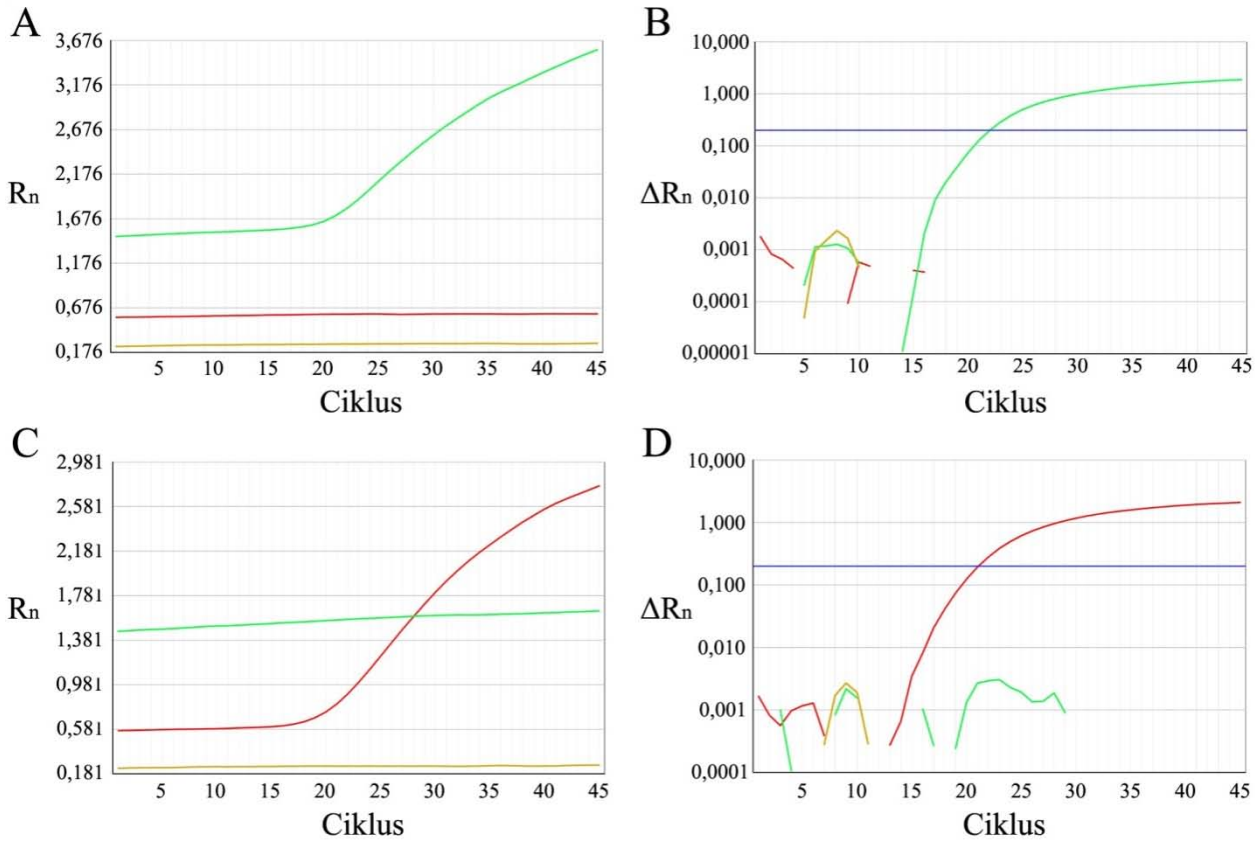
Tablica 13. Usporedba osjetljivosti detekcije fitoplazmi metodom ugniježđene lančane rekcije polimerazom ovisno o metodama izolacije genomskeDNA. Uzorci u kojima su detektirane fitoplazme su označeni znakom (+) i zelenom pozadinom, a znak (-) znači da fitoplazme nisu detektirane. Označene su ukupne količine analizirane DNA izolirane svim trima metodama.

	OmniPrep					CTAB					QIAGEN				
Količina DNA / ng Broj uzorka	20	1	0,5	0,05	0,005	20	1	0,5	0,05	0,005	20	1	0,5	0,05	0,005
1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
19	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
33	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
34	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
37	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-

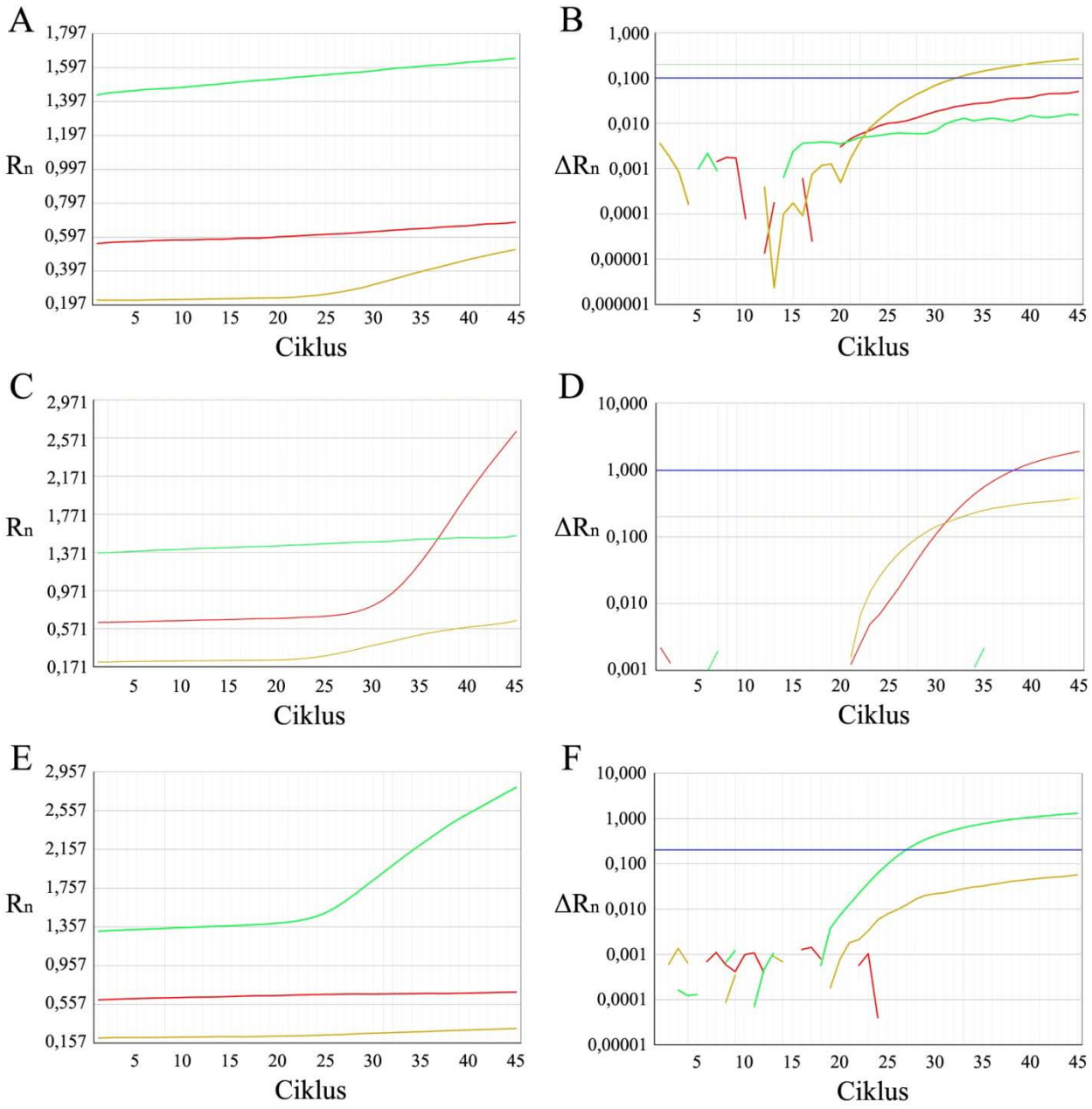
3.5. USPOREDBA OSJETLJIVOSTI DETEKCIJE FITOPLAZMI METODOM LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU

Odabrane uzorke – 1, 5, 19, 33, 34 i 37, sam analizirala i metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR). Koncentracije koje sam koristila za kalup su bile 4 ng/µL, 0,2 ng/µL, 0,1 ng/µL, 0,01 ng/µL i 0,001 ng/µL, tako da su ukupne količine analizirane DNA 20 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,05 ng i 0,005 ng. Za uzorke 1, 5 i 34 sam analizirala i ukupne količine DNA od 5 ng, 50 ng i 100 ng, no kako nije bilo značajne razlike u C_t vrijednostima, kod ostalih uzoraka analizirala sam samo donju granicu osjetljivosti. Koristila sam tri kombinacije para početnica i fluorescentno obilježene sonde: početnice VITIS-F/VITIS-R i sonda VITIS-NED za vinovu lozu; početnice mapFD-F/mapFD-R i sonda mapFD-FAM za podskupine 16SrV-C, D i E fitoplazmi; početnice mapBN-F/mapBN-R i sonda mapBN-VIC za podskupinu 16SrXII-A fitoplazmi. Kao negativnu kontrolu koristila sam sterilnu vodu. Za pozitivne kontrole koristila sam FD70 (koncentracije 6 ng/µL, tj. analizirana količina 30 ng) za 16SrV skupinu i PO (koncentracije 16 ng/µL, tj. analizirana količina 90 ng) za 16SrXII-A podskupinu. Svako razrjeđenje uzoraka sam analizirala u duplikatu, odnosno u dvije jažice, a za C_t vrijednost sam uzela prosječnu vrijednost dva dobivena rezultata. Za graničnu Ct vrijednost za detekciju 16SrV skupine ili 16SrXII-A podskupine sam odabrala $C_t = 40$; $C_t \leq 40$ vrijednosti su pozitivne na fitoplazme, a $C_t > 40$ su negativne (Pelletier i sur., 2009). Endogena kontrola vinove loze bila je prisutna u svim analiziranim uzorcima i njena C_t vrijednost bila je u rasponu 31 - 37. Srednje C_t vrijednosti

kontrola iznosile su 21,5 za FD70, odnosno 20,5 za PO. Analizom *real-time* PCR-om ustanovila sam da fitoplazme uzoraka 1, 5, 19, 33 i 37 pripadaju podskupini 16SrXII-A, a fitoplazma uzorka 34 pripada skupini 16SrV. Vrijednosti Ct analiziranih uzoraka kao i usporedba osjetljivosti detekcije fitoplazmi prikazana je u tablici 14. Kod pozitivnih kontrolna FD70 i PO, Ct vrijednosti bile su u rasponu od 18 do 22. Na slici 15 dani su primjeri grafičkog prikaza ovisnosti R_n i ΔR_n vrijednosti o ciklusu za kontrole FD70 i PO, a na slici 16 je prikazana ovisnost R_n i ΔR_n o ciklusu za zdravu lozu, te uzorake 1 i 34.



Slika 15. Primjeri grafičkih prikaza ovisnosti vrijednosti R_n i ΔR_n o ciklusu *real-time* PCR-a. Žuta linija označava sondu VITIS-NED (vinova loza), zelena linija sondu mapFD-FAM (skupina 16SrV), a crvena sondu mapBN-VIC (podskupina 16SrXII-A). Plava linija označava *threshold*. (A) i (B) Ovisnost vrijednosti R_n, odnosno ΔR_n o ciklusu za kontrolu FD70 koja pripada ribosomskoj skupini 16SrV. (C) i (D) Ovisnost vrijednosti R_n, odnosno ΔR_n o ciklusu za kontrolu PO koja pripada ribosomskojj podskupini 16SrXII-A.



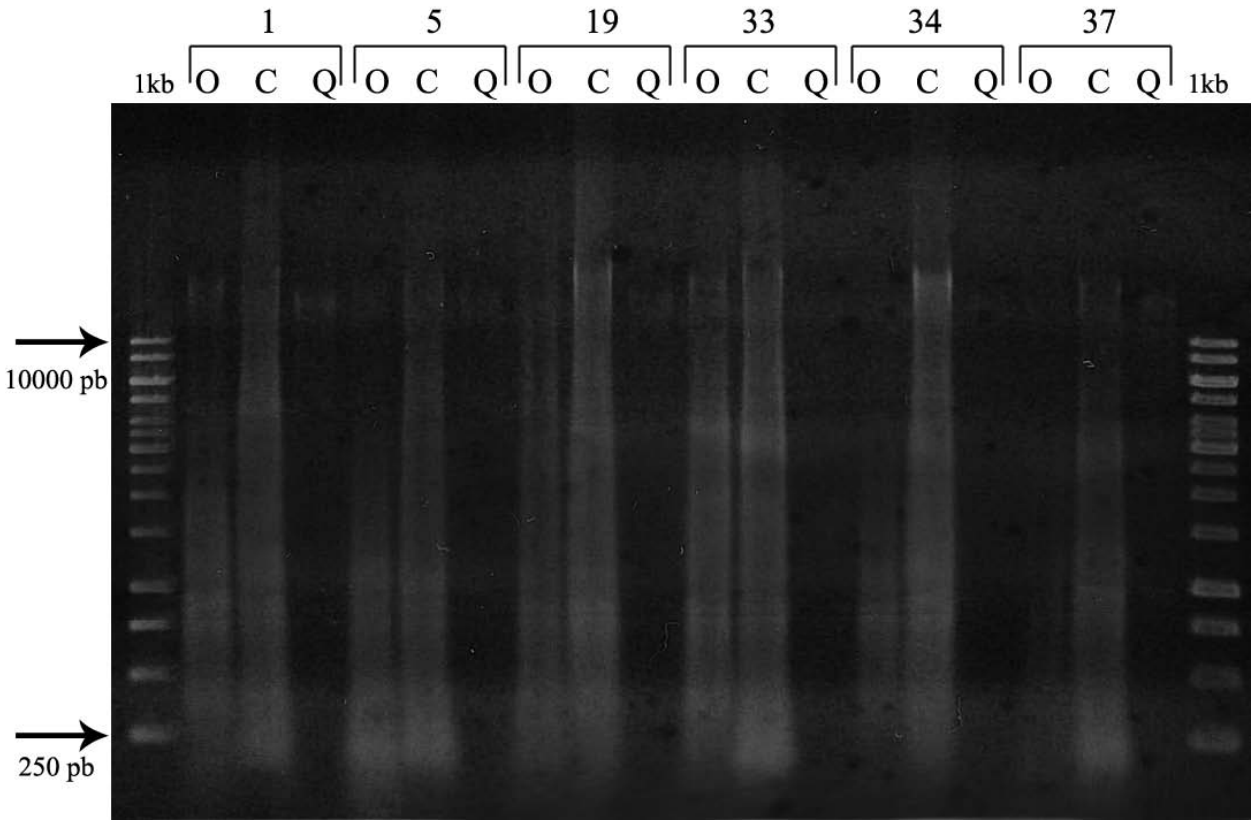
Slika 16. Primjeri grafičkih prikaza ovisnosti vrijednosti R_n i ΔR_n o ciklusu *real-time* PCR-a. Žuta linija označava sondu VITIS-NED (vinova loza), zelena linija sondu mapFD-FAM (skupina 16SrV), a crvena sondu mapBN-VIC (podskupina 16SrXII-A). Plava linija označava *threshold*. (A) i (B) Ovisnost vrijednosti R_n, odnosno ΔR_n o ciklusu za zdravu vinovu lozu. (C) i (D) Ovisnost vrijednosti R_n, odnosno ΔR_n o ciklusu za vinovu lozu zaraženu fitoplazmom ribosomalne podskupine 16SrXII-A. Prikazani su grafovi uzorka 1 izoliranog CTAB-metodom, količina DNA - 20 ng. (E) i (F) Ovisnost vrijednosti R_n, odnosno ΔR_n o ciklusu za vinovu lozu zaraženu fitoplazmom ribosomske skupine 16SrV. Prikazani su grafovi uzorka 34 izoliranog CTAB-metodom, količina DNA - 20 ng.

Tablica 14. Usporedba osjetljivosti detekcije fitoplazmi metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu ovisno o metodama izolacije genomske DNA. Skupina označava pripadnost ribosomskoj skupini/podskupini fitoplazmi. Rezultati su prikazani kao prosječne C_t vrijednosti. Uzorci s vrijednostima $C_t \leq 40$ su pozitivni na fitoplazme, a $C_t > 40$ negativni. Oznaka (-) znači da nije bilo detekcije fitoplazmi. Zelena podloga služi za lakšu usporedbu osjetljivosti detekcije – što je C_t vrijednost niža nijansa zelene podloge je tamnija.

		OmniPrep					CTAB					QIAGEN				
Količina DNA / ng		20	1	0,5	0,05	0,005	20	1	0,5	0,05	0,005	20	1	0,5	0,05	0,005
Broj uzorka	Skupina															
1	16SrXII-A	33,5	35,5	37,3	40	-	31,7	34,5	35,7	38,4	-	32,5	38,2	39	-	-
5	16SrXII-A	36,2	-	38,9	-	-	39,5	35,8	38,4	-	-	35,5	36,7	40	-	-
19	16SrXII-A	36,3	36,5	-	37,2	-	27,4	27,1	28,2	31,5	35,3	31,3	32,1	33,6	36,4	38,6
33	16SrXII-A	37	39,3	40,5	-	-	33,8	36,1	38,9	41,2	39,6	32,8	37,5	40,1	-	-
34	16SrV	32,2	35,2	40,7	-	-	28,4	37,6	37,6	39,5	-	30,9	36	39,7	-	-
37	16SrXII-A	31,7	32,8	33,7	34,5	36,6	36,9	40	-	-	-	30,4	34,7	35,2	38,2	39,7

3.6. ANALIZA GENOMSKE DNA VINOVE LOZE ELEKTROFOREZOM U AGAROZNOM GELU

U agaroznom gelu sam elektroforezom analizirala ukupnu genomsku DNA vinove loze izoliranu različitim metodama. U jažice sam stavljala ~2 µg DNA. Rezultati elektroforeze ukazuju da su većina fragmenata DNA dobivena CTAB-metodom izolacije manji fragmenti, dok izolacija genomske DNA komercijalnim kompletima *OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit* daje veći udio fragmenata većih od 10 kbp. Znači da se CTAB-metodom izolacije dobiva više manjih fragmenata DNA tj. DNA je više fragmentirana, dok se izolacijom komercijalnim kompletima dobiva više većih fragmenata, odnosno izolirana DNA je manje fragmentirana. Rezultati elektroforeze genomske DNA prikazani su na slici 17.



Slika 17. Elektroforeza genomske DNA vinove loze uzoraka 1, 5, 19, 33, 34 i 37. Ukupna DNA je izolirana komercijalnim kompletima *OmniPrep™ for Plant* (O) i *DNeasy Plant Mini Kit* (Q), te CTAB-metodom (C). Izolacija DNA komercijalnim kompletima daje više većih fragmenata DNA, dok CTAB-metoda izolacije daje više manjih fragmenata. Koristila sam biljeg *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (1kb).

4. RASPRAVA

Fitoplazme su biljni patogeni koji uzrokuju nekoliko stotina bolesti u različitim biljnim vrstama. U važnim poljoprivrednim vrstama smanjuju urod i uzrokuju velike gubitke pa je stoga od velike važnosti brza i pouzdana detekcija fitoplazmama zaraženih biljaka. Molekularne metode predstavljaju glavni način detekcije i identifikacije fitoplazme, a među njima su važne ugniježđeni PCR i *real-time* PCR. Pelletier i sur. (2009) su razvili brz i pouzdan način detektiranja skupina 16SrV i 16SrXII fitoplazmi metodom *triplex real-time* PCR-a, te je ta metoda korištena i u ovom radu.

Iz 45 prikupljenih uzoraka vinove loze i korova sam izolirala ukupnu genomsku DNA pomoću *OmniPrep™ for Plant* komercijalnog kompleta. Provela sam ugniježđenu lančanu reakciju polimerazom za sve uzorke koristeći parove početnica P1/P7 i F2/R2. Ukupno su 22 uzorka bila pozitivna na prisutnost fitoplazmi; uzorci 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 18, 19, 24, 29, 31, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 42 i 43. Odabrala sam 17 uzoraka koji su bili pozitivni na fitoplazme (uzorci 1, 2, 3, 4, 5, 10, 18, 19, 24, 29, 31, 33, 34, 37, 38, 42 i 43), te sam njihovu ukupnu genomsku DNA izolirala kratkom CTAB-metodom za izolaciju TNA i komercijalnim kompletom *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN*)*. Iz tablica 11 i 12 se primjećuje kako se izoliranjem ukupne genomske DNA kratkom CTAB-metodom kod većine uzoraka dobiva nešto čišća DNA nego izoliranjem DNA komercijalnim kompletima *OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit*. Za dodatne analize i ispitivanje osjetljivosti detekcije fitoplazmi odabrala sam 6 uzoraka vinove loze u kojima je dokazana prisutnost fitoplazmatskog gena za 16S rRNA: 1, 5, 19, 33, 34 i 37.

Metodama ugniježđenog PCR-a korištenjem univerzalnih fitoplazmatskih parova početnica P1/P7 i F2/R2 i *real-time* PCR-a korištenjem specifičnih početnica za istovremenu detekciju fitoplazmi skupina 16SrXII-A i 16SrV, analizirala sam spomenute uzorke i to uz prisutnost sljedećih količina kalupa DNA: 20 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,05 ng i 0,005 ng. Ustanovljeno je da fitoplazme detektirane u uzorcima 1, 5, 19, 33 i 37 pripadaju 16SrXII-A ribosomskoj podskupini fitoplazmi, a fitoplazma uzorka 34 pripada 16SrV skupini. Kako se i pretpostavljalo, pri manjim količinama kalupa DNA u reakciji, fitoplazme je bilo teže detektirati, odnosno, osjetljivost je bila slabija. Iz tablice 13, gdje su prikazani rezultati analize ugniježđenim PCR-om, primjećuje se kako se za uzorke gdje je količina kalupa DNA iznosila 20 ng fitoplazme detektiraju u svim uzorcima, osim u uzorku 37 gdje je DNA izolirana CTAB-metodom. No u tom uzorku fitoplazme su detektirane metodom *real-time* PCR (tablica 14), što ukazuje na to da je u ovom slučaju *real-time* PCR osjetljiviji od tradicionalnog PCR-a. Pri manjim količinama kalupa DNA fitoplazme se teže detektiraju, kako se i može

primjetiti iz tablica 13 i 14. Iako je pri količini kalupa DNA od 0,005 ng ugniježđeni PCR dao pozitivan rezultat samo za jedan uzorak (19-CTAB), *real-time* PCR dao je pozitivan rezultat za pet uzoraka (19-CTAB, 19-QIAGEN, 33-CTAB, 37-*OmniPrep* i 37-QIAGEN), što opet potvrđuje veću osjetljivost *real-time* PCR-a.

Analiza uzoraka ugniježđenim PCR-om dala je pozitivne rezultate u 14/30 (46,7%) uzoraka gdje DNA izolirana *OmniPrep*-kompletom, zatim 18/30 (60%) pozitivnih rezultata uzoraka DNA izolirane CTAB-metodom, te 11/30 (36,7%) pozitivnih rezultata uzoraka QIAGEN- izolacije. Pri tome je donja granica osjetljivosti detekcije kod uzoraka čija je DNA izolirana kompletom *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) bila pri količini kalupa od 0,5 ng, kod uzoraka čija je DNA izolirana kompletom *OmniPrep™ for Plant* pri količini kalupa 0,05 ng, a kod CTAB-izolacije 0,005 ng.

Analizom uzoraka *real-time* PCR-om je kod *OmniPrep*-izolacije dobiveno 18/30 (60%) pozitivnih rezultata (C_t vrijednost je manja od 40), kod CTAB-metode dobiveno je 22/30 (73,3%) pozitivnih rezultata, a kod QIAGEN-izolacije 21/30 (70%) pozitivnih rezultata. Dok se kod pozitivnih rezultata uzoraka *OmniPrep* i QIAGEN-izolacija C_t vrijednosti nalaze između 30-40, kod pozitivnih rezultata CTAB-izolacije za 4 uzorka je C_t vrijednost bila manja od 30.

Svi prikazani rezultati ukazuju na to da je detekcija fitoplazmatskih gena ugniježđenim PCR-om te metodom *real-time* PCR bila osjetljivija i efikasnija kod uzoraka čija je DNA izolirana kratkom CTAB-metodom, nego kod uzoraka DNA izolirane komercijalnim kompletima *OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit*. Razlog tome može biti u činjenici da je izolacija CTAB-metodom kod istih uzoraka davala DNA veće čistoće i ukupnog prinosa u odnosu na onu izoliranu komercijalnim kompletima. Isto tako, izolacijom ukupne genomske DNA CTAB-metodom dobivaju se manji fragmenti DNA nego izolacijom komercijalnim kompletima koji su optimizirani za manju fragmetanciju DNA, odnosno dobivanje što više većih fragmenta (slika 17).

5. ZAKLJUČAK

Uspoređivanjem triju metoda izolacije DNA (komercijalni kompleti *OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit*, te kratka CTAB-metoda za izolaciju TNA) pokazala sam kako DNA izolirana kratkom CTAB-metodom daje najveću osjetljivost te efikasnost detekcije fitoplazmi metodama ugniježđene i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Razlog tome može biti činjenica da se izolacijom CTAB-metodom dobivaju manji fragmenti DNA nego kada se nukleinske kiseline izoliraju komercijalnim kompletima, a izolacija CTAB-metodom također daje DNA veće čistoće nego DNA izolirana kompletima *OmniPrep™ for Plant* i *DNeasy Plant Mini Kit*.

Također sam potvrdila kako je *real-time* PCR osjetljivija metoda od tradicionalnog PCR pa se *real-time* PCR-om mogu detektirati fitoplazme iz vrlo male količine korištenog kalupa izolirane DNA, za razliku od tradicionalnog PCR gdje su za detekciju kod većine uzoraka potrebne veće količine kalupa DNA u reakciji. Isto tako, osim osjetljivosti, prednost *real-time* PCR-a je i u tome što nije potrebna elektroforeza na agaroznom gelu što omogućuje izbjegavanje rada s opasnim kemikalijama (etidijev bromid) i skraćuje vrijeme potrebno za analizu, a u ovakvoj izvedbi tzv. *triplex real-time* PCR, omogućena je i istovremena detekcija fitoplazmi iz dvije različite skupine.

6. LITERATURA

Achaz, G., Coissac, E., Netter, P., Rocha, E.P. (2003): Associations between inverted repeats and the structural evolution of bacterial genomes. *Genetics* **164**: 1279-1289.

Bai, X., Correa, V. R., Toruno, T. Y., Ammar, E-D., Kamoun, S., Hogenhout, S. A. (2009): AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 18-30.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., 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**: 3682-3696.

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**: 249-258.

Bertaccini, A. (2007): Phytoplasmas: Diversity, taxonomy, and epidemiology. *Front Biosci* **12**: 673-689.

Botti, S., Bertaccini, A. (2003): Variability and functional role of chromosomal sequences in 16SrI-B subgroup phytoplasmas including aster yellows and related strains. *J Appl Microbiol* **94**: 103-110.

Bové, J. M. (1997): Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wien Klin Wochenschr* **109** :604-612.

Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *Eur J Plant Pathol* **107**: 695-700.

Chen, J. C., Chang, C. J., Jarret, R., Gawel, N. (1992b): Isolation and cloning of DNA fragments from mycoplasmalike organism associated with walnut witches'-broom disease. *Phytopathology* **82**: 306-309.

Chen, T.-A., Lei, J. D., Lin, C. P. (1992a): Detection and identification of plant and insect mollicutes. U: Whitcomb R. F. & Tully, J. G. (ur.) *The Mycoplasmas, Vol. 5*. New York: Academic Press, str. 393-424.

Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci* **10**: 526-535.

Clark, M. F., Morton, A., Buss, S. L. (1989): Preparation of MLO immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLO-associated antigens. *Ann Appl Biol* **114**: 111-124.

Daire, X., Boudon-Padieu, E., Berville, A., Schneider, B., Caudwell, A. (1992): Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence doree mycoplasma-like organism (MLO). *Ann Appl Biol* **121**: 95-103.

Dalbey, R. E., Kuhn, A. (2000): Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 51-87.

Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J Microbiol Methods* **14**: 53-61.

Doi, Y. M., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **33**: 259-266.

Ebbert, M.A., Nault, L.R. (1994): Improved overwintering ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) vectors infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae). *Environ Entomol* **23**: 634-644.

Economogu, A. (1999): Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**: 315-320.

Fos, A., Danet, J. L., Zreik, L., Garnier, M., Bové, J. M. (1992): Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasmalike organism in plants and insects and to identify a vector in *France Plant Dis* **76**: 1092-1096.

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Jr (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 166-70.

Gasparich, G. E. (2002): Spiroplasmas: evolution, adaptation and diversity. *Front Biosci* **7**: d619-d640.

Gundersen, D. E., Lee, I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* **35**: 114-151.

Guo, Y. H., Cheng, Z.-M., Walla, J. A. (1998): Amplification and RFLP analysis of 23S ribosomal DNA from phytoplasmas. *Phytopathology* **88**: S35.

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

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 Microbiol* **54**: 1243-1255.

Jomantiene, R., Davis, R. E., Maas, J., Dally, E. L. (1998): Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 269-277.

Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2001): Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Mol Plant–Microbe Interact* **14**: 1043-1050.

Kirkpatrick B., Smart C., Gardner S., Gao J.-L., Ahrens U., Mäurer R., Schneider B., Lorenz K.-H.,Seemüller E., Harrison N., Namba S., Daire X. (1994): Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Lett* **3**: 228-229.

Kirkpatrick, B. C., Fisher, G. A., Fraser, J. D., Purcell, A. H. (1987): Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasmalike organism. *Science* **238**: 197-200.

Kollar, A., Seemüller, E. (1989): Base composition of the DNA of mycoplasmalike organisms associated with various plant diseases. *J Phytopathol* **127**: 177-186.

Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R., Seemüller, E. (2008): The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus* Phytoplasma mali'. *BMC Genomics* **9**: 306.

Kuske, C. R., Kirkpatrick, B. C. (1992): Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasmalike organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 226-233.

Lee, I. M., Zhao, Y., Bottner, K. D. (2005): Novel insertion sequence-like elements in phytoplasma strains of the aster yellows group are putative new members of the IS*3* family. *FEMS Microbiol Lett* **242**: 353-360.

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**: 87-91.

Lee, I.-M., Davis, R. E. (1992): Mycoplasmas which infect plants and insects. U: Maniloff, J., McElhansey, R. N., Finch, L. R., Baseman, J. B. (ur.) *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology. str. 379-390.

Lee, I.-M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal, D. E. (2000): Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Ann Rev Microbiol* **54**: 221-254

Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, I. M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1153-1169.

Lee, I.-M., Hammond, R. W., Davis, R. E., Gundersen, D. E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathology* **83**: 834-842.

Lefol, C., Caudwell, A., Lherminier, J., Larrue, J. (1993): Attachment of the Flavescence doree pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Ann Appl Biol* **123**: 611-622.

Liefting, L. W., Havukkala, I., Andersen, M. T., Lough, T. J., Beever, R. E. (2006): The complete genome sequence of '*Candidatus* Phytoplasma australiense'. U: *Proceedings of*

the 16th Congress of the International Organization for Mycoplasmology 2006. Cambridge, International Organization for Mycoplasmology, str. 43.

Lim, P. O., Sears, B. B. (1992): Evolutionary relationships of a plantpathogenic mycoplasmalike organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J Bacteriol* **174**: 2606-2611.

Lim, P.-O., Sears, B. B. (1989): 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasmalike organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J Bacteriol* **171**: 5901-5906.

Madden, L., Nault, L. R. (1983): Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. *Phytopathology*, **73**: 1608-1614.

Madden, L., Nault, L. R., Heady, S. E., Styer, W. E. (1984): Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of *Dalbulus* leafhopper vectors. *Ann Appl Biol* **105**: 431-441.

Maniloff, J. (2002): Phylogeny and evolution. U: Razin, S., Herrmann, R. (ur.) *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publisher, str. 31-43.

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

Montano, H. G., Davis, R. E., Dally, E. L., Hogenhout, S., Pimentel, J. P., Brioso, P. S. T. (2001): '*Candidatus* Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1109-1118.

Nakashima, K., Kato, S., Iwanami, S., Murata, N. (1993): DNA probes reveal relatedness of rice yellow dwarf mycoplasmalike organisms (MLOs) and distinguish them from other MLOs. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1206-1212.

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2004): Reductive evolution suggested

from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genet* **36**: 27-29.

Pelletier C., P. Salar, J. Gillet, G. Cloquemin, P. Very, X. Foissac, S. Malembic Maher. (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**: 87-95.

Razin, S., Yoev, D., Naot., Y. (1998): Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1094-1156.

Rudzinska-Langwald, A., Kaminska, M. (1999): Cytopathological evidence for transport of phytoplasma in infected plants. *Acta Soc Bot Pol* **68**: 261-266.

Schneider, B., Gibb, K. S., Seemuüller, E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* **143**: 3381-3389.

Schneider, B., Seemüller, E. (1994): Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3409-3412.

Sears, B. B., Kirkpatrick, B. C. (1994): Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms. *ASM News* **60**: 307-312.

Sears, B. B., Lim, P.-O., Holland, N., Kirkpatrick, B. C., Klomparens, K. L. (1989): Isolation and characterization of DNA from a mycoplasmalike organism. *Mol Plant–Microbe Interact* **2**: 175-180.

Siller, W., Kuhbandner, B., Marwitz, R., Petzold, H., Seemüller, E. (1987): Occurrence of mycoplasma-like organisms in parenchyma cells of *Cuscuta odorata* (Ruiz-Et-Pav). *J Phytopathol* **119**: 147-159.

Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., Blanchard, A. (2007): Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol* **158**: 754-766.

Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B. C. (1996): Phytoplasma-specific PCR

primers based on sequences of 16S- 23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2988-2993.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., Whitman, W. B. (2002): Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1043-1047.

Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 846-849.

Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S., van Dijl, J.M. (2000): Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Microbiol. *Mol Biol Rev* **64**: 515-547.

Tran-Nguyen, L. T. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K. S. (2008): Comparative genome analysis of "*Candidatus* Phytoplasma *australiense*" (subgroup *tuf*-Australia I; *rp*-A) and "*Ca*. Phytoplasma *asteris*" Strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol* **190**: 3979-3991.

Webb, D. R., Bonfiglioli, R. G., Carraro, L., Osler, R., Symons, R. H. (1999): Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology* **89**: 894-901.

Weintraub, P. G., Beanland, L. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* **51**: 91-111.

Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., Van Etten, J., Maniloff, J., Woese, C.R. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* **171**: 6455-6467.

Woese, C. R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.

Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C.N., Jr. (2006): Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7**: 85.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. New York, Garland Science. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4 (pristupljeno 23. svibnja 2010.)

Applied Biosystems by Life Technologies. (2010a): *Real Time PCR vs Traditional PCR.* Dostupno na: http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-vs-traditional-pcr.html (pristupljeno 24. svibnja 2010.)

Applied Biosystems by Life Technologies. (2010b): *TaqMan® and SYBR® Green Chemistries*. Dostupno na: http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html (pristupljeno 23. svibnja 2010.)

Applied Biosystems by Life Technologies. (2010c): *Essentials of Real Time PCR*. Dostupno na: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042485.pdf (pristupljeno 24. svibnja 2010.)

Applied Biosystems by Life Technologies. (2010d): *TaqMan® Universal PCR Master Mix*. Dostupno na: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042996.pdf (pristupljeno 24. svibnja 2010.)

Assunte Bertaccini (2004), IRPCM, Sveučilište u Bologni, Italija. Dostupno na: http://137.204.42.130/person/collectionseptember_2003.pdf (pristupljeno 23. ožujka 2010.)

Brown, T.A. (2002): *Genomes, 2nd edition*. Oxford, Wiley-Liss. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=genomes (pristupljeno 23. svibnja 2010.)

Maixner, M. (2006): *Grapevine yellows - current developments and unsolved questions.* Dostupno na: http://www.icvg.ch/data/maixner.pdf (pristupljeno 24. svibnja 2010.)

NCBI taxonomy database: Candidatus Phytoplasma. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=33926&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f (pristupljeno 20. travnja 2010.)

Odjel UMR1090 Génomique Diversité Pouvoir Pathogène (2007): *La collection phytoplasmes*. Francuski nacionalni institut za poljoprivredna istraživanja (INRA) i Sveučilište u Bordeauxu 2. Dostupno na: https://www.bordeaux.inra.fr/umr1090/coll_isola.htm (pristupljeno 23. ožujka 2010.)