

Multigenska karakterizacija izolata bakterije 'Candidatus Phytoplasma asteris' iz uljane repice (*Brassica napus* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg.)

Glumac, Biljana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:945079>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Biljana Glumac

Multigenska karakterizacija izolata bakterije '*Candidatus Phytoplasma asteris*' iz uljane
repice (*Brassica napus* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg.)

Diplomski rad

Zagreb, 2019

Ovaj diplomski rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

Zahvale

Veliko hvala dragoj mentorici izv.prof.dr.sc. Martini Šeruga Musić na velikom strpljenju, potpori, stručnom vodstvu u izradi ovog diplomskog rada.

Hvala i mojoj obitelji na potpori svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Multigenetska karakterizacija izolata bakterije '*Candidatus Phytoplasma asteris*' iz uljane repice
(*Brassica napus* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg.)

Biljana Glumac

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fitoplazme (rod '*Candidatus Phytoplasma*') su bakterije bez stanične stijenke koje parazitiraju u floemu biljaka i stanicama kukaca te ih nije moguće uzgajati u čistoj kulturi *in vitro*. Fitoplazme imaju iznimno reducirane genome (680 - 1600 kb) i nedostaju im mnogi esencijalni geni za različite metaboličke putove. U svom životnom ciklusu obavezno izmjenjuju dva domaćina – biljku i kukca koji je ujedno i vektor. Dok kod kukaca najčešće ne izazivaju nikakve smetnje, njihov učinak na biljke je često vrlo štetan. U biljkama se zadržavaju unutar floema što im osigurava unos potrebnih metabolita za preživljavanje i umnažanje. Bolesti proliferacije uljane repice često se povezuju se s infekcijom unutarstaničnim fitogenim bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*'. Budući da ove bakterije nije moguće uzgojiti u čistoj kulturi *in vitro*, dokaz prisutnosti bazira se isključivo na molekularnim metodama. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bila identifikacija te multigenetska tipizacija izolata fitoplazme '*Ca. P. asteris*' dobivenih iz simptomatičnih uzoraka uljane repice prikupljenih u Zagrebu na eksperimentalnom zemjištu Agronomskog fakulteta. Zarazu fitoplazmatskom vrstom '*Ca. P. asteris*' dokazala sam PCR/RFLP analizom gena za 16S rRNA, a filogenetska analiza fitoplazmatskog gena za 16S rDNA iz izolata simptomatične uljane repice potvrdila je rezultate PCR/RFLP klasifikacije te pripadnost vrsti '*Ca. P. asteris*' kao i u prethodno identificiranim fitoplazmama na istom domaćinu. Analiza još tri genska lokusa izvan 16S rRNA gena nije samo potvrdila pripadnost podskupini I-B ribosomske skupine *Aster Yellow*s i vrsti '*Ca. P. asteris*', nego je po prvi puta pružila i detaljnu molekularnu karakterizaciju nekog izolata fitoplazme iz uljane repice. .

(41 stranica, broj slika 16, broj tablica 10, broj literalnih navoda 79 , jezik: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: fitoplazma, uljana repica, 16S rRNA, filogenetska analiza

Voditelj: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv.prof

Ocjenitelji: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv.prof

Doc. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Dr. sc. Ines Radanović, izv.prof

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Multigene characterization of "*Candidatus Phytoplasma asteris*" isolate from oilseed rape
(*Brassica napus* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg.)

Biljana Glumac

Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

Phytoplasmas (genus '*Candidatus Phytoplasma*') are bacterial pathogens that cause numerous diseases in plants. Because of their small size and lack of a cell wall they are affiliated to the class *Mollicutes*. Phytoplasmas have extremely reduced genomes (680 - 1600 kb) and lack many essential genes for different metabolic pathways. Life cycle of phytoplasma involves two hosts – plants and insects. Although in insects they usually do not cause negative effects, their effect on plants is often harmful. In the infected plants phytoplasmas retain within phloem which ensures them to get required metabolites for growth and multiplication. Rapeseed proliferation diseases are often associated with infection with the intracellular phytopathogenic bacteria of the genus '*Candidatus Phytoplasma*'. Since these bacteria cannot be grown in pure *in vitro* culture, detection and diagnosis are based mainly on molecular methods. Therefore, the aim of this study was the identification and multigene typing of '*Ca. P. asteris*' phytoplasma obtained from symptomatic oilseed rape samples collected in Zagreb on the experimental plot of the Faculty of Agriculture. The infection with the '*Ca. P. asteris*' phytoplasma species was detected by PCR/RFLP gene analysis of 16S rRNA. Phylogenetic analysis of the phytoplasma 16S rDNA gene from isolates of symptomatic oilseed rape confirmed the results of PCR/RFLP classification and affiliation to the '*Ca. P. asteris*' species, as in the previously identified phytoplasma isolates from the same host. The analysis of three more genetic loci outside the 16S didn't only confirm belonging to the subgroup I-B of the Aster Yellows group and '*Ca. P. asteris*' species, but also provided detailed molecular characterization of an oilseed rape phytoplasma isolate for the first time.

(41 pages, number of pictures 16, number of tables 10, number of literal citations 79, language: Croatian)

The work is stored in a central biological library.

Keywords: physoplasm, rapeseed, 16S rRNA, phylogenetic analysis

Supervisor: Martina Šeruga Musić, PhD, Assoc. Prof

Reviewers: Martina Šeruga Musić, PhD, Assoc. Prof

Vesna Petrović Peroković, PhD, Assoc. Prof

Ines Radanović, PhD, Assoc. Prof

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	FITOPLAZME	1
1.2.	KLASIFIKACIJA I EVOLUCIJA FITOPLAZMI.....	2
1.3.	MULTIGENSKA TIPIZACIJA (MLST).....	5
1.4.	GENOM FITOPLAZMI.....	6
1.5.	<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris	9
1.6.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
2.	MATERIJALI I METODE	11
2.1.	MATERIJALI.....	11
2.1.1.	Biljni materijali	11
2.1.2.	Referentni sojevi	11
2.1.3.	Komercijalni kompleti.....	11
2.1.4.	Početnice	11
2.1.5.	Pribor i uređaji.....	13
2.1.6.	Puferi i otopine	13
2.2.	METODE.....	15
2.2.1.	Izolacija ukupne genomske DNA iz uzoraka biljnog tkiva.....	15
2.2.2.	Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA	16
2.2.3.	Lančana reakcija polimerazom (PCR)	16
2.2.4.	Elektroforeza u agaroznom gelu	21
2.2.5.	Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) fitoplazmatskih gena za 16S rRNA.....	21
2.2.6.	Filogenetske analize	22
3.	REZULTATI.....	24
3.1.	SIMPTOMI.....	24
3.2.	Analiza fragmenta gena 16S rRNA	26
3.2.1.	Analiza umnoženog fragmenta gena za 16S rRNA elektroforezom u agaroznom gelu	26

3.2.2.	RFLP analiza umnoženog fragmenta gena za 16S rRNA	27
3.2.3.	Filogenetska analiza gena za 16S rRNA	28
3.3.	Analiza fragmenta gena <i>secY</i>	29
3.3.1.	Analiza elektroforeze na agaroznom gelu umnoženih gena <i>secY</i>	29
3.3.2.	Filogenetska analiza gena <i>secY</i>	30
3.4.	Analiza dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine	31
3.4.1.	Analiza dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine elektroforezom u agaroznom gelu	31
3.4.2.	Filogenetska analiza dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine... 32	
3.5.	Analiza gena <i>tufB</i>	33
3.5.1.	Analiza umnoženog gena <i>tufB</i> elektroforezom u agaroznom gelu.....	33
3.5.2.	Filogenetska analiza umnoženog gena <i>tufB</i>	34
4.	RASPRAVA.....	35
5.	ZAKLJUČCI	37
6.	LITERATURA.....	38
7.	ŽIVOTOPIS	41

POPIS KRATICA

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

dNTPs – deoksiribonukleotidi

dH₂O - deionizirana voda

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

map- gen za metionin-aminopeptidazu

MLO - mikoplazmama slični organizmi (eng. *mycoplasma like-organism*)

MLST - multigenska tipizacija (eng. *multi-locus sequence typing*)

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

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

RFLP - metoda poliformizma duljine restrikcijskih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*)

RNA - ribonukleinska kiselina

rp operon – operon za ribosomske proteine

secY- gen za membransku podjedinicu proteinske translokaze

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

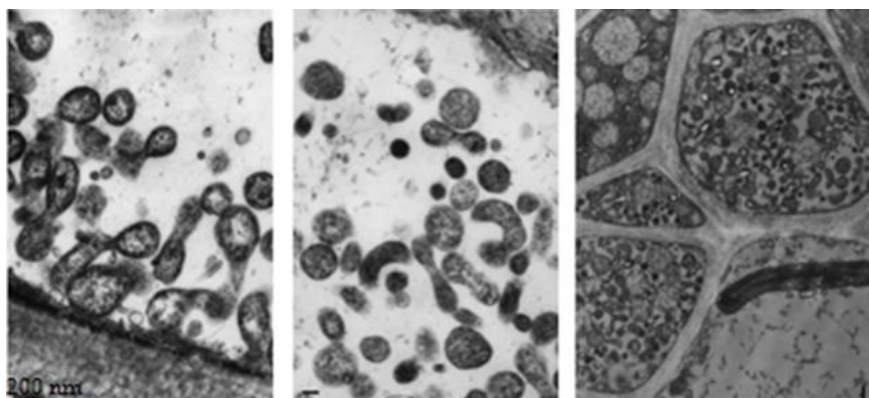
TE-pufer - pufer Tris-a i EDTA

tufB - gen za elongacijski faktor EF-Tu

1. UVOD

1.1. FITOPLAZME

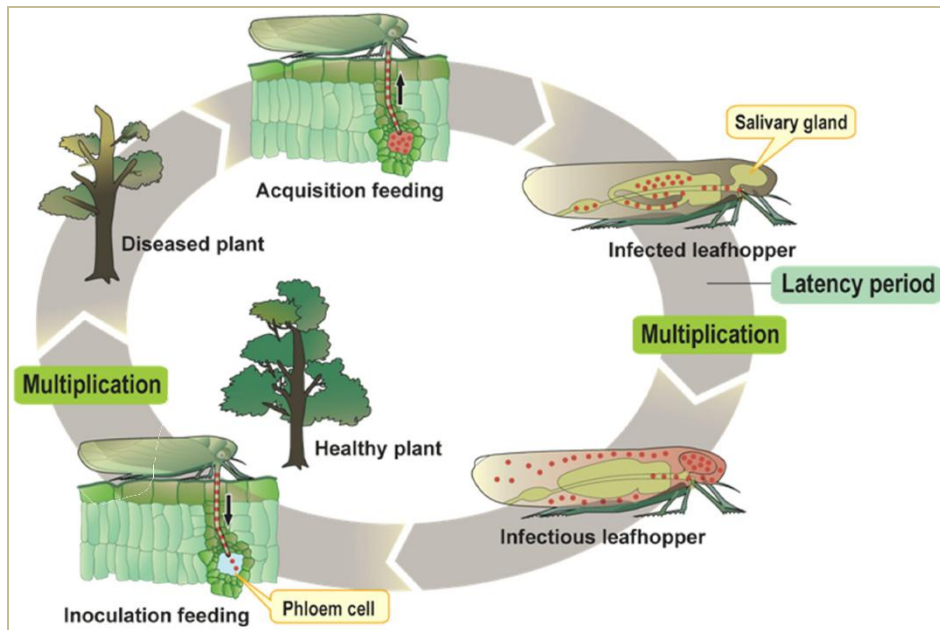
Fitoplazme (rod '*Candidatus Phytoplasma*') su unutarstanične patogene bakterije bez stanične stijenke (Slika 1) čiji su domaćinski organizmi i biljke i kukci. Uzrokuju više stotina gospodarski značajnih bolesti širom svijeta, uključujući i one s velikim ekonomskim štetama na važnim poljoprivrednim kulturama kao što su kukuruz, šećerna repa, krumpir, vinova loza, riža, mnoge voćke kao i ukrasno bilje (Lee i sur. 1998). Zaražene biljke pokazuju širok raspon simptoma kao što su žućenje, sterilnost cvjetova, virescencija, zaostajanje u razvoju, promjene boje cvijetova, nekroze i općenito propadanje biljnog materijala. Nastanjuju floem, gdje imaju direktan pristup asimilatima koje biljka stvara i tako ometaju normalno funkcioniranje i razvoj biljaka (Bertaccini i Duduk 2009, Marcone 2014). Nije ih moguće uzgojiti u čistoj kulturi *in vitro* te su otkrivene tek 1967. godine transmisijom elektronskom mikroskopijom (Doi i sur. 1967), do kada su se uzročnicima žutica biljaka smatrali virusi.



Slika 1. Elektronsko-mikroskopske snimke stanica fitoplazmi u prerezima sitastih cijevi zaraženih biljaka (preuzeto i prerađeno iz Bertaccini i Duduk 2009).

Vektori za prijenos ovih patogena su kukci, najčešće iz porodica Cicadellidae, Cixiidae i Fugoroidae. Smatra se da njihov životni ciklus odvija na sljedeći način (Slika 2): fitoplazme iz zaražene biljke putem floemskog soka ulaze u kukca koji se njime hrani, a nakon toga se probavnom sustavu kukca fitoplazme umnažaju i putuju hemolimfom do unutarnjih organa uključujući i razne žlijezde, pa tako i žlijezde slinovnice te se iz slinovnica šire na novu biljku kad kukac promjeni mjesto hranjenja. Ovo je horizontalni način prijenosa. No, dokazan je i vertikalni način prijenosa tj. širenje s kukca roditelja na potomke (Alma i sur.

1997). Također, fitoplazme se mogu prenositi i putem reznica, rizoma ili cijepljenjem zaraženim materijalom (Marcone 2014).



Slika 2. Shematski prikaz ciklusa fitoplazmi kroz promjenu domaćina iz dva kraljevstva – biljke i kukca. Fitoplazme su na slici prikazane kao crvene točkice. Preuzeto iz Oshima i sur. 2011 (<http://journals.plos.org/plosone/article/figure/image?size=large&id=10.1371/journal.pone.0023242.g001>).

1.2. KLASIFIKACIJA I EVOLUCIJA FITOPLAZMI

Fitoplazme su svrstane u razred *Mollicutes* (Tablica 1) unutar kojeg se nalaze mikoplazme, ureaplazme, spiroplazme, aheloplazme i ostali rodovi bakterija koje nemaju staničnu stijenku (Marcone 2014). Pripadnici ovog roda imaju svojstvo pleomorfnosti (mogu mijenjati svoj oblik), zbog nedostatka stanične stijenke. Uglavnom su okruglog oblika (Slika 1), a neke poprimaju i filametozni oblik, posebno tijekom ranih faza infekcije biljke (Lee i sur. 2000). Bakterije ovog razreda potječu od zajedničkog Gram-pozitivnog pretka, najvjerojatnije bakterija roda *Clostridium* ili *Lactobacillus* spp.

Opsežne filogenetske analize pokazale su da fitoplazme čine zasebnu filogenetsku granu razvijenu iz aholeplazmatske grane koja je evolucijski udaljena od ostalih grana u razredu (Kube i sur. 2012). Smatra se da otprilike prije 470 milijuna godina unutar razreda *Mollicutes* došlo je do podjela u dva ogranka: ogranak AAA (*Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*), te ogranak SEM (*Spiroplasma*, *Entemoplasma*, *Mycoplasma*), kojem

pripadaju spiroplazme i mikoplazme, a redukcija genoma ogranaka se odvijala neovisno jedan o drugom (Lee i sur. 2000. Bai i sur. 2004).

Dok većina pripadnika SEM ogranaka parazitira na ljudima i životinjama, fitoplazme su biljni patogeni. Sve spiroplazme parazitiraju u kukcima, osim tri vrste koji su biljni patogeni i prenose s kukcima, kao i fitoplazme. Zbog velike filogenetske udaljenosti između spiroplazmi i fitoplazmi smatra se da je to primjer konvergentne evolucije (Gasparich 2002).

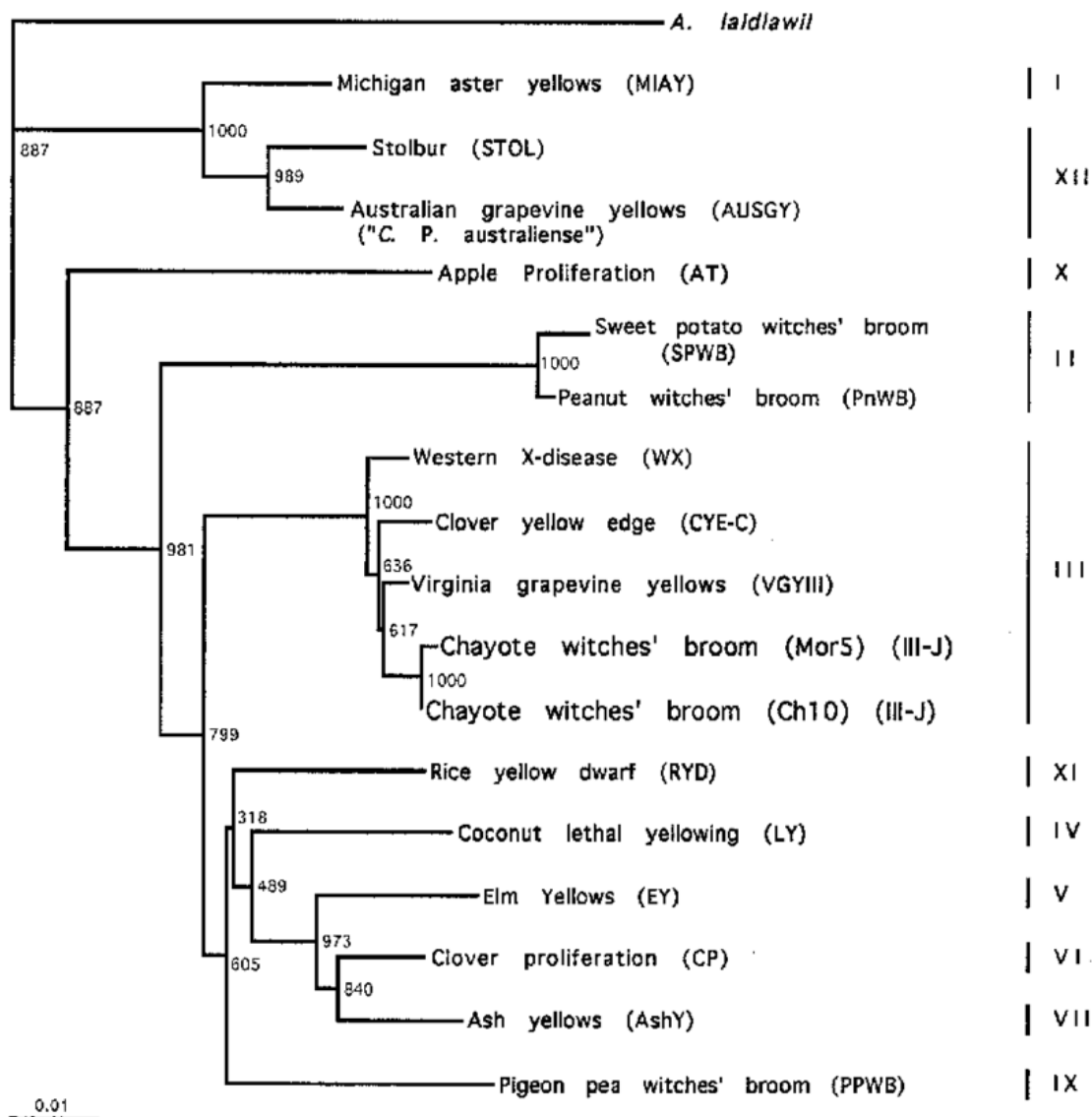
Fitoplazme dijele neke karakteristike sa aholeplazmama kao što je i struktura rRNA-operona. U svojoj intergenskoj regiji (eng. *Internal transcribed spacer*, ITS) regiji, između gena za 16S i 23S rRNA, sadrži gene za tRNA (Razin i sur., 1998; Ho i sur., 2001). Dok između fitoplazmi i mikoplazmi postoji razlika u broju kopija rRNA-operona: većina fitoplazmi sadrži dva rRNA-operona, dok većina mikoplazmi samo jedan (Bertaccini, 2007).

Prije klasifikacije fitoplazmi u zasebni rod '*Candidatus Phytoplasma*' (IRPCM 2004), ustanovljena je podjela fitoplazmi u 16Sr ribosomske skupine. Skupine su napravljene uz pomoć metode polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP, od engleskog *restriction fragment length polymorphism*) visoko konzerviranog fitoplazmatskog gena za 16S rDNA koji je prethodno umnožen metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, od engleskog *polymerase chain reaction*). Filogenetskom analizom sekvenci gena 16S rDNA otkriveno je približno 20 glavnih filogenetskih skupina (Lee i sur. 1998,2000; Wei i sur. 2007). U novijim istraživanjima, prema računalnoj simulaciji RFLP metode gena 16S rDNA broj skupina je proširen na 32 (označenih rimskim brojevima: 16SrI – 16SrXXXII) i 100 podskupina (označenih s velikim slovima: na primjer V-A, V-B, V-C, V-D itd.) (Dickinson i sur. 2013.; Nejat i sur. 2013; Marcone 2014; Marcone i sur. 2016). Primjer filogenetskog stabla s nekima od skupina prikazan na slici 3. Današnja klasifikacija fitoplazmi prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija fitoplazmi

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=33926&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>, pristupljeno 25.11.2018.)

Sistematska kategorija	Naziv
Supercarstvo	Bacteria
-	Terrabacteria
Koljeno	Tenericutes
Razred	Mollicutes
Red	Acholeplasmatales
Porodica	Acholeplasmataceae
Rod	<i>Candidatus</i> Phytoplasma



Slika 3. Filogenetsko stablo konstruirano metodom susjednog povezivanja (*neighbour-joining*; NJ) sekvenci gena 16S rDNA 17 fitoplazmi i *Acholeplasma laidlawii* kao pripadnik druge skupine istog razredaza ukorjenjivanje stabla. Rimski brojevi označavaju 16S rDNA RFLP skupine. Pripadnost različitim skupinama je prikazana rimskim brojevima s desne strane stabla (preuzeto iz Montano i sur. 2000).

1.3. MULTIGENSKA TIPIZACIJA (MLST)

Fitoplazmatska filogenija i dijagnostika je prvobitno bila temeljena samo na 16S rRNA genu. Međutim, filogenetske analize temeljene isključivo na ovom visoko konzerviranom genu nisu dovoljne kada se definiraju podskupine i razlike u sojevima unutar podskupina. Tako se u posljednje vrijeme, uz 16S rRNA gen, počinju koristiti manje konzervirani geni kao

dodatni molekularni markeri što omogućuje preciznije razlikovanje blisko srodnih sojeva (Foissac i sur. 2013; Lee i sur. 2010; Plavec i sur. 2015, 2018a).

Općenito, upotreba metode multigenске tipizacije (MLST, od engleskog *multi-locus sequence typing*) je prvi put predložena 1998. godine (Maiden i sur. 1998). MLST je metoda koja koristi nukleotidne sekvence više, većinom konstitutivnih (*housekeeping*), gena za tipizaciju izolata prokariota, a osobito je pogodna za tipiziranje bakterijskih patogena (Hodgetts i Dickinson 2010). Obično se izabiru konstitutivni geni jer relativno sporo evoluiraju i pouzdanije pokazuju srodstvene odnose. Dijelovi genoma koji brzo evoluiraju nisu pogodni za MLST. Međutim, za epidemiološke svrhe, bolja slika stanja može se dobiti sa spajanjem konstitutivnih i varijabilnijih gena u metodi MLST. Neki od varijabilnih gena koji se koriste u svrhu genotipizacije fitoplazmi su geni koji kodiraju za membranske proteine. (Urwin i Maiden 2003; Plavec i sur. 2015).

Jedna od prednosti metode MLST također je i ta da se prikupljeni podaci mogu učiniti dostupnima učitavanjem na razne internetske stranice u virtualne kolekcije izolata te se tako omogućuje međunarodno uspoređivanje izolata i poboljšava epidemiološko promatranje bakterijskih patogena. Ovi podaci se mogu iskoristiti na različite načine. Mogu poslužiti za identificiranje patogena, praćenje širenja patogena i za razvoj novih pristupa za pokušaj sprečavanja budućeg širenja bolesti (Urwin i Maiden 2003). MLST se također može koristiti za istraživanje evolucijskih veza između bakterija, kao i za korištenje sekvenca različitih gena i njihovu kombinaciju, u nekom računalnom programu, kako bi izgradili fitoplazmatsko filogenetsko stablo (James i sur. 2006; Keeling i sur. 2005). Tako su primjerice, u multigenskoj tipizaciji fitoplazme FD do sada su se najčešće koristili geni *map* (gen za metionin-aminopeptidazu), *secY* (gen za membransku podjedinicu proteinske translokaze), *vmpA* (gen za varijabilni membranski protein) te regija *uvrB-degV* (gen za podjedinicu B ekscinukleaze ABC i protein DegV porodice) (Plavec i sur. 2015).

1.4. GENOM FITOPLAZMI

Genom fitoplazmi uglavnom se sastoji od jednog kružnog ili linearnog kromosoma i nekoliko malih plazmida, iako postoje i vrste koje nemaju plazmide (Oshima i sur., 2013). Veličina genoma varira od 0,53 Mpb do 1,35 Mpb (Neimark i Kirkpatrick 1993; Marcone i sur., 1999) te ima niski sadržaj G+C baza (od 23-29 mol%) (Kollar i Seemüller, 1989; Sears i sur., 1989). Iako nemogućnost uzgoja fitoplazmi u čistoj kulturi uvelike otežava istraživanja genoma fitoplazmi, do sada su u potpunosti sekvencirani i opisani genomi šest

fitoplazmatskih sojeva: 3 soja fitoplazme '*Candidatus Phytoplasma asteris*' – onion yellows M soj (OY-M; Oshima i sur. 2004), Aster yellows-witches broom soj (AY-WB; Bai i sur. 2006) te soj MBSP (Orlovskis i sur. 2017), 2 soja (PAa i SLY) fitoplazme '*Ca. P. australiense*' (Tran-Nguyen i sur. 2008, Andersen i sur., 2013) te soja AT fitoplazme '*Ca. P. mali*' (Kube i sur. 2008). Osim toga, postoji i više nepotpunih genomskih sekvenci (Chung i sur. 2013, Chang i sur. 2015, Fisher i sur. 2016, Šeruga Musić i sur. 2019). Za soj AY-WB utvrđeno je da ima čak 4 plazmida, soj OY-M dva, a soj AUSGY jedan plazmid, dok primjerice kod soja AT vrste '*Ca. Phytoplasma mali*' nije zabilježen niti jedan izvankromosomski element (Bai i sur., 2006; Tran-Nguyen i sur., 2008; Kube i sur., 2012). Nadalje, kromosomi svih sekvenciranih sojeva su kružni, izuzev soja AT iz vrste '*Ca. Phytoplasma mali*' čiji je kromosom linearan. To je izrazito neobična odlika nekarakteristična za bakterije, a zabilježena je i kod vrsta '*Ca. P. prunorum*' i '*Ca. P. pyri*' (Kube i sur., 2008). Daljnim komparativnim analizama sekvenciranih genoma potvrđene su opće genomske karakteristike fitoplazmi: mala veličina genoma (0,601-0,879 Mbp), niski sadržaj G+C baza (21,4-27,7%), redukcija u broju metaboličkih gena, postojanje dva rRNA operona. Unatoč malom i reduciranom genomu, fitoplazmatski kromosom sadrži značajan broj otvorenih okvira čitanja (Open Reading Frame ili ORF) prisutnih u više kopija (Oshima i sur., 2004; Bai i sur., 2006; Tran-Nguyen i sur., 2008). ORF-ovi su uglavnom organizirani u grupe (eng. *clusters*) koje se nazivaju „moguće pokretne jedinice“ ili Potential Mobile Units (PMUs). Primjerice, u genomu fitoplazme AY-WB, PMUs i njima slične regije čine između 10,2% i 14,1% genoma (Bai i sur., 2006). Najveći među njima je PMU1 koji u svojoj strukturi sadržigene za transpozazu (*tra5*) te gene za proteine uključene u replikaciju (*ssb*, *dnaB* i *dnaG*), sintezu (*tmk*) popravak i rekombinaciju (*himA*) kao i gene za membranske i sekrecijske proteine te proteine nepoznate funkcije (Bai i sur., 2006; Hogenhout i Šeruga Musić, 2010). Na krajevima PMU1 nalaze se velike inverzne sekvence pa je pretpostavka da PMU1 ima odlike replikativnog transpozona (Bai i sur., 2006; Hogenhout i sur., 2008; Toruño i sur., 2010). U genomu AY-WB postoje još manje degenerirane verzije PMU1 kojima nedostaju pojedini ORF-ovi ili su potencijalni pseudogeni (Bai i sur., 2006, Toruño i sur., 2010).

Činjenica da u genomu fitoplazmi postoji značajna redukcija u genima za osnovne metaboličke puteve s jedne strane i prisustvo značajnog broja PMU-ova i njima nalik sljedova s druge strane, ukazuje na iznimnu važnost PMU-ova za fitoplazme. Pretpostavka je da PMU-ovi igraju značajnu ulogu u evoluciji fitoplazmatskog genoma te prilagodbi fitoplazmi na biljne domaćine i kukce (Hogenhout i sur., 2008). Raspodjela PMU-ova u genomu fitoplazmi nije nasumična, već dolazi do njihovog udruživanja u slijedove s tandemskim i višestrukim

ponavljanjima (Bai i sur., 2006; Hogenhout i Šeruga Musić, 2010). Ta područja podložnija su preraspodjeli genoma (Bai i sur., 2006), što potvrđuje tezu da velike regije ponavljajuće DNA imaju destabilizirajući učinak na genom, budući da dolazi do delecija, inverzija i duplikacija (Hogenhout i sur., 2008).

S druge strane, genomske analize su pokazale da otprilike 40% otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frame*, ORF) u fitoplazmama ne pokazuju značajnu sličnost sa sekvencama koje se nalaze u bazi podataka GenBank, a među njima oko 200 gena su evolucijski očuvani u genomima OY i AYWB (Bai i sur., 2006). Ti jedinstveni geni su potencijalno dobri kandidati za molekularne markere u determinaciji i preciznijoj klasifikaciji fitoplazmi. Trenutno se kao dodatni molekularni markeri najčešće koriste geni za ribosomske proteine (Lim i Sears, 1992; Gundersen i sur., 1994; Martini i sur., 2007) te neribosomski geni, primjerice *tufB* (Schneider i sur., 1997; Langer i Maixner, 2004), *vmp1* (*stolH10*) (Cimerman i sur., 2009; Fialová i sur., 2009; Pacifico i sur., 2009), *secY* (Lee i sur., 2006; Arnaud i sur., 2007; Cimerman i sur., 2009; Fialová i sur., 2009; Lee i sur., 2010) i *stamp* (Fabre i sur., 2011).

Gen *tufB* je evolucijski očuvan gen koji kodira za elongacijski faktor Tu (EF-Tu) važan u procesu translacije (Filer i Furano, 1980). U ranijim analizama s pripadnicima razreda Mollicutes koje je moguće uzgojiti *in vitro* te ostalim bakterijama, pokazao se kao vrijedan marker u diferencijaciji vrsta i različitih sojeva unutar određene vrste (Yogev i sur., 1988). Istraživanja koja su proveli Schneider i suradnici 1997. godine pokazala su da je sličnost na temelju nukleotidne sekvence između povezanih fitoplazmi između 87,8 i 97,0%, dok je homologija s ostalim molikutima između 66,3 i 72,7%. Klasifikacija na temelju analize njegove sekvence poklapa se s klasifikacijom temeljenom na 16S rDNA pa gen *tufB* predstavlja vrijedan filogenetski marker za finiju klasifikaciju fitoplazmi (Marcone i sur., 2000). Inače je u genomu fitoplazmi prisutan u jednoj kopiji, što je zajedničko s ostalim molikutima i Gram-pozitivnim bakterijama (Schneider i sur., 1997).

Gen *vmp1* (*stolH10*) je polimorfan gen koji kodira za membranski protein na površini stanica specifičan fitoplazmi pripadnika ribosomske skupine 16Sr XII-A (stolbur; 'Ca. P. solani'). Pretpostavka je da je bitan u interakciji fitoplazmi s domaćinima. Postoje barem dvije kopije gena *vmp1* u genomu stolbur fitoplazmi. Kao membranski protein izložen je snažnom selekcijskom pritisku koji se očituje u iznimnoj varijabilnosti te predstavlja potencijalni specifični molekularni marker za stolbur fitoplazme (Cimerman i sur., 2009).

Gen *secY* je dio operona *spc* ribosomskog proteina koji kodira za proteinsku podjedinicu translokaze SecY. Sec-translokacijski sustav je esencijalni transportni sustav u bakterija koji kod fitoplazmi, zbog nepostojanja stanične stijenke vjerojatno direktno izlučuje proteine u stanice domaćina (Kakizawa i sur., 2001). Pronađena je samo jedna kopija gena *secY* u svim poznatim fitoplazmama 16Sr (Lee i sur., 2006; Martini i sur., 2007; Lee i sur., 2010).

Gen *stamp* je nedavno karakteriziran gen koji kodira za antigenski membranski protein također karakterističan za stolbur-fitoplazme (Fabre i sur., 2011). Protein se sastoji od 157 aminokiselina sa signalnim peptidom i C-terminalnom hidrofobnom alfa zavojnicom. Iako njegova biološka funkcija nije još posve jasna, ima važnu ulogu u interakciji fitoplazmi s kukcima (Suzuki i sur., 2006). Naime, antigenski membranski protein specifično prepoznaje aktinske mikrofilamente kukca-vektora. Radi toga je gen *stamp* izložen pozitivnom selekcijskom pritisku, što ga čini jednim od varijabilnijih filogenetskih markera koji omogućuju razlikovanje između vrlo blisko povezanih sojeva unutar iste vrste. Slijedom toga, karakterizacija temeljna na analizi sekvenci, također omogućuje razlikovanje genotipova unutar vrste '*Ca. Phytoplasma solani*' (Aryan i sur., 2014).

1.5. *Candidatus Phytoplasma asteris*

'*Candidatus Phytoplasma asteris*' najveći je i najraznovrsniji podrazred fitoplazmi. '*Ca.P. asteris*' obuhvaća sve poznate podgrupe unutar grupe 16Srl, poznatije kao grupa *Aster Yellows* (AY). Unutar grupe 16Srl sojevi 16Srl-A, 16Srl-B, 16Srl-C rasprostarnjeni su širom svijeta i uzrokuju bolesti na više od 80 vrsta biljaka (Tsai, 1979; Chiykowski, 1991).

AY fitoplazme naseljavaju floem biljaka te se prenose putem više od 30 vrsta kukaca (Lee et al. 2004). Simptomi koje izazivaju na zaraženim biljkama vrlo su raznosvrсни, od žućenja i crvenjenja listova, patuljastog rasta, nenormalnog razvoja cvjetnih dijelova u listove (filodija), nenormalnog razvoja zelene pigmentacije poznatog u povijesti kao "zelene laticе" (viresecencija), proliferacije, te malih i deformiranih plodova (Slika 4; Bertaccini et. al. 1998).

Uljana repica (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.)) sve je važniji usjev koji se koriste za prehrambeno ulje, biodizelska goriva i proizvodnju biomase. Ovaj trend se još uvijek primjećuje u europskim zemljama koje pokušavaju povećati upotrebu biogoriva u skladu s EU direktivom o obnovljivoj energiji (2009/28/EZ). Virus i fitoplazme sjemena uljane repice su ozbiljan faktor ograničenja za proizvodnju.



Slika 4. *Allium cepa*. L. zaražen s AY fitoplazmom, u usporedbi sa zdravim lukom. slika preuzeta sa (<https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5472602> , pristupljeno 3.8.2018.)

Do sada su upravo AY fitoplazme najčešće prijavljena fitoplazmatska vrsta povezana s bolestima uljane repice (Bertaccini i sur., 1998; Maglioka i sur., 2009; Olivier i sur., 2010; Tazehkand i sur., 2010; Zwolińska i sur., 2011). No, osim gena za 16S rRNA, detaljnija molekularna karakterizacija nije napravljena.

1.6. CILJ ISTRAŽIVANJA

Bolesti proliferacije uljane repice često se povezuju se s infekcijom unutarstaničnim fitogenim bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*'. Ove bakterije nije moguće uzgojiti u čistoj kulturi *in vitro*, a dokaz prisutnosti bazira se isključivo na molekularnim metodama.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada bila identifikacija te multigenskaa tipizacija izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma asteris*' dobivenih iz simptomatičnih uzoraka uljane repice prikupljenih u Zagrebu na eksperimentalnom zemjištu Agronomskog fakulteta.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Biljni materijali

Uzorci uljane repice prikupljeni su krajem svibnja 2009. u Zagrebu na eksperimentalnom zemljištu Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od strane prof. dr. sc. Zvonimira Štafe te prof. dr. sc. Milana Pospišila (Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) te dopremljeni u Zavod za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Analizirani su uzorci dviju biljaka sa simptomima te dviju asimptomatičnih biljaka.

2.1.2. Referentni sojevi

Kao pozitivne kontrole u lančanim reakcijama polimerazom koristila sam sljedeće referentne sojeve: HydB i SA-1 dobivene iz kolekcije Laboratorija za fitoplazmologiju prof. Assunte Bertaccini sa Sveučilišta u Bologni, Italija (IRPCM, 2004; http://137.204.42.130/person/collectionseptember_2003.pdf).

2.1.3. Komercijalni kompleti

Za izolaciju ukupne genomske DNA iz biljnog materijala, koristila sam komercijalni komplet *OmniPrepTM for Plant (G-Biosciences)*

2.1.4. Početnice

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 u direktnom PCR-u. Univerzalne početnice F2/R2 (Gundersen i Lee, 1996) koje umnažaju fragment veličine 1,2 kb unutar za 16S rRNA, korištene su u *ugnježđenom*-PCR-u. Nukleotidni slijed početnica naveden je u Tablici 2.

Tablica 2. Slijed nukleotida početnica za umnažanje fitoplazmatske genske regije 16S rRNA

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
P1	5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'
P7	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT -3'
F2	5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG - 3'
R2	5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Za umnažanje fitoplazmatske genske regije *tufB* direktnim PCR-om koristila sam specifične parove početnica fTufu/rTufu (Schneider i sur., 1997). Nukleotidni slijed početnica naveden je u Tablici 3.

Tablica 3. Slijed nukleotida početnica za umnažanje fitoplazmatske genske regije *tufB*

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
fTufu	5'-CCTGAAGAAAGAGAACGTGG-3'
rTufu	5'-CGG AAA TAG AAT TGA GGA CG-3'

Za umnažanje fitoplazmatske genske regije *secY* direktnim PCR-om koristila sam specifične parove početnica AYsecYF1/AYsecYR1 (Lee i sur., 2006). Tablica 4).

Tablica 4. Slijed nukleotida početnica za umnažanje fitoplazmatske genske regije *secY*

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
AYsecYF1	5'-TCT GCT TTG CCT TTG CCT TT-3'
AYsecYR1	5'- ATT AGT AAA CTA GTT CCT CC-3'

Za umnažanje fragmenta gena *rplF* u direktnom PCR-u korištene su početnice rpF1/rpR1/Lee i sur. 1998) koja umnaža dio ribosomskog operona (dio gena za *rpsS*, čitavi gen *rplV* te dio gena za *rpsC*). Popis i nukleotidni slijedovi početnica navedeni su u tablici 5.

Tablica 5. Nukleotidni sljedovi početnica za umnažanje dijela ribosomskog operona

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
rpF1	5'- GGACATAAGTTAGGTGAATTT-3'
rpR1	5'- ACGATATTTAGTTCCTTTTTGG--3'

2.1.5. Pribor i uređaji

- mikropipete: Biohit, Finska
Eppendorf, Njemačka
CAPP, Danska
- mikropruvete i nastavci: Eppendorf, Njemačka
- vaga: *Precisa 62 A* (Precisa Instruments AG, Švicarska)
- 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 VI (Kisker-Biotech, Njemačka)
- spektrofotometar: Nanodrop 2000 (Thermo scientific, SAD)
- PCR uređaji: SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD)
- kadice za elektroforezu: Mini-Sub[®] Cell GT (Bio-Rad, SAD)
- uređaj za napajanje za elektroforezu: Power Pac 300 (Bio-Rad, SAD)
- UV-transiluminator: T2202 (Sigma, SAD)
- sustav za dokumentaciju gelova: *DigiGenius* (Syngene Ltd., UK)
- digitalni fotoaparat: Panasonic DMC-FZ8 (Panasonic, Japan)

2.1.6. Pufferi i otopine

- TE-pufer, pH 7,6
 - za 200 ml pufera; 2 ml Tris 10 mM, 0,4 ml EDTA 1 mM
- 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)

- za 200 μ L dNTPs 10 mM otopine:
 - 180 μ L dH₂O (deionizirana voda)
 - 5 μ L dATP 100 mM
 - 5 μ L dGTP 100 mM
 - 5 μ L dCTP 100 mM
 - 5 μ L dTTP 100 mM
- 0,5XTBE-pufer pripremljen razrjeđenjem 10X TBE s deioniziranom vodom
 - Tris 90 mM
 - borna kiselina 90 mM
 - EDTA 1 mM
- pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel
 - bromfenol plavo 0,25%
 - ksilencijanол fluorofosfat 0,25%
 - glicerol 30% (u vodi)
- Taq-polimeraza i pripadajući pufer i otopina za standardne PCR reakcije
 - GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega)
 - 5X Colorless GoTaq[®] Flexi Reaction Buffer (Promega)
 - MgCl₂ 25 mM (*Promega*)
- Fluorescirajuća boja SYBR[™] Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher scientific)

2.2. METODE

2.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA iz uzoraka biljnog tkiva

Za što kvalitetniju ekstrakciju genomske DNA iz biljnih uzoraka, koristila sam komercijalni komplet „*OmniPrep™ for Plant*“. Komplet sadrži pufer za lizu (*Genomic Lysis Buffer*), proteinazu K, otopinu za odvajanje komponenata (*DNA Stripping Solution*), otopinu za precipitaciju (*Precipitation Solution*), TE-pufer te glikogen dagnji (*Mussel Glycogen*) koji koprecipitira nukleinske kiseline tijekom izolacije i čišćenja.

U prethodno ohlađenim tarionicima homogenirala sam oko 80 mg biljnog tkiva u tekućem dušiku uz dodatak 500 µL pufera za lizu (*Genomic Lysis Buffer*) i 5µL otopine proteinaze K. Zatim sam prebacila homogenate u mikroepruvete od 2 mL, oko 5 sekundi mješala na vrtložnoj mješalici te potom inkubirala u vodenoj kupelji 2 sata pri 60°C. Nakon inkubacije, uzorke sam ostavila da se ohlade na sobnoj temperaturi, a zatim sam dodala 200 µL kloroforma. Svaku mikroepruvetu sam lagano promiješala nekoliko puta. Uzorke sam potom centrifugirala 10 min na 14000 g u ohlađenoj centrifugi. Nukleinske kiseline su se odijelile u gornju vodenu fazu koju sam zatim pažljivo otpipetirala u čistu mikroepruvetu od 2 mL, u nju dodala 50 µL otopine za odvajanje komponenata (*DNA Stripping Solution*), uzorke promiješala okretanjem, a zatim ih inkubirala u vodenoj kupelji 10 min pri 60°C. Svakom uzorku sam dodala 100 µL otopine za precipitaciju (*Precipitation Solution*) i tijekom narednih 20 sekundi miješala ih na vrtložnoj mješalici. Prilikom dodatka otopine dolazi do stvaranja bijelog taloga, a ako u pojedinom uzorku ne nastane talog, dodati još 50 µL navedene otopine. Uzorke sam zatim inkubirala na ledu, te nakon toga centrifugirala 5 min pri 14000 g u ohlađenoj centrifugi na 4°C. Supernatant sam prebacila u novu mikroepruvetu od 1.5 mL, dodala 500 µL izopropanola i 2 µL glikogena dagnji (*Mussel Glycogen*). Uzorke sam lagano promiješala okretanjem. Nakon toga, uzorke centrifugirati 15 min pri 14000 g kako bi se istaložila DNA. Supernatant pažljivo baciti, a talogu dodati 700 µL 70% etanola. Tijekom sljedeće minute provela sam još jedan krug centrifugiranja na 14000 g. Ponovno sam pažljivo dekantirala supernatant. Dobiveni talog sam sušila na zraku dok se nije izgubio miris etanola, cca 30 min, te sam ga potom otopila u 50 µL TE-pufera i dodala RNAazu. Uzorak se inkubirao na vodenoj kupelji 30 min na temperaturi od 37°C. Uzorak izolirane DNA čuva se pri -20°C.

2.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Različite molekule apsorbiraju pri specifičnim valnim duljinama (λ). Nukleotidi, RNA i DNA imaju maksimum apsorpcije pri 260 nm (A_{260}), dok proteini, fenoli i ostale nečistoće apsorbiraju pri 280 nm (A_{280}). Za mjerenje apsorpcije korišten je spektrofotometar *Nanodrop2000* (*Thermo Scientific*). Nakon mjerenja, uzorke s izoliranim ukupnim nukleinskim kiselinama (TNA) sam razrijedila na radnu koncentraciju od 20 ng/ μ L.

2.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Polimerazna lančana reakcija (PCR) je metoda kojom se specifični slijed molekule DNA umnaža u veliki broj indentičnih kopija. Reakcije su se odvijale u uređajima „2720 Thermal Cycler“ (Applied Biosystems, SAD) i „Mastercycler personal“ (Eppendorf, Njemačka) koji automatski kontroliraju promjenu temperature tijekom pojedinih faza. PCR metoda je u osnovi jednostavna metoda koja se sastoji se od tri faze koje se ciklički ponavljaju i definirane su određenom temperaturom i duljinom trajanja. U prvoj fazi dolazi do denaturiranja kalupa DNA, zatim slijedi druga faza u kojoj dolazi do prijanjanja oligonukleotidnih početnica na kalup DNA i završne faze, sinteze komplementarnih lanaca DNA. Zbog izrazito niskog titra fitoplazmatske DNA u uzorku, nije ih uvijek moguće detektirati u direktnom PCR-u, stoga se često koristi „ugnježđeni“ PCR (eng. *nested*) koji se, za razliku od direktnog PCR-a, odvija u dvije uzastopne reakcije pri čemu se koriste dva seta početnica. Kao pozitivne kontrole u lančanim reakcijama polimerazom koristila sam DNA referentih izolata, a kao negativnu kontrolu autoklaviranu vodu.

2.2.3.1. Umnažanje fitoplazmatskog gena za 16S rRNA

Specifičnim umnažanjem fitoplazmatskog gena za 16S rRNA PCR-metodom, dokazala sam prisutnost fitoplazmi u navedenim uzorcima. Sastojci reakcijske smjese navedeni su u Tablici 6.

Tablica 6. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze korištena za umnažanje gena za 16S rRNA. Kratice: c_0 -početna koncentracija, c_k -konačna koncentracija, V- volumen dodanog reagensa, kalup 1-TNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	DIREKTNI PCR			<i>ugnježdjeni</i> PCR		
	c_0	c_k	V/ μ L	c_0	c_k	V/ μ L
Sterilna dH ₂ O			13,375			13,875
5x 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
P1	5 μ M	0,2 μ M	1	-	-	-
P7	5 μ M	0,2 μ M	1	-	-	-
F2	-	-	-	5 μ M	0,2 μ M	1
R2	-	-	-	5 μ M	0,2 μ M	1
GoTaq Flexi polimeraza	5 U/ μ L	0,625 U	0,125	5 U/ μ L	0,625 U	0,125
Kalup 1	-	-	1	-	-	-
Kalup 2	-	-	-	-	-	0,5
Ukupno			25			25

Uvjeti umnažanja u direktnom PCR-u bili su: početna denaturacija pri 95°C na 2 min (1 ciklus); denaturacija pri 95°C, 1 min (35 ciklusa); prijanjanje početnica na kalup pri 58°C, 1 minuta (35 ciklusa); sinteza komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 68°C, 2 min (35 ciklusa) te završno produljivanje lanaca DNA pri 68°C, 10 min (1 ciklus). Uvjeti umnažanja u *ugnježdjenom* PCR-u bili: početna denaturacija pri 94°C na 1 min (1 ciklus); denaturacija pri 94°C, 1 min (35 ciklusa); prijanjanje početnica na kalup pri 50°C, 2 minuta (35 ciklusa); sinteza komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 72°C, 3 min (35 ciklusa) te završno produljivanje lanaca DNA pri 72°C, 7 min (1 ciklus).

2.2.3.2. Umnažanje fitoplazmatskih gena *tufB*

Sastojci reakcijske smjese za umnažanje gena *tufB* i navedeni su u Tablici 7.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze korištena za umnažanje gena *tufB*
Kratice: c_0 -početna koncentracija, c_k -konačna koncentracija,
V-volumen dodanog reagensa, kalup 1-TNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	DIREKTNI PCR		
	c_0	c_k	V/ μ L
Sterilna dH ₂ O			2,8
5x GoTaqFlexiBuffer	5x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
dNTPs otopina	10 mM	0,2 mM	2
fTufu	5 μ M	1 μ M	5
rTufu	5 μ M	1 μ M	5
GoTaqFlexipolimeraza	5U/ μ L	1U	0,2
Kalup1	20 ng/ μ L	2,4 ng/ μ L	3
Ukupno			25

Uvjeti umnažanja u direktnom PCR-u bili su: početna denaturacija pri 94°C na 4 min (1 ciklus); denaturacija pri 94°C, 30 sekundi; prijanjanje početnica na kalup pri 53°C, 30 sekundi; sinteza komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 72°C, 1 min (34 ciklusa) te završno produljivanje lanaca DNA pri 72°C, 5 min (1 ciklus).

2.2.3.3. Umnažanje fitoplazmatskog gena *secY*

Volumen reakcijske smjese iznosio je 25 μL isto kao i volumen reakcijske smjese za umnažanje gena *secY*. Sastojci reakcijske smjese prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom korištena za umnažanje gena *secY*

Kratice: c_0 -početna koncentracija, c_k -konačna koncentracija, V-volumen dodanog

reagensa, kalup 1-TNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	DIREKTNI PCR			
		c_0	c_k	V/ μL
Sterilna dH_2O				2,6
5x GoTaqFlexiBuffer	5x	1x		5
MgCl_2	25 mM	2 mM		2
dNTPs otopina	10 mM	0,2 mM		2
AYsecF1	5 μM	1 μM		5
AYsecR1	5 μM	1 μM		5
GoTaqFlexipolimeraza	5U/ μL	2U		0,4
Kalup	20 ng/ μL	2,4 ng/ μL		3
Ukupno				25

Uvjeti reakcije za gen *secY* u direktnom PCR-u bili su: početna denaturacija pri 95°C, 3 min (1 ciklus); denaturacija pri 95°C, 30 sekundi; prijanjanje početnica na kalup pri 54°C (62°C u *nested*-PCR-u), 30 sekundi; sinteza komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 72°C, 1 min (35 ciklusa) te završno produljivanje lanaca DNA pri 72°C, 7 min (1 ciklus).

2.2.3.4. Umnažanje dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine

Sastojci reakcijske smjese za umnažanje dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine (dio gena za *rpsS*, čitavi gen *rplV* te dio gena za *rpsC*), prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom za umnažanje dijela ribosomskog operona (dio gena za *rpsS*, čitavi gen *rplV* te dio gena za *rpsC*).

Kratice: c_0 -početna koncentracija, c_k -konačna koncentracija, V-volumen dodanog reagensa, kalup 1- ukupna genomski DNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	DIREKTNI PCR		
	c_0	c_k	V/ μ L
Sterilna dH ₂ O			12,3
5x GoTaq Buffer	5x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs otopina	10 mM	0,2 mM	2
S8F1	5 μ M	0,2 μ M	1
L18R1	5 μ M	0,2 μ M	1
S8F2	-	-	-
L18R2	-	-	-
GoTaq polimeraza	5U/ μ L	0,625U	0,2
Kalup1	20 ng/ μ L	-	2
Kalup2	-	-	-
Ukupno			25

2.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Za provjeru uspješnosti izdvajanja molekula DNA nakon lančane reakcije polimerazom, napravila sam elektroforezu u 1%-tnom gelu agaroze. Otapanje agaroze pospješila sam zagrijavanjem staklene tikvice u mikrovalnoj pećnici. Nakon hlađenja tikvice na sobnu temperaturu, dodala sam 1 μ L SYBR™ Safe DNA Gel Stain. Obojani gel sam potom izlila u prethodno pripremljen kalup za gel i ostavila da polimerizira tijekom dvadesetak minuta. Zatim sam kalup s gelom premjestila u kadnicu za elektroforezu „Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)“. U jažice gela nanijela sam po 5 μ L PCR- produkta pomiješanog s 1 μ L obojenog pufera za nanošenje laganim uvlačenjem i ispuštanjem cijelog sadržaja na parafilmu. Kao molekularni standard radi kontrole duljine amplikona koristila sam 5 μ L „ Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9, ready-to-use“ (Fermentas, Litva) pomiješanog s 2 μ L obojenog pufera. Elektroforeza se provodila 30 min pri konstantnom naponu od 150 V („Powerpac 300“, Bio-Rad, SAD).

Dobivene rezultate sam potom promatrala na UV-transiluminatoru i dokumentirala sustavom za dokumentaciju *DigiGenius* (Syngen, Ltd., UK) te obradila nekim od programa za obradu fotografija.

2.2.5. Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) fitoplazmatskih gena za 16S rRNA

RFLP je metoda koja se obično koristi nakon umnažanja fragmenata PCR-om i omogućava razlučivanje pocijepanih fragmenata DNA na temelju restrikcijskih mjesta unutar njihove sekvence. Razdvajanjem pocijepanih fragmenata na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu, dobije se specifičan restrikcijski profil vrpce (eng. *band*), tzv. RFLP-obrazac. Ako dođe do mutacije u genomu, restrikcijsko mjesto može nestati ili može nastati novo čime se mijenja RFLP-obrazac te se na temelju toga može determinirati pripadnost fitoplazme određenoj skupini. Za RFLP-analizu umnoženih fitoplazmatskih gena koristila sam restrikcijske endonukleaze i odgovarajuće puferne prema uputama proizvođača:

TruII (*MseI*) 5' T↓TAA 3'

TspEI (*Tsp509I*) 5' ↓AATT 3'

Za pripravu restrikcijske smjese pomiješala sam 2 μ L pufera za restrikciju, 0,5 μ L restrikcijskog enzima (*TspEI* ili *TruII* u pojedinačnoj reakciji), 13,5 μ L destilirane vode i 4

μL uzorka (fragменти umnoženi u *nested*-PCR-u). Tako pripremljeni uzorci inkubiraju se 16h pri temperaturi od 65°C . Dobivene pocijepane fragmente gena za 16S analizirala sam elektroforezom u 5%-tnom poliakrilamidnom gelu. Kod pripreme gela, prvo sam zasebno priredila dvije otopine, koje sam zatim pomiješala. Prva otopina se sastojala od 10 μL TEMED-a, 1,25 mL AA-a (40%) i 0,625 mL BIS-a (2%), a druga od 1 mL 10xTBE-pufera, 100 μL APS-a (10%) i 7,015 mL vode. Kao elektroforetski pufer koristila sam također 1x TBE-pufer. U jažice gela nanostila sam 20 μL uzorka pomiješanog s 4 μL obojenog pufera za elektroforezu. Na gel se nanosi i 7 μL markera pomiješanog s 2 μL boje, što služi kao biljeg molekularnih masa. Elektroforezu sam provodila pri naponu od 200 V u trajanju 45 min. Dobivene gelove sam bojila u otopini etidijeva bromida (0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oko 15 min te fotografirala na transiluminatoru.

2.2.6. Filogenetske analize

2.2.6.1. Sekvenciranje nukleotidnih slijedova

Svi umnoženi fragmenti gena za 16S rRNA, *tufB*, *secY* te dijela ribosomskog operona dobiveni iz izolata fitoplazme '*Ca. P. asteris*' poslani su na određivanje primarne strukture molekule DNA u *MacroGen Inc.* (Amsterdam, Nizozemska <https://dna.macrogen.com/>). Za sekvenciranje svih fragmenta su korištene jednake početnice kao i za umnažanje u PCR-u za svaki pojedini gen.

2.2.6.2. Računalne analize nukleotidnih slijedova

Dobivene nukleotidne slijedove ujedinihla sam i sastavila pomoću računalnog programa *Sequencher*TM 4.10. Demo (<http://www.genecodes.com/>). Kako su nukleotidni slijedovi duži od samog gena prvo treba svaku sekvencu skratiti na duljinu gena. Nakon toga, otvoreni okvir čitanja proteina kodiranog genom provjerila sam *in silico* korištenjem *on-line* programa za translaciju (<http://web.expasy.org/translate/>). Uređeni nukleotidni slijedovi zatim su globalno sravnjeni pomoću računalnog programa ClustalX 2.0, čime je omogućeno lakše pronalaženje mutacija unutar sekvenci (Thompson i sur., 1997; <http://www.clustal.org>). Filogenetske analize napravila sam korištenjem programa MEGA 4 (Tamura i sur., 2007; <http://www.megasoftware.net>), metodom *neighbour joining* (NJ). Za procjenu pogreške modela korištena je statistička metoda *bootstrap* (uz 500 ponavljanja, a za računanje

udaljenosti nukleotidnih slijedova korišten je model *number of differences*. Uz nukleotidne slijedove ispitivanih uzoraka, u analize su uključene i referente sekvence dostupne u bazi podataka GenBank.

3. REZULTATI

3.1. SIMPTOMI



Slika 5. Zdrava uljana repica (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzg.)



Slika 6. Zaražena uljana repica sa simptomima filodije i virescencije

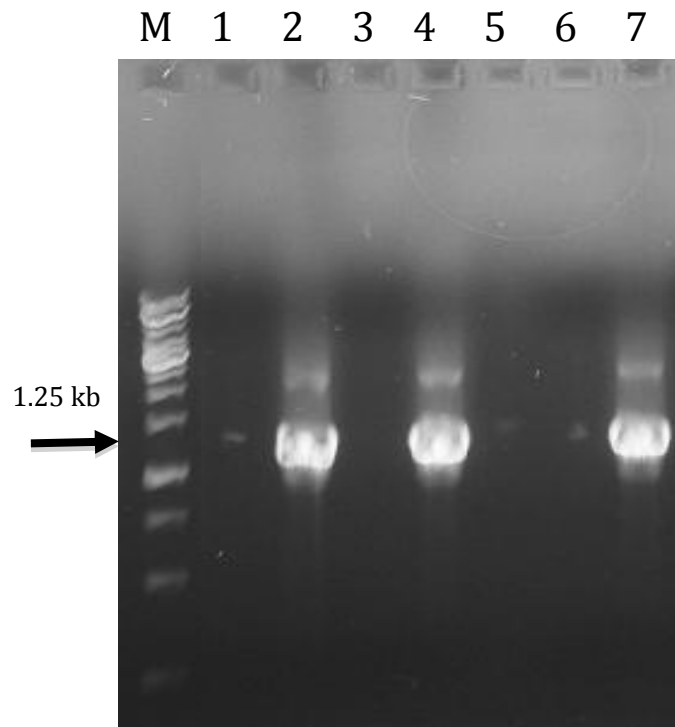


Slika 7. Skraćeni internodiji te deformacija ploda kod zaražene uljane repice

3.2. Analiza fragmenta gena *16S rRNA*

3.2.1. Analiza umnoženog fragmenta gena za 16S rRNA elektroforezom u agaroznom gelu

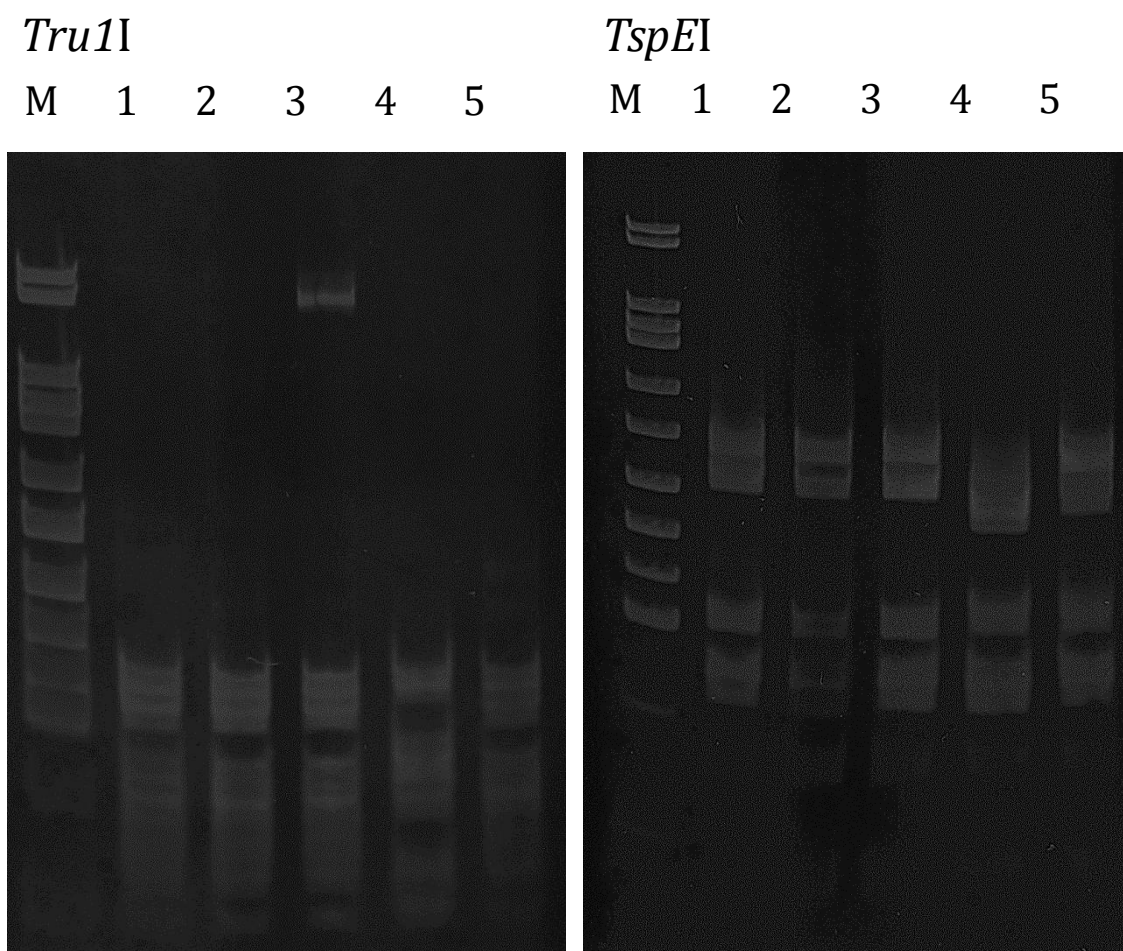
Prema detaljno opisanom protokolu u poglavlju 3.2.1. iz uzoraka biljnog materijala izolirala sam genomsku DNA korištenjem komercijalnog kompleta *OmniPrepTM for Plant*. Koncentraciju i čistoću ukupne izolirane DNA izmjerila sam spektrofotometrijski, te uzorke razrijedila autoklaviranom vodom do radne koncentracije od 20 µg/µL. Direktnim PCR-om umnožila sam gene za 16S rRNA korištenjem univerzalnih para početnica P1/P7, nakon čega je uslijedio *nested* („ugniježđeni“) PCR korištenjem početnica F2/R2. U uzorcima u kojima je utvrđena prisutnost fitoplazmi, umnožen je fragment veličine oko 1,25 kb (Slika 8).



Slika 8. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze umnožene regije fitoplazmatskog gena 16S rRNA korištenjem P1/P7 početnica. 1-4 su uzorci repa, negativna kontrola je 5 i 6 voda. Pozitivna kontrola je 7 HydB

3.2.2. RFLP analiza umnoženog fragmenta gena za 16S rRNA

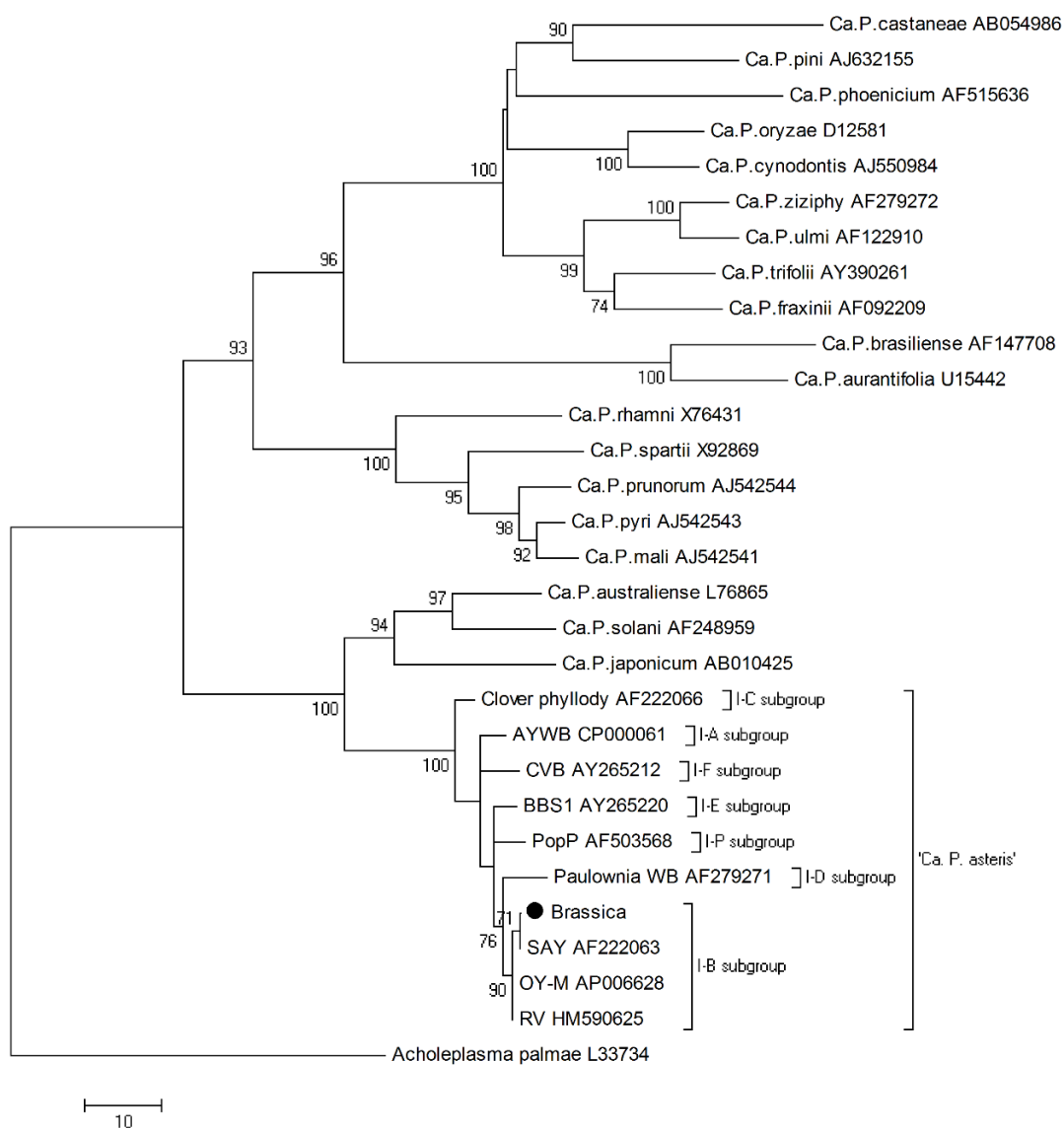
Analiza RFLP umnoženih fragmenata gena za 16S rRNA i cijepanje restrikcijским enzimima *Tru*II i *Tsp*EI pokazala je da su profili svih uzoraka bili međusobno jednaki te da odgovaraju onom referentnog soja HydB koji pripada fitoplazmatskoj vrsti '*Ca. P. asteris*' (Slika 9).



Slika 9. Reprezentativni prikaz rezultata analize RFLP umnoženih fragmenata gena za 16S rRNA i cijepanje restrikcijским enzimima *Tru*II i *Tsp*EI. Korišten je PAGE gel.

3.2.3. Filogenetska analiza gena za 16S rRNA

Filogenetska analiza gena za 16S rRNA iz uzorka simptomatične uljane repice pokazala je grupiranje sa sekvencama koje pripadaju vrsti '*Ca. P. asteris*'. Najveća srodnost postoji sa sekvencama uzoraka klasificiranim u ribosomsku podskupinu 16Sr I-B, a 99% identiteta pokazala je sekvenca soja RV, također iz uljane repice porijeklom iz Francuske (Slika 10).

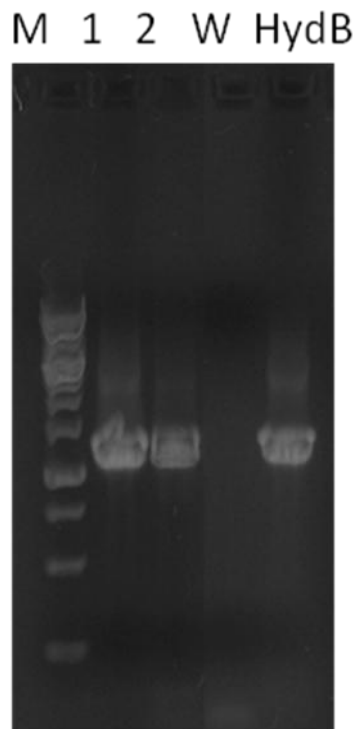


Slika 10. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno metodom susjednog povezivanja (NJ) na temelju nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Referentni sojevi su označeni pristupnim brojem. Pripadnost različitim genotipovima je prikazana s desne strane stabla. Uzorci uljane repice su neoznačeni.

3.3. Analiza fragmenta gena *secY*

3.3.1. Analiza elektroforeze na agaroznom gelu umnoženih gena *secY*

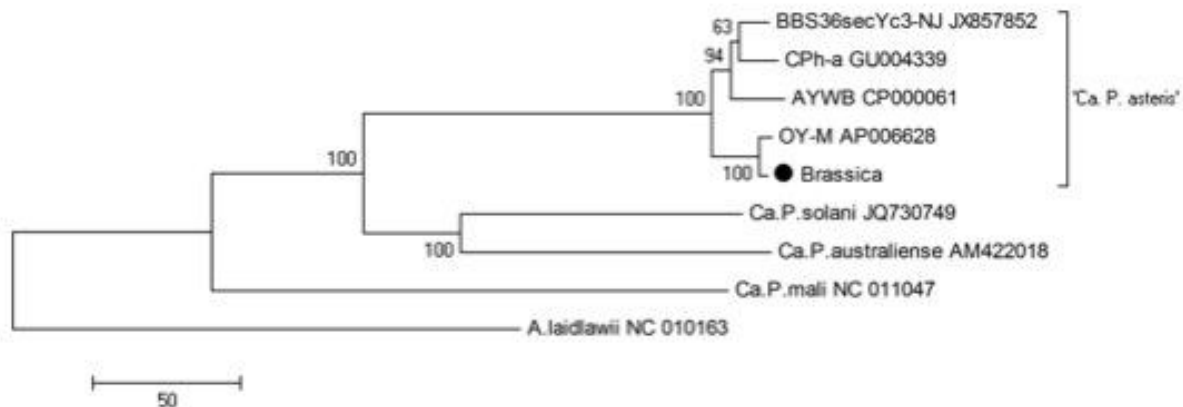
Fragmente fitoplazmatskih gena *secY* i umnožila sam u reakciji direktnog PCR-a koristeći specifične fitoplazmatske početnice AYsecF1/R1 (gen *secY*). Fragment gena *secY* veličine oko 1400 pb uspješno je umnožen iz oba uzoraka simptomatične uljane repice (Slika 11).



Slika 11. Prikaz rezultata elektroforeze na agaroznom gelu fitoplazmatskog gena *secY* metodom PCR-a za simptomatične uzorke uljane repice (1,2) Pozitivna kontrola je referentni soj fitoplazme HydB, a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

3.3.2. Filogenetska analiza gena *secY*

Filogenetska analiza gena *secY* pokazala je visoku srodnost i 99% identiteta sa sekvencom soja OY-M te potvrdila pripradnost vrsti 'Ca.P. asteris' i podskupini 16SrI-B.

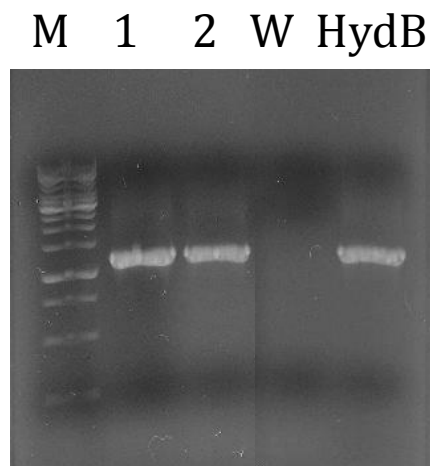


Slika 12. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno metodom susjednog povezivanja (NJ) na temelju nukleotidnih sljedova gena za *secY*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Referentni sojevi su označeni pristupnim brojem. Pripadnost različitim genotipovima je prikazana s desne strane stabla. Uzorci uljane repice su neoznačeni.

3.4. Analiza dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine

3.4.1. Analiza dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine elektroforezom u agaroznom gelu

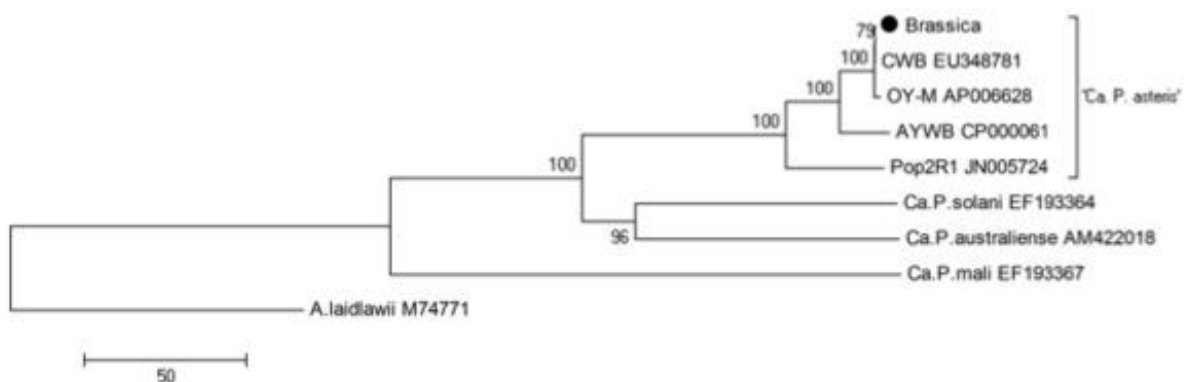
Umnožene fragmente dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine dobivene u direktnom PCR-u analizirala sam u 1%-totnom agaroznom gelu. Kod umnažanja ovog fragmenta se očekivala veličina fragmenta od oko 1250 parova baza (pb). Kod uzoraka iz simptomatične uljane repice dobivena je očekivana veličina fragmenta. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam referentni soj FD92 ili uzorak u kojem je dokazana prisutnost fitoplazme FD, a kao negativnu kontrolu koristila sam autoklaviranu dH₂O (W) umjesto kalupa DNA. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze prikazan je na slici 13.



Slika 13. Prikaz rezultata elektroforeze fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine u agaroznom gelu metodom PCR-a simptomatičnih uzoraka uljane repice (1 i 2). Pozitivna kontrola je referentni soj fitoplazme HydB, a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

3.4.2. Filogenetska analiza dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine

Kao i kod gena za 16S rRNA i *secY*, filogenetska analiza pokazala je visoku srodnost sa sekvencama vrste '*Ca. P. asteris*', podskupine 16SrI-B, odnosno 99% identiteta sa sekvencom soja OY-M (Slika 14).

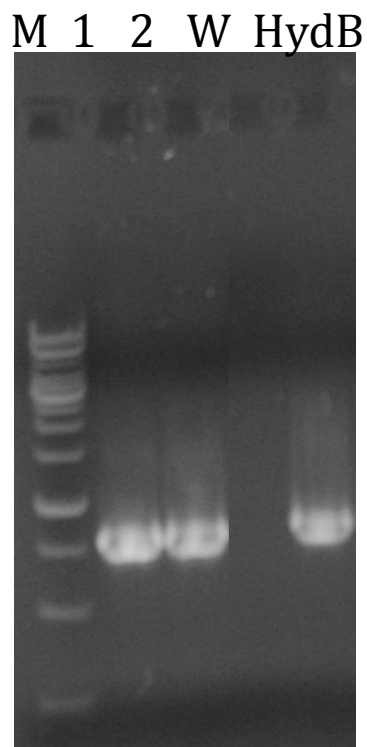


Slika 14. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno metodom susjednog povezivanja (NJ) na temelju nukleotidnih sljedova dijela fitoplazmatskog operona za ribosomske proteine. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Referentni sojevi su označeni pristupnim brojem. Pripadnost različitim genotipovima je prikazana s desne strane stabla. Uzorci uljane repice su neoznačeni.

3.5. Analiza gena *tufB*

3.5.1. Analiza umnoženog gena *tufB* elektroforezom u agaroznom gelu

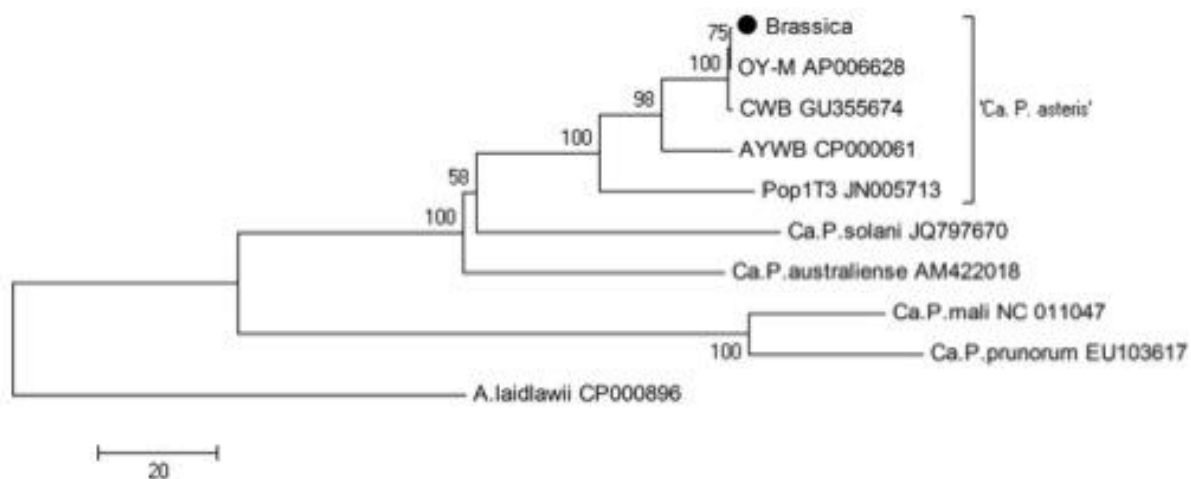
Umnožene fragmente gena *tufB* iz direktnog PCR-a analizirala sam u 1%-totnom agaroznom gelu. Kod *tufB* gena za uzorke simptomatične uljane repice dobivena je očekivana veličina fragmenta od oko 850 pb. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze umnoženog gena *tufB* prikazan je na slici 15



Slika 15. Prikaz rezultata elektroforeze fitoplazmatskog gena u agaroznom gelu *tufB* metodom PCR-a za uzorke uljane repice (1, 2). Pozitivna kontrole je referenti soj fitoplazme HydB, a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

3.5.2. Filogenetska analiza umnoženog gena *tufB*

Filogenetska analiza gena *tufB* pokazala je visoku srodnost i 100% identiteta sa sekvencom soja OY-M te potvrdila prikladnost vrsti 'Ca.P. asteris' i podskupini 16SrI-B. Filogenetsko stablo prikazano je na slici 16.



Slika 16. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno metodom susjednog povezivanja (NJ) na temelju nukleotidnih sljedova gena za *tufB*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Referentni sojevi su označeni pristupnim brojem. Pripadnost različitim genotipovima je prikazana s desne strane stabla. Uzorci uljane repice su neoznačeni.

4. RASPRAVA

Fitoplazme su biljni patogeni i zajedno s ureaplazmama, mikoplazmama, spiroplazmama i aholeoplazmama svrstane su u razred *Mollicutes* (lat. *mollis* - mekan, *cutis* – koža). Kao i drugi pripadnici ovog razreda nemaju staničnu stijenu. U svom životnom ciklusu izmjenjuju dva domadara, biljke i kukce-vektore, te uzrokuju bolesti na oko 1000 različitih biljnih vrsta u čitavom svijetu. Imaju vrlo reduciran genom zbog čega se ne mogu uzgajati u čistoj kulturi *in vitro* što izuzetno otežava njihovo istraživanje. Zbog nemogućnosti uzgoja u čistoj kulturi *in vitro* za detekciju fitoplazmi potrebno je uzorkovati simptomatični biljni materijal ili čitavog kukca-vektora te dokazati prisutnost fitoplazmatske DNA u uzorku.

Prethodne molekularne studije dokazale su prisutnost fitoplazme '*Ca. P. asteris*' u uljanjoj repici (*B.napus* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg) na biljkama diljem Europe (Bertaccini et al.1998; Maglioka et al. 2009; Zwolinska et al. 2011). Također su pronađene i u uljanim repicama u Kanadi (Wang and Hiruki 2001; Olivier et al. 2010), i Iranu (Tazehkand et al. 2010). Većinom se radi o AY fitoplazmama ribosomske podskupine I-B. Pored toga, AY fitoplazma iz podskupine I-A prijavljena je u Kanadi (Wangand Hiruki 2001; Olivier et al. 2010). Za zemlje u susjedstvu Hrvatske nema dostupnih podataka o prisustvu '*Ca. P. asteris*' kao uzročnika bolesti uljane repice. No, u biljakama kelja (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.) sa simptomima crvenila i patuljastog rasta iz Srbije dokazana je prisutnost fitoplazme ribosomske skupine 16SrXII-A (*stolbur*; '*Ca. P. solani*')(Trkulja i sur., 2011).

Do sada nije bilo podataka u literaturi o fitoplazmama kao uzročnicima bolesti uljane repice u Hrvatskoj kao niti o samim simptomima na ovoj gospodarski važnoj vrsti. U ovom radu, u uzorcima vrste uljane repice prikupljenim u Zagrebu na eksperimentalnom zemljištu Agronomskog fakulteta, dokazala sam zarazu fitoplazmatskom vrstom '*Ca. P. asteris*' PCR/RFLP analizom gena za 16S rRNA. Filogenetska analiza fitoplazmatskog gena za 16S rRNA (Slika 10) iz izolata simptomatične uljane repice potvrdila je rezultate PCR/RFLP klasifikacije te pripadnost vrsti '*Ca. P. asteris*', kao u prethodno identificiranim AY fitoplazmama na istom domaćinu (Bertaccini et al. 1998), a najveća srodnost bila je s izolatom RV iz uljane repice sa simptomima virescencije u Francuskoj (Slika 10). Analiza još 3 genska lokusa izvan 16S rDNA nije samo potvrdila pripadnost podskupini I-B skupine AY, nego je po prvi puta pružila i detaljnu molekularnu karakterizaciju,

S obzirom na činjenicu da je skupina AY fitoplazmi jedna od geografski najraširenijih fitoplazmatskih vrsta te da zaražava veliki broj domaćinskih biljnih vrsta i

prenosi se brojnih vrstama kukaca-vektora, nalaz ove fitoplazme u uljanoj repici u Hrvatskoj nije začuđujući. Fitoplazme iz ribosomske podskupine 16SrI-B i njima srodne fitoplazme do sada su u Hrvatskoj sporadično pronađene u vinovoj lozi te voćkama (Križanac i sur. 2010), kao i asimptomatičnim stablima brijesta (rod *Ulmus*) (Katanić i sur. 2016), no kukci-vektori povezani s prijenosom nisu poznati niti istraživani.

Kako su fitoplazme kao uzročnici bolesti biljaka otkrivene tek krajem šezdesetih godina, moguće se da su simptomi bolesti bili prisutni i ranije no sam uzročnik nije bio definiran. Virusne zaraze biljaka roda *Brassica* vrlo su česte, a simptomi mogu biti različiti, od žućenja ili crvenjenja listova do kržljivog rasta ili pojave nekroza, a mogu nalikovati onima uzrokovanim fitoplazmatskim zarazama. Najčešće se radi o virusu *Turnip mosaic virus* (TuMV), a sam virus, kao i njegovi vektori *Myzus persicae* (Sulz.) i *Brevycorine brassicae* L. (Rimmer i sur 2007.) ranije su zabilježeni na području Hrvatske (Štefanac-Uđbinac i sur., 1963).

Ekonomski gubici uzrokovani fitoplazmatskim bolestima variraju od djelomične redukcije u prinosu i kvaliteti ploda do gotovo potpunih gubitaka. Iako u ovom slučaju zaraze uljane repice nije bilo većih ekonomskih gubitaka, s ciljem razjašnjavanja epidemiologija ove zaraze u budućnosti bi svakako trebalo pronaći kukce-vektore koji su uključeni u ovaj patosistem.

5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

- u simptomatičnim uzorcima uljane repice dokazala sam zarazu fitoplazmatskom vrstom *Candidatus Phytoplasma asteris* PCR/RFLP analizom gena za 16S rRNA
- filogenetska analiza fitoplazmatskog gena za 16S rRNA potvrdila je rezultate PCR-RFLP klasifikacije te pripadnost vrsti '*Ca. P. asteris*', kao u prethodno identificiranim AY fitoplazmama na istom domaćinu
- analizom još 3 genska lokusa izvan 16S nije samo potvrdila pripadnost podskupini I-B skupine AY, nego je po prvi puta pružila i detaljnu molekularnu karakterizaciju.
- fitoplazme iz ribosomske podskupine 16SrI-B do sada su u Hrvatskoj sporadično pronađene u vinovoj lozi te voćkama (Križanac i sur. 2010), no kukci-vektori nisu bili poznati. Kako bi se epidemiologija ove zaraze uljane repice što bolje razjasnila, u budućnosti bi svakako trebalo pronaći kukce-vektore koji su uključeni u ovaj patosistem.

6. LITERATURA

- Bertaccini, A., Voráčková, Z., Vibio, M., Fránova, J., Navrátil, M., Špak, J. and Nebesárová, J. (1998) Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with Italian Brassica phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. *Plant Pathol* **47**, 317-324.
- Bertaccini A., Duduk B. (2009): Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* **48**, 355-378.
- Chang, S.-H., Cho, S.-T., Chen, C.-L., Yang, J.-Y., Kuo, C.-H. (2015) Draft genome sequence of a 16SrII-A subgroup phytoplasma associated with purple coneflower (*Echinacea purpurea*) witches' broom disease in Taiwan. *Genome Announc.* **3**, e01398-15.
- Chung, W.C., Chen, L.L., Lo, W.S., Lin, C.P., Kuo, C.H. (2013) Comparative analysis of the peanut witches'-broom phytoplasma genome reveals horizontal transfer of potential mobile units and effectors. *PLoS One* **8**, e62770.
- Fischer, A., Santana-Cruz, I., Wambua, L., Olds, C., Midega, C., Dickinson, M., Kawicha, P., Khan, Z., Masiga, D., Jores, J., Schneider, B. (2016) Draft genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma oryzae' strain Mbital, the causative agent of Napier grass stunt disease in Kenya. *Genome Announc.* **4**, e00297-16.
- Foissac X., Danet J. L., Malembic-Maher S., Salar P., Šafářová D., Válová P., Navratil M. (2013) Tuf and SecY PCR Amplification and Genotyping of Phytoplasmas. In: Hodggetts J., Dickinson M., *Phytoplasma: Methods and Protocols*, Springer New York 189 –204
- Katanić Z., Krstin Lj., Ježić M., Zebec M., Čurković-Perica M. (2016) Molecular characterization of elm yellows phytoplasmas in Croatia and their impact on *Ulmus* spp. *Plant Pathol* **46**: 1430-1440.
- Križanac I., Budinščak Ž., Šeruga Musić M., Škorić D. (2010): Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. *J Plant Dis Prot* **117 (5)**: 206-213
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E. and 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., Zhao, Y. and Bottner, K.D. (2006) SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol Cel Probe* **20**, 87-91.
- Maglioka, V.I., Tsialtas, J.T., Papantoniou, A., Efthimiou, K. and Katis, N.I. (2009) First report of phytoplasma associated with an oilseed rape disease in Greece. *Plant Pathol* **58**, 792.
- Mitrovic, J., Kakizawa, S., Duduk, B., Oshima, K., Namba, S., Bertaccini, A. (2011) The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains. *Ann Appl Biol* **159**, 41–48.
- Montano H. G., Davis R. E., Dally E. L., Brioso P. S., Pimental J. P. (2000) Identification and Phylogenetic Analysis of a New Phytoplasma from Diseased Chayote in Brazil. *Plant Disease* **84(4)**, 429-436.
- Orlovskis, Z., Canale, M.C., Haryono, M., Lopes, J.R.S., Kuo, C.H., Hogenhout, S.A. (2017) A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Ann. Bot.* **119**, 869–84.
- Plavec J., Križanac I., Budinščak Ž., Škorić D., Šeruga Musić M. (2015) A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. *European Journal of Plant Pathology*. **142**, 591-601.
- Plavec J., Budinščak Ž., Križanac I., Škorić D., Foissac X., Šeruga Musić M. (2018a) Multilocus sequence typing reveals the presence of three distinct '*flavescence doree*' phytoplasma genetic clusters in Croatian vineyards. *Plant pathology*.
- Plavec J, Budinščak Ž, Križanac I, Samaržija I, Škorić D, Foissac X, Šeruga Musić M* (2018b) Emergence of '*flavescence dorée*' in Croatia: distinct genetic clusters and new hotspots. Proceedings of the 19th Congress of the ICVG. Santiago de Chile, Čile, 9.-12.04. 2018. Pp. 98-99.
- Rimmer, S.R., Shattuck, V.I. and Buchwaldt, L. (2007) Compendium of Brassica Diseases. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Schneider B., Gibb K.S., Seemüller E (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* **143**: 3381-3389.

Trkulja N., Ivanović Ž., Pfaf Dolovac E., Dolovac N., Živković S., Jović J., Mitrović M., 2011. Stolbur phytoplasma infection of kale crops (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.) in Serbia. *Bulletin of Insectology* **64 (Supplement)**: S81-S82.

Štefanac-Uđbinac, Z., Milčić, D. i Zeljko, M. (1963) Wasserruĕben- und Kohlrruĕbenmosaikvirus (*Turnip mosaic virus*) in Jugoslawien. *Acta Bot Croat* **22**, 107–117.

Zwolińska, A., Krawczyk, K., Kleydysz, T. and Pospieszny, H. (2011) First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ associated with oilseed rape phyllody in Poland. *Plant Dis* **95**, 1475.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Biljana Glumac

Email: biljana.glumac@gmail.com

Obrazovanje

1998.-2019. DIPLOMSKI STUDIJ, profesor biologije i kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

1994. – 1998. SREDNJA ŠKOLA OTOČAC– opća gimnazija, Ul. Ćirila i Metoda 2, 53200 Otočac

1986. – 1994. OSNOVNA ŠKOLA – Osnovna škola Zrinskih i Frankopana Otočac, Ul. Kralja Zvonimira 15, 53220 Otočac

Radno iskustvo

2011- Opća privatna gimnazija, Gajeva 22 , Zagreb, prof. bio-kemije

2006. -2011. – Druga oća privatna gimnazija, Amruševa 4, Zagreb, prof. bio-kemije

Vještine

-rad na računalu (Windows, Office)

-JEZICI – engleski (aktivno), njemački (pasivno)