

Učinak indol-3-maslačne kiseline na bakteriju 'Candidatus Phytoplasma pruni'

Pavelić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:439407>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Katarina Pavelić

**Učinak indol-3-maslačne kiseline na
bakteriju '*Candidatus Phytoplasma pruni*'**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom red. prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica.

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem dr. sc. Mirni Ćurković Perica na stručnom vodstvu i savjetima, ljubaznosti, razumijevanju i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Također zahvaljujem profesorima i asistentima Biološkog i Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na susretljivosti i brojnim prenesenim znanjima.

Posebno zahvaljujem mojim predivnim Roditeljima na svemu što su mi u životu pružili, na beskrajnoj ljubavi, strpljivosti, podršci, razumijevanju i što su me odmalena učili živjeti u skladu s prirodom. Bez Vas ovo ne bi bilo ostvareno!

Zahvaljujem:

Sestri, vječnoj motivatorici i pozitivki, na bezuvjetnoj ljubavi, pomoći i potpori u svemu, smijehu i brojnim sretnim trenucima.

Nećacima, na ljubavi i radosti koju unose u moj život i što su me naučili da „ništa nije nemoguće ako se dovoljno trudiš“.

Baki, na posebnoj ljubavi i pažnji te što me potaknula na uzgoj biljaka i puno naučila o presađivanju istih i očuvanju sjemena starih sorti.

Prijateljicama, na svim druženjima, podršci, zajedničkom rastu i učenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak indol-3-maslačne kiseline na bakteriju '*Candidatus Phytoplasma pruni*'

Katarina Pavelić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' su unutarstanični, biljni patogeni bez stanične stijenke iz razreda *Mollicutes*. Uzrokuju bolesti brojnih biljaka širom svijeta. Svrha ovog rada bila je istražiti učinak egzogenog biljnog regulatora rasta indol-3-maslačne kiseline (IBA) na bakteriju '*Candidatus Phytoplasma pruni*' (soj KVI) i domaćinsku biljku madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Zdravi i bakterijom zaraženi izdanci madagaskarskog zimzelena dugoročno su održavani u kulturi tkiva *in vitro* na hranidbenoj podlozi s dodanim biljnim regulatorom rasta indol-3-maslačnom kiselinom (IBA) ili benzilamunopurinom (BAP). Tijekom tri supkulture (13., 14. i 15.) mjerene su i uspoređivane visine izdanaka. Rezultati su pokazali da je biljni regulator rasta IBA povoljno utjecao na produžni rast fitoplazmom zaraženih izdanaka madagaskarskog zimzelena. Prisutnost bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*' (soj KVI) u zaraženim izdancima madagaskarskog zimzelena provjerena je „ugniježđenom“ lančanom reakcijom polimerazom. Fitoplazma nije detektirana u 83% izdanaka tretiranih IBA-om, što pokazuje da IBA ima učinak na tu bakteriju.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Rad sadrži: 43 stranice, 11 slika, 4 tablice, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: '*Candidatus Phytoplasma pruni*', *Catharanthus roseus*, kultura tkiva, indol-3-maslačna kiselina, lančana reakcija polimerazom

Mentor: Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, red. prof.

Ocjenjivači: Dr. sc. Ines Radanović, red. prof.

Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Zamjena: Dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.

Rad prihvaćen: siječanj, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

The effect of indole-3-butyric acid on '*Candidatus Phytoplasma pruni*'

Katarina Pavelić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Bacteria of the genus '*Candidatus Phytoplasma*' are intercellular, wall-less plant pathogens from the class *Mollicutes*. They cause diseases in numerous plants worldwide. The purpose of this study was to investigate the effect of the exogenous plant growth regulator indole-3-butyric acid (IBA) on the '*Candidatus Phytoplasma pruni*' (strain KVI) and the host plant Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Healthy and infected shoots of Madagascar periwinkle were grown *in vitro* on the nutrient medium containing growth regulator indole-3-butyric acid (IBA) or benzylaminopurine (BAP). During three subcultures (13., 14. and 15.) heights of their shoots were monitored and compared. The results have shown that plant growth regulator IBA had positive effect on the elongation of phytoplasma-infected Madagascar periwinkle shoots. The presence of '*Candidatus Phytoplasma pruni*' (strain KVI) in the infected shoots of the Madagascar Periwinkle was tested by nested Polymerase Chain Reaction. Phytoplasma was not detected in 83% of the shoots treated with IBA, which shows that IBA has the effect on that bacterium.

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Thesis includes: 43 pages, 11 figures, 4 tables, 49 references, original in:
Croatian

Key Words: '*Candidatus Phytoplasma pruni*', *Catharanthus roseus*, tissue culture, indole-3-butyric acid, Polymerase Chain Reaction

Supervisor: Mirna Ćurković Perica, Ph. D., Prof.

Reviewers: Ines Radanović, Ph. D., Prof.

Dubravka Matković-Čalogović, Ph. D., Prof.

Substitution: Draginja Mrvoš-Sermek, Ph. D., Assoc. Prof.

Thesis accepted: January, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Bakterije roda ' <i>Candidatus Phytoplasma</i> '.....	2
1.2. <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	9
1.3. Biljni hormoni.....	11
1.3.1. Auksini.....	11
1.3.2. Citokinini.....	12
2. CILJ DIPLOMSKOG RADA.....	14
3. MATERIJALI I METODE	
3.1. Uzgoj biljnog materijala u kulturi tkiva.....	15
3.2. Priprema hranidbene podloge.....	16
3.3. Autoklaviranje.....	18
3.4. Rad u komori sa strujanjem sterilnog zraka.....	19
3.5. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina iz biljnog tkiva.....	20
3.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinske kiseline.....	21
3.7. Detekcija bakterije ' <i>Candidatus Phytoplasma pruni</i> ' lančanom reakcijom polimerazom (PCR).....	21
3.8. Elektroforeza.....	24
4. REZULTATI	
4.1. Učinak indol-3-maslačne kiseline na bakterijom ' <i>Candidatus Phytoplasma pruni</i> ' zaražen madagaskarski zimzelen (<i>Catharanthus roseus</i>).....	25
4.2. Učinak indol-3-maslačne kiseline na bakteriju ' <i>Candidatus Phytoplasma pruni</i> '.....	27
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČAK.....	36
7. LITERATURA.....	37
8. ŽIVOTOPIS.....	43

1. UVOD

Biljne vrste rasprostranjene su širom svijeta u svim klimatskim područjima. Od davnina čovjek živi u suživotu s prirodom i ovisi o biljkama. One mu omogućuju disanje, koristi ih u prehrani i kao lijek, izradi različitih građevinskih materijala, a mnoge uzgaja kao ukrasno bilje. Biljke su često ugrožene patogenima koji ih oštećuju i onemogućuju njihov razvoj. Godinama znanstvenici provode razna istraživanja i razvijaju sve naprednije tehnike kako bi razotkrili interakciju biljke i patogena te pronašli načine za suzbijanje djelovanja patogena na određeni biljni organizam. Neke se biljke uspijevaju same obraniti, a nekima je potrebna „pomoć u obrani“ (npr. čovjek upotrebljava različita zaštitna sredstva za biljke u uzgoju).

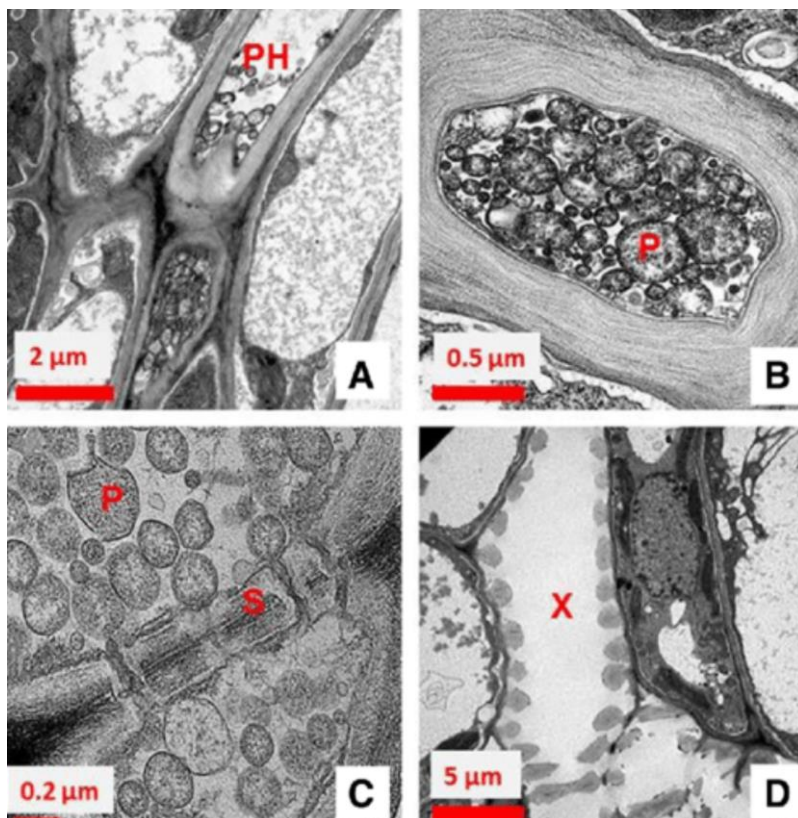
Šezdesetih godina prošlog stoljeća znanstvenici su otkrili mikroorganizme čiji mehanizam djelovanja i danas istražuju. Te sitne bakterije prvotno su smatrane virusima zbog nemogućnosti kultiviranja na hranidbenoj podlozi. Zatim su nazvane mikoplazmama slični organizmi. Za mikoplazme se znalo da izazivaju bolesti u čovjeka i životinja, a ove bakterije bile su slične njima jer nemaju staničnu stijenku i udio G + C baza u DNA je nizak. Devedesetih godina dobile su naziv fitoplazme jer su izazivale bolesti biljaka, a 2004. godine svrstane su u poseban rod '*Candidatus Phytoplasma*' (IRCPM, 2004).

Iako imaju reduciran, malen genom, bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' imaju razvijen izvrstan sustav preživljavanja, razmnožavanja i prijenosa tvari. Same ne mogu sintetizirati određene tvari te iskorištavaju biljku domaćina kako bi unijele sve što im je potrebno u svoje stanice (Christensen i sur., 2005). Fitoplazme ometaju biljku domaćina, njene metaboličke procese i razvitak te djelovanje biljnih hormona. Zbog toga biljke domaćini pokazuje razne abnormalnosti u rastu, imaju smanjene prinose i najčešće odumiru. Ove bakterije su isključivo unutarstanični prokarioti. Prenose se s biljke na biljku vegetativnim razmnožavanjem i kukcima vektorima koji se hrane biljnim sokom (Sugio A. i Hogenhout S. A., 2012). Razvojem tehnika molekularne biologije sekvencionirani su genomi nekih fitoplazmi. Stalno se traže novi načini za razumijevanje mehanizma njihova djelovanja i sprječavanje širenja bolesti, te tvari koja bi potaknule oporavak fitoplazmama zaraženih biljaka (Ćurković Perica, 2012).

1.1. Bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*'

Bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' su unutarstanični prokarioti, biljni patogeni koji uzrokuju više stotina biljnih bolesti širom svijeta. Pripadaju razredu *Mollicutes* (mikoplazme) (Lee i sur., 2000). Do 1993. godine nazivane su „mikoplazmama slični organizmi“ (MLO), a onda im je na desetom kongresu Međunarodne organizacije za mikoplazmologiju (IOM) promijenjen naziv u „fitoplazme“ (Tully, 1993).

Obligatni su paraziti, ne mogu živjeti bez biljke domaćina i kukaca vektora koji ih prenose s jedne biljke na drugu. U najvećoj koncentraciji nakupljaju se u floemu biljke (slika 1, A), (Christensen i sur., 2004), ali su prisutne i u citoplazmi stanica floemskog parenhima blizu sitastih elemenata (Sears i Klomparens, 1989). Stanice ovih bakterija omeđuje troslojna membrana, nemaju staničnu stijenu pa su promjenjivog, najčešće okruglog oblika (slika 1, B), (Bai i sur., 2008). Genom im je mali (530 – 1350 kbp), najčešće građen od jedne kružne dvolančane molekule DNA, s niskim sadržajem G - C parova baza (25 – 30 %), koja slobodno pluta u citoplazmi. Nedostaju im neki metabolički geni stoga bakterija crpi metabolite iz biljke domaćina (Oshima i sur., 2004).



Slika 1. Snimak elektronskim mikroskopom stanica bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*', soj *Crotalaria witches' broom* (16SrII grupa) u floemu zaraženog lista: A) bakterije se nalaze unutar sitaste cijevi floema (PH); B) poprečni presjek sitaste cijevi pokazuje visoku koncentraciju bakterijskih stanica (P = bakterijska stanica); C) bakterijske stanice ulaze u pore sitaste ploče (S) i začepljuju sitaste cijevi; D) bakterijskih stanica nema u stanicama ksilema (X)

(preuzeto iz <https://www.semanticscholar.org/paper/Classification-of-a-new-phytoplasmas-subgroup-with-AI-Subhi-Hogenhout/b9e1a59ab27c8bd3966a62cd9ec94141fc59848c>)

Visoka koncentracija bakterija '*Candidatus Phytoplasma*' u biljkama uzrokuje začepljenje sitastih cijevi (slika 1, C), provodnih žila koje opskrbljuju biljku hranjivim tvarima, te poremećaj prijenosa biljnih hormona (regulatora rasta). Zbog toga zaražene biljke pokazuju čitav niz različitih simptoma kao što su promjene u boji listova (žućenje ili crvenjenje), kovrčanje listova, skraćenje internodija, patuljast rast, kržljivost, virescenciju (ozelenjavanje cvjetnih dijelova), filodiju (transformaciju cvjetnih dijelova u listove), sterilnost cvjetova, neodrvenjavanje stabljike, proliferaciju (abnormalni razvitak bočnih ogranaka, tzv. „vještija metla“) te skraćivanje i sušenje korjenčića (Cousin, 1995). Neki od simptoma prikazani su na slici 2.



a)



b)



c)

Slika 2. Simptomi na biljkama povezani s prisutnošću bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*': virescencija i filodija na madagaskarskom zimzelenu (a) (preuzeto iz http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762012000200005) i purpurnoj ehinaceji (b) (preuzeto iz <https://wimastergardener.org/article/aster-yellows/>); promjene u boji listova na vinovoj lozi (c) (preuzeto iz <https://www.agroportal.hr/vinogradarstvo/23288>)

S obzirom da ove bakterije uzrokuju bolesti ekonomski važnih biljaka i kultura (npr. vinove loze; stabala voćaka - kruške, marelice, jabuke, breskve; ukrasnog bilja; povrtnih kultura - rajčice, paprike, krumpira; šumskog drveća - jablana, bora, brijesta), važno je njihovo proučavanje i otkrivanje učinkovitih puteva za kontrolu i liječenje

istih. Međutim, ono je otežano jer se bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' ne mogu uzgajati samostalno u kulturi *in vitro* na hranidbenoj podlozi.

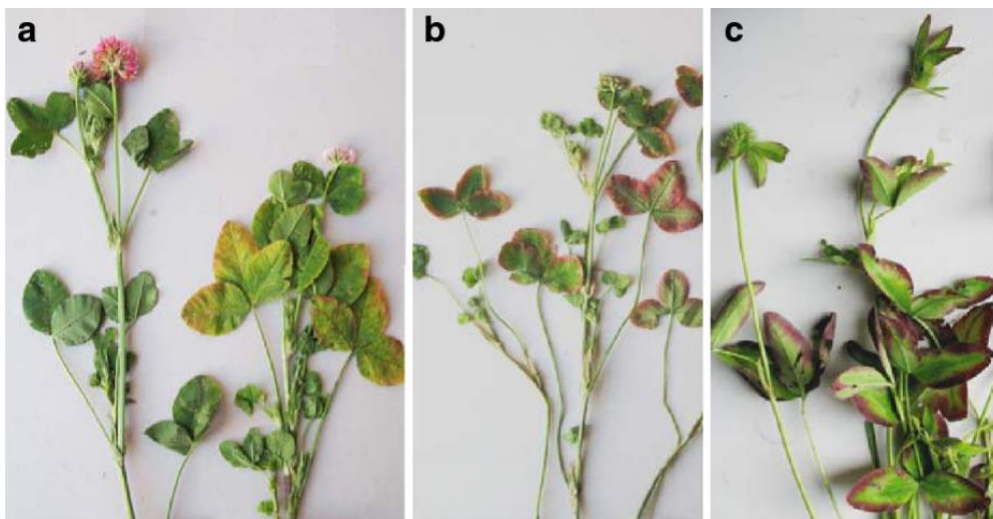
Prijašnja istraživanja o mogućnostima uklanjanja bakterija iz zaraženih biljaka temeljila su se na djelovanju različitih tvari s antibiotskom aktivnošću. Antibiotici tetraciklini imali su bakteriostatski učinak (Davis i sur., 1968), ali simptomi zaraze na tretiranim biljkama većinom su se ponovo pojavili nakon prijenosa biljaka na hranidbenu podlogu bez antibiotika. Samo su u dva slučaja zabilježeni baktericidni učinci tetraciklina u biljkama domaćinima božićnoj zvijezdi (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzsch) i madagaskarskom zimzelenu (*Catharanthus roseus*, (L.) G. Don). U božićnoj zvijezdi, tj. u njenim komercijalnim kultivarima, dokazane su bakterije '*Candidatus Phytoplasma*' koje pripadaju podskupini 16SrIII (H), (Lee i sur., 1995). Simptomi koje te bakterije uzrokuju na biljci (patuljast rast i izražena aksilarna proliferacija s puno pricvjetnih obojenih listova) omogućili su uzgoj božićne zvijezde kao ukrasne biljke.

Liječenje β -aminomaslačnom kiselinom, neproteinskom kiselinom koja pokazuje postzaraznu aktivnost protiv oblića, gljiva, bakterija i virusa mozaika duhana, nije se pokazalo djelotvornim protiv ovih bakterija (Ćurković Perica i Šeruga Musić, 2005). Liječenje poliaminima (putrescinom, sperminom, spermidinom) uzrokovalo je sporiji razvoj simptoma i različite promjene u ultrastrukturi bakterija (deformacija, aglutinacija) te se pretpostavlja da su poliamini imali učinak na razmnožavanje i kretanje ovog patogena. Tretiranje različitim bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' zaraženih izdanaka madagaskarskog zimzelena biljnim regulatorima rasta - auksinima izazvalo je oporavak izdanaka. Izdanci su bolje rasli i došlo je do remisije simptoma, ali nije u svim slučajevima dovelo do oslobađanja domaćinske biljke od bakterija (Ćurković Perica, 2008).

Klasifikacija biljnih patogena u prošlosti temeljila se na simptomima bolesti koji se javljaju na zaraženim biljkama. Razvojem tehnika molekularne biologije postale su dostupne puno osjetljivije metode za detekciju, identifikaciju i klasifikaciju pojedinih vrsta fitoplazmi. Jedna od metoda je lančana reakcija polimerazom (PCR) u kojoj se umnožava visoko konzervirani gen za 16S rRNA. Nakon toga slijedi analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) tog gena (Lee i sur., 2000).

Na osnovu razlike RFLP-obrazaca fitoplazme su bile podijeljene u 14 ribosomskih skupina i više od 40 podskupina. Godine 2004. pojavila se nova klasifikacijska shema i novi rod '*Candidatus Phytoplasma*' koji obuhvaća 30 '*Candidatus*' vrsta (IRPCM, 2004).

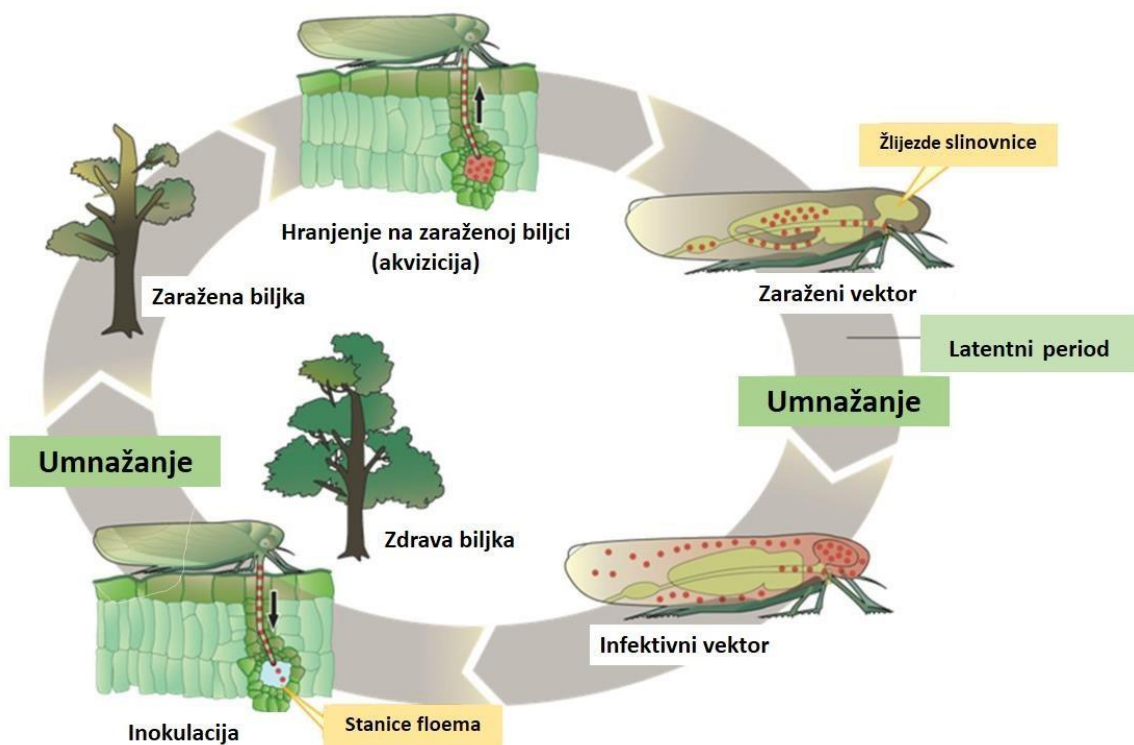
Sustav ribosomskih skupina i podskupina još uvijek se široko primjenjuje. Prema podacima objavljenim do 2016. godine, opisane su 33 ribosomske skupine (16SrI – 16SrXXXIII) unutar kojih je opisan veći broj podskupina (Zhao i Davis, 2016). Bakterija '*Candidatus Phytoplasma pruni*' (soj KVI) pripada skupini 16SrIII-B. Soj KVI potječe iz Italije (<http://ipwgnet.org/collection>). Uzrokuje bolest koja se naziva „clover yellow edge“. Nedavno je fitoplazma koja pripada istoj skupini detektirana i u zaraženim djetelinama u Rusiji (Girsova i sur., 2017). Rubovi listova djetelina zaraženih tom bakterijom postaju žuti ili crvenkasti što je prikazano na slici 3.



Slika 3. a) Zdrava (lijevo) i bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' soj KVI (clover yellow edge, 16SrIII-B) zaražena hibridna djetelina (desno); b) zaražena bijela djetelina; c) zaražena crvena djetelina (preuzeto iz <https://www.semanticscholar.org/paper/Diverse-phytoplasmas-associated-with-leguminous-in-Girsova-Bottner-Parker/12a93fd2e60b6a5c99af824e9dec603dab09ece5>)

Prijenos bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' s biljke na biljku i širenje zaraze odvija se vegetativnim razmnožavanjem (lukovicama, rizomima i reznicama) zaraženih biljaka (Lee i Davis, 1992), cijepljenjem voćaka te kukcima vektorima.

Kukci iz reda polukrilci (*Hemiptera*), porodice skakavci (*Cicadellidae*), cvrčci (*Cicadidae*), *Fulgoridae* i lisne buhice (*Psyllidae*) (Weber i Maxner, 1998) hrane se biljnim sokom te tako u svoj organizam unose fitoplazme. One prolaze kroz stijenku probavnog trakta, razmnožavaju se u hemolimfi kukca te ulaze u žlijezde slinovnice. Da bi kukac vektor postao zaražen, potrebno je vrijeme inkubacije 10 – 18 dana. Kukac ostaje zaražen cijeli život i preko sline prenosi bakterije u floem zdravih biljaka (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz životnog ciklusa bakterija roda 'Candidatus Phytoplasma' unutar kukca vektora i biljke domaćina. Bakterije su na slici prikazane kao crvene točkice.

(Prilagođeno prema Oshima i sur., 2011)

Zaražene biljke, u kojima je inhibiran rast apikalnih (vršnih) izdanaka, što potiče rast bočnih izdanaka (formiranje tzv. „vještije metle“), privlačnije su kukcima, pogotovo skakavcima za ishranu. Ženke skakavca *Macrosteles quadrilineatus* (Forbes, 1885) više prenose zarazu nego mužjaci zbog češćeg hranjenja (Beanland i sur., 1999).

Ustanovljeno je da do inhibicije rasta apikalnih izdanaka dolazi jer neke bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' izlučuju protein koji direktno prigušuje biosintetski put auksina u stanicama apikalnih pupova (Hoshi i sur., 2009). Taj se protein zove TENGU, malen je, građen od samo 38 aminokiselina. Dobio je ime po mitskom biću - dugonosom japanskom goblinu koji je živio u planinama, letio nebom, a u šumama svijao gnijezda nalik „vještičjoj metli“. Iako su fitoplazme ograničene na floem, TENGU se može transportirati u druge stanice. U Japanu je prije više od 140 godina opisana bolest vještičje metle Paulovnije uzrokovana fitoplazmom. Zaražene biljke pokazivale su simptome zaraze – patuljast rast i velik broj pazušnih izdanaka nalik na metlu. Slika 5 prikazuje promjene u obliku „vještičje metle“ na bakterijom roda '*Candidatus Phytoplasma*' zaraženim biljkama.



a)



b)

Slika 5. „Vještičja metla“ na:

a) paulovniji

(preuzeto iz <https://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=3943089>);

b) boru

(preuzeto iz <https://www.flickr.com/photos/turismocuencasmineras/8676753893/>)

1.2. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) je biljka trajnica podrijetlom s Madagaskara, pripada porodici zimzelenovke (*Apocynaceae*), redu sirištarolike (*Gentianales*), (sistematika prema Unites States Department of Agriculture, 2014). Rasprostranjen je u Indiji, Šri Lanki, Australiji, Južnoafričkoj Republici, zemljama zapadnog dijela Indijskog oceana, u cijelom tropskom i djelomično subtropskom području. U 18. stoljeću prenesen je u Europu. Iako trajnica, kod nas se uzgaja kao jednogodišnja biljka jer mu ne pogoduje temperatura ispod 5°C. Zbog svog izgleda (glatkih, sjajnih, tamnozelenih listova ovalnog oblika i cvjetova različitih boja – od bijele do crvene i ljubičaste, slika 6) te dugog razdoblja cvjetanja (u tropima tijekom cijele godine, kod nas od proljeća do kasne jeseni i prvih mrazova), uzgaja se kao ukrasna biljka u mnogim vrtovima (Royal Botanic Gardens, 2014). Vrlo dobro podnosi visoku temperaturu i sušu, dobro raste na osunčanom položaju i u polusjeni, razmnožava se sjemenom (sjemenke su u mahunama) te reznicama.

Madagaskarski zimzelen stoljećima se koristio kao „narodni lijek“ za različite bolesti. U Indiji, Brazilu, Engleskoj i drugim zemljama koristio se protiv dijabetesa i malarije, u Americi protiv laringitisa i bolova u prsima, a u Indiji su sokom lišća biljke liječili ubode insekata (Anthwal i sur., 2012). Na Kubi su ekstraktom cvijeta ispirali djeci oči za ublažavanje iritacije i upale, a na Bahamima liječili tuberkulozu, astmu i lošu probavu. Također se koristio za snižavanje visokog krvnog tlaka, liječenje limfoma, ublažavanje menstrualnih bolova i kao diuretik (Duke i sur., 1985). Sadrži više od 120 različitih alkaloida, organskih tvari koje u svom heterocikličkom prstenu sadrže dušik i u većim su količinama otrovni za čovjeka, a u manjim se koriste u medicini (Pevalek–Kozlina, 2003). Neki od njih koriste se u liječenju raznih bolesti: vindolinin smanjuje razinu šećera u krvi, serpentin i reserpin djeluju kao jaka sredstva za smirenje, ajmalicin snižuje visoki krvni tlak, a vinblastin i vinkristin imaju antikancerogena svojstva te se koriste u liječenju nekih vrsta tumora (Risner i sur., 2006).

Madagaskarski zimzelen je pogodan domaćin za različite bakterije roda 'Candidatus Phytoplasma' i istraživanje interakcija bakterija – biljka. Izdanci biljke uzgajaju se u kulturi *in vitro*, što znači „u staklu“, tj. staklenim epruvetama. Održavaju se u posebnim uvjetima mikroklimе i na hranidbenim podlogama koje sadrže mineralne soli, vitamine i regulatore rasta.



Slika 6. Madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), biljke iz uzgoja (preuzeto iz https://www.123rf.com/photo_31076177_flowers-and-herbs-that-have-the-ability-to-treat-disease.html?fromid=QXpBT1pKdlEwS2JCYXFpOXp2ZklQZz09)

1.3. BILJNI HORMONI

Biljni hormoni ili regulatori rasta su organske molekule koje kao kemijski signali putuju iz jednog dijela biljke u drugi. U stanicama se vežu na specifične receptorske proteine te nastali kompleks hormon – receptor predstavlja aktivan oblik hormona. Djelotvorni su u niskim koncentracijama (10^{-6} - 10^{-8} M) na mjestu sinteze i u drugim dijelovima biljke. Reguliraju i koordiniraju metabolizam, rast i morfogenezu viših biljaka. Podijeljeni su u pet skupina: auksini, giberelini, citokinini, etilen, apscizinska kiselina (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.3.1. AUKSINI

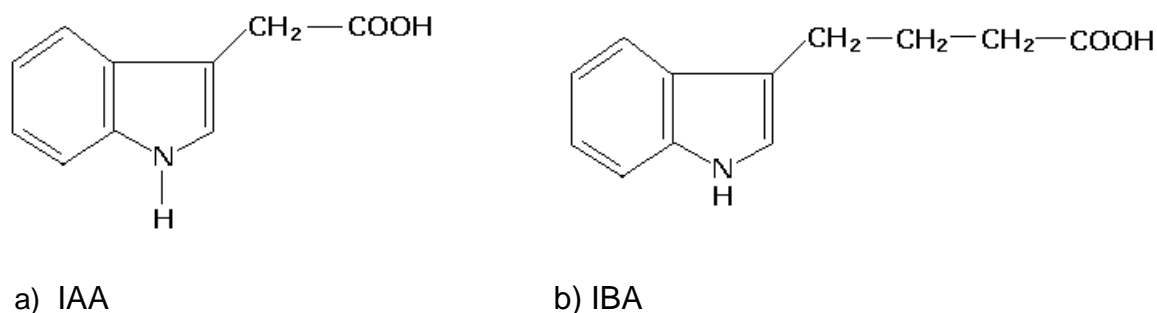
Auksini su biljni hormoni čije ime potječe od grčke riječi *auxein* što znači rasti. Imaju razne učinke: u niskim koncentracijama stimuliraju produžni rast stabljike, a inhibiraju rast korijena u dužinu; stimuliraju stanične diobe u stabljici, a inhibiraju ih u bočnim pupovima (apikalna dominacija); stimuliraju razvoj adventivnog korijenja na reznoj plohi stabljike. Osim toga, posreduju u odgovorima biljke na svjetlost (fototropizam) i silu teže (geotropizam), odgađaju rane stadije apscizije (otpadanje listova, cvjetova, plodova) i utječu na razvitak plodova i partenokarpije. Svi ti učinci ovise o koncentraciji i vrsti auksina, razvojnom stadiju tkiva ili organa te uključenosti drugih biljnih hormona (Pevalek-Kozlina, 2003).

Najpoznatiji prirodni auksin je indol-3-octena kiselina (IAA) koja se sintetizira u meristemskim tkivima i tkivima embrija te mladim listovima. Može biti obilno prisutna u spremišnim tkivima, npr. endospermu plodova i supkama i peludu. Primarni izvor auksina je vršni pup izdanka i od tuda je prijenos IAA usmjeren prema korijenu (Finet i Jaillas, 2012). Ako je koncentracija auksina dovoljno visoka za stimuliranje rasta stanica stabljike, inhibirat će rast stanica korijena. I obrnuto, ako je preniska za stimuliranje produživanja stabljike, uzrokovat će produžni rast korijena (Pevalek-Kozlina, 2003).

Indol-3-maslačna kiselina (IBA) dugo se smatrala sintetskim auksinom, ali utvrđeno je da postoji i kao prirodni auksin u nekim biljnim vrstama (kukuruzu,

jabukama, duhanu) (Schneider i sur., 1997). Najčešće se koristi u hortikulturi za zakorjenjivanje reznica.

Struktura indol-3-octene kiseline i indol-3-maslačne kiseline prikazana je na slici 7. Oba auksina imaju indolski prsten koji sadrži dušik.



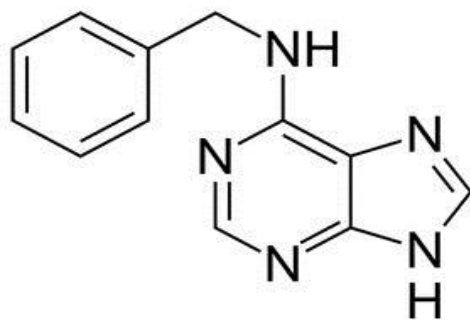
Slika 7. Struktura auksina: a) indol-3-octene kiseline (IAA) i b) indol-3-maslačne kiseline (IBA)

Danas se proizvode brojni sintetski auksini koji se koriste u hortikulturi i agrikulturi za zakorjenjivanje reznica, sprječavanje otpadanja listova, izazivanje partenokarpije (razvoj plodova, npr. rajčice, krastavca, jabuke bez sjemenki), poticanje cvjetanja nekih biljaka (npr. ananasa) i kao herbicidi.

1.3.2. CITOKININI

Citokinini su biljni hormoni koji pospješuju citokinezu (diobu stanica), ali djeluju i na sazrijevanje kloroplasta, mobilizaciju hranjivih tvari, poticanje rasta bočnih pupova, odgađanje starenja i kontrolu morfogeneze u kultiviranom tkivu. Sintetiziraju se u vršnim meristemima korijena, embrijima i plodovima. Iz korijena se prenose u izdanak kroz ksilem zajedno s vodom i mineralnim tvarima. Djeluju antagonistički u odnosu na auksine i potiču rast bočnih pupova (Pevalek-Kozlina, 2003). Kada se u biljci zaraženoj bakterijama '*Candidatus Phytoplasma*' djelovanjem proteina TENGU blokira sintetski put auksina, citokinini potiču rast bočnih pupova i formira se tzv. „vještija metla“. Zaražene biljke pokazuju i patuljast rast (Hoshi i sur., 2009).

Danas se proizvode brojni sintetski spojevi koji pokazuju citokininsku aktivnost. Jedan od njih, koji se koristi za rast i razvoj biljnih stanica u kulturi tkiva *in vitro*, je benzilaminopurin (BAP), (slika 9).



Slika 9. Struktura benzilaminopurina (BAP)

2. CILJ DIPLOMSKOG RADA

- Održavanje zdravih i bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' zaraženih izdanaka biljke *Catharanthus roseus* u kulturi tkiva *in vitro*.
- Utvrđivanje učinka indol-3-maslačne kiseline (IBA) na produžni rast zdravih, kontrolnih i zaraženih izdanaka biljke *Catharanthus roseus*.
- Određivanje učinka indol-3-maslačne kiseline (IBA) na bakteriju '*Candidatus Phytoplasma pruni*' soj KVI utvrđivanjem prisutnosti/ odsutnosti bakterije u uzorcima tkiva biljke nakon djelovanja indol-3-maslačne kiseline (IBA) i uspoređivanjem rezultata s kontrolnim uzorcima tkiva zaraženih izdanaka koji su uzgajani na hranidbenoj podlozi s benzilaminopurinom (BAP).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj biljnog materijala u kulturi tkiva

Prije ovoga istraživanja izdanci biljke madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus*) zaraženi bakterijama 'Candidatus Phytoplasma pruni', soj KVI (16SrIII-B podgrupa), održavani su u kulturi tkiva *in vitro* u Zavodu za mikrobiologiju, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tretirani su dvjema različitim koncentracijama indol-3-maslačne kiseline (IBA) kroz dvanaest supkultura. Dobiveni su iz mikropropagirane kolekcije referentnih sojeva održavanih u Laboratoriju za fitoplazmologiju Sveučilišta u Bologni (IRPCM, 2004). Također su, u kulturi *in vitro*, uzgajani i izdanci zdrave biljke na hranidbenoj podlozi s dodanom indol-3-maslačnom kiselinom (IBA), odnosno benzilaminopurinom (BAP), te izdanci zaraženi bakterijama 'Candidatus Phytoplasma pruni' soj KVI na hranidbenoj podlozi s dodanim benzilaminopurinom (BAP). Po dvanaest izdanaka iz svake kulture presadila sam na hranidbenu podlogu istog kemijskog sastava kao ona na kojoj su prethodno uzgajani.

Tijekom istraživanja izdanke sam presađivala svakih šest tjedana i mjerila visinu svakog izdanka na početku i kraju svake supkulture (kroz ukupno tri supkulture). Omjer konačne i početne vrijednosti visine naziva se "faktor porasta izdanka". U svakoj supkulturi na hranidbenoj podlozi s dodanim BAP ili IBA bilo je 12 izdanaka zdrave ili zaražene biljke, tako da sam faktore porasta svih 12 izdanaka izrazila kao srednju vrijednost. Na kraju sam odredila srednju vrijednost faktora porasta izdanka sve tri skulpture koja pokazuje koliko su, u prosjeku, izdanci rasli na pojedinoj hranidbenoj podlozi.

3.2. Priprema hranidbene podloge za uzgoj biljnih izdanaka

Zdrave i zaražene izdanke madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus*) uzgajala sam i presađivala u laboratorijskim uvjetima u kulturi tkiva *in vitro* na modificiranoj MS hranidbenoj podlozi (Murashige i Skoog, 1962), (tablica 1).

Svaku hranidbenu podlogu pripremila sam u Erlenmeyerovoj tikvici tako da sam dodala sve navedene sastojke (tablica 1), osim agara. Zatim sam dodala određenu količinu biljnog regulatora rasta IBA ili BAP kako bih postigla koncentracije navedene u tablici 2 i tikvicu do oznake nadopunila destiliranom vodom te dobro izmiješala na magnetskoj mješalici. Podesila sam pH pripremljene hranidbene podloge na 5,7 pomoću kiseline HCl, odnosno lužine NaOH. Na kraju sam, kako bi se postigla želatinoznost medija, u otopinu dodala agar i zagrijavala u mikrovalnoj pećnici dok se agar nije otopio. Vruću otopinu ulila sam u epruvete pripremljene u košari. Svaku sam zatvorila vatom i prekrila aluminijskom folijom. Cijelu košaru prekrila sam papirom i zavezala konopcem. Na papir sam naljepila komadić bijele trake za kontrolu sterilizacije.

Tablica 1. Osnovni sastav hranidbene podloge (prema Murashige i Skoog, 1962)

TVAR	MASENA KONCENTRACIJA TVARI U HRANIDBENOJ PODLOZI (mg/L)
<p><i>Makroelementi</i></p> <p>NH₄NO₃</p> <p>KNO₃</p> <p>CaCl₂ x 2H₂O</p> <p>MgSO₄ x 7H₂O</p> <p>KH₂PO₄</p>	<p>1650</p> <p>1900</p> <p>440</p> <p>370</p> <p>170</p>
<p><i>Mikroelementi:</i></p> <p>H₃BO₃</p> <p>MnSO₄ x H₂O</p> <p>ZnSO₄ x 7H₂O</p> <p>KI</p> <p>Na₂MoO₄ x 2H₂O</p> <p>CuSO₄ x 5H₂O</p> <p>CoCl₂ x 6H₂O</p>	<p>6,2</p> <p>16,9</p> <p>8,6</p> <p>0,83</p> <p>0,25</p> <p>0,025</p> <p>0,025</p>
<p><i>Željezo</i></p> <p>FeSO₄ x 7H₂O</p> <p>Na₂EDTA</p>	<p>27,85</p> <p>37,25</p>
<p><i>Vitamini:</i></p> <p>tiamin (B1)</p> <p>piridoksin hidroklorid (B6)</p> <p>nikotinska kiselina</p>	<p>0,1</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p>
<p><i>Ostali organski sastojci:</i></p> <p>kazein</p> <p>saharoza</p> <p>mio-inozitol</p> <p>agar</p>	<p>1000</p> <p>30000</p> <p>100</p> <p>8000</p>

Tablica 2. Regulatori rasta i njihova koncentracija za uzgoj zdravih i bakterijama ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’ (soj KVI) zaraženih izdanaka biljke *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Biljka domaćin	Prisutnost bakterije ‘ <i>Candidatus Phytoplasma pruni</i> ’ (soj KVI)	Regulator rasta u hranidbenoj podlozi	Koncentracija regulatora rasta (mg/L)
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (madagaskarski zimzelen)	-	BAP*	0,5
		IBA**	4
	+	BAP*	0,5
		IBA**	2
		IBA**	4
		(zdrava biljka)	
	(zaražena biljka)		

*Benzilaminopurin (BAP), **Indol-3-maslačna kiselina (IBA)

3.3. Autoklaviranje

Prije presađivanja biljnog materijala pripremljene hranidbene podloge sterilizirala sam u autoklavu („Papinovom loncu“), uređaju za zagrijavanje tvari pod povišenim tlakom na temperaturu višu od njihova vrelišta. Vrućom stlačenom vodenom parom, uz odabir optimalnog vremena autoklaviranja, mogu se uništiti svi mikroorganizmi i tako se hranidbena podloga sterilizira. U autoklavu se postižu temperature od 115 do 135 °C. Korišteni autoklav bio je namješten na temperaturu 121 °C, tlak 118 kPa i vrijeme 20 minuta. Prije otvaranja autoklava tlak mora biti izjednačen s atmosferskim tlakom, a temperatura ispod 100 °C.

3.4. Rad u komori sa strujanjem sterilnog zraka

Za rezanje i presađivanje biljnog materijala i uzgoj istog u kulturi *in vitro* potrebni su sterilni uvjeti. Za to je najpogodnija komora sa strujanjem sterilnog zraka, tzv. „laminar“. Iz stražnje površine laminara upuhuje se zrak koji prolazi kroz posebne filtere te takav sterilan zrak ulazi u unutrašnjost laminara i ispuhuje se prema van. S obzirom da struji iz laminara prema van, sprječava ulazak prašine i mikroorganizama u radnu komoru.

Tijekom rada u laboratoriju i laminaru obavezno se treba držati određenih propisa. Prije ulaska u laboratorij stavila sam naočale s UV zaštitom. Zatim sam u laboratoriju i laminaru ugasila UV lampe, uključila ventilator u laminaru te stavila zaštitne rukavice. Laminar sam, prije upotrebe, prebrisala 70 %-tnim etanolom.

U čašu, prethodno napunjenu 96 %-tnim etanolom, stavila sam pribor - pincete (dvije velike i dvije male) i skalpel. Upalila sam špiritnu lampu i sterilizirala pribor. Nakon toga sam u laminar stavila košaru s uzorcima biljaka i epruvete s prethodno pripremljenom i steriliziranom hranidbenom podlogom. Također sam pripremila sterilizirane folije i papire na kojima sam obrađivala biljke za presađivanje. Prilikom rada potrebno je često ispirati ruke, odnosno rukavice, 70 %-tnim etanolom.

Prije presađivanja izdanaka biljaka iz jedne epruvete u drugu sa svake epruvete s izdankom skinula sam zaštitnu aluminijsku foliju i vatu, a otvor epruvete kratko zagrijala špiritnom grijalicom. Zatim sam kratkom pincetom izvadila izdanak i položila ga na sterilan komad papira. Izdanak sam izmjerila, odstranila uvenule dijelove, podijelila ga na manje dijelove i pomoću duge pincete usadila svaki dio na novu hranidbenu podlogu. Nakon toga sam epruvete zatvorila vatom, zapalila vrhove vate i stavila zaštitne folije. Upotrijebljeni pribor sterilizirala sam odmah nakon korištenja. Nakon presađivanja laminar sam očistila etanolom i korišteni etanol procijedila, preko vate, u posebnu bocu. Prije izlaska iz prostorije upalila sam UV lampe.

3.5. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina iz biljnog tkiva

Nakon održavanja uzoraka (tablica 2) kroz tri supkulture odvojila sam izdanke iz svake supkulture. Stavljala sam ih u male paketiće od plastične folije (težina svakog paketića trebala je biti 400 - 500 mg) i zamrznula.

Izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina iz biljnog tkiva radila sam prema protokolu (Šeruga Musić i sur., 2003). Za brzu izolaciju uzela sam 1 uzorak tkiva biljke *Catharantus roseus* zaraženih bakterijom 'Candidatus Phytoplasma pruni' i tretiranih BAP-om, 6 uzoraka tkiva biljke *Catharantus roseus* zaraženih bakterijom 'Candidatus Phytoplasma pruni' i tretiranih IBA-om (tri uzorka su bila tretirana IBA-om u koncentraciji 2 mg/L a tri IBA-om u koncentraciji 4 mg/L) i po 1 uzorak tkiva zdrave biljke tretirane regulatorima rasta IBA ili BAP. Uzorke sam na isti način uzimala u 13. i 14. supkulturi. U digestoru sam pripremila CTAB - pufer (3% (w/v) CTAB, 1 M Tris, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8) i dodala 2-merkaptetanol u konačnoj koncentraciji 0,0004%. Svaki iznad navedeni zaleđeni uzorak biljnog tkiva stavljala sam u ohlađeni tarionik i homogenizirala u tekućem dušiku. Prije nego se uzorak otopio brzo sam dodavala 3,5 mL pufera, postupno po 1 mL. Odpipetirala sam po 1 ml dobivenih homogenata u mikroeprevete od 2 ml koje sam zatim stavila u vodenu kupelj na 65 °C 20 min. Nakon inkubacije u vodenoj kupelji uzorci su se hladili na sobnoj temperaturi te sam svakom dodala 1 mL kloroforma. Svaku mikroeprevetu lagano sam vorteksirala pazeći da se ne otvori poklopac. Uzorke sam zatim centrifugirala 10 min na 11 000 rpm pri temperaturi 4°C.

Nakon centrifugiranja odvojila su se dva sloja - vodeni s nukleinskim kiselinama i organski s kloroformom. Vodene slojeve odpipetirala sam u čistu mikroeprevetu i pomiješala s izopropanolom u istoj količini, dobro promućkala i centrifugirala 15 min na 11 000 rpm. Nakon centrifugiranja dobila sam taloge nukleinske kiseline. Supernatant (izopropanol) ocijedila sam u drugu mikroeprevetu a svaki talog isprala 70 %-tnim hladnim etanolom, centrifugirala i ocijedila. Taloge sam ostavila da se osuše na zraku (30-60 min). Na kraju sam ih otopila, svaki talog u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6).

3.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinske kiseline

Uzorke otopljenih taloga nukleinske kiseline otopila sam u sterilnoj vodi (45 µL vode + 5 µL uzorka) i zatim mjerila koncentraciju. Koncentraciju DNA odredila sam spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije nukleinske kiseline pri valnoj duljini 260 nm. Ovisno o koncentraciji DNA u uzorku, uzorke sam razrijedila na 20 µg/mL PCR vodom.

3.7. Detekcija bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*' lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

U razrijeđenim uzorcima nukleinske kiseline provjeravala sam prisutnost gena za 16S rRNA bakterija '*Candidatus Phytoplasma pruni*' nakon tretiranja zaraženih izdanaka madagaskarskog zimzelena različitim koncentracijama indol-3-maslačne kiseline (IBA). Zaražene izdanke tretirane benzilaminopurinom (BAP) koristila sam kao pozitivnu kontrolu, a zdrave izdanke tretirane biljnim regulatorima rasta IBA ili BAP kao negativnu kontrolu za prisutnost bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*'.

Kako bih dobila veliki broj kopija određenog gena, koristila sam metodu lančane reakcije polimerazom (PCR). Ciljani niz ili gen koji se želi umnožiti omeđen je oligonukleotidnim početnicama, kratkim DNA nizovima koji su komplementarni krajevima gena. Sekvenca početnica mora biti pažljivo određena. Sadržaj G + C baza u njima treba biti od 50 – 70 %. Ne smije biti komplementarnosti među početnicama, niti ponavljanja određenog nukleotida više od 4 puta za redom. Reakcija u kojoj enzim DNA polimeraza na kalupu određenog niza DNA lanca sintetizira novi, komplementarni lanac, kreće od početnica.

Lančana reakcija polimerazom odvija se u uređaju koji automatski i precizno kontrolira promjene temperature tijekom umnožavanja određene DNA sekvence. Sastoji se od 3 faze koje se ciklički ponavljaju. Osim određene temperature, svaka faza ima određenu duljinu trajanja. U prvoj fazi dolazi do denaturacije DNA kalupa, u drugoj do vezanja oligonukleotidnih početnica na kalup DNA, a u trećoj do sinteze komplementarnih lanaca DNA. Reakcijski ciklusi provođeni su prema obrascu (Shaff i sur., 1992), (tablica 3).

Tablica 3. Reakcijski ciklusi prema obrascu (Shaff i sur., 1992)

FAZA	početna denaturacija	35 ciklusa reamplifikacije			završno produljenje lanaca
		denaturacija	sparivanje početnica i kalupa	produljenje lanaca	
Vrijeme / temperatura	1 min / 94°C	1 min / 94°C	2 min / 50°C	3 min / 72°C	7 min / 72°C

Smjesa za PCR mora sadržavati ciljani niz ili gen DNA, sva 4 deoksiribonukleozidtrifosfata (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), DNA - polimerazu koja je aktivna na višim temperaturama, oligonukleotidne početnice, pufer i sterilnu vodu.

U direktnom PCR-u koristila sam par početnica F1/R0 za dokazivanje gena za 16S rRNA bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*'

* par univerzalnih početnica R16F1/R0 (F1/R0) (Lee i sur., 1995.)

R16F1: 5'-AAG ACG AGG ATA ACA GTT GG-3'

R16R0: 5'-GGA TAC CTT GTT ACG ACT TAA CCC C-3'

Smjesu za PCR pripremila sam prema postupku:

15,875 µL sterilne deionizirane vode
2,5 µL reakcijskog pufera za PCR sa 1,5 mM MgCl₂ (10x)
4 µL dNTPmixa (200 µM svaki dNTP)
1 µL početnice F1 (0,2 µM)
1 µL početnice R0 (0,2 µM)
0,125 µL enzima *Taq*-polimeraze (0,625 U)
1 µL uzorka DNA

25 µL (ukupni volumen)

U svaki pokus bile su uključene pozitivna kontrola ('*Candidatus* Phytoplasma pruni', soj KVI, tretiran regulatorom rasta BAP), negativna kontrola (sterilna voda umjesto uzorka DNA), te još dvije negativne kontrole: zdrava biljka uzgojena na podlozi s BAP-om i zdrava biljka uzgojena na podlozi s IBA.

Nakon direktnog PCR-a radila sam „ugniježđeni“ (nested) PCR. Umnožene fragmente DNA iz direktnog PCR-a razrijedila sam 30 puta autoklaviranom deioniziranom vodom i koristila kao kalup za prvu „ugniježđenu“ lančanu reakciju polimerazom. Smjesu za tu reakciju pripremila sam na prethodno opisan način, koristeći par početnica R16F2n/R2:

- * par univerzalnih početnica R16F2n/R2 (Gundersen i Lee, 1996)

R16F2n: 5'-GAA ACGACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2: 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Reakcijski ciklusi bili su jednaki kao i za direktni PCR.

Produkte dobivene umnožavanjem u prvoj "ugniježđenoj" lančanoj reakciji polimerazom razrijedila sam 30 puta autoklaviranom deioniziranom vodom. Razrijeđeni produkti korišteni su za sljedeće umnožavanje (drugu „ugniježđenu lančanu reakciju“) koristeći par specifičnih početnica za treću grupu bakterija '*Candidatus* Phytoplasma' R16(III)F2/R1:

- * par specifičnih početnica R16(III)F2/ R1 (Lee i sur., 1994.)

R16(III)F2: 5'- AAG AGT GGA AAA ACT CCC-3'

R16(III)R1: 5'-TTC GAA CTG AGA TTG A-3'

Sve lančane reakcije polimerazom odvijale su se u uređaju MasterCycler Personal (Eppendorf AG, Njemačka).

3.8. Elektroforeza

Fragmente umnožene PCR metodom analizirala sam elektroforezom u 1 %-tnom gelu agaroze. Agarozna gel elektroforeza je metoda koja služi za odvajanje, identifikaciju i purifikaciju molekula DNA veličine od nekoliko stotina nukleotida do 25 000 nukleotida. Molekule DNA se odvajaju na temelju različite veličine.

Agarozni gel pripremila sam u Erlenmeyerovoj tikvici otapanjem 1 g agaroze u 100 mL pufera 1x TBE (90 mM Tris, 90 mM borne kiseline, 1 mM EDTA, pH 8,3). Otapanje sam pospješila zagrijavanjem. Ohlađeni gel izlila sam u kadicu i stavila češalj za jažice. Nakon hlađenja, oprezno sam izvadila češalj kako se jažice ne bi deformirale. Gel u kadici stavila sam u uređaj za elektroforezu i ulila TBE 1x pufer toliko da prekrije gel.

U prvu jažicu unijela sam molekularni standard - 5 puta razrijeđeni *DNA molecularweight marker IX* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), a u ostale redom dobivene uzorke – PCR produkte. Pet μL svakog uzorka pomiješala sam s 1 μL obojenog pufera za elektroforezu. Uključila sam uređaj i elektroforeza se odvijala 1 sat pri konstantnom naponu od 100 V i jakosti struje 22 mA. Nakon elektroforeze gel sam stavila 15 minuta u vodenu otopinu etidijevog bromida te fotografirala pod UV-svjetlom.

4. REZULTATI

4.1. Učinak indol-3-maslačne kiseline na bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' zaražen madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus*)

Zdravi i bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' (soj KVI) zaraženi izdanci madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus*) rasli su na hranidbenoj podlozi s dodanim biljnim regulatorom rasta benzilaminopurinom (BAP) ili indol-3-maslačnom kiselinom (IBA). Mjerenja visine navedenih izdanaka i određivanje faktora rasta pokazala su da dodatak biljnog regulatora rasta u hranidbenu podlogu utječe na rast zdravih i bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' zaraženih izdanaka madagaskarskog zimzelena (tablica 4). Svi izdanci madagaskarskog zimzelena su relativno dobro rasli, zdravi bolje nego bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' zaraženi izdanci. Zdravi izdanci na podlozi s dodanim BAP -om malo su bolje rasli nego na podlozi s dodanom IBA. Zaraženi izdanci na podlozi s dodanim BAP -om najslabije su rasli, što je i očekivano jer je u njima već utvrđena prisutnost bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*'.

Zaraženi izdanci na podlozi s dodanom IBA manje koncentracije (2 mg/L) nešto su bolje rasli od zaražnih izdanaka na podlozi s dodanim BAP, a najbolje od svih promatranih zaraženih izdanaka rasli su oni na podlozi s dodanom IBA veće koncentracije (4 mg/L). Ti su izdanci rasli podjednako kao zdravi izdanci tretirani s IBA koncentracije 4 mg/L, što pokazuje srednja vrijednosti faktora porasta izdanaka tijekom svih triju supkultura (tablica 4).

Tablica 4. Faktor porasta izdanaka zdravih i bakterijom '*Candidatus* Phytoplasma pruni' (soj KVI) zaraženih izdanaka madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) uzgojenih na hranidbenim podlogama s dodanim različitim biljnim regulatorima rasta. Faktor porasta izdanaka mjereno je u 13, 14. i 15. supkulturi.

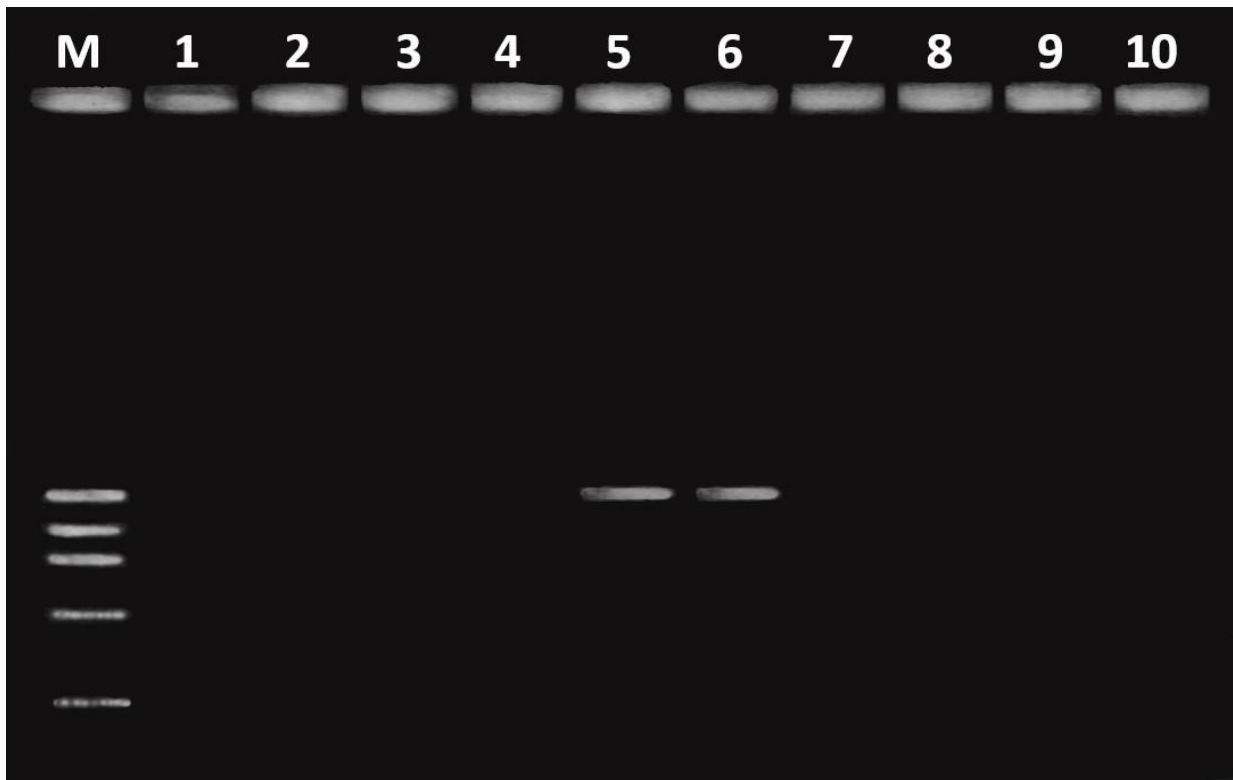
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (madagaskarski zimzelen)	Koncentracija biljnog regulatora rasta u hranidbenoj podlozi (mg/L)	FAKTOR PORASTA IZDANKA (srednja vrijednost 12 mjerenja u supkulturi)			Srednja vrijednost faktora porasta izdanka za sve 3 supkulture
		13. supkultura	14. supkultura	15. supkultura	
ZDRAVA BILJKA	BAP* (0,5)	2,51	2,63	2,57	2,57
	IBA** (4)	1,79	1,98	1,84	1,87
BAKTERIJOM ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pruni' (soj KVI) ZARAŽENA BILJKA	BAP* (0,5)	1,26	1,29	1,35	1,30
	IBA** (2)	1,53	1,61	1,56	1,57
	IBA** (4)	1,62	1,68	2,20	1,83

*Benzilaminopurin (BAP), **Indol-3-maslačna kiselina (IBA)

4.2. Učinak indol-3-maslačne kiseline na bakteriju '*Candidatus Phytoplasma pruni*'

U uzorcima izdanaka madagaskarskog zimzelena 13. i 14. supkulture prisutnost gena za 16S rRNA bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*' provjerila sam „ugniježđenim“ PCR-om. Uzorke izdanaka zdrave biljke (jedan s hranidbene podloge s dodanom IBA, jedan s hranidbene podloge s dodanim BAP -om) i uzorak vode koristila sam kao negativne kontrole, a uzorak izdanaka zaraženog bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*', raslog na hranidbenoj podlozi s dodanim BAP-om, koristila sam kao pozitivnu kontrolu.

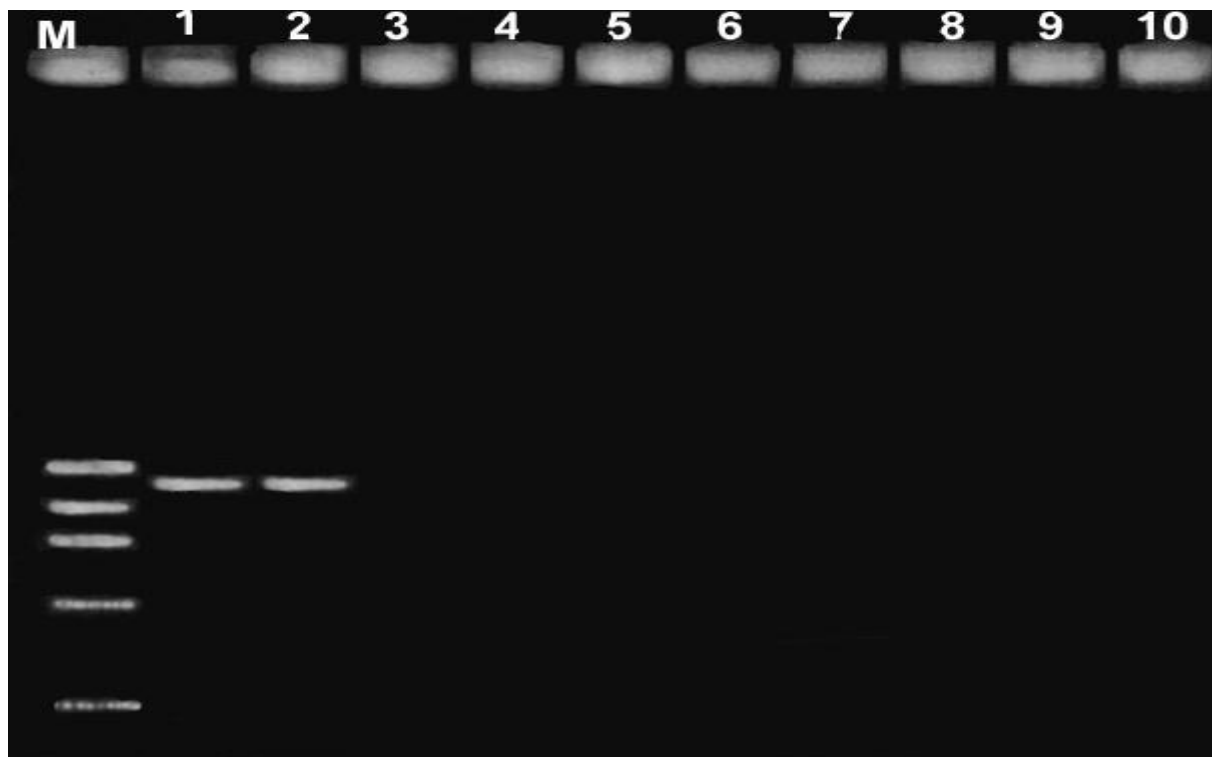
Nakon direktne lančane reakcije polimerazom koristeći početnice F1/RO, te „ugniježdene“ lančane reakcije polimerazom, koristeći par početnica F2/R2n, provela sam elektroforetsku analizu amplikona fitoplazmatskog gena za 16S rRNA. Analizirani su uzorci iz 13. i 14. supkulture. Analiza je pokazala prisutnost bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*' u jednom uzorku iz 13. supkulture (slika 10 - uzorak 5.) u kojoj su zaraženi izdanci madagaskarskog zimzelena tretirani indol-3-maslačnom kiselinom (IBA) u koncentraciji 2 mg/L. Svi ostali uzorci izdanaka madagaskarskog zimzelena, tretirani indol-3-maslačnom kiselinom u koncentraciji 2 mg/L (slika 10 – uzorci 3.,4.) i koncentraciji 4 mg/L (slika 10 – uzorci 7.,8.,9.), koji su prije početka tretmana IBA-om bili zaraženi bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' sada su bili negativni - u njima nije utvrđena prisutnost bakterijskog gena. Uzorci izolirani iz zdravih izdanaka madagaskarskog zimzelena i uzorak vode bili su negativni, a uzorak izdanaka zaražen bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' tretiran benzilaminopurinom (BAP) bio je pozitivan (slika 10).



Slika 10. Rezultati elektroforeze amplificiranog fitoplazmatskog gena za 16S rDNA. U agaroznom gelu (1%) su razdvojeni produkti 1. „ugniježđenog“ PCR –a. M - Marker IX; uzorci: 1. zdrava biljka (0,5 mg/L BAP, negativna kontrola); 2. zdrava biljka (4 mg/L IBA, negativna kontrola); 3., 4., 5. zaražene biljke (2 mg/L IBA); 6. zaražena biljka (0,5 mg/L BAP, pozitivna kontrola); 7., 8., 9. zaražene biljke (4 mg/L IBA); 10. voda (negativna kontrola).

Korišteni su izdanci iz 13. supkulture.

U uzorcima iz 14. supkulture „ugniježđenom“ lančanom reakcijom polimerazom i elektroforetskom analizom (slika 11) pokazala se prisutnost gena za 16S rDNA bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' u uzorku izdanka zaraženog bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*', soj KVI (slika 11 - uzorak 1.) tretiranom benzilaminopurinom (BAP), i jednom uzorku izdanka, iz 14. supkulture, zaraženom bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*', soj KVI (slika 11 - uzorak 2.) tretiranom indol-3-maslačnom kiselinom (IBA) u koncentraciji 2 mg/L. Svi ostali uzorci izdanaka (14. supkultura) koji su prije početka tretmana IBA-om bili zaraženi bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' soj KVI, te uzorci zdravih biljaka i uzorak vode bili su negativni.



Slika 11. Rezultati elektroforeze amplificiranog fitoplazmatskog gena za 16S rDNA. U agaroznom gelu (1%) su razdvojeni produkti 1. „ugniježđenog“ PCR– a. M – Marker IX; uzorci: 1. zaražena biljka (0,5 mg/L BAP, pozitivna kontrola); 2., 3., 4. zaražene biljke (2 mg/L IBA); 5., 6., 7. zaražene biljke (4 mg/L IBA); 8. zdrava biljka (0,5 mg/L BAP, negativna kontrola); 9. zdrava biljka (4 mg/L IBA, negativna kontrola); 10. voda (negativna kontrola).

Korišteni su izdanci iz 14. supkulture.

Rezultati druge „ugniježdene“ lančane reakcije polimerazom bili su jednaki kao u prvoj „ugniježdjenoj reakciji“. Ovi rezultati pokazuju da je većina izdanaka madagaskarskog zimzelena (5 od 6 istraženih) zaraženih bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' soj KVI, tijekom dugoročnog tretmana IBA-om bila oslobođena od ovog patogena. U jednom od 6 uzoraka u 13. supkulturi i u jednom od 6 uzoraka u 14. supkulturi potvrđena je prisutnost fitoplazme. Pozitivan rezultat potvrđuje prisutnost fitoplazme, dok negativan rezultat ne znači nužno odsustvo fitoplazme jer ona može biti prisutna u koncentraciji manjoj od one koja se može detektirati „ugniježđenom“ lančanom reakcijom polimerazom.

5. RASPRAVA

Bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' su unutarstanične fitopatogene bakterije. Svojim prisustvom u floemu biljaka utječu na ravnotežu biljnih regulatora rasta, začepuju sitaste cijevi i prekidaju normalan prijenos tvari kroz biljna tkiva te tako uzrokuju oboljenja biljaka (Chang i Lee., 1995). Zbog toga se na zaraženim biljkama javljaju promjene kao što su sužućenje i uvijanje listova, proliferacija, smanjeni rast, gubitak ili sterilnost cvjetova i deformacije plodova (Jagoueix-Eveillard i sur., 2001). Iako rastu i razmnožavaju se u hranjivim tvarima bogatom floemskom soku, te bakterije se ne mogu uzgojiti samostalno u kulturi *in vitro* što otežava njihovo proučavanje (Bove i Garnier, 2002). S obzirom da su one vrlo opasni patogeni i uzrokuju štete na mnogim biljnim vrstama, godinama se nastoji otkriti mehanizam njihova djelovanja te pronaći učinkoviti putevi za liječenje zaraženih biljaka. Kao dobar domaćin za održavanje različitih vrsta bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' pokazao se madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus*).

Za potrebe istraživanja, bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' zaraženi izdanci madagaskarskog zimzelena uzgajaju se u kulturi *in vitro* na hranidbenoj podlozi koja sadrži sve potrebno za njihov rast i razvitak. Osamdesetih godina 20. stoljeća otkriveno je da te bakterije mogu promijeniti razine biljnih regulatora rasta u biljkama domaćinima, što bi moglo biti odgovorno za indukciju pojave simptoma na biljkama (Davey i sur. 1981, Chang i Lee, 1995). Hoshi i suradnici (2009) otkrili su da bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' izlučuju protein TENGU koji u zaraženim biljkama izaziva simptome „vještičju metlu“ i patuljasti rast. Kako bi se otkrilo može li utjecaj egzogenih, biljnih regulatora rasta potaknuti oporavak zaražene biljke, u hranidbenu se podlogu dodaju različiti biljni regulatori rasta. Pri tome se prati utjecaj egzogenih biljnih regulatora rasta na biljku domaćina i bakteriju kojom je biljka zaražena. Razvoj tehnika molekularne biologije omogućio je detektiranje bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' u biljkama (Davis i sur., 1993). Metodom lančane reakcije polimeraze umnožava se gen 16S rDNA bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' te tako utvrđuje njihova prisutnost u biljci.

Prijašnja istraživanja pokazala su da utjecaj egzogenih biljnih regulatora rasta na bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' te njima zaražene izdanke biljke *Catharanthus roseus* ovisi o soju bakterije i o biljnom regulatoru rasta koji je dodan u hranidbenu podlogu, njegovoj koncentraciji i vremenskom periodu djelovanja, ali i o vremenu između inokulacije patogena i primjene hormona (Ćurković Perica i sur., 2007). Otkriveno je da auksini indol-3-maslačna kiselina (IBA) i indol-3-octena kiselina (IAA) potiču oporavak bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' zaraženih izdanaka. Oporavak obuhvaća remisiju simptoma, bolji rast, fotosintezu i eliminaciju (izostanak) bakterije, a moguća je i remisija simptoma iako su bakterije i dalje prisutne u biljci. Pokazalo se da je za oporavak domaćina *Catharanthus roseus* zaraženog bakterijama '*Candidatus Phytoplasma asteris*' i '*Candidatus Phytoplasma solani*' potrebna puno veća koncentracija i dulji period tretiranja indol-3-octenom kiselinom dok na istraživane sojeve navedenih bakterija indol-3-maslačna kiselina djeluje već u prve četiri supkulture.

U svom istraživanju željela sam ustanoviti utječe li egzogena indol-3-maslačna kiselina (IBA) na izdanke madagaskarskog zimzelena i na bakteriju '*Candidatus Phytoplasma pruni*', soj KVI. S obzirom da '*Candidatus phytoplasma pruni*' izaziva proliferaciju i skraćenje internodija (Oshima i sur., 2004), duljinu izdanaka (određivanje faktora rasta) koristila sam kao parametar za određivanje učinka indol-3-maslačne kiseline na madagaskarski zimzelen. Faktore porasta, bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' zaraženih izdanaka madagaskarskog zimzelena održavanih na hranidbenim podlogama s različitim koncentracijama indol-3-maslačne kiseline ili benzilaminopurinom, uspoređivala sam međusobno i s faktorima porasta zdravih izdanaka održavanih na hranidbenoj podlozi s dodanom indol-3-maslačnom kiselinom (IBA) ili benzilaminopurinom (BAP). Iako je BAP biljni hormon koji djeluje i u hortikulturi se koristi za zakorjenjivanje (Pevalek – Kozlina, 2003), ovim istraživanjem se pokazalo da djeluje na produžni rast izdanaka domaćinske biljke *Catharanthus roseus*. Zdravi izdanci su na hranidbenoj podlozi s BAP-om pokazali nešto bolji rast nego na hranidbenoj podlozi s IBA. Bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' zaraženi izdanci madagaskarskog zimzelena održavani na hranidbenoj podlozi s BAP-om služili su mi kao pozitivna kontrola jer su prijašnja istraživanja pokazala da je u njima '*Candidatus Phytoplasma pruni*' prisutna u visokoj koncentraciji kroz dugi vremenski period (Ćurković Perica i Šeruga Musić, 2005).

Ti izdanci pokazivali su patuljast rast te žućenje i postupno sušenje listova što su simptomi koje pokazuju biljke zaražene bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' (Cousin, 1995). Zaraženi izdanci koji su rasli na hranidbenoj podlozi s dodanom indol-3-maslačnom kiselinom pokazivali su značajniji produžni rast i bolji razvoj listova u odnosu na pozitivnu kontrolu (izdanci na podlozi s BAP-om). Srednje vrijednosti faktora porasta zaraženih izdanaka, održavanih na podlogama s različitim koncentracijama IBA, nisu se razlikovale značajno, ali je veća koncentracija IBA ipak bila najpovoljnija za rast i razvoj izdanaka u ovom istraživanju. To se podudara s prijašnjim istraživanjima. Rezultati testiranja učinka IBA na '*Candidatus Phytoplasma pruni*' i zaražene izdanke domaćinske biljke *Catharanthus roseus* (Ćurković Perica, 2008) pokazali su da dugoročno tretiranje biljnim regulatorom rasta IBA ima djelotvoran učinak i na bakteriju '*Candidatus Phytoplasma pruni*' (eliminacija iz biljke) i biljku. Naime, u kratkom vremenskom periodu kroz 4 supkulture izdanci zaraženi bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' i tretirani različitim koncentracijama IBA pokazivali su simptome zaraze i nisu se razlikovali od pozitivne kontrole (izdanaka zaraženih bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' uzgajanih na mediju s BAP-om), dok su nakon dugog tretmana s IBA (od 16. - 19. supkulture) pokazali znakove oporavka. Osim što izdanci nisu više pokazivali simptome zaraze i bolje su rasli, bakterija '*Candidatus Phytoplasma pruni*' nije u njima detektirana.

Prisustvo gena za 16S rDNA bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*' u uzorcima izoliranim iz 13. i 14. supkulture, ispitala sam metodom „ugniježdene“ lančane reakcije polimerazom (PCR). U svaku „ugniježdenu“ PCR reakciju bili su uključeni uzorci DNA izolirani iz zdravih biljaka (jedan iz podloge s BAP-om, drugi iz podloge s IBA), kao i uzorak s vodom, a služili su kao negativne kontrole, te uzorak bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' zaražene biljke s hranidbene podloge s dodanim BAP-om kao pozitivnom kontrolom. U rezultatima dobivenim elektroforetskom analizom navedeni uzorci zdravih biljaka i vode bili su negativni, a prisutnost bakterije pokazao je uzorak DNA izoliran iz zaražene biljke uzgojen na hranidbenoj podlozi s BAP-om, što je bilo za očekivati s obzirom na već spomenuto djelovanje BAP-a. Samo jedan od ispitivanih uzoraka tretiranih IBA-om u obje supkulture pokazao je prisustvo umnoženog gena bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*' za 16S rDNA, i to onaj tretiran tim regulatorom rasta u nižoj koncentraciji. Ostali uzorci bili su negativni i pokazali su da je IBA imala utjecaj na odsutnost

bakterije '*Candidatus Phytoplasma pruni*' u izdancima i na razvoj biljke u cjelini.

Nakon mog istraživanja zdravi i zaraženi izdanci madagaskarskog zimzelena i dalje su održavani u kulturi. Kroz period od 16. - 19. supkulture nisu pokazivali simptome zaraze i '*Candidatus Phytoplasma pruni*' nije bila detektirana u testiranim izdancima iz 18. i 19. supkulture. Izdanci su nakon 19. supkulture presađeni na hranidbenu podlogu s BAP-om kako bi se vidjelo jesu li zaista oslobođeni od bakterija '*Candidatus Phytoplasma pruni*' ili se samo smanjila njihova koncentracija u biljci. Kada je nakon tri supkulture provjerena prisutnost '*Candidatus Phytoplasma pruni*', ista je otkrivena u 20% izdanaka (Ćurković Perica, 2008). Svi ti rezultati pokazuju da dugotrajno tretiranje indol-3-maslačnom kiselinom utječe na odsutnost '*Candidatus Phytoplasma pruni*' i oporavak zaraženih izdanaka madagaskarskog zimzelena. Tretiranje IBA-om može dakle služiti kao metoda za oslobađanje madagaskarskog zimzelena od fitoplazmi. Ipak, detekcija fitoplazme u 20% izdanaka koji su nakon tretmana IBA-om ponovno presađeni na podlogu s BAP-om pokazuje da je fitoplazma u 20% slučajeva ipak bila prisutna u madagaskarskom zimzelenu ali u tako niskoj koncentraciji da se nije mogla detektirati niti „ugniježđenim“ PCR-om (Ćurković Perica, 2008).

Bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' imaju reduciran genom. Vjerojatno su reduktivnom evolucijom izgubile dio gena jer žive kao unutarstanični paraziti u hranjivim tvarima bogatom okolišu (Oshima i sur., 2004). U gotovo svim genomima bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' postoji gen za folat-sintetazu, enzim potreban za sintezu folne kiseline neophodne za diobu i rast stanica, replikaciju i održavanje nukleinskih kiselina. Postojanje tog gena važno je za prilagodbu bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' različitim biljnim vrstama, a time većina navedenih bakterija nije metabolički specijalizirana, već može parazitirati u mnogo biljnih vrsta (Oshima i sur., 2004). Nasuprot tome, nedostaju im mnogi geni bitni za sintezu aminokiselina, masnih kiselina i nukleotida, a nedostatak se kod većine bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' nadoknađuje višestrukim kopijama gena koji kodiraju transportne sustave. Većinu metabolita koje ne mogu same sintetizirati, bakterije roda '*Candidatus Phytoplasma*' transportiraju iz stanica domaćina. Stoga se i pri tretmanima biljaka zaraženih fitoplazmama uzimaju u obzir navedena svojstva ovih bakterija.

Biljne bolesti uzrokovane bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' uočene su u mnogim kultiviranim zeljastim i drvenastim biljkama u cijelome svijetu. U Hrvatskoj je još prije 35 godina zabilježena proliferacija jabuka i potvrđena elektron – mikroskopskim snimkama stanica bakterija roda '*Candidatus Phytoplasma*' u floemu jabuka (Šarić i Cvjetković, 1985). S obzirom da navedene bakterije ugrožavaju vinovu lozu i voćke čiji uzgoj u Hrvatskoj ima dugu tradiciju, već dvadesetak godina istražuju se bolesti vinove loze uzrokovane bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' (Škorić i sur., 1998; Križanac i sur., 2010; Kozina i sur., 2011; Šeruga Musić i sur., 2011), a prije desetak godina počelo je istraživanje bolesti voćaka (rodovi *Malus*, *Prunus*, *Pyri*) uzrokovanih bakterijama roda '*Candidatus Phytoplasma*' (Križanac i sur., 2008; Križanac i sur., 2010; Plavec i sur., 2013; Ježić i sur., 2016). Na zaraženim biljkama javljaju se simptomi “vještičja metla”, uvijanje i promjene boje listova, deformacije plodova, dulje peteljke jabuka, ranije listanje i kasnija cvatnja, a većina biljaka suši se i odumire. Ne mogu se liječiti i predstavljaju izvor zaraze te ih je najbolje ukloniti. Učinak IBA-e istražen je i na vinovoj lozi, te je također pokazano da je IBA povoljno utjecala na oslobađanje trsova od fitoplazmi i na povlačenje simptoma zaraze (Kozina i sur., 2011). Ta istraživanja pokazuju da IBA nije učinkovita samo *in vitro*, što je dokazano mojim istraživanjem, već tretman auksinima može služiti za oslobađanje različitih biljnih vrsta od fitoplazmi u uzgojnim uvjetima.

6. ZAKLJUČAK

- Bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' soj KVI zaraženi izdanci madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus*) tretirani indol-3-maslačnom kiselinom pokazivali su bolji produžni rast u odnosu na zaražene izdanke održavane na hranidbenoj podlozi s dodatkom benzilaminopurina.
- Lančanom reakcijom polimerazom utvrđena je odsutnost fitoplazme u 86% izdanaka nakon tretiranja indol-3-maslačnom kiselinom.
- Indol-3-maslačna kiselina povoljno utječe na biljke zaražene bakterijom '*Candidatus Phytoplasma pruni*' u smislu njihova oporavka, boljeg rasta i izostanka simptoma, te na smanjenje koncentracije navedene bakterije u biljci ispod granice detekcije „ugniježđenom“ lančanom reakcijom polimerazom.

7. LITERATURA

- Anthwal V., Ishaq F., Singh R. N., Khan A. (2012): Antioxidant and antiatherogenic impacts of *Catharanthus roseus* and *Hibiscus sabdariffa* on Cu⁺⁺ mediated oxidation kinetics of low density lipoprotein. *Der Pharmacia Sinica* **3** (4): 443-456
- Bai X., Zhang J., Ewings A., Miller S. A., Jansco Radek A., Scevchenko 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. *Journal of Bacteriology* **188**: 3682 – 3696
- Beanland L., Hoy C. W., Miller S. A., Nault L. R. (2000): Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* **93**: 271–276
- Bové J. M., Garnier M. (2002): Phloem-and xlem–restricted plant pathogenic bacteria. *Plant science* **163**: 1083-1098
- Chang C. J., Lee I.-M. (1995): Pathogenesis of diseases associated with micoplasma-like organisms. U: Singh U.S., Singh R.P., Kohmoto K. (eds.) *Pathogenesis and host specificity in plant diseases*. New York, Elsevier, **1**: 237-246
- Christensen N. M., Nicolaisen M., Hansen M., Schulz A. (2004): Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real – time PCR and bioimaging. *Molecular Plant – Microbe Interactions* **17**: 1175-1184
- Christensen N. M., Axelsen K. B., Nicolaisen M., Schulz A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* **10**: 526-535

- Cousin M. T. (1995): Phytoplasmes et phytoplasmoses. *Agronomie* **15**: 245-264
- Ćurković Perica M. (2008): Auxin-treatment induces recovery of phytoplasma-infected periwinkle. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1826-1834
- Ćurković Perica M. (2012): Effect of auxins on plant pathogenic phytoplasmas and phytoplasma-infected host. U: Keller A. H., Fallon M. D. (eds.) *Auxins: Structure, Biosynthesis and Functions*. Nova Science Publishers: 93-101
- Ćurković Perica M., Lepeduš H., Šeruga Musić M. (2007): Effect of indole-3-butyric acid on phytoplasmas in infected *Catharanthus roseus* shoots grown *in vitro*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **268**: 171-177
- Ćurković Perica M., Šeruga Musić M. (2005): Effect of β -aminobutyric acid on phytoplasma-infected *Catharanthus roseus* shoots. *Journal of Plant Diseases and Protection* **112** (6): 544-549
- Davey J. E., Van Staden J., De Leeuw G. T. N. (1981): Endogenous cytokinin levels and development of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with mycoplasmas. *Physiological Plant Pathology* **19**: 193-200
- Davis R. E., Whitcomb R. F. and Steere R. L. (1968): Remission of aster yellows disease by antibiotics. *Science* **161**, 793-794
- Davis R. E., Dally E. L., Bertaccini A., Credi R., Osler R., Savino V. N., Carraro L., Di Terlizzi B., Lee I.-M., Barba M. (1993): Restriction fragment length polymorphism analyses and dot hybridizations distinguish mycoplasma-like organisms associated with Flavescence dorée and Southern European grapevine yellows disease in Italy. *Phytopathology* **83**: 772-776
- Duke J. A., Bogenschutz - Godwin M.J., duCellier J., Duke P.-A. K. (1985): *Handbook of medicinal herbs*. Second edition, Crc Press, Florida.

- Finet C., Jaillais Y. (2012): Auxology: when auxin meets plant evo-devo. *Developmental Biology* **369** (1): 19-31
- Girsova N. V., Bottner-Parker K. D., Bogoutdinov D. Z., Kastalyeva T. B., Meshkov Y. I., Mozhaeva K. A., Lee I.-M. (2017): Diverse phytoplasmas associated with leguminous crops in Russia. *European Journal of Plant Pathology* **149**: 599-610
- Gundersen D. E., Lee I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* **35**: 144-151
- Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kakiwada S., Yamaji Y., Namba S. (2009): A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 6416-6421
- IRPCM Phytoplasma taxonomy group (2004): '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1243-1255
- Jagoueix-Eveillard S., Tarendeau F., Guolter K., Danet J.-L., Bové J.M., Garnier M. (2001): *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by Mollicute infections. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 225-233
- Ježić M., Poljak I., Idžijotić M., Liber Z., Ćurković Perica M. (2016): First report on phytoplasmas infecting wild apples and wild pears in Croatia. *Plant Disease* **100**: 207
- Kozina A., Ježić M., Tkalec M., Kozina B., Osrečak M., Ćurković Perica M. (2011): Effect of indole-3-butyric-acid on the recovery of phytoplasma-infected grapevine. *Bulletin of Insectology* **64** (Supplement): 195-196

- Križanac I., Mikec I., Budinščak Ž., Šeruga Musić M., Škorić D. (2010): Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. *Journal of Plant Diseases and Protection* **117**: 206 – 213
- Križanac I., Mikec I., Budinščak Ž., Šeruga Musić M., Krajačić M., Škorić D. (2008): Pomaceous fruit tree phytoplasmas and their potential vectors in Croatia. *Acta Horticulturae* **781**: 477 – 482
- Lee I.-M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D. E. (1995): Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* **85**: 728-735
- Lee I.-M., Davis R. E., Gundersen-Rindal D. E. (2000): Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *The Annual Review of Public Health* **54**: 221-254
- Lee I.-M., Gundersen D. E., Hammond R. W., Davis R. E. (1994): Use of mycoplasma-like organism (MLO) group - specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* **84**: 559-566
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Bertaccini A. (1998): Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* **88** (12): 1359-1366
- Lee I.-M., Tiffany M., Gundersen D. E., Klopmeier M. (1995): Phytoplasma infection: A beneficial factor for production of commercial branching poinsettia cultivars. *Phytopathology* **85**: 1179
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Oshima K., Ishii Y., Kakizawa S., Sugawara K., Neriya Y., Himeno M. (2011): Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS ONE* **6**(8): e23242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023242>

- 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 Genetics* **36**: 27-29
- Pevalek - Kozlina B. (2003): *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb.
- Plavec J., Križanac I., Budinščak Ž., Ivić D., Škorić D., Šeruga Musić M. (2013): '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' - a new phytoplasma species molecularly characterized in Croatia. European cooperation in science and technology, Action FA0807 Final Meeting Abstract Book, Bertaccini A., Lisabon: 31 – 32
- Rischer H., Orešič M., Seppänen-Laakso T., Katajamaa M., Lammertyn F., Ardiles-Diaz W., Van Montagu M. C. E., Inzé D., Oksman-Caldentey K.-M., Goossens A. (2006): Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 5614-5619
- Royal Botanic Gardens, Kew (2014): *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle). <<http://www.kew.org/plants-fungi/Catharanthus-roseus.htm>>.
- Schaff D. A., Lee I.-M., Davis R. E. (1992): Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms in plants by polymerase chain reactions. *Biochemical Biophysical Research Communications* **186**: 1503-1509
- 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 Society* **143**: 3381-3389
- Sears B. B., Klomparens K. L. (1989): Leaf tip cultures of the evening primrose allow stable aseptically cultured mycoplasma-like organisms. *Canadian Journal of Plant Pathology* **11**: 343-348

- Sugio A., Hogenhout S. A. (2012): The genome biology of phytoplasma: Modulators of plants and insects. *Current opinion in Microbiology* **15**: 247-254
- Šarić A., Cvjetković B. (1985): Nalaz mikoplazmama sličnih organizama u jabuci sa simptomima proliferacije i kruški sa simptomima propadanja. *Poljoprivredna znanstvena smotra* **68**: 61-67
- Šeruga M., Škorić D., Botti S., Paltrinieri S., Juretić N., Bertaccini A. F. (2003): Molecular characterization of a phytoplasma from the aster yellows (16Srl) group naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. *Forest pathology* **33**: 113 – 125
- Šeruga Musić M., Škorić D., Haluška I., Križanac I., Plavec J., Mikec I. (2011): First report of Flavescence dorée-related phytoplasma affecting grapevines in Croatia. *Plant Disease* **95**: 353
- Škorić D., Šarić A., Vibio M., Murari E., Krajačić M., Bertaccini A. (1998): Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. *Journal of Grapevine Research* **37**: 171-175
- Tully J. G. (1993): International committee on systematic bacteriology, subcommittee on the taxonomy of Mollicutes. Minutes of the interim meetings, 1st – 2nd August 1992, Ames, Iowa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 394-397
- United States Department of Agriculture (2014): Natur Resources Conservation Service. <<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GYAU>>.
- Zhao Y., Davis R. E., Wei W., Lee I.-M. (2015): Should 'Candidatus Phytoplasma' be retained within the order Acholeplasmatales?. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**: 1075 – 1082

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1982. godine u Zagrebu. Od rođenja živim u Kloštru Ivaniću gdje sam završila osnovnu školu, a zatim Opću gimnaziju u Ivanić Gradu. Nakon toga upisala sam željeni Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer Profesor biologije i kemije. Kao apsolvent, radila sam više različitih poslova od kojih bih istaknula povremeni rad u osnovnoj školi kao zamjenski nastavnik biologije i kemije, te vođenje nekoliko radionica u sklopu Festivala znanosti u Tehničkom muzeju. Također sam vodila i grupe učenika osnovnih i srednjih škola na izložbi „Vladimir Prelog – novo lice kemije“. Stjecanje novih vještina i znanja u poslu i svakodnevnom životu uvijek nastojim povezati s usvojenim znanjima iz biologije i kemije. U slobodno vrijeme bavim se različitim hobijima: vožnjom biciklom, planinarenjem, pilatesom. Dugi niz godina uzgajam povrtnu i ukrasnu biljku u vlastitom vrtu te nastojim očuvati sjeme različitih sorti. Posljednjih nekoliko godina povećao mi se interes za kukce, ponajviše leptire, pčele i bumbare, te proučavanje i sađenje biljnih vrsta koje ih privlače u vrt.