

Multigenska analiza patosustava fitoplazme ribosomske skupine 16SrXII-A

Šturlan, Kasia

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:611510>

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

Kasia Šturlan

Multigenska analiza patosustava fitoplazme ribosomske skupine 16SrXII-A

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Multigenska analiza patosustava fitoplazme ribosomske skupine 16SrXII-A

Kasia Šturlan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fitoplazme (rod '*Ca. Phytoplasma*') su kozmopolitni obligatorni paraziti bez stanične stijenke koji tvore monofiletsku bakterijsku skupinu unutar razreda *Mollicutes*. Istraživanje fitoplazmi otežano je nemogućnošću uzgoja u kulturi *in vitro*. Imaju vrlo kompleksan životni ciklus koji može uključivati više biljaka-domaćina i kukaca-vektora, a uzrokuju mnoge ekonomski značajne bolesti poljoprivrednih kultura u cijelom svijetu. U Europi su jako raširene žutice vinove loze koje uzrokuju fitoplazme *flavescence dorée* (FD) i *bois noir* (BN; *Ca. Phytoplasma solani*). Cilj ovog diplomskog rada bila je multigenska tipizacija izolata fitoplazme analizom 16S rRNA gena te gena *tufB* (elongacijski faktor Tu), *vmp1* (varijabilni membranski protein), *secY* (dio sekretornog sustava translokaze) i *stamp*, za koje postoji indikacija da bi mogli biti važni kod razlikovanja epidemioloških karakteristika različitih sojeva. U analizu su uključeni uzorci kukaca-vektora vrste *Hyalestes obsoletus*, simptomatični uzorci *Vitis vinifera* te asimptomatični uzorci *Convolvulus arvensis*. Analizirani su fragmenti gena za 16S rRNA, *tufB*, *secY*, *vmp1* i *stamp* za koje se smatra da su važni kod utvrđivanja epidemiološkog potencijala različitih fitoplazmatskih sojeva. Fragmenti su umnoženi lančanom reakcijom polimerazom, ispitani RFLP analizom te sekvencirani i obrađeni filogenetskom analizom. Pokazano je da je *tufB* konzerviraniji od membranskih proteina. Svi geni su se pokazali kao dobri markeri za razlučivanje sojeva i bolje razumijevanje epidemiologije fitoplazmoza.

(48 stranica, 10 slika, 17 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: žutice vinove loze, BN fitoplazma, MLST,

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Inga Marijanović

Izv. prof. dr.sc. Damjan Franjević

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Multigene analysis of phytoplasma 16SrXII-A pathosystem

Kasia Šturlan

Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

Phytoplasmas (genus '*Ca. Phytoplasma*') are obligatory intracellular wall-less cosmopolit parasites which belong to the class *Mollicutes*, within which they create monophyletic group. Investigations of phytoplasmas are hindered by the inability to cultivate them in a pure culture *in vitro*. Phytoplasmas cause great economic losses in the agriculture worldwide. Control of the diseases is difficult because of their diverse range of host and vector systems and complex life styles. Throughout European vineyards grapevine yellow diseases (GY) are caused by two types of phytoplasmas: *Flavescence dorée* (FD) and *bois noir* (BN; *Ca. Phytoplasma solani*). The aim of this study was to perform multilocus sequence typing of phytoplasma strains isolated from vector insects *Hyalestes obsoletus*, symptomatic *Vitis vinifera* and asymptomatic weed *Convolvulus arvensis*. Analysis included 16Sr RNA gene and four non-ribosomal genes: *tufB*, *vmp1*, *secY* and *stamp*, for which it was shown previously that they are relevant for distinguishing epidemiological capacity of different phytoplasma strains. Fragments of these genes were amplified by PCR, analyzed by RFLP, and sequenced. Obtained sequences were aligned and phylogenetic analysis was performed. It was shown that gene *tufB* is more conserved than membrane proteins as expected, considering their assumed role in the phytoplasma life-cycle. All of the genes proved to be important distinguishable markers for better understanding of phytoplasma epidemiology.

(48 pages, 10 figures, 17 tables, 60 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: grapevine yellows, BN phytoplasma, MLST, *tufB*, *secY*, *vmp*, *stamp*

Supervisor: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, PhD, Assoc. Prof

Reviewers: Dr. sc. Inga Marijanović, PhD, Assoc. Prof.

Dr. sc. Damjan Franjević, PhD, Assoc. Prof.

Thesis accepted:

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Fitoplazme	1
1.2	Evolucija fitoplazmi	2
1.3	Klasifikacija fitoplazmi	3
1.4	Genom fitoplazmi	4
1.5	Molekularni markeri	5
1.5.1	<i>TufB</i> genska regija	6
1.5.2	<i>SecY</i> genska regija	6
1.5.3	<i>Stamp</i> genska regija	7
1.5.4	<i>Vmp1</i> genska regija	7
1.6	Interakcija fitoplazmi i domaćina	7
1.6.1	Fitoplazma <i>Bois noir</i> (' <i>Ca. P. solani</i> ') i kukac vektor <i>Hyalestes obsoletus</i> Signoret	9
1.7	Žutice vinove loze	11
1.8	Metode istraživanja fitoplazmi	12
1.8.1	Lančana reakcija polimerazom (PCR)	12
1.8.2	MLST - multigenska tipizacija	14
2	Cilj istraživanja	15
3	Materijali i metode	16
3.1	Materijali	16
3.1.1	Uzorci kukaca i biljaka	16
3.1.2	Referentni sojevi	16
3.1.3	Komercijalni kompleti	17
3.1.4	Restriksijski enzimi i markeri	17
3.1.5	Početnice	18
3.1.7	Pribori i uređaji	20

3.1.8	Puferi i otopine.....	20
3.2	Metode.....	22
3.2.1	Izolacija ukupne genomske DNA	22
3.2.2	Spektrofotometrija	22
3.2.3	PCR.....	23
3.2.4	Umnažanje fragmenta gena 16S rRNA.....	23
3.2.5	Umnažanje gena za neribosomske proteine <i>tufB</i> , <i>secY</i> , <i>vmp1</i> i <i>stamp</i>	24
3.2.6	Elektroforeza.....	26
3.2.7	Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP)	26
3.2.8	Sekvenciranje	27
3.2.9	Računalne analize	27
4	Rezultati	29
	Ugniježđeni PCR i RFLP analiza 16s rRNA genskog fragmenta.....	30
4.1	30	
4.2	Ugniježđeni PCR i RFLP analiza <i>tufB</i> genskog fragmenta	31
4.3	Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza <i>SecY</i> genskog fragmenta.....	32
4.4	Ugniježđeni PCR i RFLP analiza <i>vmp1</i> genskog fragmenta	34
4.5	Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza <i>stamp</i> genskog fragmenta.....	35
5	Rasprava.....	37
6	Zaključak.....	41
7	Literatura	42
8	Životopis.....	48

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 magistra molekularne biologije.

Zahvale,

Najljepše se zahvaljujem svojoj divnoj mentorici prof.dr.sc Martini Šerugi Musić na ogromnom razumjevanju i svesrdnoj podršci.

Osim toga zahvaljujem se svojim najboljim prijateljima Duji Buriću i Driti Novak.

Posebna zahvala ide mojoj plesnoj obitelji.

1 Uvod

1.1 Fitoplazme

Fitoplazme su obligatorni intracelularni paraziti staničnih stanica biljnog floema i hemolimfe kukaca s velikim rasponom biljaka-domaćina i kukaca-vektora te složenim životnim ciklusom. Prokarioti su bez stanične stijenke, pleomorfni su, uglavnom okruglasti, koje je nemoguće kultivirati u *in vitro* čistoj staničnoj kulturi čime je otežano njihovo istraživanje i klasifikacija (Lee et al. 2000). Svrstani su u razred Mollicutes i provizorni rod '*Candidatus Phytoplasma*'. U prirodi ih prenose kukci-vektori koji se hrane floemom, a u poljoprivredi se šire zaraženim sadnim materijalom, te vegetativnim razmnožavanjem zaraženih biljaka (Arnaud et al. 2007).

Fitoplazme su kozmopoliti koji zaražavaju stotine ekonomski važnih biljnih vrsta, ali i ukrasne biljke te šumsko drveće na kojima još nema sveobuhvatnih istraživanja. U floemu imaju pristup svim potrebnim hranjivim tvarima čime ometaju normalan razvoj biljke.

Simptomi bolesti nalikuju simptomima virusnih bolesti (npr. žućenja listova uzrokovana razgradnjom i inhibicijom sinteze klorofila), te se dugo vremena smatralo da su virusi uzročnici fitoplazmatskih bolesti. Tipični simptomi često ukazuju na neravnoteženost biljnih faktora rasta: virescencija i filodija cvjetova, sterilnost, gubitak apikalne dominacije i proliferacija aksilarnih pupova u obliku "vještice metle", smežurani listovi, abnormalna elongacija internodija, općenito kržljanje i patuljast rast, žućenje listova, gubitak normalnih cvjetnih pigmenata, sitni plodovi, nekroza ili pretjerana proliferacija floema (Lee et al. 2000; Bertaccini 2007). Postoje ipak primjeri kada fitoplazme nose poželjne osobine npr. jedan soj fitoplazme omogućava da se *Poinsettia* uzgaja kao lončanica (Lee et al. 1997). Utjecaj na vektorske organizme je raznolik: kod nekih je pozitivna simbioza u smislu da imaju pozitivan utjecaj na životni vijek i plodnost, dok je kod većine neutralan odnos, a vrlo rijetko negativan

(Sugio et al. 2011). Vektori su svi pripadnici reda *Hemiptera*, obitelji *Cicallidae* i *Psyllidae*, te superobitelj *Fulgoroidea*.

Fitoplazme ne zadovoljavaju Kochove postulate što je uvelike otežalo njihovo otkriće te i dalje otežava istraživanja, naročito nemogućnost *in vitro* uzgoja. Osim što simptomi nalikuju simptomima virusnih oboljenja, također ih prenose kukci-vektori, prolaze kroz bakterijske filtre te se nisu mogle uzgojiti na hranjivoj podlozi kao niti virusi, međutim pokazivale su osjetljivost na tetraciklinske antibiotike (Ishii et al. 1967). Stanice su im manje od 0.8µm pa zato prolaze kroz bakterijske filtre i spadaju među najmanje poznate bakterije te su otkrivene tek zahvaljujući elektronskoj mikroskopiji 1960-tih. Presudan je bio razgovor Yoji Doi sa kolegom veterinarom koji je tada radio na mikoplazmama peradi. Mikoplazme su već bile poznati uzročnici bolesti ljudi i životinja pa su stoga fitoplazme prvo nosile naziv MLO – eng. *mycoplasma like organism*. Na IOM kongresu (*International Organisation for Mycoplasmology*) 1994 g. usvaja se ime fitoplazma (grč. *phyto*-biljka; *plasma*-uobličena tvar), a zaseban rod unutar razreda *Mollicutes* postaju 2004. kao '*Candidatus Phytoplasma*' (IRPCM, *The International Organisation for Mycoplasmology*).

1.2 Evolucija fitoplazmi

Tablica 1 Najvažnije skupine unutar razreda *Mollicutes*

Phylum	<i>Firmicutes</i>		
Classis	<i>Mollicutes</i>		
Ordo	<i>Mycoplasmatales</i>	Genus:	<i>Mycoplasma</i> ; <i>Ureaplasma</i>
	<i>Entomoplasmatales</i>	Genus:	<i>Entomoplasma</i> ; <i>Spiroplasma</i>
	<i>Acholeplasmatales</i>	Genus:	<i>Acholeplasma</i> ; <i>Phytoplasma</i>
	<i>Anaeroplasmatales</i>	Genus:	<i>Anaeroplasma</i> ; <i>Asteroplasma</i>

Razred *Mollicutes* (lat. *mollis* – mekano, *cutis* – koža) obuhvaćaju pleomorfne bakterije bez stanične stijenke koji su paraziti biljaka, životinja i čovjeka, a najvažnije skupine navedene su u tablici 1. Sve *Mollicutes* su male bakterije, bez stijenke, reduciranog genoma s niskim udjelom GC baza. Pretpostavlja se da su nastale reduktivnom evolucijom od Gram-pozitivnog pretka roda *Clostridium* ili *Lactobacillus* (Hogenhout et al. 2008).

Fitoplazme su uvijek biljni patogeni prenošeni kukcima, a mikoplazme i ureaplazme su patogeni ljudi i životinja. Spiroplazme su većinom patogeni kukaca, osim tri vrste koje se kao i fitoplazme prenose kukcima i zaražavaju biljke. Sličnost s tim spiroplazmama se smatra posljedicom konvergentne evolucije, a smatra se i da fitoplazme dijele sa spiroplazmama gene koji im omogućavaju interakcije s biljkama i kukcima (Bai et al. 2004)-

Sekvenciranjem i filogenetskim analizama te prema korištenju kodona i metaboličkim preferencijama unutar razreda *Mollicutes* fitoplazme su smještene u aholeplazmatsku granu (Hogenhout et al. 2008). Fitoplazme imaju dva rRNA operona dok mikoplazme imaju samo jedan (Bertaccini, 2007). Genom fitoplazmi je više reduciran od genoma mikoplazmi i spiroplazmi što se objašnjava činjenicom da su fitoplazme obligatorni unutarstanični paraziti koji metabolite asimiliraju direktno iz stanica domaćina.

Pretpostavka je da su se unutar razreda *Mollicutes*, nakon inicijalne redukcije genoma kojom su izgubile stijenku i prešle na parazitski način života, razdvojile dvije grane prije oko 450 milijuna godina tzv. AAA i SEM grana te da se u svakoj grani neovisno nastavila redukcija genoma (Bai et al. 2004, Chen et al. 2012).

1.3 Klasifikacija fitoplazmi

Specifičnom DNA amplifikacijom i sekvenciranjem skupljeni su dokazi da su fitoplazme velika zasebna monofiletička skupina unutar razreda *Mollicutes*.

2004. godine na IRPCM kongresu postignut je konsenzus oko imena '*Candidatus* Phytoplasma' i opisa načina klasifikacije sojeva. '*Candidatus*' kategorija uvedena je zbog nemogućnosti *in vitro* uzgoja i manjka fenotipskih osobina potrebnih za razlikovanje i kategorizaciju unutar klasične binomijalne nomenklature po vrstama i rodovima. Soj stiče vlastiti '*Candidatus* P.' status ako ima više od 2.5% razlike u sekvenci 16S rRNA gena u usporedbi s drugim poznatim sojevima. Iznimke od tog pravila se čine ukoliko postoji dodatna različitost u biološkim svojstvima (različiti biljni domaćini ili kukci prijenosnici) ili pak postoje dokazi dodatne molekularne raznolikosti poput drugačijih simptoma i specifičnih antigena (Seëmuller and Schneider 2004).

Prije uvođenja kategorije '*Candidatus*' uvedena je podjela prema restrikcijским profilima 16Sr RNA regije (Lee et al. 1998, Wei et al. 2007) kojima danas razlikujemo 33 priznate ribosomske skupine (16SrI - 16SrXXXIII) i oko 160 podskupina. Ove dvije metode

klasifikacije prilično su usklađene te u većini skupina klasa '*Candidatus*' odgovara ribosomskoj grupi, no i tu postoje iznimke. Ribosomska skupina 16SrXII je skupina tzv. stolbur fitoplazmi koja ima devet podskupina. Podskupina 16SrXII-A (tzv. soj STOL11) je poznati uzročnik tzv. „*bois noir*“ ili BN fitoplazma žutica vinove loze je prema biološkim svojstvima i specifičnim molekularnim markerima unutar više gena (*tufB*, *rp*, *secY*) dobila i svoj zasebni status vrste '*Candidatus* Phytoplasma solani' (Quaglino et al. 2013), te je tako primjer kako klasa '*Candidatus*' može odgovarati i ribosomskoj podskupini. U Europi je ta vrsta obuhvaćala isprva samo 16SrXII-A, no kasnije je dodano još podgrupa (Quaglino et al. 2017).

Za drugog uzročnika bolesti žutica vinove loze *flavescence dorée* ili FD fitoplazmu svrstavanje u ribosomske skupine i podskupine je trenutno jedina službena taxonomija te one pripadaju 16SrV-C i 16SrV-D podskupinama (Martini et al. 1999).

Uz filogenetske analize temeljene na 16S rRNA rađene su i analize sa nešto manje očuvanom intergenskom 16/23S rDNA-*spacer* regijom (Kirkpatrick et al. 1994), a zatim i s genima za ribosomske proteine (Martini et al. 2007) te je danas finija diferencijacija unutar skupina i podskupina moguća analizama molekularnih markera opisanih u poglavlju 1.5.

1.4 Genom fitoplazmi

Do sada su sekvencirani genomi šest sojeva fitoplazmi. Općenito, genomi fitoplazmi su jedni od najmanjih u svih poznatih bakterija (0.5-1.3kb), a najmanji je onaj vrste '*Candidatus* Phytoplasma cynodotis' sa samo 530kb. Svi *Mollicutes* imaju jako reducirani genom s niskim udjelom GC sadržaja ispod 28% što je na granici mogućeg za kodirajuću DNA (Marcone et al. 1996). Zbog tolike redukcije genoma fitoplazme su izgubile osim stanične stijenke i gene za većinu metaboličkih puteva te su obvezni paraziti koje je zasada nemoguće uzgojiti na hranjivoj podlozi, ali mogu preživjeti i umnožavati se u izotoničnom okolišu biljnog floema i hemolimfe kukaca.

Genom fitoplazmi se sastoji uglavnom od jednog kružnog, a rijetko linearnog kromosoma, što je vrlo neobično za bakterije. Iako su izgubile važne metaboličke puteve i mnoge ključne enzime poput ATP-sintaze fitoplazme i dalje imaju znatan broj otvorenih okvira čitanja organiziranih u klastere koji kodiraju za kompleksne metaboličke puteve i omogućuju im interakciju s domaćinima i vektorima (Hogenhout et al. 2008). Genom je vrlo dinamičan

zbog prisutnosti genskih duplikacija i redundancija (Oshima et al. 2004), a veliki broj ponavljajućih sljedova mogao bi objasniti velike varijacije u veličinama genoma fitoplazmi.

U nekih sojeva postoji i ekstrakromosomalna DNA - plazmidi. Plazmidi su smatra se virusnog porijekla (od geminivirusa), a nose proteine koji utječu na specifičnost za vektore i domaćine (Hogenhout i Musić, 2010). Česte su i potencijalne mobilne jedinice PMU na plazmidima i na kromosomu koje ponekad sadrže važne gene, a ponekad pseudogene (Hogenhout i Musić, 2010). Na krajevima PMU su velike intervenirajuće sekvence te PMU najvjerojatnije sudjeluju u kromosomskim rearanžmanima i utječu na varijacije u veličini genoma te tako imaju značajnu ulogu u evoluciji genoma fitoplazmi. Ukratko, rekombinacijama između plazmida te plazmida i genoma povećava se biološka raznolikost fitoplazmi (Hogenhout i Musić, 2010). Uz to, u insektima su PMU prisutni u većem broju i više eksprimirani nego u biljkama (Toruno et al. 2010, Hogenhout et al. 2008) što dodatno upućuje na njihovu moguću ulogu u specifičnosti odnosa i adaptaciji na vektore i domaćine.

Smatra se da se ekspresija ne samo PMU-ova već cijelog genoma mijenja prelaskom s vektora na domaćina (Oshima et al. 2011, Oshima et al. 2013), te da fitoplazme koriste transporterske i sekretorne proteine ali i metaboličke enzime specifično za pojedinog vektora/domaćina. Veliki je broj transportnih sustava, neki od kojih su *sec*, *ABC* i transportni sustav za aminokiseline, a koji bi trebali biti niske specifičnosti kako bi omogućili prijenos što više metabolita iz oba carstva (Hogenhout i Musić, 2010).

1.5 Molekularni markeri

Ribosomski i neribosomski proteini koji pokazuju različite stupnjeve konzerviranosti koriste se za daljnju finiju rezoluciju fitoplazmi unutar grupa i podgrupa. Pri tome se koriste analize molekularnih markera različitih stupnjeva konzerviranosti. Ribosomski proteini kao vrlo konzervirani, zatim relativno konzervirani neribosomski proteini (*secA*, *secY*, *tufB*, *map*, i *pnp*), te varijabilni geni za površinske proteine poput *vmp1*, *imp*, *amp* i *stamp*. Naročito su interesantni potonji koji vjerojatno sudjeluju u interakcijama s domaćinima i vektorima te utječu na specifičnost međudnosa, a time i na epidemiologiju i ekologiju fitoplazmi. Naime, membranski proteini su ključni za patogenost, neki djeluju poput adhezina prijanjanjem na biljnu stanicu, a neki određuju specifičnost prijenosa kukcima interakcijom s mikrofilamentima kukaca (Suzuki et al. 2006).

U ovom poglavlju navodim kratki pregled gena korištenih u MLST metodi tipiziranja GY fitoplazmi koje pripadaju u 16SrXII-A (BN; 'Ca. P. solani') skupinu.

1.5.1 *TufB* genska regija

Gen *tufB* kodira za elongacijski faktor Tu (EF-Tu), a u genomu je prisutan u samo jednoj kopiji kod svih *Mollicutes* i Gram-pozitivnih bakterija (Schneider et al. 1997). Riječ je o *housekeeping* genu konstitutivne ekspresije koji ima bitnu ulogu u translaciji te je stoga evolucijski dosta konzerviran, ali ipak pokazuje veću varijabilnost od 16S rRNA ribosomske regije. Klasifikacija analizom njegove sekvence poklapa se s klasifikacijom temeljenom na 16S rDNA pa se gen *tufB* koristi za ispitivanje finije genske raznolikosti unutar 16Sr XII-A podgrupe (Marccone et al. 2014).

RFLP analizama *tufB*-podtipova unutar 16SrXII-A podgrupe s restrikcijskim enzimom *HpaII* identificirane su tri varijante gena *tufB*. U Europi su *tufB*-a i *tufB*-b profili povezani sa žuticama vinove loze i specifičnosti za alternativne domaćine koji su rezervoari BN fitoplazme. To su divlje biljke i korovi koji rastu u okolini vinograda pa je *Urtica dioica* tako povezana s *tufB*-a podtipom (Langer and Maixner 2004, Bressan et al. 2007, Riolo et al. 2007), a *Convolvulus arvensis* s *tufB*-b podtipom (Ember et al. 2011). *TufB*-b podtip je osim s *C. arvensis* povezan s više vrsta korova (Credi et al. 2006), a postoji još i *tufB*-c podtip povezan s *Calystegia sepium* (Langer and Maixner 2004). Nedavno je u Austriji otkrivena i varijanta *tufB*-b podtipa *tufB*-b2 varijanta koja se razlikuje u *HpaII* restrikciji, a čini se da ima i drugačija ekološka svojstva (Aryan et al. 2014). Ukratko, različiti *tuf* podtipovi su dakle uključeni u različite epidemiološke cikle.

Daljnje varijacije unutar *tufB*-podtipova ustanovljene su analizom sekvenca drugih varijabilnijih gena ali njihov epidemiološki značaj zasad nije poznat (Pacifico et al. 2009).

1.5.2 *SecY* genska regija

Sekrecijski i transportni proteini su jako bitni za parazite pa tako imaju i nekoliko transportnih sustava niske specifičnosti kako bi mogli uvesti što više različitih metabolita (Kube et al. 2008, Hogenhout i Šeruga-Musić 2010).

Gen *secY* kodira za komponentu sekrecijskog sustava, podjedinicu proteina translokaze (Karamanou et al. 1999), a dio je operona ribosomskog proteina *spc*. Varijabilniji je od ribosomskog proteina pa je stoga marker za klasifikaciju sojeva fitoplazmi unutar skupina 16SrXII-A (Lee et al. 2012) i 16SrV (Arnaud et al. 2007).

U bakterija postoji barem pet sustava za transport proteina (Karamanou et al. 1999) ali samo je *sec*-sustav esencijalan. U bakteriji *Escherichia coli* sustav translokaze čini 11 proteina, *sec* sustav je prisutan u svih *Mollicutes*, a geni za *secY* nađeni su u više sojeva fitoplazmi i to u samo jednoj kopiji (Lee et al. 2006, 2010). Smatra se da na površinu fitoplazme transportira proteine vezane uz virulenciju što bi zbog nepostojanja stanične stijenke značilo da se izlučuju direktno u stanice domaćina te tako vjerojatno utječu na patogenost (Kakizawa et al. 2006). Proteini su označeni za transport translokazom N-terminalnim sljedom.

Uz *sec*-sustav koji imaju sve fitoplazme u nekih sojeva postoji još jedan sekrecijski sustav - *YidC* (Kakizawa et al. 2006) koji je odgovoran za uklapanje membranskih proteina.

1.5.3 Stamp genska regija

Gen *stamp* kodira za antigenski membranski protein (Fabre et al. 2011), smatra se da kao membranski protein ima važnu ulogu u interakciji fitoplazmi i kukaca vektora (Suzuki et al. 2006) jer se pokazalo da specifično prepoznaje aktinske mikrofilamente kukaca. Zbog toga je izložen stalnom pozitivnom selekcijskom pritisku i pogodan molekularni marker koji je specifičan za razlikovanje genotipova unutar '*Candidatus Phytoplasma solani*' (Aryan et al. 2014).

1.5.4 Vmp1 genska regija

Gen *vmp1* (od engl. *variable membrane protein*) je membranski protein specifičan za Stolbur fitoplazme koji također pokazuje veliku raznolikost unutar skupine '*Ca. P. Solani*' (Cimerman et al. 2009, Pacifico et al. 2009) RFLP analiza s *RsaI* unutar skupine '*Ca. P. solani*' ima 23 profila (Murolo et al. 2014, Pacifico et al. 2009).

Obzirom da se nalazi na površini stanice i da se i za njega pretpostavlja da ima ulogu u interakcijama fitoplazme, domaćina i vektora prikladan je molekularni marker za epidemiologiju jer je i on izložen snažnom selektivnom pritisku (Murolo et al. 2014).

1.6 Interakcija fitoplazmi i domaćina

Fitoplazme imaju kompleksne i međusobno vrlo različite životne cikluse koji im omogućuju život u dva potpuno odvojena carstva.

U biljkama su najzastupljenije u stanicama floema gdje se i razmnožavaju (Doi et al. 1967), iako je njihova prisutnost dokazana i u drugim dijelovima biljaka. Odnos biljnog domaćina i

fitoplazme je raznolik i vrlo kompleksan, od izrazito negativnog koji završava smrću domaćina do gotovo neutralnog u kojem su biljke zaražene ali potpuno asimptomatične. Fitoplazme tako mogu potaknuti metaboličku aktivnost domaćina i to ujedno i primarnog i sekundarnog metabolizma, podižu proliferaciju biljnih izdanaka, te utječu na oblik i boju cvijetova (Bertaccini et al. 2014), no ujedno uzrokuju i niz fizioloških disfunkcija te značajno propadanje i smrt zaraženih biljaka.

Mehanizmi kojima fitoplazme djeluju na domaćina su nepoznati. Smatra se da luče efektorske proteine kojima utječu na gensku ekspresiju i hormonsku regulaciju biljaka domaćina te zapravo tako uzrokuju većinu simptoma. Simptomi nisu samo nuspojava infekcije u smislu iskorištavanja asimilata (Bai et al. 2006, Sugio et al. 2014) već fitoplazme aktivno remete biljni metabolizam i obrambene mehanizme biljaka čime si osiguravaju uspješnije širenje. Naime, od biljnih obrambenih mehanizama stvaranje peroksida povezano je s oporavkom od infekcije, a za širenje fitoplazme pak trebaju vektore pri čemu simptomi poput virescencije privlače vektore, a filodija produljuje vegetativnu fazu što pomaže širenju fitoplazmi. Dodatnu kompleksnost međuodnosa biljke i fitoplazme pokazuje činjenica da postoje biljke koje se oporave od infekcije.

Fitoplazme prezimljavaju u trajnicama koje su ujedno i rezervoari i izvor zaraze jednogodišnjih vrsta. Prijenos sjemenjem (Chung i Jeong 2014, Satta et al. 2016) je isto zabilježen kod nekih vrsta. Ujedno se mogu širiti sadnim materijalom, vegetativnim razmnožavanjem, sadnicama i mikropropagacijom (Bertaccini et al. 1992, Bertaccini 2007).

Epidemiologija patogena prenošenih vektorom direktno ovisi o biologiji vrste koja je vektor, dakle o njegovom životnom ciklusu i strategijama preživljavanja (Maixner 2011). Kukci koji prenose fitoplazme spadaju u red Hemiptera, obitelji *Cicadellidae* i *Psyllidae* te superobitelj *Fulgoroidea*. Fitoplazme su obligatorni endosimbionti kukaca te se u njima nalaze i intracelularno i sktracelularno u različitim tkivima i organima, no primarno u hemolimfi i žlijezdama slinovnicama (Hogenhout et al. 2008). Kako uspješnost širenja fitoplazme direktno ovisi o dobrobiti vektora utjecaj na kukca vektora je iznimno rijetko negativan, a većinom je neutralan ili čak pozitivan. Naime, negativan utjecaj fitoplazme na kukca nije koristan niti za kukca niti za fitoplazmu te se smatra da što dulje koevoluiraju kukac-fitoplazma to su bolje adaptirani jedan na drugog. Vertikalni transovarialni prijenos u vektorima je upitan i više je iznimka nego pravilo te bi također bio odlika dugotrajne koevolucije patogena i vektora (Tedeschi et al. 2006).

Neki kukci mogu prenositi samo jedan tip fitoplazmi a neki mogu nositi više tipova fitoplazmi te uz sve to i druge bakterije i viruse koji su biljni patogeni. Osim toga kukci imaju vlastite mikrobe endosimbionte te uz fitoplazme mogu biti zaraženi i s drugim virusima ili bakterijama. Malo je poznato o tim međuosobnim odnosima i njihovom utjecaju na efikasnost prenošenja fitoplazmi (Trivedi et al. 2016).

Način prehrane vektora bitno utječe na sposobnost prijenosa (Bertaccini 2007) što znači da se uspješan vektor hrani floemom makar samo u odrasloj fazi. Polifagni i oligofagni kukci uspješniji su u širenju zaraze od monofagnih. Mobilnost vektora također ima veliki utjecaj na širenje zaraze na nove lokalitete, a uz to specifičnost prijenosa određena je i geografski jer se niša kukaca koji bi mogli biti potencijalni vektori ne mora se preklapati s nišom zaraženih biljaka (Foissac i Wilson, 2010).

Na molekularnoj razini smatra se da bi najveću ulogu u specifičnom prijenosu vektorom imao AMP protein (gen *amp*, od eng. *antigenic membrane protein*) (Suzuki et al. 2006, Pacifico et al. 2015).

1.6.1 Fitoplazma *Bois noir* ('*Ca. P. solani*') i kukac vektor *Hyalestes obsoletus* Signoret

'*Candidatus* Phytoplasma solani' je jedna od fitoplazmi s najširim krugom vrsta domaćina, zaražava mnoge gospodarski važne biljke te cijeli niz različitih divljih biljaka. Osim na vinogradima, uzrokuje štete i na povrtnicama iz porodice *Solanaceae* (krumpir, duhan, rajčica), uzročnik je vrlo problematične bolesti kukuruznog crvenila u Srbiji, a inficira i šećernu repu i još neke ekonomski važne biljke.

Osim *Hyalestes obsoletus* koji je glavni prenositelj '*Ca. P. solani*' fitoplazme odnedavno su dokazana još dva kukca vektora i povezana s drugačijim patosustavima. U Srbiji i Francuskoj vektori *Reptalus panzeri* i *R. quinquecostatus* (Cvrković et al. 2014, Olivieri et al. 2015, Chuche et al. 2016) povezani su sa zarazama kukuruza i krumpira.

Divlje i ukrasno bilje koje je zaraženo BN fitoplazmom ključno je u njenom životnom ciklusu jer je ono najčešće rezervoar i izvor zaraze za ekonomski značajne kultivare te je također primarni domaćin kukca-vektora na kojem se on izliježe i prezimljava. Vezano uz vinograde i bolest žutice vinove loze najvažniji u Hrvatskoj i okolici su kopriva *U. dioica* i poljski slak *C.*

arvensis kao glavni domaćini *H. obsoletus* (Mori et al. 2013), a odnedavno je i lavanda *Lavendula officinalis* potvrđena kao domaćin (Hossard et al. 2018).

BN fitoplazma koja uzrokuje žutice vinove loze je tako primjer otvorenog patosustava u kojem se podrazumijeva prijenos fitoplazme kukcem vektorom s jedne biljke koja služi kao rezervoar i izvor zaraze za drugu biljku koja je krajnji domaćin (Alma et al. 2015). Biljni rezervoari su navedeni korovi u okolici vinograda, dok je krajnji domaćin fitoplazme vinova loza. Za razliku, zatvoreni patosustav pak podrazumijeva prijenos fitoplazme s uvijek istog kukca na uvijek istu biljku koja je i izvor i krajnji domaćin, takav primjer je sustav vinove loze, FD fitoplazme i njenog vektora *Scaphoideus titanus*. Dva su različita otvorena patosustava BN fitoplazme povezana s različitom genetikom njenih *tufB* podtipova. Otvoreni sustav *C. arvensis* – *H. obsoletus* – *Vitis vinifera* povezan s podtipom *tufB*-b, dok je *U. dioica* – *H. obsoletus* – *V. vinifera* patosustav povezan s *tufB*-a podtipom.

Tipičan proces prijenosa fitoplazme kukcem vektorom uključuje tri faze: AAP je faza akvizicijskog hranjenja (od eng. *acquisition acces period*) tijekom koje kukac postaje inficiran dok se hrani. Druga faza je period latencije, LP, tijekom koje kukac ne prenosi zarazu već se fitoplazma umnaža u tijelu kukca. Treća i zadnja faza je inokulacijska faza, IAP (od eng. *inoculation acces period*) u kojoj je kukac infektivan. Jednom kada stekne fitoplazmu vektor ju prenosi perzistentno i propagativno što zahtijeva kratku AAP fazu, dugu LP fazu i umjereno kratku IAP fazu (Alma et al. 2015).

Hyalestes obsoletus je oligofagni hemimetabolični kukac iz porodice *Cixiidae*. U Europi ima jednu generaciju godišnje, no u Izraelu i dvije. Period akvizicije vezan je uz nimfe koje se izliježu na korijenu inficiranih biljaka rezervoara u rano ljeto. Nimfe nisu jako mobilne pa čak i kada ne bi bilo perioda latencije ili bi bio znatno kraći nimfe ne bi bile uspješne u prijenosu jer ne lete. Iz utrobe kukaca fitoplazme moraju izaći u hemolimfu i zatim njome putuju po tkivima i organima kukca dok napokon ne dođu do žlijezda slinovnica. Ključno za uspješno širenje zaraze jest postizanje dovoljnog titra virusa u žlijezdama slinovnicama. Taj period obično traje četiri do pet tjedana, a toliko i traje vrijeme sazrijevanja nimfe u odraslog kukca. Inokulaciju i širenje zaraze na nove biljke domaćine stoga najefikasnije obavljaju odrasli kukci jer oni mogu letjeti te se oni lako pomiču s korova na lozu.

1.7 Žutice vinove loze

Bolesti žutica vinove loze - GY (od engl. *Grapevine yellows*) su bolesti raširene po cijelom svijetu, koje su kao i većina žutica dugo smatrane virusnim oboljenjem. Simptomi bolesti su uvijek isti iako uzročnici mogu biti različite sorte fitoplazmi. BN fitoplazma se prvi puta pojavila u Francuskoj 1961 g. kada je smatrana manje opasnom varijantom FD fitoplazme jer uzrokuju iste simptome, od tada se širi po vinogradima Europe gdje je ponekad odgovorna za ekonomski značajne štete na vinogradima ali s manjim posljedicama od FD fitoplazme. U Hrvatskoj je zastupljenija od FD fitoplazme i najraširenija fitoplazma vinograda. Koje fitoplazme će biti uzročnik žutice ovisi o geografskoj lokaciji vinograda i o okolišu, u smislu prisutstva vrsta kukaca-vektora i korova koji ga okružuju. Samo prema simptomima nije moguće odrediti koja je fitoplazma izazvala zarazu, a uz to postoji i mogućnost da više različitih sojeva fitoplazmi uzrokuje žuticu u istom vinogradu, u pravilu, simptomi će biti slični, ali će epidemiologija i način kontrole zaraze ovisiti o tipu fitoplazme koja je uzročnik.

Mnogo je razloga zašto simptomi zaraze GY jako variraju. Simptomi mogu ovisiti o kultivaru loze te neke mogu biti podložnije, a neke otpornije što može biti vezano uz njihovu genetiku i epigenetiku ili pak uz prehrambene navike kukaca. Osim toga moguće je i da različiti tipovi fitoplazmi unutar iste skupine mogu uzrokovati ozbiljnije ili manje ozbiljne simptome. Također bitan je i način na koji je do zaraze došlo kao i količina titra virusa koja varira sezonski. Različite razvojne faze kukaca vektora prenose fitoplazme više ili manje efikasno te na uspješnost prenosa vektorom utječu i period latencije od akvizicije fitoplazme, način akvizicije fitoplazme, kao i ekologija vektora u smislu njegovog rasprostranjenja, svladavanja različitih udaljenosti. Često se simptomi pojavljuju tek iduću sezonu to jest oko godinu dana od akvizicije fitoplazme.

Kompleksnost BN epidemiologije onemogućava dizajniranje efikasnih strategija kontrole, insekticidi ne utječu niti na bolest niti na *H. obsoletus* (Mori et al. 2008) te je stoga nužno dobro poznavanje patosustava, svih uključenih vektora i rezervoara te svih BN podtipova kako bi se moglo kontrolirati širenje zaraze.

Kod BN epidemiologije interesantan je proces oporavka pri kojem simptomi zaraze spontano nestanu sa simptomatičnih biljaka. Sposobnost spontanog oporavka zabilježena u vinovoj lozi je još nerazjašnjena, ali opisan je proces u kojem se smatra da ulogu ima nakupljanje peroksida. U oporavljenim biljkama nemoguće je detektirati fitoplazme, a uz to one ne mogu

zaraziti nove nezaražene kukce vektore (Morone et al. 2007). Sposobnost oporavka jako ovisi o starosti i vrsti kultivara, a pokazalo se da u oporavku pomaže obrezivanje. Iako postoje asimptomatične biljke iz kojih se može izolirati DNA fitoplazmi to su uglavnom rezervoari, u oporavljenim kultivarima se ona ne može detektirati niti može prenijeti zarazu na kukca.

1.8 Metode istraživanja fitoplazmi

1.8.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom ili PCR (od engl. *polymerase chain reaction*) je najčešća dijagnostička metoda detekcije i tipizacije fitoplazmi (Dickinson et al. 2013). Napredak u metodama molekularne biologije donosi i napredak u istraživanju fitoplazmi, tu je riječ prvenstveno o PCR metodi i njenim inačicama, naročito ugniježđenom i kvantitativnom ili qPCRu (tzv. *real-time* PCR) (Lee et al. 1998).

To je relativno jednostavna metoda in vitro eksponencionalne amplifikacije određenog dijela DNA kojom se stvaraju milijuni kopija sekvence u par sati, a može umnožiti fragmente od 0.1 do 10kbp.

Reaktanti potrebni za izvođenje su kalup DNA koji sadrži fragment od interesa, specifične početnice, termostabilna DNA polimeraza, 4 vrste dNTPova te pufer s magnezijevim ionima. Reakcija se izvodi u PCR uređaju koji ciklički mijenja temperature u kratkim vremenskim periodima te time omogućuje izvođenje specifičnih temperaturno ovisnih reakcija. Obično se izvodi 20 do 40 ciklusa termalnog cikliranja kojima prethodi korak inicijalne denaturacije, a iza njih je korak završne elongacije.

Denaturacija je prvi korak, njome se razdvajaju lanci DNA (tzv. *melting*) kako bi se omogućilo vezanje početnica u sljedećem koraku. Denaturacija se obično izvodi na oko 95 °C, a trajanje ovisi o duljini i sastavu DNA. *In vivo* taj korak odrađuje helikaza.

Drugi korak je prijanjanje početnica tzv. *annealing*. Temperatura se spušta kako bi se omogućilo komplementarno sparivanje lanaca DNA kalupa i specifičnih početnica potrebnih za aktivnost polimeraze u koraku elongacije. Temperatura annealing-a ovisi o dizajnu početnica i obično je oko 5 stupnjeva ispod melting temperature hibrida početnica-kalup. Preniska temperatura uzrokovati će nespecifično vezanje početnica, a ukoliko je previsoka početnice se neće uopće vezati.

Korak elongacije provodi DNA polimeraza koja umnaža željeni fragment u 5'→3' smjeru. Zbog visokih temperatura tijekom PCR-a koriste se termostabilne polimeraze poput Taq koja je DNA polimeraza I izolirana iz termofilne bakterije hidrotermalnih odušaka *Thermus aquaticus*. Taj korak obično se izvodi pri oko 72 °C, temperaturi optimalnoj za aktivnost Taq. Taq polimeraza nema 3'→5' proofreading aktivnost pa se za Hi-Fi amplifikaciju koriste druge polimeraze poput PFU. Termostabilne polimeraze omogućuju izvođenje PCR-a na višim temperaturama što omogućuje specifično prijanjanje početnica i smanjuje stvaranje nespecifičnih produkata.

Nastajanje produkta ima tri faze eksponencionalnu linearnu i plato fazu. Količina nastalog produkta određena je dostupnim supstratima te s napretkom reakcije oni postaju limitirajući. Plato faza nastupa kada se potrošio neki od reaktanata, kod klasičnog PCR-a u toj fazi detektiramo DNA na gelu uz pomoć DNA vezujuće boje npr. etidij-bromida. Takva analiza je semikvantitativna jer se može procijeniti količina nastalog produkta samo prema omjeru debljine nastalih bandova.

Većina protokola za fitoplazme uključuje da se prvo koriste univerzalni parovi početnica u direktnom PCRu te potom u ugniježđenom PCR-u parovi specifični za grupu zbog niskog titra fitoplazmi ali i inhibitora koji utječu na uspješnost PCR-a (Gundersen et al. 1994).

Ugniježđeni PCR, modifikacija klasičnog PCR-a, je metoda dizajnirana da podigne i specifičnost i osjetljivost reakcije te je stoga glavna metoda amplifikacije fitoplazmi. Njome se smanjuje nastajanje nespecifičnih produkata zbog vezivanja početnica na neočekivana mjesta. Koriste se dva seta početnica u dvije sukcesivne PCR reakcije s time da drugi set početnica amplificira produkt unutar produkta dobivenog prvim setom početnica. Ugniježđeni PCR omogućuje amplifikaciju željene regije sa smanjenim brojem ciklusa u reakciji sa prvim setom početnica kako bi bilo manje nespecifično nastalog produkta. Mana ugniježđenog PCR-a jest pojava lažnih pozitiva zbog kontaminacije između uzoraka, te je upravo zbog manje vjerojatnosti kontaminacije još bolji qPCR.

Kvantitativni PCR je postao alternativa ugniježđenom PCRu u rutinskim testovima jer je vrlo osjetljiva tehnika sa smanjenim rizikom od kontaminacije uzorka. Brz i pouzdan način detektiranja 16S rRNA je metoda *triplex* qPCRa.

1.8.2 MLST - multigenska tipizacija

MLST od eng. *multilocus sequence typing* je metoda koja se koristi za finiju rezoluciju blisko srodnih prokariota te za istraživanje njihovih evolucijskih odnosa. Uspješnost metode ovisi o pažljivom odabiru gena na koje se primjenjuju, najčešće su to dosta konzervirani konstitutivni geni, ali kod epidemioloških istraživanja fitoplazmi sustav se nadopunjuje i s nešto varijabilnijim genima. Prednost tehnika baziranih na sekvenciranju je u mogućnosti virtualne pohrane izolata.

Predložena je 1998 g, kako bi se bolje definirale razlike unutar ribosomskih skupina i podskupina (Lee et al. 1998, 2010, Foissac et al. 2013). Za istraživanja evolucijskih međuodnosa koriste se konzervirani geni, a metoda je naročito korištena za proučavanje bakterija. Varijabilni, naročito membranski proteini gledaju se kod epidemioloških istraživanja fitoplazmi (Urwin i Maiden, 2003). Ovisno o vrsti ili soju fitoplazme koriste se različiti molekularni markeri i rade se njihove filogenetske analize.

2 Cilj istraživanja

Razumijevanje bioloških aspekata razvoja epidemije ključno je za kontrolu širenja fitoplazmi. Cilj ovog istraživanja je bio istražiti različite epidemiološke aspekte i povezati ih s molekularnim analizama na 2 lokacije u Hrvatskoj, a u sklopu opsežnijeg monitoringa zaraze fitoplazmom BN na više lokacija u Hrvatskoj. Nadalje, cilj istraživanja bio je ispitati i preciznije definirati tipove i podtipove BN fitoplazmi ribosomske skupine 16SrXII-A '*Candidatus Phytoplasma solani*' iz uzoraka prikupljenih u Vukanovcu i Brckovštini gdje uzrokuju pojavu žutice vinove loze, te usporediti dobivene rezultate između svih članova patosustava koji čine kukac - vektor, biljka - rezervoar (alternativni domaćin) i vinova loza kao krajnji domaćin.

3 Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci kukaca i biljaka

Kukci, njih 24, *Hyalestes obsoletus* Signoret (hrv. medeći cvrčak), su prikupljeni u Vukanovcu, Međimurje u sedmom mjesecu 2011g. Simptomatični uzorci vinove loze te asimptomatični uzorci korova skupljeni su na istim lokacijama na kojima su prikupljeni i kukci, u Vukanovcu, i još dodatno u Brckovštini. Uzorci korišteni u analizama navedeni su u Tablica 2 Popis uzoraka korištenih u analizama.

Tablica 2 Popis uzoraka korištenih u analizama

Uzorak	Vrsta	Lokacija	Godina	Hrvatski naziv
Gvu1, Gvu2	<i>Vitis vinifera</i>	Vukanovec	2011	Vinova loza
GBr2, GBr4	<i>Vitis vinifera</i>	Brckovština	2011	Vinova loza
Br8	<i>Convolvulus arvensis</i>	Brckovština	2011	Poljski slak
H1-H24	<i>Hyalestes obsoletus</i>	Vukanovec	2011	Medeći cvrčak

3.1.2 Referentni sojevi

U PCR reakcijama kao pozitivne kontrole korišteni su sljedeći sojevi: FD70 je referentni soj za grupu 16SrV, a sojevi 19-25, PO i Charente-1 za skupinu 16SrXII koji su održavani u *C.roseus* L., a dobiveni su od Dr. X. Foissac iz kolekcije Odjela UMR1090 *Genomique Diversite Pouvoir Pathogene* francuskog nacionalnog instituta za poljoprivredna istraživanja (INRA) i sveučilišta u Bordeauxu 2 (https://www.bordeaux.infra.fr/umr1090/coll_isola.htm).

Tablica 3 Popis referentnih sojeva s pripadajućim ribosomskim skupinama

Soj	Ribosomska podskupina
FD70	16SrV <i>flavescence dorée</i>
19-25	16SrXII stolbur
PO	16SrXII stolbur
Ch	16SrXII stolbur
GGY	16SrXII stolbur

3.1.3 Komercijalni kompleti

Izolacija ukupne genomske DNA sa komercijalnim kompletom *OmniPrep™ for Plant* (G-Biosciences). Komplet sadrži pufer za lizu (*Genomic Lysis Buffer*), proteinazu K, otopinu za odvajanje komponenata (*DNA Stripping Solution*), otopinu za precipitaciju (*Precipitation Solution*), TE-pufer i glikogen dagnji (*Mussel Glycogen*) koji koprecipitira nukleinske kiseline tijekom izolacije i čišćenja.

3.1.4 Restriksijski enzimi i markeri

Markeri i restriksijski enzimi navedeni su u Tablica 4.

M9 markeri su bili: *DNA Molecular Weight Marker IX* (Roche Diagnostics, Njemačka) i *Marker 9* (Fermentas, Litva): 11 fragmenata raspona 72 - 1353 bp (72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 bp) dobivenih razgradnjom ΦX-174 faga s RE *HaeIII* (*BsuRI*)

M8 marker je *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Fermentas, SAD): 14 fragmenata raspona 250 - 10000 bp (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp).

Tablica 4 Popis markera i restriksijskih enzima

Proizvod	Skala/restriksijsko mjesto	Proizvođač
Marker 8	250 – 10000pb	Fermentas, SAD
Marker 9	72 – 1353 pb	Fermentas, Litva
RE <i>Tru1I</i> (<i>MseI</i>)	5' - T ↓ T A A - 3'	ThermoFischer scientific
RE <i>TspEI</i>	5' - ↓ A A T T - 3'	ThermoFischer scientific
<i>HpaII</i>		Promega, USA
<i>RsaI</i>	j	New England Biolabs, UK

3.1.5 Početnice

Za direktni PCR regije gena 16S rRNA korišteni su univerzalni fitoplazmatski parovi početnica. P1/P7 (Deng i Hiruki 1991, Smart et al. 1996) umnaža fragment veličine 1.8kb koji obuhvaća skoro cijeli 16S rRNA gen te spacer regiju između 16S i 23S rRNA. Za ugniježđeni PCR korišten je R16F2n/R2 par (Gundersen i Lee, 1996) koji umnaža fragment veličine 1.2 kb unutar gena za 16S rRNA. Sekvence početnica navedene su u tablici 5.

Tablica 5 Nukleotidni sljedovi početnica za umnažanje regije gena 16S rRNA

Početnica	Nukleotidni sljed
P1	5'- AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT -3'
P7	5'- CGTCCTTCATCGGCTCTT -3'
R16F2n	5'- GAAACGACTGCTAAGACTGG -3'
R16R2	5'- TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'

Za umnažanje fragmenta genske regije *tufB* u direktnom PCR-u korištene su početnice ftuf1/rtuf1 (Schneider et al. 1997), a u ugniježđenom PCR-u su korištene ftufAY/rtufStoL (Schneider et al. 1997). Prilikom sekvenciranja su korištene jednake početnice kao i za umnažanje u ugniježđenom PCR-u. Popis i nukleotidni sljedovi početnica navedeni u tablici 6.

Tablica 6 Nukleotidni sljedovi početnica za umnažanje genske regije *tufB*

Početnica	Nukleotidni sljed
ftufI	5'- CACATTGACCACGGTAAAAC-3'
rtuf1	5'- CCACCTTCACGAATAGAGAAC -3'
ftufAY	5'- GCTAAAAGTAGAGCTTATGA -3'
RtufStoL	5'- CGTTGTACCTGGCATAACC -3'

Umnažanje *vmp1* genske regije u direkt PCR-u sa (STOL)H10F1/(STOL)H10R1 parom (Cimerman et al. 2009). Ugniježđeni PCR je odrađen sa TYPH10F1/TYPH10F1 početnicima (Fialova et al. 2009). Za sekvenciranje su korištene jednake početnice kao i za umnažanje ugniježđenim PCR-om. Nukleotidni sljedovi početnica navedeni su u tablici.

Tablica 7: Nukleotidni sljedovi početnica za umnažanje i sekvenciranje gena *vmp1*

Početnica	Nukleotidni sljed
(STOL)H10F1	5'- AGGTTGTAAAATCTTTTATGT-3'
(STOL)H10R1	5'- GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC-3'
TYPH10F	5'- AACGTTTCATCAACAATCAGTC-3'
TYPH10R	5'- CAC TTCTTTCAGGCAACTTC-3'

Za umnažanje gena *secY* direktnim PCR-om korištene su specifične početnice PosecF1/PosecR1 (Fialova et al. 2009). U ugniježđenom PCR-u korištene su specifične početnice PosecF3/PosecR3 (Fialova et al. 2009). Za sekvenciranje su korištene iste početnice kao i za ugniježđeni PCR.

Tablica 8: Nukleotidni sljedovi početnica za umnažanje i sekvenciranje gena *secY*

Početnica	Sljed nukleotida
PosecF1	5'- TCTGCTTTGCCTTTGCCTTT-3'
PosecR1	5'- ATTAGTAAACTAGTTCCTCC-3'
PosecF3	5'-GGATTGATAGATGCTGCCCC-3'
PosecR3	5'-GCCCCTATAACGGTGATTTTGA-3'

Umnažanje *stamp* genske regije direktnim PCR-om izvršeno je pomoću specifičnih početnica StampF/StampR0 (Fabre et al. 2011). Za sekvenciranje i ugniježđeni PCR korištene su StampF1/StampR1 početnice (Fabre et al. 2011).

Tablica 9: Sljedovi početnica za umnažanje/sekvenciranje *stamp* genske regije

Početnice	Sljed nukleotida
StampF	5'-GTAGGTTTTGGATGTTTTAAG-3'
StampR0	5'- AAATAAAAGAACAAGTATAGACGA-3'
StampF1	5'-TTCTTTAAACACACCAAGAC-3'
StampR1	5'-AAGCCAGAATTTAATCTAGC-3'

3.1.7 Pribori i uređaji

Pribor/Uređaj	Komercijalno ime	Proizvođač
mikropipete		Biohit, Finska CAPP, Danska
mikroeprovete		Eppendorf, Njemačka
vaga	<i>Precisa 62 A</i>	Precisa Instruments AG, Švicarska
vodena kupelj	<i>SW22</i>	Julabo, Njemačka
inkubator	<i>Incubator Hood TH 15</i>	Edmund Buhler GmbH
centrifuge	<i>Centrifuge 5804 R</i> <i>Mikro-242</i> <i>Multi-Spin</i>	Eppendorf, Njemačka Tehtnica Železniki, Slovenija Biosan, Latvija
vertložne miješalice	<i>EV-100</i> <i>Bio Vortex VI</i>	Tehtnica Železniki, Slovenija Kisker-Biotech, Njemačka
PCR uređaji	<i>GeneAmp PCR system 2700</i> <i>2720 Thermal Cycler</i> <i>SimpliAmp Thermal Cycler</i>	<i>Applied Biosystems, SAD</i> <i>Applied Biosystems, SAD</i> <i>Applied Biosystems, SAD</i>
spektrofotometar	<i>Nanodrop 2000</i>	Thermo scientific, SAD
qPCR uređaj	<i>7300 Real Time PCR System</i>	Applied Biosystems, SAD
Elektroforeza: 1)kadice	<i>Mini-Sub® Cell GT</i> <i>Wide Mini-Sub® Cell GT</i>	Bio-Rad, SAD Bio-Rad, SAD
2)uređaj za napajanje	<i>Power Pac 300</i>	Bio-Rad, SAD
3)UV-transiluminator	<i>T2202</i>	Sigma, SAD
4)dokumentacija gela	<i>DigiGenius</i>	Syngene Ltd., UK
5)digitalni fotoaparat	<i>Panasonic DMC-FZ8</i>	Panasonic, Japan

3.1.8 Puferi 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 µL dNTPs 10 mM otopine:
 - 180 µL dH₂O (deionizirana voda)
 - 5 µL dATP 100 mM
 - 5 µL dGTP 100 mM

- 5 µL dCTP 100 mM
 - 5 µL 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%
 - ksilencijanol fluorofosfat 0,25%
 - glicerol 30% (u vodi)
- Taq-polimeraza i pripadajući pufer i otopina za standardne PCR reakcije
 - *GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, SAD)*
 - *5X Colorless GoTaq[®] Flexi Reaction Buffer (Promega, SAD)*
 - *MgCl₂ 25 mM (Promega, SAD)*
 - *qPCR : TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD)*

3.2 Metode

3.2.1 Izolacija ukupne genomske DNA

Kukci, 24 primjerka *Hyalestes obsoletus*, čuvani u etanolu i posušeni na zraku, homogenizirani su u tekućim dušiku i hladnim mikroeprijetama (2mL). Dodano je 500μL pufera za lizu (*Genomic Lysis Buffer*) i 5μL otopine proteinaze K. Tkivo je dodatno usitnjeno i promiješano na vrtložnoj mješalici. Nakon inkubacije u vodenoj kupelji (2h/60°C) uz povremeno okretanje uzorci se hlade na sobnu temperaturu. Ohlađenim uzorcima dodano je 200μL kloroforma, promiješano okretanjem i centrifugiranjem (10 min. na 14000g).

Gornja vodena faza koja sadrži DNA otpipetirana je u čiste mikroeprijetu (1.5mL), dodano je 50μL otopine za odvajanje komponenata (*DNA Stripping Solution*), promiješano i inkubirano u vodenoj kupelji (10min/60°C). Nakon inkubacije dodano je 100μL otopine za precipitaciju (*Precipitation Solution*), promiješano na vrtložnoj mješalici pri čemu nastaje bijeli talog i centrifugirano (4°C, 10min/14000g).

Supernatant je prebačen u novu mikroeprijetu (1.5mL), dodano je 500μL izopropanola i 2μL glikogena dagnji (*Mussel Glycogen*), miješano i centrifugirano (4°C, 10min/14000g).

Supernatant je sad pažljivo ocijeđen na salvetu, a talogu je dodano 700μL 70%-tnog etanola. Ponovno centrifugiramo u ohlađenoj centrifugi, 4°C, 2min/14000 g. Ponovno uklanjanje supernatanta. Dobiveni talog se suši na zraku dok ne nestane miris alkohola te se potom otapa u 50μL TE-pufera 1h kako bi se dobro rehidrirao. Izoliranu DNA čuva se na -20°C.

3.2.2 Spektrofotometrija

Metoda se temelji na činjenici da različite molekule imaju maksimum apsorpcije pri različitim i specifičnim valnim duljinama.

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određuje se spektrofotometrijski uređajem. Odvaja se 5μL uzorka i stavlja u 495μL dH₂O. Koncentracija DNA izračunata je iz vrijednosti apsorbanacije pri 260nm. Proteini i fenoli tj. nečistoće imaju maksimum apsorpcije na 280 nm. Čistoća izolirane DNA određena je omjerom apsorbanacija DNA (260nm) i proteina (280nm). Nakon mjerenja uzorci su razrijeđeni na radnu koncentraciju DNA od 20 ng/μL (1 μL uzorka i potrebna količina dH₂O).

3.2.3 PCR

3.2.4 Umnažanje fragmenta gena 16S rRNA

Lančanom reakcijom polimerazom umnoženi su fragmenti gena 16S rRNA i neribosomskih proteina. Korištena je GoTaq® polimeraza i pripadajuće kemikalije (Promega) te specifične početnice iz tablica s početnicama. Reakcijska mješavina za 16S rRNA nalazi se u tablici 10, a uvjeti reakcija u tablici 11. Reakcije su provedene u uređaju *SimpliAmp Thermal Cycler*. Pozitivna kontrola je referentni uzorak, a negativna autoklavirana dH₂O umjesto lanca kalupa DNA.

Tablica 10: Reakcijska smjesa za umnažanje 16S rRNA gena metodom PCR. Kratice: Co- početna koncentracija, Ck- konačna koncentracija, V- volumen dodanog reagensa.

REAGENS	Direktni PCR			Ugniježđeni PCR		
	C ₀	C _k	V/ μ L	C ₀	C _k	V/ μ L
Sterilna dH ₂ O			13,375			13,875
5x GoTaq 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 polimeraza	5U/ μ L	0,625U	0,125	5U/ μ L	0,626U	0,125
Kalup Tdna	20 ng/ μ L	-	1	-	-	-
Kalup direktPCR	-	-	-	-	-	0,5
Ukupno			25			25

Tablica 11: Uvjeti direktnog i ugniježđenog PCR-a 16S rRNA genskog fragmenta

Segment	Direkt	T	T	Ugniježđeni	T	T
Početna denaturacija	1	95 °C	2 min	1	94 °C	1 min
Denaturacija kalupa	35x	95 °C,	1 min	35x	94 °C	1 min
Prijanjanje početnica	35x	53 °C,	1 min	35x	53 °C	2 min
Produljivanje lanaca	35x	72 °C,	2 min	35x	72 °C	3 min
Završna alongacija	1	72 °C,	10 min	1	72 °C	7 min

3.2.5 Umnažanje gena za neribosomske proteine *tufB*, *secY*, *vmp1* i *stamp*

Reakcijske mješavine razlikuju se samo po korištenim početnicama, no uvjeti PCR reakcija se razlikuju i nalaze se u tablicama. Pozitivna kontrola je referentni uzorak, a negativna kontrola autoklavirana dH₂O.

Tablica 12. Reakcijska smjesa za umnažanje gena neribosomskih proteina. Kratice: c0-početna koncentracija, ck-konačna koncentracija, V-volumen dodanog reagensa, kalup 1-ukupna genomska DNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	direktni PCR			ugniježđeni PCR		
	C ₀	C _k	V/μL	C ₀	C _k	V/μL
Sterilna dH ₂ O			2.6			5.3
5x GoTaq Buffer	5x	1x	5	5x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 Mm	2	25 mM	1,5 mM	2
dNTPs otopina	10 mM	0,2 Mm	2	10 mM	0,2 mM	2
direkt F početnica	5 μM	0,2 μM	5	-	-	-
direkt R početnica	5 μM	0,2 μM	5	-	-	-
<i>nested</i> F početnica	-	-	-	5 μM	0,2 μM	5
<i>nested</i> R početnica	-	-	-	5 μM	0,2 μM	5
GoTaq polimeraza	5U/μL	0,625U	0,4	5U/μL	1U	0,2
Kalup Tdna	20 ng/μL	-	3	-	-	-
Kalup direktPCR	-	-	-	-	-	0,5
Ukupno			25			25

Tablica 13 Uvjeti direktne i ugniježdene PCR reakcije za umnažanje genskog fragmenta *tufB*, po završetku temperatura pada na 4°C

<i>tufB</i>	Ciklusi	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	1	94 °C	2 min
Denaturacija kalupa	35	94 °C	30 sec
Prijanjanje početnica	35	53 °C	30 sec
Produljivanje lanaca	35	72 °C	60 sec
Završna elongacija	1	72 °C	5 min

Tablica 14 Reakcijski uvjeti za umnažanje *secY* direktnom i ugniježđenom PCR reakcijom

<i>secY</i>	Direkt	Temp.	Vrijeme	<i>Nested</i>	Temp.	Vrijeme
Početna denaturacija	1	95 °C	3 min	1	95°C	3min
Denaturacija kalupa	20x	94 °C	30 sec	35x	95°C	30sec
Prijanjanje početnica	20x	54 °C	30 sec	35x	62°C	30sec
Produljivanje lanaca	20x	72 °C	60 sec	35x	72°C	60sec
Završna elongacija	1	72 °C	5 min	35x	72°C	5min

Tablica 15 Reakcijski direktnog i ugniježđenog PCR-a *vmp1* genskog fragmenta, po završetku temperatura se spušta i ostaje na 10°C

<i>vmp1</i>	Direkt	Temp.	Vrijeme	<i>Nested</i>	Temp.	Vrijeme
Početna denaturacija	1	94 °C	90 sec	1	94°C	4min
Denaturacija kalupa	20x	94 °C	30 sec	35x	94°C	30sec
Prijanjanje početnica	20x	52 °C	30 sec	35x	55°C	30sec
Produljivanje lanaca	20x	72 °C	2min	35x	72°C	90sec
Završna elongacija	1	72 °C	7min	35x	72°C	7min

Tablica 16. Reakcijski uvjeti direktnog i ugniježđenog PCR-a *stamp* genskog fragmenta

<i>Stamp</i>	Direkt	Temp.	Vrijeme	<i>Nested</i>	Temp.	Vrijeme
Početna denaturacija	1	94 °C	4min	1	94°C	4min
Denaturacija kalupa	20x	94 °C	30 sec	35x	94°C	30sec
Prijanjanje početnica	20x	56 °C	30 sec	35x	52°C	30sec
Produljivanje lanaca	20x	72 °C	90 sec	35x	72°C	90sec
Završna elongacija	1	72 °C	7min	35x	72°C	7min

3.2.6 Elektroforeza

Prisutnost PCR-om umnoženih fragmenata provjerena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Otapanje agaroze pospiješeno je zagrijavanjem. Smjesa je potom ohlađena na sobnu temperaturu, dodana je SERVA *DNA stain G* interkalirajuća boja te je potom smjesa prelivena u kalup i ostavljena da polimerizira (20min). Gotov kalup s gelom prenešen je u kadu za elektroforezu napunjenu 0.5x TBE-puferom do prekrivanja gela. Nanešeno je po 5µL uzorka pomiješanih s 1 µL obojenog pufera za nanošenje u svaku jažicu. U prvoj jažici je M9 1kb molekularni marker (5µL sa 2 µL obojenog pufera), u predzadnjoj pozitivne kontrole - referentni sojevi, a u zadnjoj negativna kontrola PCR reakcije - voda.

Elektroforeza je trajala 20 min pri naponu od 150 V. Rezultat je provjeren UV-transiluminatorom, uslikan te obrađen programom za fotografije.

Uvjeti elektroforeze malo se razlikuju za različite gene. Amplikoni reakcija s 16S rRNA, *tufB*, *secY* i *stamp* vizualizirani su na 1%-tnom agaroznom gelu, dok je gel za *vmp1* bio 0.7%-tni.

3.2.7 Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP)

RFLP (od eng. *restriction fragment length polymorphism*) je metoda rezolucije DNA fragmenata nastalih djelovanjem restrikcijskih enzima, a koji su prethodno umnoženi PCR-om. Restrikcijska mjesta ovisna su o sekvenci te mutacijama mogu nastajati i nestajati pa ovisno o njima na gelu dobivamo specifičan raspored vrpce (eng. *band*) tzv. restrikcijski profil ili RFLP-obrazac. Pripadnost fitoplazme u određenu skupinu ili podskupinu moguća je na temelju specifičnih restrikcijskih profila.

RFLP analiza provedena je prema uputama proizvođača sa sljedećim restrikcijskim enzimima i pripadajućim puferima.

<i>Fragment</i>	<i>RE</i>	<i>restr.</i>	<i>T</i>	<i>vrijeme</i>	<i>gel</i>
16S rRNA	<i>Tru1I (MseI)</i>	5' T↓TAA 3'	65°C	16h	PAGE 5%
16S rRNA	<i>TspEI</i>		65 °C	16h	PAGE 5%
<i>tufB</i>	<i>HpaII</i>	5' C↓CGG 3'	37 °C	4h	2,5% agaroz
<i>vmp1</i>	<i>RsaI</i>	5' GT↓AC 3'	65 °C	16h	PAGE 8%

Restriksijska smjesa za 16S rRNA i *vmp1* pripremljena je miješanjem 2 µL pufera za restrikciju sa 0.5 µL restriksijskog enzima, 13,5 µL destilirane vode i 4 µL uzorka iz ugniježđenog PCR-a. Nakon inkubacije (16h/65°C) nastale pocijepane fragmente analiziramo elektroforezom u 5%-tnom poliakrilamidnom gelu. Za *tufB* restrikcija je trajala 4h/37°C, a analiziran je na 2.5% agaroznom gelu, uz 4 mikrolitra boje.

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Pripremljene su dvije zasebne otopine kako bi polimerizacija bila ujednačena. Pufer za elektroforezu je 1xTBE-pufer.

Prva otopina 10 µL TEMED-a, 1,25 mL AA-a (40%) i 0,625 mL BIS-a (2%).

Druga otopina 1 mL 10xTBE-pufera, 100 µL APS-a (10%) i 7,015 mL vode.

Nakon polimerizacije u jažice nanosimo 20 µL uzorka pomiješanog s 4 µL obojenog pufera za elektroforezu i 7 µL markera pomiješanog s 2 µL boje. Uvjeti elektroforeze: napon od 200 V u trajanju od 45 min. Gel je obojan etidijevim bromidom (0,75 µg/mL, 15 min), te vizualiziran na transiluminatoru i fotografiran.

3.2.8 Sekvenciranje

Na sekvenciranje su poslani fragmenti gena *stamp*, *secY* i *vmp1* u *MacroGen Inc.* (Amsterdam, Nizozemska <https://dna.macrogen.com/>). Uzorci su pripremljeni za sekvenciranje PCR umnažanjem sa istim početnicama koje su korištene i za ugniježđeni-PCR.

3.2.9 Računalne analize

Sljedovi dobiveni sekvenciranjem su ujedinjeni i sastavljeni programom *Sequencher*TM 4.10 Demo (<http://www.genecodes.com/>). Sekvence su potom skraćene na duljinu gena, a ORF proteina provjeren je *in silico* korištenjem *on-line* programa za translaciju (<http://web.expasy.org/translate/>). Globalno sravnjenje uređenih sljedova napravljeno je programom ClustalX 2.0.11 koji omogućava pronalaženje mutacija unutar sekvenci (Thompson et al. 1997; <http://www.clustal.org>). Sravnjenje sekvence su potom korištene za filogenetsku analizu. Filogenetske analizire napravljene su programom MEGA 7 (Tamura et al. 2007; <http://www.megasoftware.net>). Filogenetska stabla dobivaju se metodom susjednog povezivanja, najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti. Korištena je metoda susjednog povezivanja (od eng. *neighbour joining*). Pogreške modela procjenjene su statistički kroz

podržanost grananja metodom *bootstrap analysis* hrv. analiza samopodržanja (Felsenstein, 1985) uz 500 ponavljanja.

Udaljenost nukleotidnih sljedova izračunata je modelom *number of differences*. Osim sekvenci naših ispitivanih uzoraka uključene su i referentne sekvence iz GenBank baze podataka.

4 Rezultati

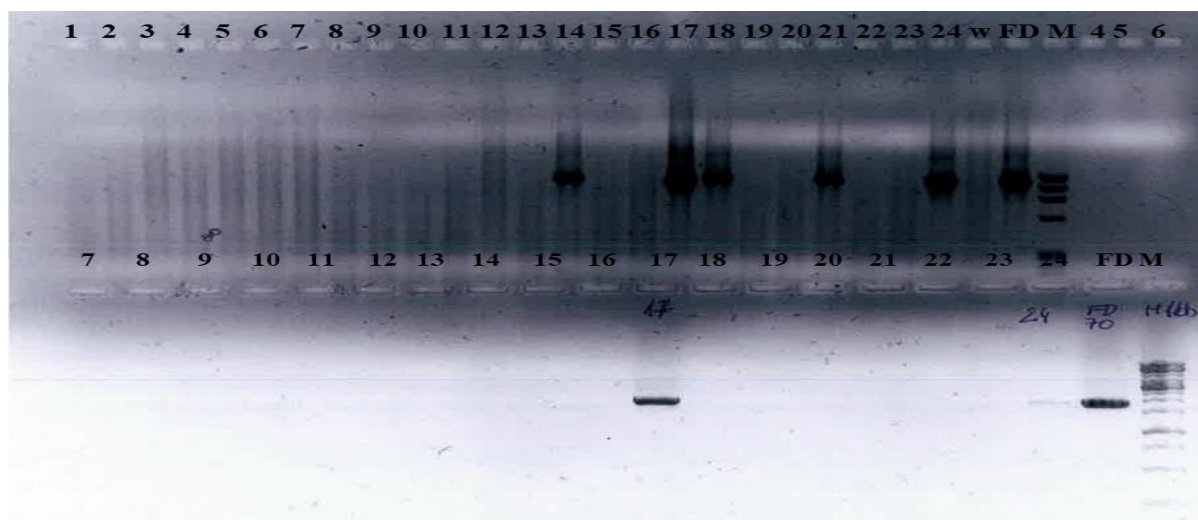
Molekularne analize napravljene su na 10 uzoraka među kojima su 4 uzorka vinove loze (*Vitis vinifera* L.) sa simptomima žutice vinove loze (GY), 5 uzoraka iz kukaca *Hyalestes obsoletus*, i 1 uzorak poljskog slaka *Convolvulus arvensis*. Popis svih uzoraka i njihovi genotipovi se nalaze u Tablica 17.

Tablica 17 Popis svih uzoraka, mjesto uzorkovanja i pridruženi genotip

Uzorak	Domaćin	Mjesto uzorkovanja	<i>tufB</i> profil	<i>vmp1</i> profil	Genotip <i>secY</i>	Genotip <i>stamp</i>
H14	<i>H. obsoletus</i>	Vukanovec	b	V18	–	–
H17	<i>H. obsoletus</i>	Vukanovec	b	V18	–	T1
H18	<i>H. obsoletus</i>	Vukanovec	b	V18	S1	T1
H21	<i>H. obsoletus</i>	Vukanovec	b	V18	S1	–
H24	<i>H. obsoletus</i>	Vukanovec	b	V18	S1	–
GVu1	<i>V. vinifera</i>	Vukanovec	b	V18	S1	T1
GVu2	<i>V. vinifera</i>	Vukanovec	b	V18	S1	T1
GBr2	<i>V. vinifera</i>	Brckovština	b	V18	S1	T1
GBr4	<i>V. vinifera</i>	Brckovština	b	V18	S1	T1
Br8	<i>C. arvensis</i>	Brckovština	b	V18	S2	T2
GGY	ref. soj	Njemačka	b	-	S2	T2 ^o
19-25	ref. soj	Francuska	b	-	S1	T1
Ch	ref. soj	Francuska	b	V4	-	-
PO	ref. soj	Francuska	b	V7	-	-

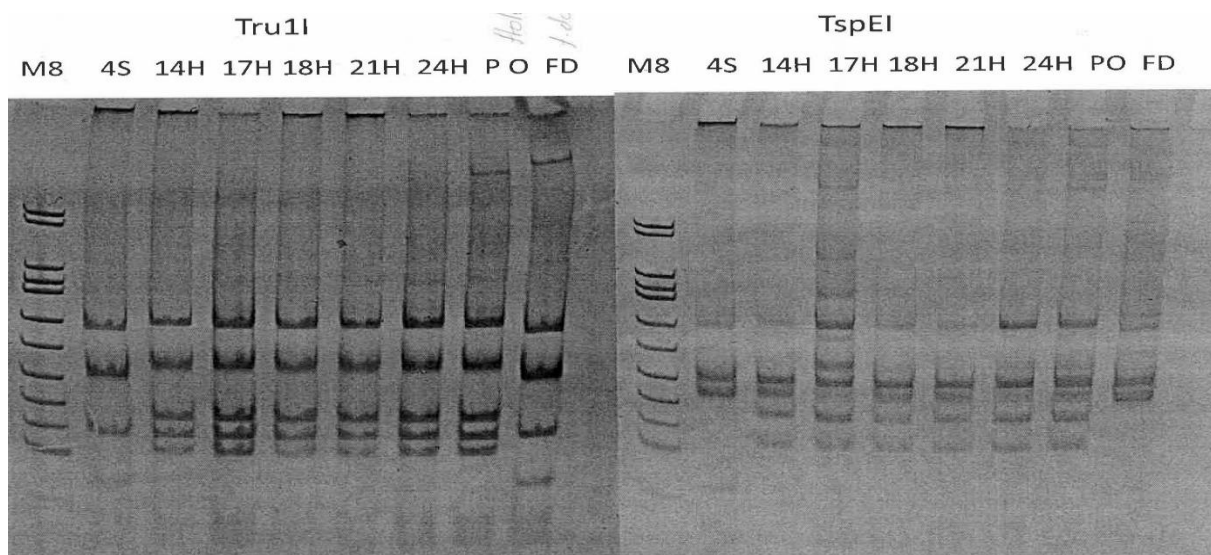
4.1 Ugniježdeni PCR i RFLP analiza 16s rRNA genskog fragmenta

Specifičnim umnažanjem fitoplazmatskog gena za 16S rRNA metodom izravnog i ugniježđenog PCR-a te kasnijom analizom u 1%-tnom agaroznom gelu dokazana je prisutnost fitoplazmi u pojedinim uzorcima. Od 24 uzorka *Hyalestes obsoletus* petero kukaca je bilo pozitivnih na prisutstvo fitoplazmatske DNA: H14, H17, H18, H21 i H24. Kao pozitivna kontrola PCR reakcije korišten je referentni soj PO, a kao negativna kontrola autoklavirana voda. Rezultati elektroforeze prikazani su na Slika 1.



Slika 1 Agarozni gel (1%) izravni i ugniježdeni PCR za 16S rRNA. Kratice: 1-24 uzorci DNA iz *H. obsoletus*, FD pozitivna kontrola i w negativna kontrola, M-1kb marker

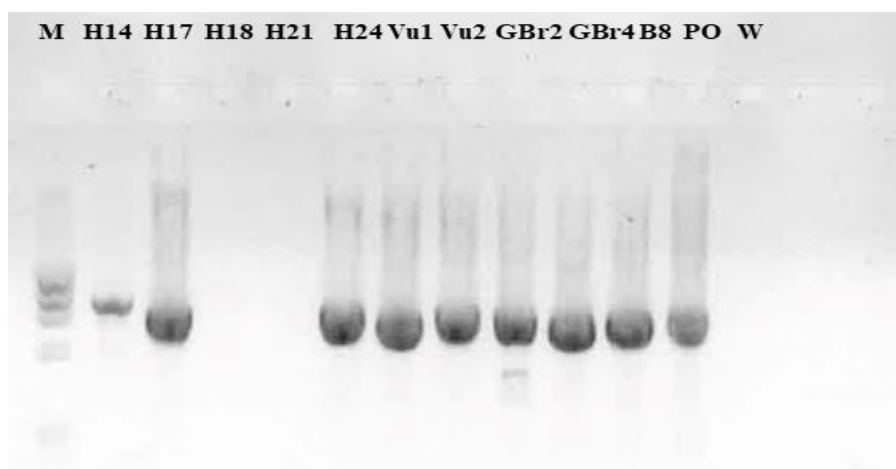
Potom je na uzorcima pozitivnim na fitoplazmatsku DNA provedena RFLP analiza fragmenata gena za 16S rRNA u svrhu određivanja pripadnosti ribosomskoj skupini. Svi uzorci sa *H. obsoletus* dali su restrikcijski profil identičan referentnom soju PO koji pripada skupini stolbur fitoplazmi 16SrXII-A. Takav rezultat je i očekivan obzirom da je *H. obsoletus* vektor specifičan za BN fitoplazmu. Rezultati restrikcije prikazani su na Slika 2.



Slika 2 Poliakrilamidni gel (5%) restrikcija fragmenta 16S rRNA. Kratice: M8 – molekularni marker, 4S-FD fitoplazma, 14H-24H uzorci iz *H. obsoletus*, PO-referentni soj BN fitoplazmi, FD-referentni soj FD fitoplazmi

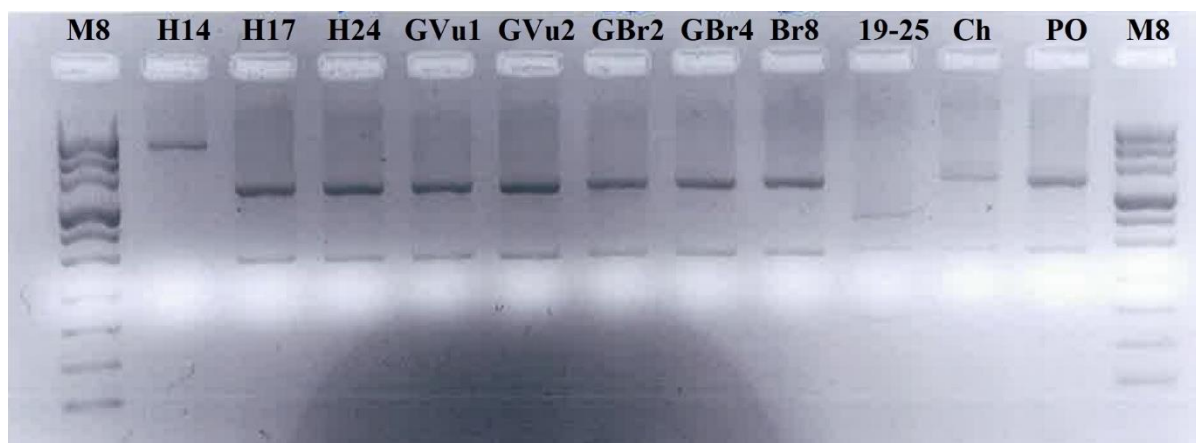
4.2 Ugniježdeni PCR i RFLP analiza *tufB* genskog fragmenta

Specifičnim početnicama za *tufB* proveden je izravni i ugniježdeni PCR *tufB* genskog fragmenta. Direkt PCR nije dao rezultate osim za referentni soj PO (1080pb fragment), dok smo u ugniježđenom PCRu dobili *tufB* fragmente očekivane veličine od oko 950pb za H17 i H24 uzorke iz kukaca, te za sve uzorke vinove loze i uzorak korova. Pozitivna kontrola je ponovno PO soj.



Slika 3 Agarozni gel (1%) ugniježđenog PCR-a *tuf* genskog fragmenta; H14-24 uzorci *H. obsoletus*, Vu1 i 2 te GBr2 i 4 uzorci iz vinove loze, Br8 uzorak iz *C. arvensis*, PO pozitivna kontrola, W negativna kontrola

Restriksijska analiza *tufB* profila provedena je na svim uzorcima koji su bili pozitivni na prisutnost fitoplazmatske DNA neovisno o rezultatu reakcije PCR-a sa specifičnim početnicama za *tufB*. Restrikcija s *HpaII* u 2.5% agaroznom gelu pokazala je da svi uzorci odgovaraju *tufB*-b profilu stolbur fitoplazmi koji je povezan s patosustavom koji uključuje *C. arvensis*. Postoje dva podtipa *tufB*-b profila b1 i b2, no oba daju isti restriksijski profil. Restrikcija je prikazana na Slika 4.



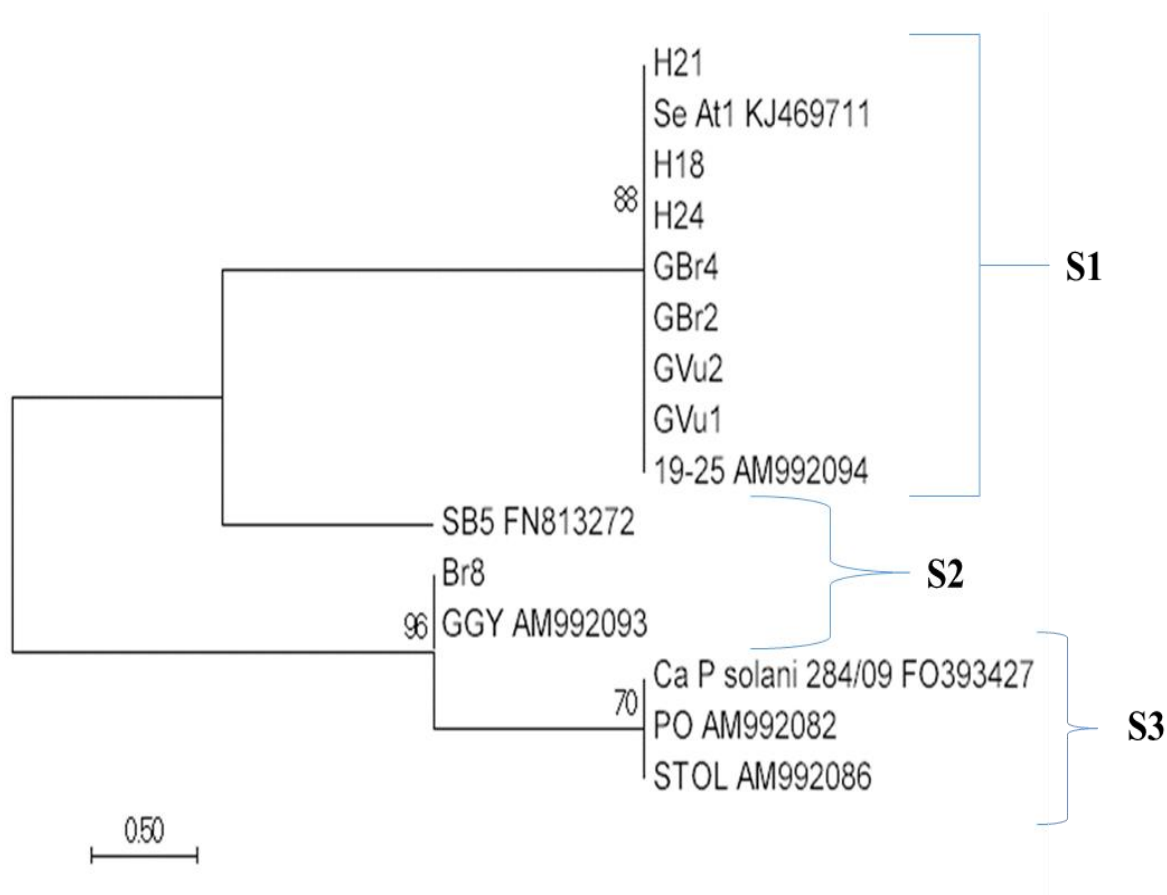
Slika 4 RFLP analiza *tufB* genskog fragmenta u 2.5% agaroznom gelu. Kratice: M8-marker veličine, H14-H24 uzorci BN iz *H. obsoletus*, GVu1/2 i GBr2/4 uzorci vinove loze, Br8 uzorak iz korova, 19-25, Ch i PO-referentni sojevi.

4.3 Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza *SecY* genskog fragmenta

Produkti PCR-a analizirani su u 1%-tnom agaroznom gelu. U izravnom PCR-u nije dobiven očekivani *secY* amplikon od 1052pb, međutim ugniježđenim PCR-om smo dobili fragmente očekivane veličine od 1000pb. Na sekvenciranje su poslani uzorci H18, H21, H24, GVu1, GVu2, GBr2, GBr4 i Br8 i referentni soj PO. Kao pozitivna kontrola korišten je referentni soj PO, a kao negativna kontrola autoklavirana deionizirana voda. Rezultati ugniježđenog PCR-a prikazani su na Slika 5.



Slika 5 Agarozni gel (1%) ugniježdenog PCRa *secY* genskog fragmenta, M-marker, H14-24 uzorci iz *H. obsoletus*, GVu1 i 2 te GBr2 i 4 uzorci vinove loze, Br8 uzorak *C. arvensis*, PO-pozitivna kontrola, w-negativna kontrola.

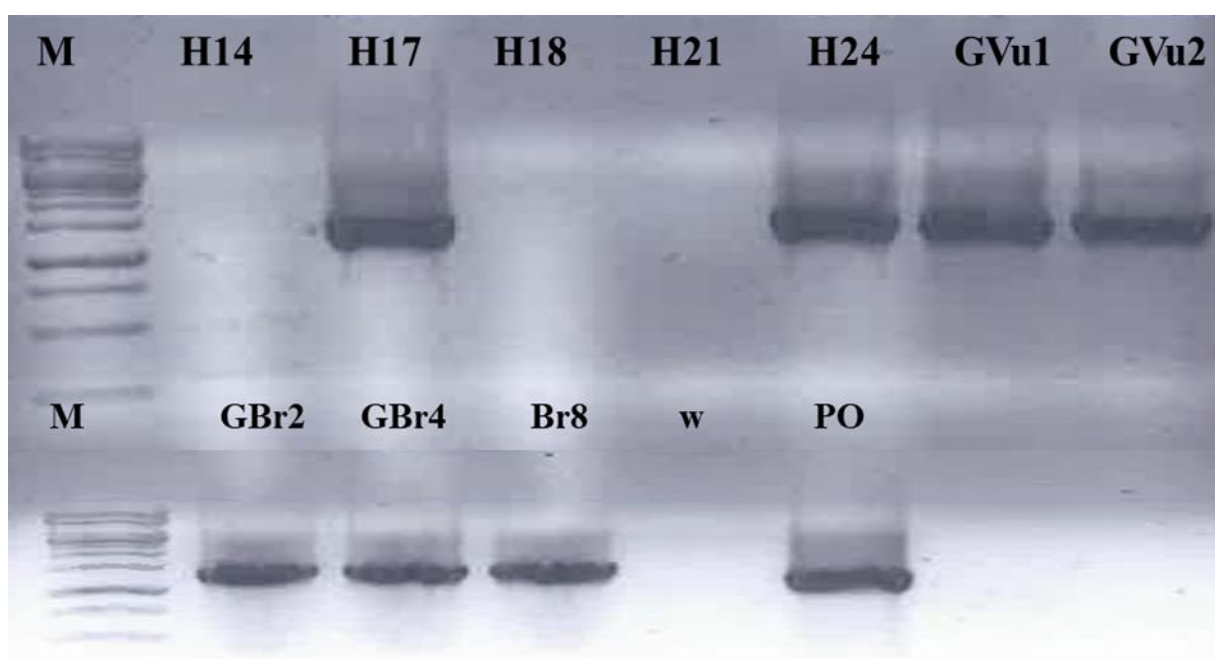


Slika 6 Filogenetska analiza *secY* lokusa referentnih sojeva i BN izolata iz kukaca, vinove loze i poljskog slaka. Neukorijenjeno drvo dobiveno je metodom susjednog povezivanja. Brojevi kod grana označuju *bootstrap* vrijednosti. Uzorci iz kukaca i iz vinove loze su se svi grupirali u istu granu dok je u zasebnoj grani uzorak iz poljskog slaka.

Na sekvenciranje poslani su uzorci H18, H21, H24, GVu1, GVu2, GBr2, GBr4 i Br8, te referentni sojevi 19-25, GGY i PO. Nakon sekvenciranja, dobiveni sljedovi su sastavljeni, uređeni i sravnjeni te je provedena filogenetska analiza u koju su uključeni i odgovarajući sljedovi iz baze GenBank. Kao rezultat je prikazano filogenetsko stablo dobiveno NJ

metodom (od eng. *neighbour joining*). Grananja prikazuju različite genotipove BN fitoplazmi. Uzorci su se raspodijelili u tri grane te smo ta tri genotipa nazvali S1, S2 i S3. Najzastupljeniji je S1 genotip unutar kojega su svi uzorci iz kukaca i vinove loze te referentni uzorak 19-25. Jedini uzorak Br8 iz *C. arvensis* je genotipa S2 kao i referentni uzorak GGY, a referentni uzorak PO je S3 genotipa. Time je pokazano da *secY* pokazuje veću raznolikost od *tufB* budući da je razlučio više podtipova unutar *tufB*-b profila.

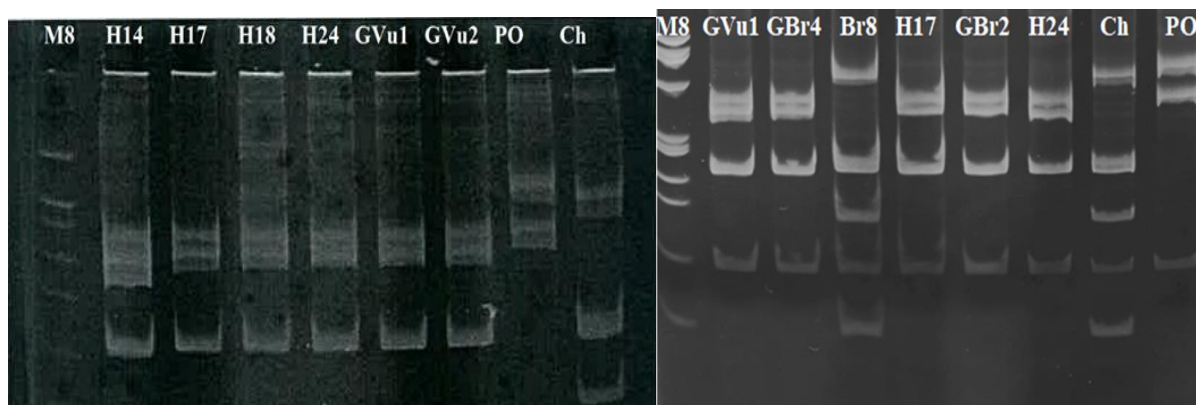
4.4 Ugniježdeni PCR i RFLP analiza *vmp1* genskog fragmenta



Slika 7 Agarozni gel 0.7% *vmp1* genskog fragmenta dobivenog ugniježđenim PCR-om. Kratice: M-marker, H14-24 uzorci iz *H. obsoletus*, GVu1 i 2 te GBr2 i 4 uzorci iz vinove loze, Br8 uzorak iz poljskog slaka, PO-pozitivna kontrola, w-negativna kontrola.

Elektroforezom u 0,7%-tnom agaroznom gelu izravnog PCR-a očekivali smo fragment od 1700pb, a iz ugniježđenog PCRa 1400pb. Inače su amplikoni *vmp1* proteina vrlo varijabilni u veličini zbog varijacija u svojim ponavljajućim domenama (Cimerman et al. 2009).

Vmp1 varijabilni membranski protein je molekularni marker specifičan za stolbur fitoplazme koji pokazuje veliku varijabilnost restrikcijskih profila, poznata su čak 23 restrikcijska profila za '*Ca. P. solani*'. Analizom restrikcijskih fragmenata u 8% poliakrilamidnom gelu pokazano je da fitoplazme svih naših uzoraka pokazuju profil V18, dok referentni soj PO ima V7, a referentni soj Ch V4 profil.



Slika 8: RFLP analiza (8%PAGE): restrikcijski profili uzoraka i referentnih sojeva (Ch i PO); M8 marker; H14 – H24 uzorci iz kukca *H.obsoletus*, GVu1 i 2 te Gbr2 i 4-uzorci iz vinove loze, Br8 – iz poljskog slaka

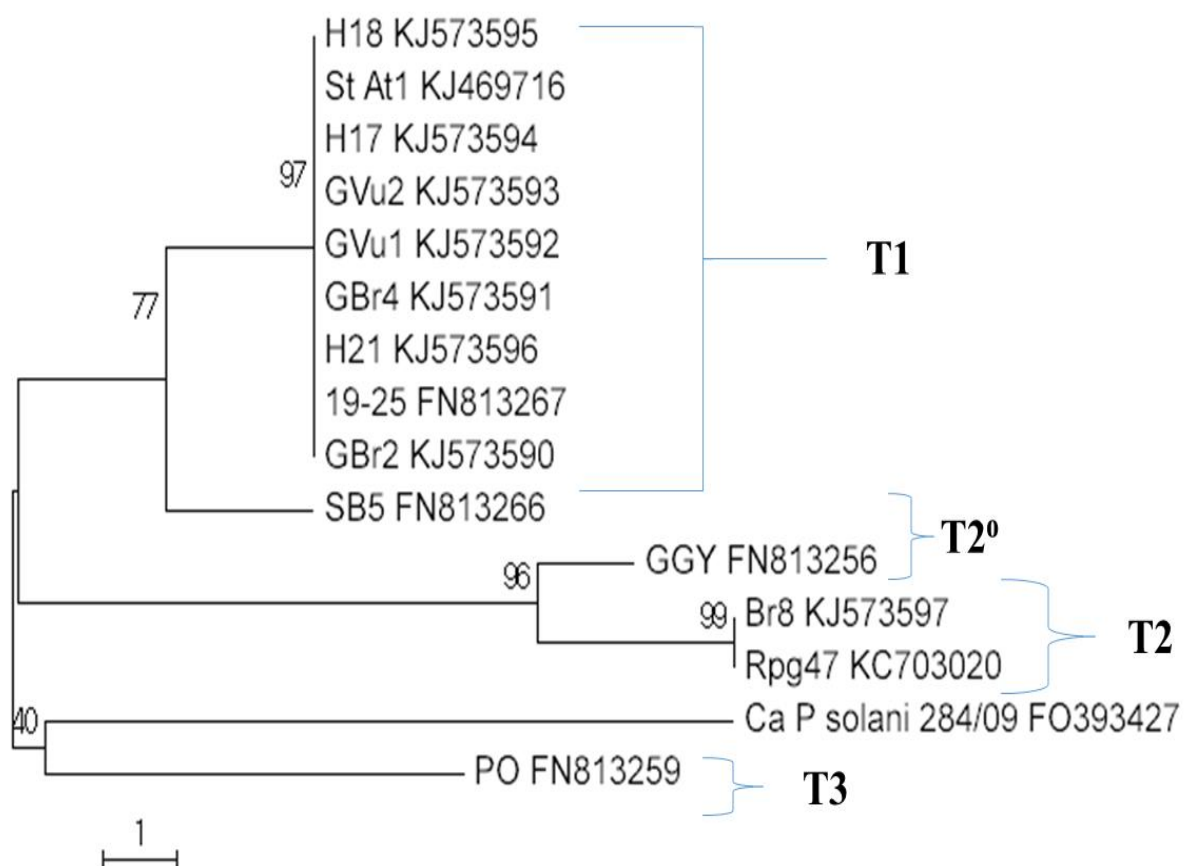
4.5 Ugniježđeni PCR i filogenetska analiza *stamp* genskog fragmenta

Elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu nakon izravnog PCR-a nismo dobili ništa, ali je ugniježđeni PCR dao u većini uzoraka očekivani fragment veličine od oko 600pb.



Slika 9 Ugniježđeni PCR; M9-marker, H17-H24 uzorci iz *H. obsoletus*; Gvu1,2 i GBr2,4 uzorci iz vinove loze; Br8 uzorak iz poljskog slaka

Na sekvencirnje su poslani uzorci H17, H18 H21, GVu1, GVu2, GBr2, GBr4, Br8, te referentni sojevi GGY, PO i 19-25. Ponovno je napravljena filogenetska analiza metodom susjednog povezivanja. Pokazalo se da su se svi uzorci iz *H. obsoletus* i vinove loze grupirali ponovno u jedan genotip nazvan T1 skupa s referentnim uzorkom 19-25. Uzorak Br8 iz *C. arvensis* ponovno se odvojio kao zaseban i pripada genotipu T2, međutim ovdje se i referentni soj GGY razdvojio od Br8 uzorka te je njegov genotip nazvan T2°. Referentni soj PO je i ovdje odvojen od ostalih te je svrstan u genotip T3.



Slika 10 Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno NJ metodom *stamp* gena pokazuje grupiranje naših uzoraka na genotipove nazvane T1 i T2. Referentni soj PO pripada genotipu T3, a GGY genotipu T2°. Brojevi kod grana označuju *bootstrap* vrijednosti.

5 Rasprava

Zbog ekonomskog utjecaja na poljoprivredne kulture važna je brza i pouzdana detekcija i tipizacija fitoplazmi u zaraženim biljkama. Širenje zaraze osim kukaca potpomaže i djelovanje čovjeka u smislu transporta asimptomatičnih biljaka, ali i slučajnog transporta kukaca na područja van njihovog dometa

Razvoj sustava klasifikacije i diferencijacije fitoplazmi omogućava bolje identificiranje i istraživanje tih prokariota, te kontrolu njihovog utjecaja na ekosustav. Klasifikacijski sustav je razvijen ponajprije primjenom molekularnih i bioinformatičkih metoda primijenjenih na određene gene. PCR, ugniježđeni PCR, RFLP, a u novije vrijeme i qPCR te sekvenciranje omogućile su opsežna istraživanja na detekciji fitoplazmi. Međutim korištenje samo genetičke diferencijacije završilo bi listama genotipova te je stoga ključno da poznavanje biologije fitoplazmi i njihovih patosustava prati taksonomiju ovih bakterija. Biološke karakteristike poželjno je dakle povezati s određenim genotipom kako bi se lakše nosilo s potencijalnim epidemijama, a sve je to potrebno pratiti tijekom godina i na većem geografskom području. Zbog toga se moraju odrediti pogodni molekularni markeri preko kojih će se genetička raznolikost povezati s epidemiologijom i patosustavima određenih sojeva.

Istraživanje genotipova nije bez problema. Već prvi korak pribavljanje DNA fitoplazmi je vrlo problematičan iz više razloga. Titar fitoplazmi u zaraženim biljkama je nizak a distribucija fitoplazmi u biljnim tkivima, ali i tijekom sezone, je nejednolika. Povrh toga su kukci prijenosnici, a često i divlje biljke trajnice koje su rezervoari, asimptomatični. Potreban je napredak u protokolima izolacije kako bi se postigla veća koncentracija dobivene fitoplazmatske DNA i smanjila količina inhibitora u izolatu (Firrao et al. 2007). Naime komercijalni kitovi za izolaciju DNA su često optimizirani za dobivanje što većih DNA fragmenata. Osim toga problem zbog velike raznolikosti fitoplazmatskih sljedova predstavlja i dizajn početnica koje bi idealno bile barem grupno specifične.

U ovom projektu je u uzorcima kukaca, vinove loze i korova prikupljenim u Vukanovcu i Brckovštini izolirana je DNA komercijalnim kitom *OmniPrep™ for Plant*. Prisutnost fitoplazmatske DNA u uzorcima dokazana je metodama PCR i ugniježđenim PCRom te je

potom određena pripadnost ribosomskoj podskupini 16SrXII-A '*Candidatus* Phytoplasma solani'. Od 24 ispitana kukca, pet uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo fitoplazmatske DNA. Analize su provedene i na simptomatičnim uzorcima vinove loze te asimptomatičnim uzorcima korova, od kojih su dva uzorka loze iz Vukanovca bili pozitivni na prisustvo fitoplazme, kao i dva uzorka iz Brckovštine odakle je i jedan pozitivni uzorak korova *C. arvensis*.

Preciznija identifikacija i klasifikacija unutar 16SrXII-A skupine je neophodna kako bi se odredile specifičnosti patosustava jer su dosadašnja istraživanja ukazala na to da je ona vrlo varijabilna skupina sa mnogo podtipova (Langer i Maixner 2004; Šeruga Musić et al. 2008; Cimerman i et al. 2009; Pacifico et al. 2009, Fialova i et al. 2009). Zbog velike biološke raznolikosti unutar skupine koristi se nekoliko molekularnih markera različitih stupnjeva konzerviranosti kako bi se bolje identificirali izolati unutar te ribosomske skupine (Langer i Maixner 2004, Pacifico et al. 2009) te je u ovom projektu provedena multigenska tipizacija analizom gena *tufB*, *vmp1*, *secY* i *stamp*.

RFLP analiza genskog fragmenta *tufB* pokazala je očekivano da svi uzorci BN fitoplazme imaju jedan restrikcijski profil *tufB*-b za koji se i otprije znalo da je raširen u Hrvatskoj. Za stolbur fitoplazme poznata su tri restrikcijska profila *tufB* od kojih su dva vrlo raširena na Mediteranu i u Europi: *tufB*-a i *tufB*-b (Langer i Maixner, 2004), no *tufB*-b restrikcijski profil je trenutno najrašireniji u Europi te je osim s GY bolestima povezan i sa zarazama nekih drugih ekonomski važnih biljaka. Aktualna su istraživanja na potencijalnim kukcima vektorima i rezervoarima zaraze u obliku korova i šumskog te ukrasnog bilja u smislu što boljeg upoznavanja različitih patosustava u kojima sudjeluje podtip *tufB*-b. Naime *tufB* podtipovi uključeni su u različite epidemiološke cikluse i koriste različite divlje biljke kao rezervoare i izvor zaraze koji se potom s njih vektorima širi na poljoprivredne kultivare. *TufB*-a podtip za primarni rezervoar ima *U. dioica*, dok podtip b primarno koristi *C. arvensis* ali i mnoge druge divlje biljke su odnedavno dokazani rezervoari ovog podtipa po Europi. Uz to sekvenciranja su otkrila dodatnu varijantu b podtipa, novi tip tzv. *tufB*-b2.

Divlje biljke su često asimptomatične vjerojatno zbog toga što su primarni domaćini na kojima se *H. obsoletus* razmnožava i prezimljuje zbog čega se pretpostavlja njihova duga koevolucija s fitoplazmama te se simptomi često jave tek na kulturama posađenima u okolini koji su evolucijski relativno novi domaćini određenih tipova fitoplazmi. Kopriva *U. dioica* je recimo potpuno asimptomatična za BN fitoplazmu te su u tom slučaju herbicidi ključni za

kontrolu zaraze (Maixner 2007). Stoga se čini da su *tuf* podtipovi povezani s rezervoarima koji su izvor zaraze ali ne određuju specifičnost prema kukcu vektoru.

Specifičnost odnosa vektor - fitoplazma bitno je proučiti kako bi se mogli procijeniti potencijalni novi vektori za fitoplazme i bolje kontrolirati širenje zaraza. Epidemiologija BN fitoplazme je čvrsto povezana s ekologijom i biologijom njenog vektora, a ključna stavka životnog ciklusa vektora su biljke trajnice, rezervoari koji su izvori zaraze fitoplazmama, primarni domaćini kukca vektora na kojima on prezimljava, i uzročnici epidemije. Naime globalno podizanje temperature pozitivno utječe na širenje mnogih vrsta kukaca koji u novim geografskim područjima mogu doći u kontakt s novim biljkama rezervoarima fitoplazmi s kojima prije nisu bili u kontaktu te ih početi širiti. Unatoč raširenosti karantenske vrste *Flavescencee dorée* po cijeloj Europi u vinogradima Hrvatske zastupljenija je BN fitoplazma što se i pokazalo na ovim uzorcima vinove loze u kojima je dokazana prisutnost samo BN fitoplazme. Razlog tomu mogao bi biti u činjenici da oligofagnom kukcu *H. obsoletus* ne pašu velika monokulturna staništa. On primarno živi na korovima, a tek odrasli kukac dolazi na vinovu lozu (Lessio et al. 2007). *Scaphoideus titanus* koji prenosi FD fitoplazmu je specijalist i s vinovom lozom čini zatvoreni sustav te se lakše širi po monokulturnim staništima, a područja korova mu čine prepreku.

SecY, *vmp1* i *stamp* su geni za proteine za koje se smatra da igraju ulogu u epidemiologiji stolbur fitoplazmi. Ovi proteini ili sudjeluju u transportu molekula na površinu fitoplazme odnosno direktno u stanice domaćina (*secY*), što je važno zbog lučenja efektoru i utjecaja na simptome, ili se oni sami nalaze na površini fitoplazme što ih čini podložnim znatnom selekcijskom pritisku kako bi fitoplazme mogle ostvariti svoj životni ciklus koji uključuje dva carstva, interakcije s nekoliko vrsta vektora i različitih biljaka domaćina te unutar njih mnogo različitih tkiva i organa. Za razliku od *tufB* i *secY*, *stamp* i *vmp1* geni su specifični molekularni markeri stolbur fitoplazmi. Oni se nalaze na površini fitoplazme te je nedavno razvijena kompleksna grupacija po klasterima obzirom na genotipove.

SecY je očekivano najkonzerviraniji među njima jer je riječ o esencijalnom transportnom sustavu razreda *Mollicutes*. Sekvenciranjem i filogenetskom analizom naših uzoraka pokazano je da ima veću raznolikost od *tufB*. Naši uzorci razdvojili su se na tri genotipa, od kojih je većina grupirana u jednoj grani i čini se kako *secY* ne pokazuje puno varijabilnosti unutar '*Ca. P. solani*'.

Potom je određen restrikcijski profil *vmp1* fragmenta gena, varijabilnog membranskog proteina koji ima čak 23 različita poznata profila unutar 16SrXII skupine, a za koji se smatra da ima važnu ulogu u sposobnosti adaptacije stolbur fitoplazmi na potencijalne nove vektore i domaćine. Od uzoraka pozitivnih za *tufB* u kukaca, njih pet, četiri su bila pozitivna na *vmp1* u ugniježđenom PCR-u, a svi su uzorci loze i jedini uzorak iz *C. arvensis* također bili pozitivni. Varijabilnost nastaje zbog iznimnog selekcijskog pritiska kojem je izložen na površini stanice međutim svi naši uzorci pokazali su pripadnost istom V18 profilu, dok su referenti sojevi imali drugačije profile.

To je bilo neočekivano, ali i vrlo zanimljivo budući da se profil V18 inače povezuje s patosustavom koji uključuje koprivu (*U. dioica*), a ne slak (*C. arvensis*) (Landi et al. 2015). Taj profil se inače javlja i unutar *tufB*-a i u *tufB*-b podtipova što upućuje na to da omogućuje kompleksnu interakciju (Landi et al. 2015) koja uključuje različite biljke rezervoare.

Stamp gen također kodira za membranski protein (antigenski membranski protein) te je stoga također uključen interakcije s kukcem-vektorom. *Stamp* analizom nakon sekvenciranja razlučena su četiri genotipa. Naši uzorci su se ponovno grupirali većinom u jedan, ali ovdje je razlučen referentni soj GGY od uzorka *C. arvensis* koji je bio grupiran skupa s njime u *secY* analizi te je tako potvrđeno da *stamp* pokazuje veću varijabilnost od *secY*.

Mnogo je još otvorenih pitanja vezanih uz patologiju, epidemiologiju i biologiju BN fitoplazmi. Njihovi kompleksni životni ciklusi se moraju istražiti u smjeru provjeravanja što više potencijalnih vektora te biljnih rezervoara poput korova u okolici vinograda. Analize genske ekspresije i razlike u ekspresiji genoma fitoplazmi između biljaka i kukaca isto su bitne u otkrivanju mehanizama adaptacije. Kompletne filogenije i vektora i fitoplazmi bile bi korisne u predviđanju potencijalnih novih vektora. Globalna putovanja i transport donose rizik od širenja i fitoplazmi i vektora na nova područja gdje mogu potencijalno uzrokovati velike štete.

6 Zaključak

- Ovo istraživanje je potvrdilo da je *tufB*-b podtip dominantan te da su rezervoari BN zaraze u dijelovima Hrvatske vezani uz poljski slak *Convolvulus arvensis*.
- Utvrđena je prisutnost samo jednog *vmp1* profila V18.
- Potvrdilo se da je *secY* relativno konzerviran gen, ali i da pokazuje veću raznolikost od *tufB*.
- *Stamp* je imao najviše podtipova (4) te je pokazao najveću varijabilnost.
- Svi geni su se zbog svoje varijabilnosti pokazali kao dobri molekularni markeri za razlučivanje podtipova unutar 16SrXXII-A podskupine.
- Praćenje epidemiologije BN fitoplazme olakšano je implementacijom ovih gena u MLST tipiziranje.

7 Literatura

Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-Padieu E., Foissac X. (2007) Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Dorée Phytoplasma Strain Clusters and Group 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4001-4010.

Aryan A, Brader G, Mörtel J, Pastar M, Riedle-Bauer M (2014) An abundant ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ *tuf b* strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. *European Journal of Plant Pathology* **140**, 213–227.

Bai X., Zhang J., Holford I. R., Hogenhout S. A. (2004) Comparative genomics identifies genes shared by distantly related insect-transmitted plant pathogenic mollicutes. *FEMS Microbiology Letters* **235**, 249–258.

Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* **188**, 3682–3696.

Bertaccini A (2007) Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* **12**, 673–689.

Bertaccini A (2015) Phytoplasma research between past and future: what directions? *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1-Supplement), S1–S4.

Bertaccini A, Bellardi MG, Vibio M (1996) Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. Infected by viruses and phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* **35**, 129–132.

Bertaccini A, Duduk B, Paltrinieri S, Contaldo N (2014) Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* **5**, 1763.

- Bertaccini A, Davis RE, Hammond RW, Bellardi MG, Vibio M, Lee I-M (1992) Sensitive detection of mycoplasma-like organisms in field-collected and in vitro propagated plants of Brassica, Hydrangea and Chrysanthemum by polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology* **121**, 593–599.
- Bressan A, Turata R, Maixner M, Spiazzi S, Boudon-Padieu E, Girolami V (2007) Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology* **150**: 331–339.
- Chen L. L., Chung W. C., Lin C. P., Kuo C. H. (2012) Comparative Analysis of Gene Content Evolution in Phytoplasmas and Mycoplasmas. *PLoS ONE* **7**(3), 34407
- Chuche J, Danet J-L, Salar P, Thiery D (2016) Transmission of ‘Candidatus Phytoplasma solani’ by *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae). *Annals of Applied Biology* **169**, 214–223.
- Chung BN, Jeong MI (2014) Identification of “stolbur” phytoplasmas in *Petunia hybrida* seedlings. *Phytopathogenic Mollicutes* **4**, 5–8.
- Cimerman A, Pacifico D, Salar P, Marzachi C, Foissac X (2009) Striking Diversity of vmp1, a Variable Gene Encoding a Putative Membrane Protein of the Stolbur Phytoplasma. *Applied Environmental Microbiology* **75**: 2951–2957.
- Credi R, Terlizzi F, Milanesi L, Bondavalli R, Cavallini G, Montermini A, Dradi D (2006) Wild host plants of “stolbur” phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of grapevine “bois noir” occurrence in Emilia-Romagna, Italy. 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 182–183.
- Cvrković T, Jović J, Mitrović M, Krstić O, Toševski I (2014) Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology* **63**: 42–53.
- Dickinson M, Tuffen M, Hodgetts J (2013) The Phytoplasmas: An Introduction. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds.) *Phytoplasma: Methods and Protocols*, Springer 1–14.
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. (1967) Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches’ broom, aster yellows or paulownia witches’ broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **33**, 259–266.

- Karamanou S, Vrontou E, Sianidis G, Baud C, Roos T, Kuhn A, Politou AS, Economou A. (1999) A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Molecular Microbiology*, **34**(5):1133-45.
- Ember I., Acs Z., Munyaneza J. E., Crosslin J. M., Kolber M. (2011). Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *European Journal of Plant Pathology* **130** 367–377
- Fabre A, Danet JL, Foissac X (2011) The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* **472**: 37–41.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fialová R, Válová P, Balakishiyeva G, Danet JL, Šafářová D, Foissac X, Navrátil M (2009) Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in South Moravia. *Journal of Plant Pathology* **91**: 411-416.
- Firrao G, Garcia Chapa M, Marzachi C (2007) Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Front Biosci* **12**: 1352-1375.
- Gundersen DE, Lee IM, Rehner SA, Davis RE, Kingsbury DT (1994) Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J Bacteriol* **176**: 5244-5254.
- Gundersen DE, Lee IM, Schaff DA, Harrison NA, Chang CJ, Davis RE, Kingsbury DT (1996) Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA group I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Syst Bacteriol* **46**: 64–75.
- Hogenhout S. A., Oshima K., Ammar E-D., Kakizawa S., Kingdom H., Namba S. (2008) Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* **9**, 403-423.
- Hogenhout SA, Šeruga Musić M (2010) Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics – what have we learnt? In: Weintraub PG, Jones P (eds.) *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Wallingford, CABI, 19–36.

IRPCM phytoplasma/spiroplasma working team-Phytoplasma taxonomy group. (2004) '*Candidatus phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(4), 1243-1255.

Kakizawa S, Oshima K, Jung HY, Suzuki S, Nishigawa H, Arashida R, Miyata S, Ugaki M, Kishino H, Namba S (2006) Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *J Bacteriol* **188**: 3424-3428.

Kakizawa S, Oshima K, Namba S (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol* **14**: 254–256.

Kirkpatrick BC, Smart CD, Gardner SL, Gao JL, Ahrens U, Maurer R, Schneider S, Lorenz KH, Seemuller E, Harrison NA, Namba S, Daire X (1994) Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Lett* **3**:228-229.

Langer M, Maixner M (2004) Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non ribosomal DNA. *Vitis* **43**: 191-199

Lee I-M, Klopmeier M, Bartoszyk IM, Gundersen-Rindal DE, Chou T, Thomson KL, Eisenreich R (1997) Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nature Biotechnology* **15**, 178–182.

Lee I. M., Gundersen-Rindal D. E., Bertaccini A (1998) Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* **88**, 1359-1366.

Lee I. M., Davis R. E., Gundersen-Rindal D.E. (2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* **54**, 221–255.

Lee IM, Zhao Y, Bottner KD (2006) SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol Cell Probes* **20**(2): 87-91.

Lee IM, Bottner-Parker KD, Zhao Y, Davis RE, Harrison NA (2010) Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on the secY gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 2887-2897.

Lee I-M, Bottner-Parker KD, Zhao Y, Bertaccini A, Davis RE (2012) Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches' broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 2279–2285.

- Marcone C. (2014) Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Annals of applied Biology* **165** (2), 199-221.
- Marcone C, Ragozzino A, Credi R, Seemüller E (1996) Detection and characterization of phytoplasmas infecting grapevine in southern Italy and their genetic relatedness to other grapevine yellows phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* **35**: 207-213.
- Maixner M (2011) Recent advances in Bois noir research. *Petria* **21**: 17-32.
- Maixner M (2007) Biology of *Hyalesthes obsoletus* and approaches to control this soilborne vector of Bois noir disease. *Bull IOBC/WPRS* **30**: 3-9.
- Maixner M, Darimont H, Mohr HD (2001) Studies on the transmission of bois noir to weeds and potential ground-cover plants by *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Bulletin OILB/SROP* **24**: 249–251.
- Martini M, Lee IM, Bottner KD, Zhao Y, Botti S, Bertaccini A, Harrison NA, Carraro L, Marcone C, Khan AJ, Osler R (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 2037–2051.
- Murolo S, Mancini V, Romanazzi G (2014) Spatial and temporal stolbur population structure in a cv. Chardonnay vineyard according to vmp1 gene characterization. *Plant Pathology* **63**: 700–707.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung H. J, 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.
- Oshima K., Maejima K., Namba S. (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Bioscience* **4**, 230.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Kuboyama T, Miyata S, Ugaki M, Namba S (2001) A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid- and viruslike domains: clue to viral ancestry or result of virus/plasmid recombination? *Virology* **285**: 270–277
- Pacifico D, Alma A, Bagnoli B, Foissac X, Pasquini G, Tessitori M, Marzachì C (2009) Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a Stolburspecific putative membrane protein gene. *Phytopathology* **99**:711-715.

- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P. A., Wei W., Davis R. E. (2013). 'Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 2879–2894
- Quaglino F, Murolo S, Zhao Y, Casati P, Davis R.E. (2017) Identification of new -J and -K 16SrXII subgroups and distinct single nucleotide polymorphism genetic lineages among 'Candidatus Phytoplasma solani' strains associated with bois noir in Central Italy. *Australasian Plant Pathology* **46**(1):31-34
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Schneider, B., Gibb, K. S., Seemuüller, E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* **143**: 3381-3389.
- Sugio A., Kingdom H. N., MacLean A. M., Grieve V. M., Hogenhout S. A. (2011) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defence hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, E1254–E1263.
- Sugio A, MacLean AM, Kingdom HN, Grieve VM, Manimekalai R, Hogenhout SA (2011a) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 175–195.
- Šeruga Musić M1, Krajacić M, Skorić D. (2008) The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *Journal of Microbiological Methods* **73**(1):69-72.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- Wei W., Davis R. E., Lee I. M., Zhao Y. (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(8), 1855-1867.

8 Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime: Kasia Šturlan

Email: ksturlan@gmail.com

Obrazovanje

1999.-2019. – Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu

1995.-1999. – Gimnazija Tituša Brezovačkog (VIII)

Radno iskustvo

1998 - 2019 instruktor društvenih plesova, voditelj udruge plesača

2013 - 2019 instruktor društvenog plesa u Gimnaziji i ekonomskoj školi Benedikt Kotruljević

2016 - 2018 instruktor društvenog plesa na filozofskom fakultetu/tjelesni

Vještine

-rad na računalu (Microsoft Office)

-jezici– engleski