Molekularna karakterizacija izolata bakterije 'Candidatus Phytoplasma solani' iz madagaskarskog zimzelena (Catharanthus roseus (L.) G. Don) s područja grada Zagreba

Zovkić, Tanja

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:217:307384

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tanja Zovkić

Molekularna karakterizacija izolata bakterije '*Candidatus* Phytoplasma solani' iz madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) s područja grada Zagreba

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

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

Zahvala:

Neizmjerno zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Šerugi Musić na stručnim i dobronamjernim savjetima, ukazanom povjerenju i strpljenju tijekom izrade rada.

Također se zahvaljujem svojim kolegama, prijateljima i Eduardu na nesebičnoj podršci.

Najveće hvala mojim roditeljima i sestri Sanji na svakodnevnoj podršci i razumijevanju tijekom cjelokupnog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna karakterizacija izolata bakterije '*Candidatus* Phytoplasma solani' iz madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) s područja grada Zagreba

Tanja Zovkić

Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Fitoplazme (rod '*Candidatus* Phytoplasma') su bakterije bez stanične stijenke iz razreda *Mollicutes* koje imaju domaćine u dva carstva jer ih nalazimo u floemu biljaka kao i stanicama kukaca. Nije ih moguće uzgojiti u čistoj kulturi *in vitro* jer se radi o unutarstaničnim organizmima kod kojih je došlo do redukcije genoma i gubitka mnogih metabolički važnih gena. Uzročnici su ekonomski značajnih bolesti biljaka u čitavom svijetu. Fitoplazmatska vrsta '*Ca.* Phytoplasma solani' jedna je od fitoplazmi s najširim krugom prirodnih domaćinskih vrsta, a karakteristična je za europski kontinent.
Cilj ovog diplomskog rada bio je karakterizirati izolate bakterije '*Ca.* Phytoplasma solani' iz madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) prikupljenih na području užeg centra grada Zagreba. U multigensku tipizaciju izolata bili su uključeni sljedeći fitoplazmatski geni: 16S rRNA, *secY, tufB, vmp1* i *stamp*. Fragmenti gena za 16S rRNA, *tufB* i *vmp1* umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom korištenjem specifičnih početnica te nakon toga analizirani metodom RFLP (polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata). Specifično umnoženi fragmenti gena *secY* i *stamp* sekvencirani su te analizirani bioinformatičkim metodama. Filogenetske analize dobivenih nukleotidnih sljedova gena *secY* i *stamp* kao i rezultati analize RFLP ostalih gena, potvrdile su pripadnost izolata fitoplazmatskoj vrsti '*Ca.* Phytoplasma solani' te njihovu varijabilnost unutar vrste. Analize gena *secY* i *tufB* pokazale su očuvanost ovih gena dok je kod gena *stamp* i *vmp1*, specifičnih za vrstu, uočena veća raznolikost genotipova.

(broj stranica 52, 18 slika, 9 tablica, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi:	16S rDNA, fitoplazma, *tufB*, *vmp1*, *secY* i *stamp*, PCR, RFLP, filogenetska analiza, genska varijabilnost
Voditelj:	Doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić
Ocjenitelji:	Doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić Doc. dr. sc. Vesna Petrović Peroković Izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

Rad prihvaćen: 10.10.2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Molecular characterization of '*Candidatus* Phytoplasma solani' isolates from periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) of the Zagreb area

Tanja Zovkić

Roosevelt square 6, Zagreb

ABSTRACT

Phytoplasmas (genus "*Candidatus* Phytoplasma") are bacteria from the class *Mollicutes* without cell wall found in hosts from two kingdoms, in plant phloem and insect hemolymph. They are intracellular organisms that have undergone reduction of genome with a loss of many metabolically important genes. Therefore they cannot be cultured *in vitro* in cell-free media. Phytoplasma infect plants all over the world causing significant economic damage. Species '*Ca.* Phytoplasma solani' is phytoplasma with widest natural host species range which is characteristic for the European continent. The aim of this thesis was to characterize '*Ca.* Phytoplasma solani' isolates from periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) collected at the Zagreb downtown area. In multigene typization of isolates following genes were analyzed: 16S rRNA, *secY, tufB*, *vmp1* and *stamp*. Fragments of 16S rRNA, *tufB* and *vmp1* genes were amplified by polymerase chain reaction using phytoplasma specific primers and further analyzed by RFLP (restriction fragment length polymorphism) analyses. Amplified fragments of genes *secY* and *stamp* were sequenced and analyzed by using bioinformatics tools. Phylogenetic analysis of *secY* and *stamp* nucleotide sequences together with RFLP analysis of other genes confirmed the affiliation of all isolates to the '*Ca.* Phytoplasma solani' species and their intraspecies variability. Analyses of housekeeping genes *secY* and *tufB* showed that these sequences were highly conserved, while the analyses of *stamp* i *vmp1* species specific genes, revealed more genotype variability.

(52 pages, 18 figures, 9 tables, 70 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: 16S rDNA, phytoplasma, *secY, tufB, vmp1, stamp*, PCR, RFLP, phylogenetic analysis, genetic variability

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

Reviewers: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.
Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, Asst. Prof.
Dr. sc. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 10.10.2014.

1. UVOD.....1

1.1. Općenito o fitoplazmama.....1

1.2. Životni ciklus fitoplazmi i interakcije s domaćinima.....3

1.3. Evolucija fitoplazmi.....6

1.4. Genom fitoplazmi.....9

1.5. '*Candidatus* Phytoplasma solani' u Hrvatskoj.....12

2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....14

3. MATERIJALI I METODE.....15

3.1. Materijali.....15

3.1.1. Biljni materijali.....15

3.1.2. Referentni sojevi.....15

3.1.3. Komercijalni komplet.....16

3.1.4. Početnice.....16

3.1.5. Pribor i uređaji.....18

3.1.6. Puferi i otopine.....19

3.2. Metode.....20

3.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA iz uzoraka biljnog tkiva 20

3.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA.....21

3.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....21

3.2.3.1. Umnažanje fitoplazmatskog gena za 16S rRNA.....22

3.2.3.2. Umnažanje fitoplazmatskih gena *tufB* i *vmp1*.....23

3.2.3.3. Umnažanje fitoplazmatskih gena *secY* i *stamp*.....24

3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu.....25

3.2.5. Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) fitoplazmatskih gena za 16S rRNA, gen *tufB* i *vmp1*.....26

3.2.6. Filogenetske analize gena *secY, stamp* i *vmp1*.....27

3.2.6.1. Sekvenciranje nukleotidnih slijedova gena *secY, stamp* i *vmp1*.....27

3.2.6.2. Računalne analize nukleotidnih slijedova.....27

4. REZULTATI.....28

4.1. PCR/RFLP analiza fitoplazmatskih gena za 16S rRNA, *tufB* i *vmp1*.....28

4.2. Filogenetske analize gena *secY, stamp* i *vmp1*.....33

4.2.1. Analiza elektroforeze na agaroznom gelu umnoženih gena *secY, stamp* i *vmp1*.....33

4.2.2. Računalna analiza nukleotidnih slijedova sekvenci gena *secY*.....35

4.2.3. Računalna analiza nukleotidnih slijedova sekvenci gena *stamp*.....38

4.2.4. Računalna analiza nukleotidnih slijedova sekvenci gena *vmp1*.....40

5. RASPRAVA.....41

6. ZAKLJUČAK.....43

7. LITERATURA.....44

8. PRILOG.....I

9. ŽIVOTOPIS.....i

POPIS KRATICA

ATP - adenozin-5'-trifosfat

BSA - goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*)

dATP - deoksiadenozin-5’-trifosfat

dCTP - deoksicitidin-5’-trifosfat

dGTP - deoksigvanozin-5’-trifosfat

dH_2O - deionizirana voda

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

dNTPs - deoksiribonukleotidi

dTTP - deoksitimidin-5’-trifosfat

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

EtBr - etidijev bromid

ITS - intergenska regija (eng. *Internal transcribed spacer*)

MAMPs - molekularni faktor vezan uz interakciju mikroba (eng. *microbe-associated molecular patterrns*)

ORF - otvoreni okvir čitanja (eng. *open reading frame*)

PAMPs - molekularni faktor vezan uz interakciju patogena (eng. *pathogen-associated molecular patterrns*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polimerase chain reaction*)

PMUs - „moguće pokretne jedinice“ (eng. *potential mobile units*).

PTSs - fosfotransferazni transportni sistem

RFLP - analiza duljine polimorfizma restrikcijskog fragmenta (eng. *restriction fragment length polymorphism*)

RNA - ribonukleinska kiselina

secY - gen koji kodira za proteinsku podjedincu translokaze SecY

stamp - gen koji kodira za antigenski membranski protein

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

TEMED - tetrametiletilendiamin

TE-pufer - otopina Tris-a i EDTA

TNA - ukupne nukleinske kiseline

tufB - gen koji kodira za elongacijski faktor Tu

vmp1 - gen koji kodira za membranski protein

1. UVOD

1.1. Općenito o fitoplazmama

Klasifikacija fitoplazmi:

Domena: *Bacteria*

Koljeno: *Tenericutes*

Razred: *Mollicutes*

Red: *Acholeplasmatales*

Porodica: *Acholeplasmataceae*

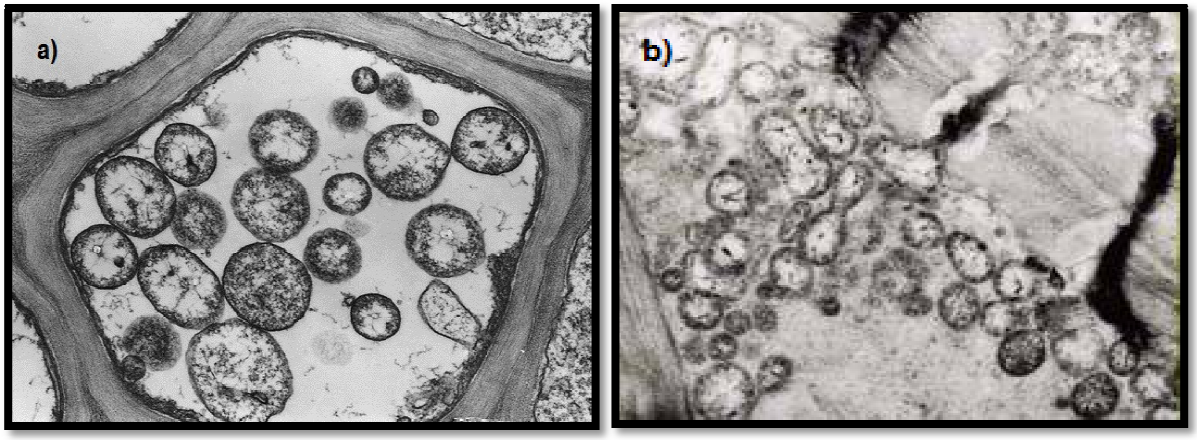
Rod: '*Candidatus* Phytoplasma'

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

Fitoplazme (rod '*Candidatus* (Ca.) Phytoplasma') čine biljni patogeni iz razreda *Mollicutes*, prokarioti bez stanične stijenke. Uzrokuju više stotina ekonomski značajnih bolesti širom svijeta na gospodarski bitnim biljkama poput riže, kukuruza, krumpira, šećerne repe, vinove loze te raznom ukrasnom bilju. Karakteristični simptomi fitoplazmoza su nekontrolirana proliferacija aksilarnih pupova („vještičja metla“), gubitak normalnih cvjetnih pigmenata i ozelenjivanje cvjetnih dijelova (virescencija), pojava listovima nalik struktura na mjestu gdje bi trebao biti cvijet (filodija), žućenje listova uzrokovano razgradnjom kloroplasta te inhibicijom njegove sinteze, sitni plodovi, smežurani listovi, kržljanje, nekroza floema i njegova pretjerana proliferacija (Lee i sur., 2000; Christensen i sur., 2005; Bertaccini i sur., 2007). Unatoč kozmopolitskoj patogenosti, fitoplazme su otkrivene tek 1967. godine (Doi i sur., 1967). Naime, zbog simptoma koji su odgovarali virusnim bolestima, nemogućnosti uzgajanja na umjetnoj podlozi, te zbog prolaska kroz bakterijske filtre, prijenosa uz pomoć kukaca-vektora vjerovalo se da je riječ o virusnoj zarazi. Međutim, proučavanjem ultratankih prereza preparata floema simptomatičnih biljaka Doi i suradnici uočavaju da je riječ o bakterijama osjetljivim na tetraciklinske antibiotike koje izgledom vrlo nalikuju na mikoplazme, uzročnike različitih bolesti u ljudi. Na temelju te sličnosti dodijeljen im je naziv „mikoplazmama slični organizmi“ (eng. *mycoplasma like-organisms*, MLO). Naziv fitoplazme (grč. *phyto* – biljka; grč. *plasma* – uobličena tvar) je opće prihvaćen 1994. godine

na 10. kongresu IOM-a (*International Organization of Mycoplasmology*) kada je nakon niza filogenetskih analiza potvrđena jedinstvenost i monofiletsko porijeklo skupine unutar razreda *Mollicutes* (Murray i Schleiffer, 1994). Deset godina kasnije, 2004. godine, svrstane su u novi rod nazvan '*Candidatus* (Ca.) Phytoplasma' (IRPCM, 2004).

Fitoplazme su pleomorfni prokarioti koji predstavljaju unutarstanične i izvanstanične simbionte floema biljaka i hemolimfe kukaca (Sl. 1., Hogenhout i sur., 2008). Riječ je o iznimno malim bakterijama promjera 0,2 do 0,8 μm, veličine genoma 0,5 i 1,3 Mbp (Christensen i sur., 2005; Hogenhout i sur., 2008).



Slika 1. Fitoplazme u stanicama biljaka (a); preuzeto s: http://dna-barcoding.blogspot.com/2012_12_01_archive.html i u stanicama kukaca (b); preuzeto s: http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC_005303&ref=index_15.html

Do sada nisu uspješno uzgojene u mediju bez stanica jer se radi o unutarstaničnim organizmima kod kojih je došlo do redukcije genoma i gubitka mnogih u metabolizmu važnih gena. Dotično svojstvo otežava i karakterizaciju i klasifikaciju fitoplazmi, kao i određivanje faktora uključenih u virulenciju i patogenezu te otkriće efikasnih načina kontrole i liječenja fitoplazmoza.

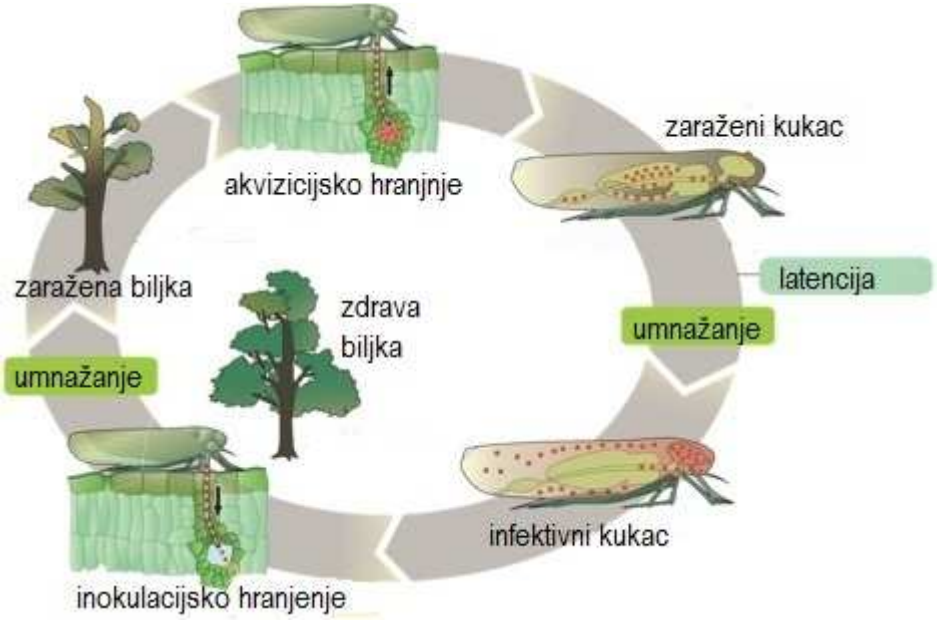
1.2. Životni ciklus fitoplazmi i interakcije s domaćinima

Fitoplazme u svom životnom ciklusu izmjenjuju dva domadara, te su u većini slučajeva potrebna oba domaćina za njihov daljnji prijenos u prirodi. U biljkama fitoplazme prvenstveno obitavaju u sitastim stanicama floema, gdje se i umnažaju (Doi i sur.,1967; Whitcomb i Tully, 1989), dok u kukcima fitoplazme nalazimo u žlijezdama slinovnicama, hemolimfi i drugim organima intracelularno i ekstracelularno (Hogenhout i sur, 2008). Malobrojni su kukci koji se hrane floemskim sokom zaražene biljke i na taj način sudjeluju u prijenosu fitoplazmi. Najčešće su to pripadnici reda *Hemiptera* (polukrilci) iz porodica *Cicadellidae* (eng. *leafhopper*) te natporodica *Fulgoroidae* (eng. *planthopper*) i *Psylloidae* (eng. *psyllids*; Weintraub i Beanland 2006). Fitoplazmatska vrsta '*Candidatus* Phytoplasma solani' jedina je poznata vrsta koja se prenosi preko kukca-vektora *Hyalesthes obsoletus*, medećeg cvrčka (Quaglino i sur., 2013).

Bolest uzrokovana fitoplazmama može se prenositi horizontalnim prijenosom, preko kukca vektora, vertikalnim prijenosom, širenjem patogena s kukca roditelja na potomke (Alma i sur., 1997), dok se neke vrste fitoplazmi mogu prenositi putem više vektora ili samo preko određene vrste kukca. Do sada nije poznat vertikalan prijenos unutar biljke putem sjemena, ali je dokazan prijenos fitoplazmi cijepljenjem biljke i vegetativnim razmnožavanjem putem reznica, rizoma ili lukovica (Schaff i sur, 1992).

Prenošenje fitoplazmi kukcima kao vektorima je aktivan proces koji se sastoji od niza koraka. Hranjenjem floemskim sokom zaražene biljke kukac dolazi u kontakt s fitoplazmama koje se nalaze u sitastim elementima floemskog sustava (faza akvizicijskog hranjenja). Nakon što se kukac zarazio hranjenjem, dolazi do razmnožavanja fitoplazmi u tijelu kukca, prodiranja kroz stijenku crijeva te ulazak fitoplazmi u hemolimfu otkuda cirkuliraju po tijelu kukca. Uvjet da bi kukac mogao poslužiti kao vektor fitoplazmi predstavlja ulazak fitoplazmi u žlijezde slinovnice kukca. U žlijezdama slinovnicama, fitoplazme se umnožavaju do koncentracije koja predstavlja infektivnu dozu za zaražavanje zdravih biljaka tijekom hranjenja kukca na njima (Lefol i sur, 1994; Lherminier i sur, 1990; Nakashima i Hayashi, 1995). Razdoblje od unošenja fitoplazmi u kukac do postizanja infektivne doze fitoplazmi u njemu nazivamo latentnim razdobljem. Ovisno o vrsti kukca, latentno razdoblje može varirati između 7 i 80 dana (Moya-Raygoza i Nault, 1998; Murral i sur., 1996). Iako predstavnici reda

Hemiptera imaju samo jednu generaciju godišnje, infektivnost prenose sa jaja na potomstvo, preko ličinačke faze do odrasle jedinke sljedeće generacije. Tijekom faze inokulacijskog hranjenja, hranjenja zaraženog kukca floemskim sokom nezaražene biljke, dolazi do izlučivanja fitoplazmi zajedno sa slinom što predstavlja novu fazu prijenosa i infekciju fitoplazmama nezaraženih biljaka. Novi ciklus započinje dolaskom drugog, nezaraženog kukca, potencijalnog vektora na novozaraženu biljku (Sl. 2.). Prvi simptomi zaraze na biljci mogu biti vidljivi šest dana nakon infekcije, dok je kod nekih potrebno od 6 do 24 mjeseca do pojave prvih znakova infekcije, ovisno o vrsti fitoplazme i biljci domaćinu (Hogenhout i sur., 2008).



Slika 2. Životni ciklus fitoplazmi u dva domaćina (modificirano s: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3156718_pone.0023242.g001&req=4)

Za biljke, fitoplazme predstavljaju unutarstanične parazite koji su uglavnom ograničeni na tkivo floema (Doi i sur., 1967) i nikada nemaju pozitivan učinak na samu biljku domaćina. Fitoplazme uzrokuju poremećaj u genskoj ekspresiji biljnih regulatora i faktora rasta, povećani udio fenolnih spojeva, pojačanu proizvodnju obrambenih proteina kao odgovor na stres uzrokovan infekcijom (Lee i sur., 2000; Christensen i sur., 2005; Bertaccini i sur., 2007). Neki od simptoma fitoplazmoza kao što su „vještičja metla“, virescencija i filodija predstavljaju utjecaj fitoplazme na biljku s ciljem povećanja njene privlačnosti za kukce koji preferiraju mlado i zeleno lišće za prehranu i odlaganje jajašaca što omogućuje uspješniji

prijenos fitoplazmi (Hogenhout i sur., 2008). Za razliku od biljaka, za kukce fitoplazme predstavljaju unutarstanične i izvanstanične simbionte (Hogenhout i sur., 2008). Učinak fitoplazmi na kukce je uglavnom neutralan, no neke fitoplazme pokazuju čak i pozitivan učinak u smislu povećanja otpornosti tijekom razdoblja gladovanja, osobito u zimskim uvjetima, povećanja fertilnost i produljenja životnog vijeka (Beanland i sur., 2000). Također, u nekim slučajevima fitoplazme negativno utječu na kukce smanjujući njihov fekundidet te skraćujući njihov životni vijek (Bressan i sur., 2005). Vjeruje se da što je evolucijski dulja veza između kukca i fitoplazme da je fitoplazma to manje virulentna po kukca (Elliot i sur., 2003).

1.3. Evolucija fitoplazmi

Razred *Mollicutes* uključuje pripadnike mikoplazmi, ureaplazmi, spiroplazmi, aholeplazmi i fitoplazmi (Razin i sur., 1998). Pripadnici ovog razreda nemaju staničnu stijenku (lat. *mollis* –mekan, *cutis* – koža) zbog čega mogu mijenjati svoj oblik (pleomorfnost). Uglavnom su okruglastog oblika, no neke poprimaju i filamentozni oblik, osobito tijekom ranih faza infekcije biljke (Lee i sur., 2000). Ove slobodno živuće prokariote karakterizira izuzetno mala veličina što im omogućuje prolazak kroz bakterijske filtre, neuobičajno malen genom s niskim sadržjem G+C baza (oko 28 mol%) koji je na granici teoretski mogućeg za kodirajuću DNA te neuobičajne metaboličke preferencije (Glass i sur., 2000). Primjerice, predstavnici roda *Mycoplasma* pokazuju strogu potrebu za egzogenim sterolom, dok predstavnici roda *Ureaplasma* zahtjevaju pored toga i egzogene urate za pravilan razvoj (Weisburg i sur., 1989). Zbog svoje jednostavnosti, predstavnici razreda *Mollicutes*, su vrlo često smatrani primitivnim organizmima iz koji se evolucijski razvila puno kompleksnija bakterija, no filogenetska istraživanja odbacila su tu hipotezu. Aktualna pretpostavka je da su se ove pleomorfne bakterije odvojile od Gram-pozitivnog pretka, najvjerojatnije od bakterije roda *Clostridium* ili *Lactobacillus spp*. redukcijom genoma i gubitkom stanične stijenke (Woese, 1987; Weisburg i sur., 1989; Oshima i sur., 2004; Sirand-Pugnet i sur., 2007; Hogenhout i sur., 2008).

Fitoplazme predstavljaju monofiletsku skupinu koja se razvila iz aholeplazmatske grane, evolucijski odvedenije grane razreda *Mollicutes* (Gundersen i sur, 1996; Lee i sur, 2000; Lim i Sears 1989, 1992). Dokaz za to predstavljaju različite filogenetske analize koje su dosljedne analizama uporabe kodona i metaboličkih preferencija između različitih pripadnika razreda *Mollicutes* (Lim i Sears, 1989, 1992; Gundersen i sur., 1994; Razin i sur., 1998; Lee i sur., 2000; Christensen i sur., 2005; Bertaccini i sur., 2007; Hogenhout i sur., 2008). Fitoplazme i aholeplazme koriste sva tri standardna stop-kodona, za razliku od mikoplazmi i spiroplazmi kod kojih kodon UGA kodira za triptofan (Razin i sur, 1998) kao rezultat tzv. „AT-pritiska“ supstitucije GC- parova s AT-parovima na zadnjoj poziciji kodona (Lim i Sears, 1992; Sirand-Punget i sur., 2007). Pretpostavka je da je najvjerojatniji zajednički predak fitoplazmi i aholeplazmi bakterija *Acholeplasma laidlawii* kod koje kodon UGG, a ne UGA kodira za triptofan (Lim i Sears, 1992; Bertaccini, 2007).

Za razliku od mikoplazmi i spiroplazmi, fitoplazmama i aholeplazmama nedostaje funkcionalni fosfotransferazni transportni sistem (PTSs) važan pri aktivnom prijenosu šećera laktoze (Bai i sur., 2006**;** Cirillo 1993; Oshima i sur., 2004). Iako postoje prilično razvijeni membranski sustavi transporta za druge šećere, poput maltoze, saharoze, trehaloze i palatinoze (Christensen i sur., 2005), enzimi za degradaciju navedenih šećera nedostaju (Oshima i sur., 2004). Predstavnici razreda *Mollicutes* pokazuju značajnu redukciju metaboličkih gena uključenih u sintezu aminokiselina *de novo*, sintezu masnih kiselina, nukleotida, Krebsov ciklus i oksidativnu fosforilaciju (Razin i sur., 1998, Tran-Nguyen i sur., 2008). Stoga, molikuti navedene metabolite moraju dobiti od domaćina. Za razliku od fitoplazmi, mikoplazme i spiroplazme imaju put spašavanja (eng. *salvage*) nukleotida, a spiroplazme mogu čak sintetizirati neke aminokiseline (Christensen i sur., 2005). Kod fitoplazmi dolazi do još veće redukcije gena uključenih u metabolički put pentoze-fosfata i gena F_0F_1 koji kodira za podjedinicu ATP- sintaze, koji ima važnu ulogu u uspostavi membranskog potencijala. Dosadašnja istraživanja pokazuju da na staničnim membranama fitoplazmi postoji potencijal, no pitanje je kako se on stvara (Christensen i sur., 2005). Potencijalni kandidat za održavanje elektrokemijskog gradijenta membrane fitoplazmi je gen koji kodira za poseban tip P-ATPaze, tzv. P2C ATPazu sličan Na^+/K^+ i H^+/K^+ pumpama u životinjskim stanicama. Iako su P-ATPaze prisutne u životinjama, biljkama i gljivama, ovo je prvi slučaj njihovog prisustva u prokariotima (Christensen i sur., 2005).

Sve poznate fitoplazme su biljni patogeni koji se prenose kukcima, dok su mikoplazme i ureaplazme patogeni mikroorganizmi životinja i ljudi (Razin i sur, 1998). Većina spiroplazmi predstavlja patogene kukaca (Gasparich, 2002), osim tri vrste spiroplazmi *Spiroplasma citri*, *S. kunkelii* i *S. phoeniceum*, koje predstavljaju biljne patogene koji se prenose kukcima-vektorima, što rezultira istim rasponom domaćina kao i fitoplazme.

Aholeplazme i fitoplazme dijele specifičnosti i u strukutri rRNA-operona. U svojoj intergenskoj (eng. *Internal transcribed spacer*, ITS) regiji, duljine oko 300 bp, između gena za 16S i 23S rRNA, nalaze se geni za tRNA (Razin i sur., 1998; Ho i sur., 2001; Bertaccini, 2007). ITS-regija fitoplazmi sadrži regiju za izoleucinsku tRNA ($tRNA^{Ile}$) i dio sekvence gena za alaninsku tRNA ($tRNA^{Ala}$, Bertaccini, 2007), dok ITS-regija aholeplazmi sadrži najmanje dva tRNA-gena. Fitoplazme u svom rRNA-operonu nizvodno od 5S rRNA-gena sadrže gene za valinsku i asparaginsku tRNA, dok ih mikoplazme i aholeplazme ne sadrže (Ho i sur.,

2001). Između fitoplazmi i mikoplazmi postoji razlika i u broju kopija rRNA-operona. Dok većina fitoplazmi sadrže dva rRNA-operona, većina mikoplazmi ima jedan (Bertaccini, 2007).

Razlog veće redukcije metaboličkih gena leži u činjenici da fitoplazme, za razliku od mikoplazmi uglavnom žive unutarstanično, u okolišu bogatom nutrijentima u kojem fitoplazmama nije potrebna sinteza većine metabolita, već im je dovoljno samo asimilirati ih iz stanice domaćina. Također, fitoplazmatski genom, osim prilično razvijenog membranskog sustava transporta hranjivih tvari, sadrži gene koji kodiraju za metabolički put sinteze folata koji im omogućava da se prilagode životu u domaćinima iz dva različita carstva kao i u kukcima koji ih prenose (Oshima i sur., 2004). Život u dva različita domaćina predstavlja dodatni selekcijski pritisak što je rezultiralo gubitkom molekularnih faktora vezanih uz interakciju mikroba i patogena (eng. *microbe/pathogen-associated molecular patterrns*, MAMPs ili PAMPs), a koji bi mogli uzrokovati obrambenu reakciju domaćina (Jones i Dangl, 2006).

1.4. Genom fitoplazmi

Karakterizacija genomskih obilježja fitoplazmi započinje devedesetih godina prošlog stoljeća kloniranjem nekolicine genomskih fragmenata (Oshima i sur., 2002). Prvi kompletno sekvencirani genom vrste '*Ca*. Phytoplasma asteris' objavljen je 2004. godine i odgovarao je soju OY-M (eng. *Onion Yellows phytoplasma strain M*; Oshima i sur., 2004), nakon čega slijedi sekvenciranje genoma još jednog soja spomenute vrste, soja AY-WB (eng. *Aster Yellows phytoplasma strain M*), zatim genom soja AUSGY (eng. *Australian grapevine yellows*) vrste '*Ca.* Phytoplasma australiense' (Tran-Nguyen i sur., 2008) te soja AT vrste '*Ca.* Phytoplasma mali' (Kube i sur., 2008). Genom fitoplazmi se uglavnom sastoji od jednog kružnog ili linearnog kromosoma i nekoliko malih plazmida koji predstavljaju izvankromosomsku DNA (Oshima i sur., 2013). Soj AY-WB ima čak 4 plazmida, soj OY-M dva, a soj AUSGY jedan plazmid, dok kod soja AT vrste '*Ca.* Phytoplasma mali' nije zabilježen niti jedan izvankromosomski element (Bai i sur., 2006; Tran-Nguyen i sur, 2008; Kube i sur., 2012). Nadalje, kromosomi svih sekvenciranih sojeva su kružni, izuzev soja AT iz vrste '*Ca*. Phytoplasma mali' čiji je kromosom linearan. To je izrazito neobična odlika nekarakteristična za bakterije, a zabilježena je i kod vrsta '*Ca.* P. prunorum' i '*Ca.* P. pyri' (Kube i sur., 2008).

Daljnim komparativnim analizama sekvenciranih genoma potvrđene su opće genomske karakteristike fitoplazmi: mala veličina genoma (0,601-0,879 Mbp), niski sadržaj G+C baza (21,4-27,7%), redukcija u broju metaboličkih gena, postojanje dva rRNA operona. Unatoč malom i reduciranom genomu, fitoplazmatski kromosom sadrži značajan broj otvorenih okvira čitanja (ORF-ova) prisutnih u više kopija (Oshima i sur., 2004; Bai i sur, 2006; Tran-Nguyen i sur., 2008). ORF-ovi su uglavnom organizirani u grupe (eng. *clusters*) koje se nazivaju „moguće pokretne jedinice“ ili PMUs. Primjerice, u genomu fitoplazme AY-WB, PMUs i njima slične regije čine između 10,2% i 14,1% genoma (Bai i sur., 2006). Najveći među njima je PMU1 koji u svojoj strukturi sadrži gene za transpozazu (*tra5*) te gene za proteine uključene u replikaciju (*ssb*, *dnaB* i *dnaG*), sintezu (*tmk*) popravak i rekombinaciju (*himA*) kao i gene za membranske i sekrecijske proteine te proteine nepoznate funkcije (Bai i sur., 2006; Hogenhout i Šeruga Musić, 2010). Na krajevima PMU1 nalaze se velike invertirajuće sekvence pa je pretpostavka da PMU1 može replikativno transpozirati (Bai i sur., 2006; Hogenhout i sur., 2008; Toruño i sur., 2010). U genomu AY-WB postoje još

manje degenerirane verzije PMU1 kojima nedostaju pojedini ORF-ovi ili su potencijalni pseudogeni (Bai i sur., 2006, Toruño i sur., 2010).

Činjenica da u genomu fitoplazmi postoji značajna redukcija u genima za osnovne metaboličke puteve s jedne strane i prisustvo značajnog broja PMU-ova i njima nalik sljedova s druge strane, ukazuje na iznimnu važnost PMU-ova za fitoplazme. Pretpostavka je da PMU-ovi igraju značajnu ulogu u evoluciji fitoplazmatskog genoma te prilagodbi fitoplazmi na biljne domaćine i kukce (Hogenhout i sur., 2008). Raspodjela PMU-ova u genomu fitoplazmi nije nasumična, već dolazi do njihovog udruživanja u slijedove s tandemskim i višestrukim ponavljanjima (Bai i sur, 2006; Hogenhout i Šeruga Musić, 2010). Ta područja podložnija su preraspodjeli genoma (Bai i sur., 2006), što potvrđuje tezu da velike regije ponavljajuće DNA imaju destabilizirajući učinak na genom, budući da dolazi do delecija, inverzija i duplikacija (Hogenhout i sur., 2008).

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

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

filogenetski marker za finiju klasifikaciju fitoplazmi (Marcone i sur., 2000). Inače je u genomu fitoplazmi prisutan u jednoj kopiji, što je zajedničko s ostalim molikutima i Gram-pozitivnim bakterijama (Schneider i sur., 1997).

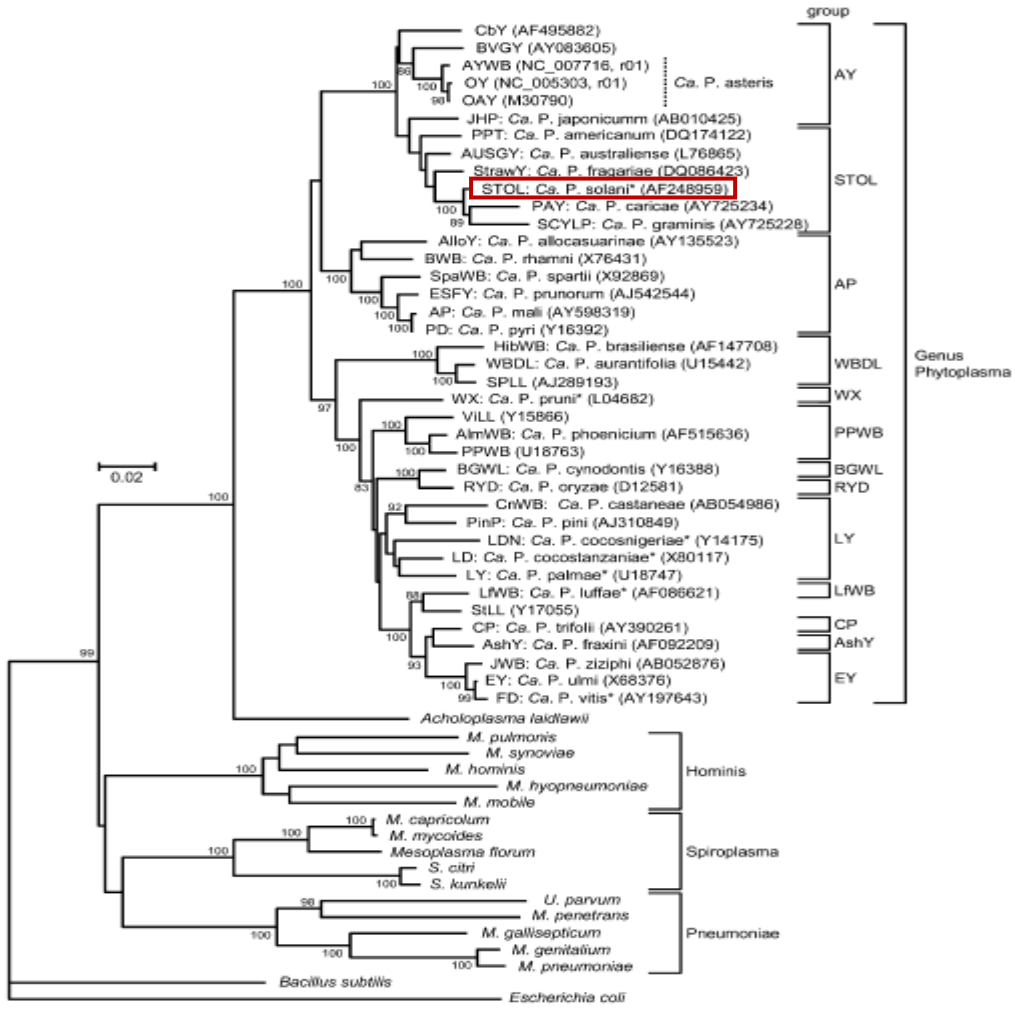
Gen *vmp1* (*stol1H10)* je polimorfan gen koji kodira za membranski protein na površini stanica specifičan fitoplazmi pripadnika ribosomske skupine 16Sr XII-A (stolbur; '*Ca*. P. solani'). Pretpostavka je da je bitan u interakciji fitoplazmi s domaćinima. Postoje barem dvije kopije gena *vmp1* u genomu stolbur fitoplazmi. Kao membranski protein izložen je snažnom selekcijskom pritisku koji se očituje u iznimnoj varijabilnosti te predstavlja potencijalni specifični molekularni marker za stolbur fitoplazme (Cimerman i sur., 2009).

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

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

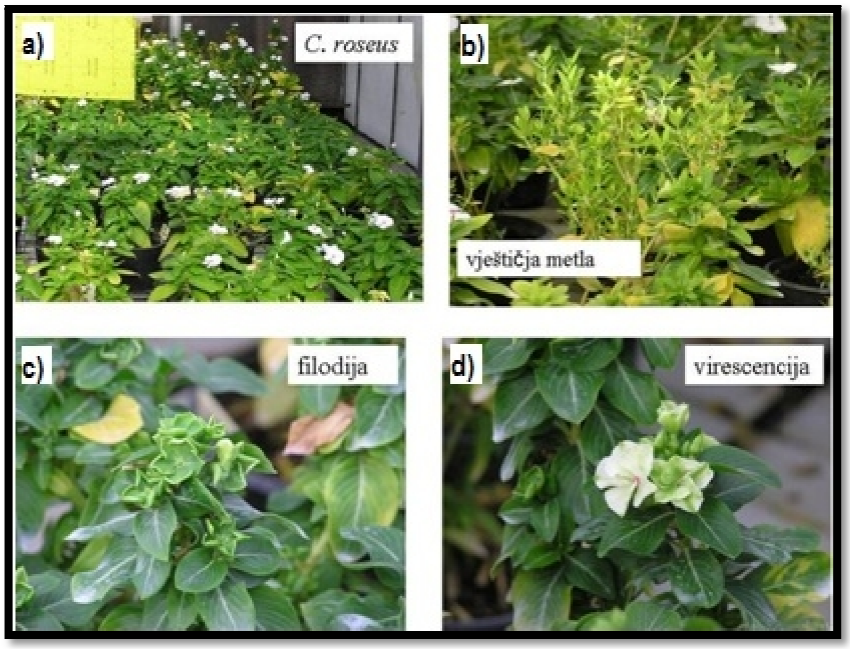
1.5. '*Candidatus* Phytoplasma solani' u Hrvatskoj

'*Candidatus* Phytoplasma solani' (IRPCM, 2004), predložena je vrsta 16SrXII-A ribosomske podskupine (stolbur-fitoplazme). Najsrodnija je vrsti '*Ca* Phytoplasma australiense'**.** Filogenetske analize temeljene na sekvenci za 16S rRNA pokazale su se kao vrijedan alat u filogeniji i klasifikaciji fitoplazmi. Prve takve analize na fitoplazmama indicirale su klasifikaciju fitoplazmi unutar razreda *Mollicutes* (Lim i Sears, 1989). Daljnje filogenetske analize 16S rRNA regije (Seemüller i sur., 1994), kao i nešto manje evolucijski očuvane intergenske 16/23S rDNA-*spacer* regije (Kirkpatrick i sur., 1994) te gena za ribosomske proteine (Lim i Sears, 1992; Gundersen i sur., 1996, Martini i sur., 2007) utvrdile su položaj fitoplazmi u rodoslovnom stablu te omogućile podjelu u 15 ribosomskih skupina (16SrI-16SrXV) i 48 podskupina (Sl. 3.,Lee i sur., 2000).



Slika 3. Filogenetsko stablo fitoplazmi utemeljeno na analizama sekvenci za gen 16S rRNA (Hogenhout i sur, 2008)

Na području Europe i Mediterana, '*Ca.* Phytoplasma solani' uzrokuje ekonomski značajne štete vinove loze (*Vitis vinifera* L.), sterilnost cvjetova kod divljih, kultiviranih zeljastih i drvenastih biljaka, žućenje i opadanje listova, anomalije lista, patuljasti rast i opću degeneraciju biljke (Sl. 4., Quaglino i sur., 2013). Stolbur-fitoplazme uzrokuju i gospodarski značajne štete na povrtnicama iz porodica *Solanaceae* (npr. rajčica, krumpir, papar) i *Asteraceae* (npr. celer; Fialová i sur., 2009).



Slika 4. Zdrava biljka *Catharantus roseus* L. (Don) (a) i fitoplazmama zaraženi primjerci sa simptomima fitoplazmoza (b-„vještičja metla“, c-filodija, d-virescencija, snimila: prof. dr. sc. Dijana Škorić).

Fitoplazmatska vrsta '*Candidatus* Phytoplasma solani' jedna je od fitoplazmi s najširim krugom prirodnih domaćinskih vrsta, a karakteristična je za europski kontinent. Prisutnost fitoplazmi u Hrvatskoj zabilježena je na područjima središnje Hrvatske, Međimurja i Slavonije, no noviji podaci bilježe prisutnost i na području Istre i Dalmacije (Šeruga i sur., 2009). Osim na vinovoj lozi i kukcu-vektoru *Hyalesthes obsoletus*, prisutnost ove fitoplazmatske vrste do sada je potvrđena i na vrstama roda *Prunus* (marelica, breskva, trešnja), *Malus* (jabuka), *Pyrus* (kruška) kao i kukcima-vektorima roda *Cacopsylla* (Križanac i sur., 2010).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je karakterizirati izolate bakterije '*Candidatus* Phytoplasma solani' iz madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) prikupljenih na području užeg centra grada Zagreba. U multigenskoj tipizaciji izolata analizirani su sljedeći fitoplazmatski geni: konzervirani i konstitutivni geni 16S rRNA, *secY i tufB,* te varijabilni geni *vmp* i *stamp*, specifični za vrstu '*Ca*. P. solani'. Umnoženi fragmenti gena za 16S rRNA, *tufB* i *vmp* analizirani su metodom RFLP (polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata), dok su fragmenti gena *secY* i *stamp* sekvencirani te analizirani bioinformatičkim metodama. Filogenetskom analizom dobivenih nukleotidnih slijedova gena *secY* i *stamp* kao i rezultatima analize RFLP ostalih gena, dobiven je uvid u raznolikost i varijabilnost izolata fitoplazmatske vrste '*Ca.* P.solani' s područja grada Zagreba.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijali

Prisutnost fitoplazme '*Candidatus* Phytoplasma solani' istraživana je na biljkama madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Listovi su pokazivali tipične simptome zaraze, a prikupljeni su na području centra grada Zagreba (gradske javne površine u blizini HNK i Glavnog kolodvora) tijekom listopada 2013 te nakon toga uzgajani u stakleniku Zavoda za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Tijekom prosinca, s prikupljenih biljaka izvršen je prijenos cijepljenjem na pokusne biljke vrste *Lycopersicon esculentum* L. (rajčica) koje su uzgajane u stakleničkim uvjetima te također korištene u ovom diplomskom radu. Popis uzoraka naveden je u Tablici 1.

Tablica 1. Popis uzoraka biljaka *Catharanthus roseus* i *Lycopersicon esculentum* i lokacija s kojih su biljke prikupljene

UZORAK	VRSTA	LOKACIJA
CR1	*Catharanthus roseus* (L.) G. Don	HNK
CR2	*Catharanthus roseus* (L.) G. Don	HNK
CR3	*Catharanthus roseus* (L.) G. Don	HNK
CR5	*Catharanthus roseus* (L.) G. Don	HNK
CR10	*Catharanthus roseus* (L.) G. Don	Park kod Gl. kolodvora
To1	*Lycopersicon esculentum* L	Staklenik ZZM
To2	*Lycopersicon esculentum* L	Staklenik ZZM
To3	*Lycopersicon esculentum* L	Staklenik ZZM

3.1.2. Referentni sojevi

Kao pozitivne kontrole u lančanim reakcijama polimerazom koristila sam sljedeće referentne sojeve: SA-1 i HydB dobivene iz kolekcije Laboratorija za fitoplazmologiju prof. Assunte Bertaccini sa Sveučilišta u Bologni, Italija (IRPCM, 2004) te sojeve 19-25 i Charente (Char) dobivene iz kolekcije Odjela UMR1090 Génomique Diversité Pouvoir Pathogène *Francuskog n*acionalnog instituta za poljoprivredna istraživanja (INRA) i Sveučilišta u Bordeauxu II (https://www.bordeaux.inra.fr/umr1090/coll_isola.htm).

3.1.3. Komercijalni kompleti

Za izolaciju ukupne genomske DNA iz biljnog materijala, koristila sam komercijalni komplet *OmniPrep*^{TM} *for Plant* (*G-Biosciences*)

3.1.4. Početnice

Početnice P1 (Deng i Hiruki, 1991) i P7 (Smart i sur., 1996) koriste se za umnažanje fragmenta veličine 1,8 kb koji obuhvaća gotovo cijeli gen za 16S rRNA i cijelu regiju (eng. *spacer region*) između gena za 16S i 23S rRNA u direktnom PCR-u. Univerzalne početnice F2/R2 (Gundersen i Lee, 1996) koje umnažaju fragment veličine 1,2 kb unutar za 16S rRNA, korištene su u *nested*-PCR-u. Nukleotidni slijed počenica naveden je u Tablici 2.

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

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

Za umnažanje fitoplazmatske genske regije *tufB* direktnim PCR-om koristila sam specifične parove početnica fTuf1/rTuf1 (Schneider i sur., 1997), te fTufAY/rTufStol (Schneider i sur., 1997) za *nested*-PCR. Nukleotidni slijed počenica naveden je u Tablici 3.

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

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
fTuf1	5’-CCT GAA GAA AGA GAA CGT GG-3’
rTuf1	5’-CGG AAA TAG AAT TGA GGA CG-3’
fTufAY	5'-GCT AAA AGT AGA GCT TAT GA- 3'
rTufStol	5'- CGT TGT CAC CTG GCA TAA CC-3'

Specifične početnice (STOL)H10F1/(STOL)H10R1 (Pacifico i sur., 2009) korištene su u direktnom PCR-u prilikom umnažanja genske regije *vmp1*, dok su u *nested*-PCR-u korištene

oligonukleotidne početnice TYPH10F/TYPH10R (Fialova i sur., 2009). Nukleotidni slijed počenica naveden je u Tablici 4.

Tablica 4. Slijed nukleotida početnica za umnažanje fitoplazmatske genske regije *vmp1*

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
(STOL)H10F1	5’-AGG TTG TAA AAT CTT TTA TGT-3’
(STOL)H10R1	5'-GCG GAT GGC TTT TCA TTA TTT GAC-3’
TYPH10F	5'-AAC GTT CAT CAA CAA TCA GTC-3'
TYPH10R	5'-CAC TTC TTT CAG GCA ACT TC-3'

Za umnažanje fitoplazmatske genske regije *secY* direktnim PCR-om koristila sam specifične parove početnica PosecF1/PosecR1 (Fialova i sur., 2009). Za *nested*-PCR koristila sam sljedeće specifične početnice PosecF3/PosecR3 (Fialova i sur., 2009; Tablica 5).

Tablica 5. Slijed nukleotida početnica za umnažanje fitoplazmatske genske regije *secY*

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
PosecF1	5’-TCT GCT TTG CCT TTG CCT TT-3’
PosecR1	5’-ATT AGT AAA CTA GTT CCT CC-3’
PosecF3	5’-GGA TTG ATA GAT GCT GCC CC-3’
PosecR3	5’-GCC CCT ATA ACG GTG ATT TTG A-3’

Za umnažanje fitoplazmatske genske regije *stamp* direktnim PCR-om koristila sam specifične parove početnica StampF/StampR0 (Fabre i sur., 2011). Za *nested*-PCR koristila sam sljedeće specifične početnice StampF1/StampR1 (Fabre i sur., 2011; Tablica 6).

Tablica 6. Slijed nukleotida početnica za umnažanje fitoplazmatske genske regije *stamp*

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
stampF	5'-GTA GGT TTT GGA TGT TTT AAG-3'
stampR0	5'-AAA TAA AAG AAC AAG TAT AGA CGA-3'
stampF1	5'-TTC TTT AAA CAC ACC AAG AC-3'
stampR1	5'-AAG CCA GAA TTT AAT CTA GC-3'

3.1.5. Pribor i uređaji

- mikropipete: Biohit, Finska
  Eppendorf, Njemačka
  CAPP, Danska
- mikroepruvete i nastavci: Eppendorf, Njemačka
- vaga: *Precisa 62 A* (Precisa Instruments AG, Švicarska)
- vodena kupelj: SW22 (Julabo, Njemačka)
- inkubator: *Incubator Hood TH 15 Edmund Bühler GmbH*
- centrifuge: Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Njemačka)
  Mikro-242 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
  Multi-Spin (Biosan, Latvija)
- vrtložne miješalice (vorteksi): EV-100 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
  Bio Vortex VI (Kisker-Biotech, Njemačka)
- PCR uređaji: *GeneAmp PCR system 2700 Applied Biosystems*
  2720 Thermal Cycler Applied Biosystems
- RT-PCR uređaji: 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD)
- kadice za elektroforezu: Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)
  Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)
- uređaj za napajanje za elektroforezu: Power Pac 300 (Bio-Rad, SAD)
- UV-transiluminator: T2202 (Sigma, SAD)
- sustav za dokumentaciju gelova: *DigiGenius* (Syngene Ltd., UK)
- digitalni fotoaparat: Panasonic DMC-FZ8 (Panasonic, Japan)

3.1.6. Puferi i otopine

- otopina deoksiribonukleotida (dNTPs) 10 mM (dATP 2,5 mM; dCTP 2,5 mM; dGTP 2,5 mM; dTTP 2,5 mM): pripremiti iz razrjeđenja matičnih otopina pojedinačnih nukleotida (100 mM);
- TE-pufer, pH 7,6: za 200 mL pufera; 2 mL Tris 10 mM, 0,4 mL EDTA 1 mM
- TBE-pufer (10x): Tris 90 mM, borna kiselina 90 mM, EDTA 1mM
- pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel: bromfenol plavo 0,25%,
  ksilencijanol fluorofosfat 0,25%,
  glicerol 30% (u vodi)
- otopina etidijeva bromida 0,75µg/mL
- polimeraza: GoTaq® *Flexi DNA polymerase* (Promega, SAD
- *5X Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer* (Promega, SAD)
- $MgCl_2$ 25 mM (Promega, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA iz uzoraka biljnog tkiva

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

U prethodno ohlađenim tarionicima homogenirala sam oko 80 mg biljnog tkiva u tekućem dušiku uz dodatak 500 µL pufera za lizu (*Genomic Lysis Buffer*) i 5µL otopine proteinaze K. Zatim sam prebacila homogenate u mikroepruvete od 2 mL, oko 5 sekundi mješala na vrtložnoj mješalici te potom inkubirala u vodenoj kupelji 2 sata pri 60°C. Nakon inkubacije, uzorke sam ostavila da se ohlade na sobnoj temperaturi, a zatim sam dodala 200 µL kloroforma. Svaku mikroepruvetu sam lagano promiješala nekoliko puta. Uzorke sam potom centrifugirala 10 min na 14000 g u ohlađenoj centrifugi. Nukleinske kiseline su se odijelile u gornju vodenu fazu koju sam zatim pažljivo otpipetirala u čistu mikroepruvetu od 2 mL, u nju dodala 50 µL otopine za odvajanje komponenata (*DNA Stripping Solution*), uzorke promiješala okretanjem, a zatim ih inkubirala u vodenoj kupelji 10 min pri 60°C. Svakom uzorku sam dodala 100 µL otopine za precipitaciju (*Precipitation Solution*) i tijekom narednih 20 sekundi miješala ih na vrtložnoj mješalici. Prilikom dodatka otopine dolazi do stvaranja bijelog taloga, a ako u pojedinom uzorku ne nastane talog, dodati još 50 µL navedene otopine. Uzorke sam zatim inkubirala na ledu, te nakon toga centrifugirala 5 min pri 14000 g u ohlađenoj centrifugi. Supernatant sam prebacila u novu mikroepruvetu od 1.5 mL, dodala 500 µL izopropanola i 2 µL glikogena dagnji (*Mussel Glycogen*). Uzorke sam lagano promiješala okretanjem. Nakon toga, uzorke centrifugirati 15 min pri 14000 g kako bi se istaložila DNA. Supernatant pažljivo baciti, a talogu dodati 700 µL 70% etanola. Tijekom sljedeće minute provela sam još jedan krug centrifugiranja na 14000 g. Ponovno sam pažljivo dekantirala supernatant. Dobiveni talog sam sušila na zraku dok se nije izgubio miris etanola, cca 30 min, te sam ga potom otopila u 50 µL TE-pufera i dodala RNAazu. Uzorak se inkubirao na vodenoj kupelji 30 min na temperaturi od 37°C. Uzorak izolirane DNA čuva se pri -20^{0}C.

3.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Različite molekule apsorbiraju pri specifičnim valnim duljinama (λ). Nukleotidi, RNA i DNA imaju maksimum apsorpcije pri 260 nm (A_{260}), dok proteini, fenoli i ostale nečistoće apsorbiraju pri 280 nm (A_{280}). Za mjerenje apsorbancije korišten je spektrofotometar *Nanodrop2000* (*Thermo Scientific*). Nakon mjerenja, uzorke s izoliranim ukupnim nukleinskim kiselinama (TNA) sam razrijedila na radnu koncentraciju od 20 ng/µL tako što sam u nove mikroepruvete od 0,5 mL dodala 1 µL uzorka i određenu količinu autoklavirane vode kako bi se postigla tražena koncentracija TNA.

3.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

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

3.2.3.1. Umnažanje fitoplazmatskog gena za 16S rRNA

Specifičnim umnažanjem fitoplazmatskog gena za 16S rRNA PCR-metodom, dokazala sam prisutnost fitoplazmi u navedenim uzorcima. Sastojci reakcijske smjese navedeni su u Tablici 7.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze korištena za umnažanje gena za 16S rRNA. Kratice: c_0-početna koncentracija, c_k-konačna koncentracija,V-volumen dodanog reagensa, kalup 1-TNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	DIREKTNI PCR			*nested* PCR		
	c_0	c_k	V/µL	c_0	c_k	V/µL
Sterilna dH_2O			13,375			13,875
5x GoTaq Flexi Buffer	5x	1x	5	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	1,5	25 Mm	1,5 mM	1,5
dNTPs otopina	10 mM	0,2 mM	2	10 mM	0,2 mM	2
P1	5 µM	0,2 µM	1	-	-	-
P7	5 µM	0,2 µM	1	-	-	-
F2	-	-	-	5 µM	0,2 µM	1
R2	-	-	-	5 µM	0,2 µM	1
GoTaq Flexi polimeraza	5 U/µL	0,625 U	0,125	5 U/µL	0,625 U	0,125
Kalup 1	-	-	1	-	-	-
Kalup 2	-	-	-	-	-	0,5
Ukupno			25			25

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

3.2.3.2. Umnažanje fitoplazmatskih gena *tufB* i *vmp1*

Sastojci reakcijske smjese navedeni su u Tablici 8. Osim početnica, nije postojala razlika u reagensima za umnažanje gena *tufB*, odnosno *vmp1*.

Tablica 8. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze korištena za umnažanje gena *tufB* i *vmp1*. Kratice: c_0-početna koncentracija, c_k-konačna koncentracija, V-volumen dodanog reagensa, kalup 1-TNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	DIREKTNI PCR			*nested* PCR		
	c_0	c_k	V/µL	c_0	c_k	V/µL
Sterilna dH_2O			2,8			5,3
5x GoTaqFlexiBuffer	5x	1x	5	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	2 mM	2	25 mM	2 mM	2
dNTPs otopina	10 mM	0,2 mM	2	10 mM	0,2 mM	2
fTuf1/ (STOL)H10F1	5 µM	1 µM	5	-	-	-
rTuf1/ (STOL)H10R1	5 µM	1 µM	5	-	-	-
fTufAY/ TYPH10F	-	-	-	5 µM	1 µM	5
rTufSTOL/ TYPH10R	-	-	-	5 µM	1 µM	5
GoTaqFlexipolimeraza	5U/µL	1U	0,2	5U/µL	1U	0,2
Kalup1	20 ng/µL	2,4 ng/µL	3	-	-	-
Kalup2	-	-	-	-	-	0,5
Ukupno			25			25

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

Kod umnažanja gena *vmp1* u direktnom PCR-u temperatura prianjanja početnica na kalup bila je 52°C, a u *nested*-PCR-u je povišena na 55°C. Ponavljajuće faze su imale 35, a ne 34 ciklusa. Također, faza sinteze komplementarnih lanaca DNA, kao i faza završnog produljivanja lanaca DNA bile su duže za 30 sekundi po ciklusu.

3.2.3.3. Umnažanje fitoplazmatskih gena *secY* i *stamp*

Volumen reakcijske smjese iznosio je 25 µL isto kao i volumen reakcijske smjese za umnažanje gena *tufB* i *vmp1*. Sastojci reakcijske smjese prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom korištena za umnažanje gena *secY* i *stamp*. Kratice: c_0-početna koncentracija, c_k-konačna koncentracija, V-volumen dodanog reagensa, kalup 1-TNA, kalup 2-produkt direktnog PCR-a

REAGENS	DIREKTNI PCR			*nested* PCR		
	c_0	c_k	V/µL	c_0	c_k	V/µL
Sterilna dH_2O			2,6			5,3
5x GoTaqFlexiBuffer	5x	1x	5	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	2 mM	2	25 mM	2 mM	2
dNTPs otopina	10 mM	0,2 mM	2	10 mM	0,2 mM	2
stampF/ PosecF1	5 µM	1 µM	5	-	-	-
stampR0/ PosecR1	5 µM	1 µM	5	-	-	-
stampF1/ PosecF3	-	-	-	5 µM	1 µM	5
stampR1/PosecR3	-	-	-	5 µM	1 µM	5
GoTaqFlexipolimeraza	5U/µL	2U	0,4	5U/µL	1U	0,2
Kalup1	20 ng/µL	2,4 ng/µL	3	-	-	-
Kalup2	-	-	-	-	-	0,5
Ukupno			25			25

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

Uvjeti umnažanja za gen *stamp* u direktnom i *nested*-PCR-u bili su: početna denaturacija pri 94°C, 4 min (1 ciklus); denaturacija pri 94°C, 30 sekundi; prianjanje početnica na kalup pri 56°C (52°C u *nested*-PCR-u), 30 sekundi; sinteza komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 72°C, 90 s (35 ciklusa) te završno produljivanje lanaca DNA pri 72°C, 7 min (1 ciklus).

3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Za provjeru uspješnosti izdvajanja molekula DNA nakon lančane reakcije polimerazom, napravila sam elektroforezu u 1%-tnom gelu agaroze. Odvagnula sam 350 mg agaroze za 1%-tni gel i prebacila staklenu Erlenmeyerovu tikvicu. Odmjerila sam 35 mL TBE-pufera (0,5X) i izlila u tikvicu uz ispiranje preostale agaroze sa stijenki posude. Otapanje agaroze pospješila sam zagrijavanjem staklene tikvice u mikrovalnoj pećnici. Nakon hlađenja tikvice na sobnu temperaturu, dodala sam 1 µL boje SERVA *DNA stain G*. Obojani gel sam potom izlila u prethodno pripremljen kalup za gel i ostavila da polimerizira tijekom dvadesetak minuta. Zatim sam kalup s gelom premjestila u kadicu za elektroforezu „Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)“. U jažice gela nanijela sam po 5 µL PCR- produkta pomiješanog s 1 µL obojenog pufera za nanošenje laganim uvlačenjem i ispuštanjem cijelog sadržaja na parafilmu. Kao molekularni standard radi kontrole duljine amplikona koristila sam 5 µL „ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9, ready-to-use“ (Fermentas, Litva) pomiješanog s 2 µL obojenog pufera. Elektroforeza se provodila 30 min pri konstantnom naponu od 150 V („Powerpac 300“, Bio-Rad, SAD).

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

3.2.5. Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) fitoplazmatskih gena za 16S rRNA, gen *tufB* i *vmp1*

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

*Hpa*II 5' C↓CGG 3' (gen *tufB*);
*Rsa*I 5' GT↓AC 3' (gen *vmp1*);
*Tru1*I (*Mse*I) 5' T↓TAA 3' (gen 16S rRNA).

Za pripravu restrikcijske smjese pomješala sam 2 μL pufera za restrikciju, 0,5 μL restrikcijskog enzima (*Hpa*II, *Rsa*I ili *Tru1*I u pojedinačnoj reakciji), 13,5 μL destilirane vode i 4 μL uzorka (fragmenti umnoženi u *nested*-PCR-u). Tako pripremljeni uzorci inkubiraju se 16h pri temperaturi od 65°C . Dobivene pocijepane fragmente gena za 16S rRNA i *vmp1* analizirala sam elektroforezom u 5%-tnom poliakrilamidnom gelu. Kod pripreme gela, prvo sam zasebno priredila priredila dvije otopine, koje sam zatim pomiješala. Prva otopina se sastojala od 10 μL TEMED-a, 1,25 mL AA-a (40%) i 0,625 mL BIS-a (2%), a druga od 1 mL 10xTBE-pufera, 100 μL APS-a (10%) i 7,015 mL vode. Kao elektroforetski pufer koristila sam također 1xTBE-pufer. U jažice gela nanostila sam 20 μL uzorka pomiješanog s 4 μL obojenog pufera za elektroforezu. Na gel se nanosi i 7 μL markera pomiješanog s 2 μL boje, što služi kao biljeg molekulanih masa. Elektroforezu sam provodila pri naponu od 200 V u trajanju 45 min. Dobivene gelove sam bojila u otopini etidijeva bromida (0,75 μg/mL) oko 15 min te fotografirala na transiluminatoru. Za razdvajanje pocijepanih fragmenata gena *tufB* korištena je elektroforeza u 2,5 %-tnom gelu agaroze, kako je opisano u poglavlju 3.2.4.

3.2.6. Filogenetske analize gena *secY*, *stamp* i *vmp1*

3.2.6.1. Sekvenciranje nukleotidnih slijedova gena *secY*, *stamp i vmp1*

Umnoženi fragmenti gena *stamp, secY i vmp1* dobiveni iz izolata fitoplazme '*Ca*. P. solani' poslani su na određivanje primarne strukture molekule DNA u *Macrogen Inc.* (Amsterdam, Nizozemska https://dna.macrogen.com/). Za sekvenciranje svih fragmenta su korištene jednake početnice kao i za umnažanje u *nested*-PCR-u za svaki pojedini gen.

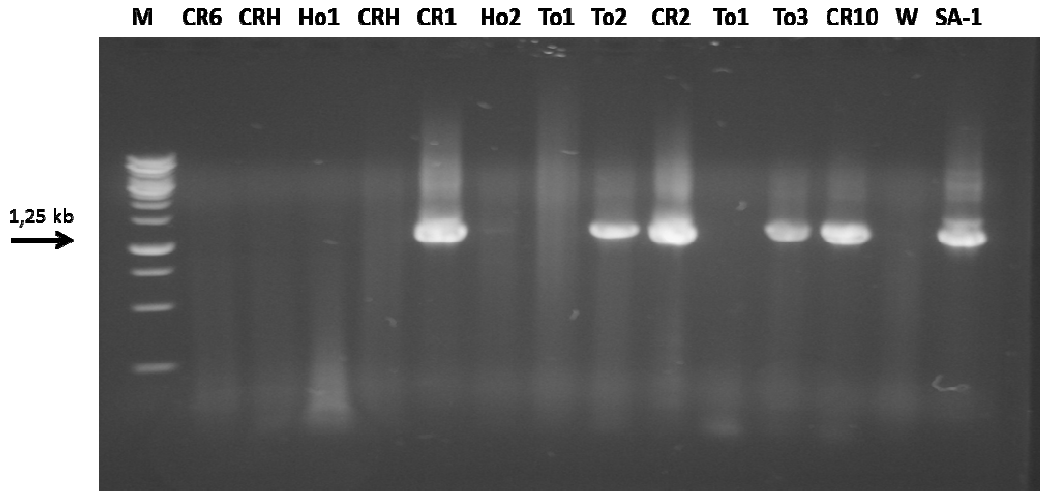
3.2.6.2. Računalne analize nukleotidnih slijedova

Dobivene nukleotidne slijedove ujedinila sam i sastavila pomoću računalnog programa *Sequencher*^{TM} 4.10. Demo (http://www.genecodes.com/). Kako su nukleotidni siljedovi duži od samog gena prvo treba svaku sekvencu skratiti na duljinu gena. Nakon toga, otvoreni okvir čitanja proteina kodiranog genom provjerila sam *in silico* korištenjem *on-line* programa za translaciju (http://web.expasy.org/translate/). Uređeni nukleotidni slijedovi zatim su globalno sravnjeni pomoću računalnog programa ClustalX 2.0, čime je omogućuno lakše pronalaženje mutacija unutar sekvenci (Thompson i sur., 1997; http://www.clustal.org). Filogenetske analizire napravila sam korištenjem programa MEGA 4 (Tamura i sur., 2007; http://www.megasoftware.net), metodom *neighbour joining* (Saitou i Nei, 1987). Za procjenu pogreške modela korištena je statistička metoda *bootstrap* (Felsenstein, 1985) uz 500 ponavljanja, a za računanje udaljenosti nukleotidnih slijedova korišten je model *number of differences*. Uz nukleotidne slijedove ispitivanih uzoraka, u analize su uključene i referente sekvence gena *stamp, secY i vmp1* dostupne u bazi podataka GenBank.

4. REZULTATI

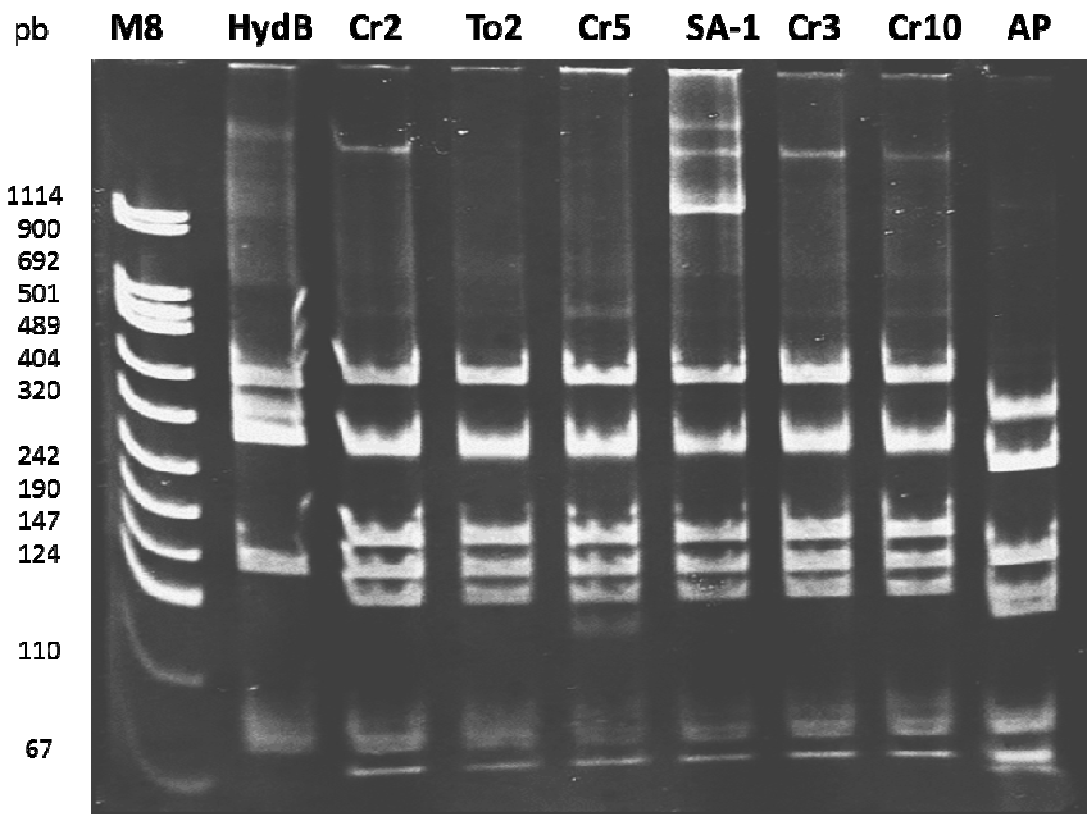
4.1. PCR/RFLP analiza fitoplazmatskih gena za 16S rRNA, *tufB* i *vmp1*

Prema detaljno opisanom protokolu u poglavlju 3.2.1. iz uzoraka biljnog materijala izolirala sam genomsku DNA korištenjem komercijalnog kompleta *OmniPrep*^{TM} *for Plant*. Koncentraciju i čistoću ukupne izolirane DNA izmjerila sam spektrofotometrijski, te uzorke razrijedila autoklaviranom vodom do radne koncentracije od 20 μg/μL. Direktnim PCR-om umnožila sam gene za 16S rRNA korištenjem univerzalnih para početnica P1/P7, nakon čega je uslijedio *nested* („ugniježđeni“) PCR korištenjem početnica F2/R2. U uzorcima u kojima je utvrđena prisutnost fitoplazmi, umnožen je fragment veličine oko 1,25 kb. Reprezentativni prikaz elektroforeze u 1%-tnom gelu nalazi se na Slici 5.



Slika 5. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze fitoplazmatskog gena 16S rRNA metodom *nested*-PCR-a za uzorke (CR6, CRH, Ho1,CR1, Ho2, To2, To1, To3 i CR10).Pozitivna kontrola je referenti soj fitoplazmi (SA-1), a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

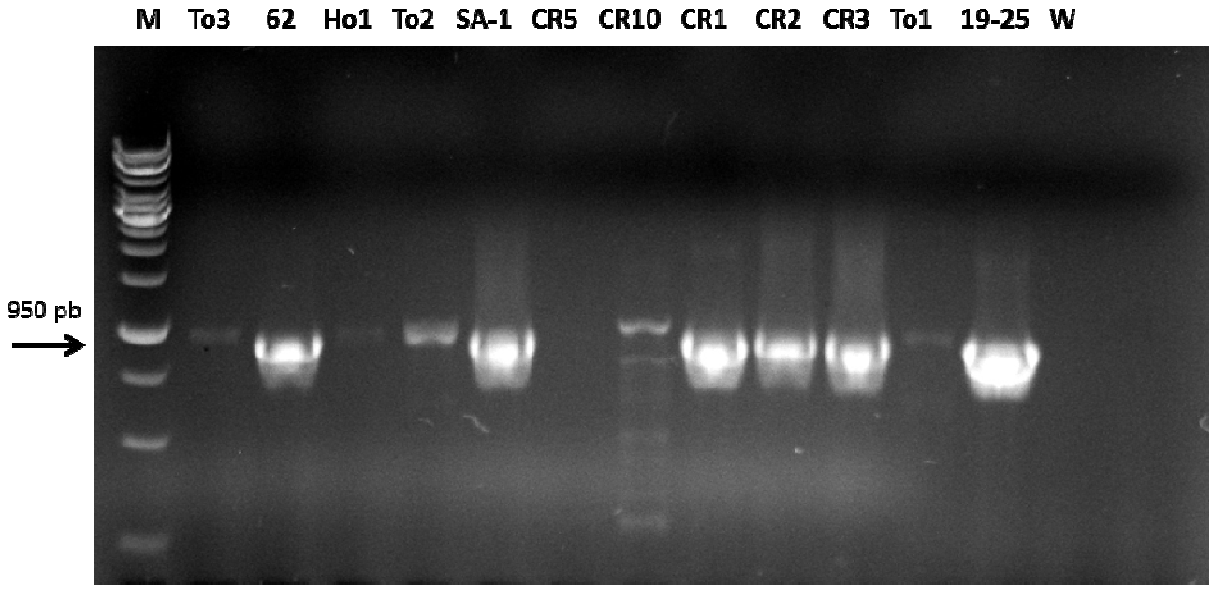
Analiza RFLP umnoženih fragmenata gena za 16S rRNA pokazala je da su profili svih uzoraka bili međusobno jednaki te da odgovaraju onom referentnog soja SA-1 koji pripada fitoplazmatskoj vrsti '*Ca*. P. solani' (Sl. 6.).



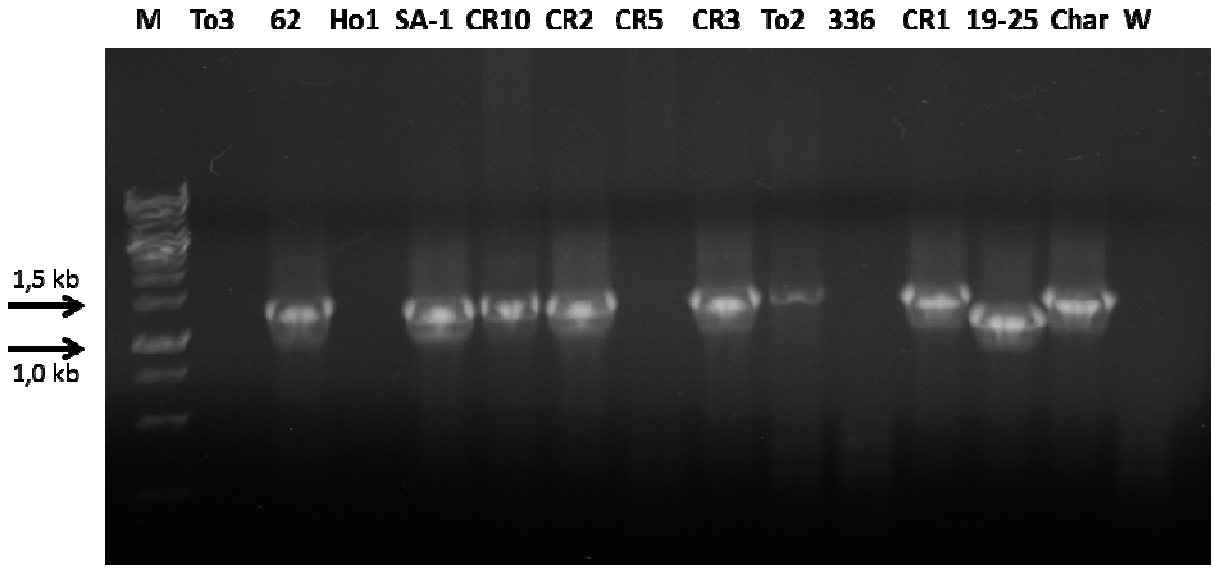
Slika 6. Prikaz rezultata poliakrilamidnog gela nakon RFLP metode fitoplazmatskog gena za 16S rRNA uz korištenje restrikcijeske endonukleaze *Mse*l. Uzorci (CR2, CR3, CR5, CR10 i To2),pozitivne kontrole referentnih sojeva (HydB, SA-1 i AP), te marker M8 (DNA *Molecular Marker* 8).

Uzorci madagaskarskog zimzelena (CR1, CR2, CR3, CR5 i CR10) te rajčice (To1, To2 i To3) kod kojih je utvrđena prisutnost fitoplazmatskog gena za 16S rRNA podvrgnuti su daljnjoj multigenskoj analizi.

Iz navedenih uzoraka umnažani su i fragmenti gena za elogancijski faktor Tu (gen *tufB*) te gen za varijabilni membranski protein vmp (gen *vmp1*) kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2. Fragment gena *tufB* veličine oko 950 pb uspješno je umnožen iz uzoraka CR1, CR2, CR3, To2 kako i iz referentnih sojeva (Sl. 7.) dok je kod uzorka CR10 primijećeno i nespecifično umnažanje. Kod umnažanja gena za varijabilni membranski protein *vmp1* dobiveni su fragmenti različite veličine u rasponu od oko 1,1 do 1,4 kbp i to iz slijedećih uzoraka: CR1, CR2, CR3, CR10 i To2 (Sl. 8.).



Slika 7. Prikaz rezultata elektroforeze fitoplazmatskog gena *tufB* metodom *nested*-PCR-a za uzorke madagaskarskog zimzelena (CR1, CR2, CR3, CR5 i CR10, To1, To2 i To3) te kukaca (Ho1). Pozitivne kontrole su referenti sojevi fitoplazmi (SA-1, 62, 19-25), a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

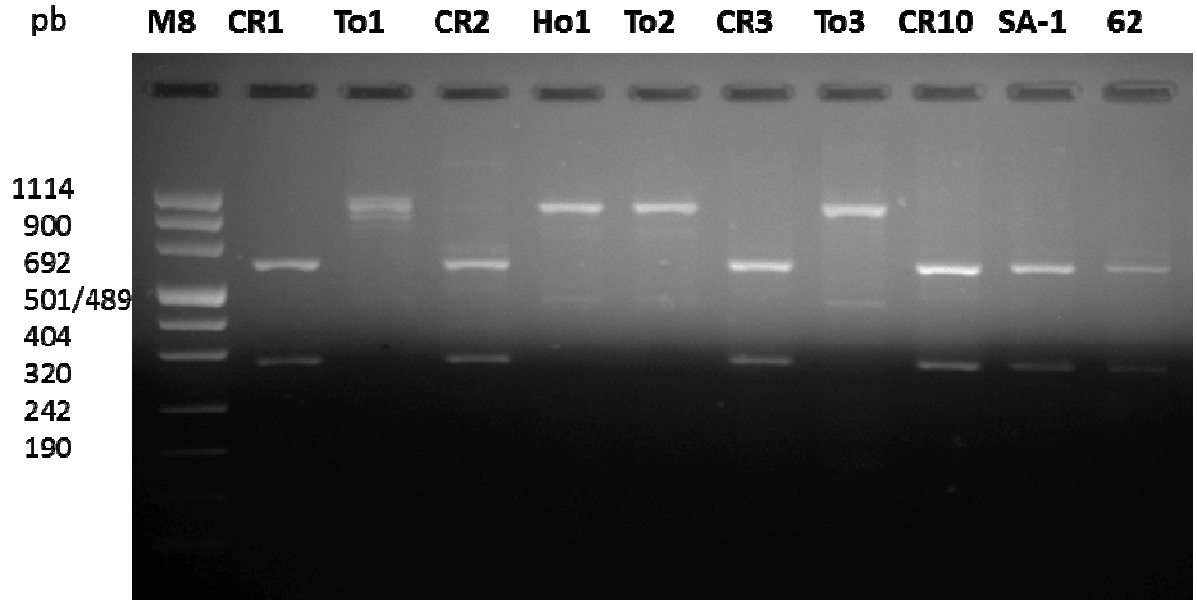


Slika 8. Prikaz rezultata elektroforeze fitoplazmatskog gena *vmp1* metodom *nested*-PCR-a za uzorke (CR1, CR2, CR3, CR5 i CR10, To2 i To3) te kukaca (Ho1 i 336). Pozitivne kontrole su referenti sojevi fitoplazmi (62, SA-1, 19-25 i Char), a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

Nakon umnažanja fitoplazmatskih gena *tufB* i *vmp1* metodom *nested*-PCR-a i elektroforetske analize, izvršila sam razgradnju umnoženih fragmenata restrikcijskim enzimima *Hpa*II (gen *tufB*) i *Rsa*I (gen *vmp1*). Dobiveni restrikcijski fragmenti razdvajaju se elektroforezom u poliakrilamidnom gelu ili agaroznom gelu na temelju razlike u duljini

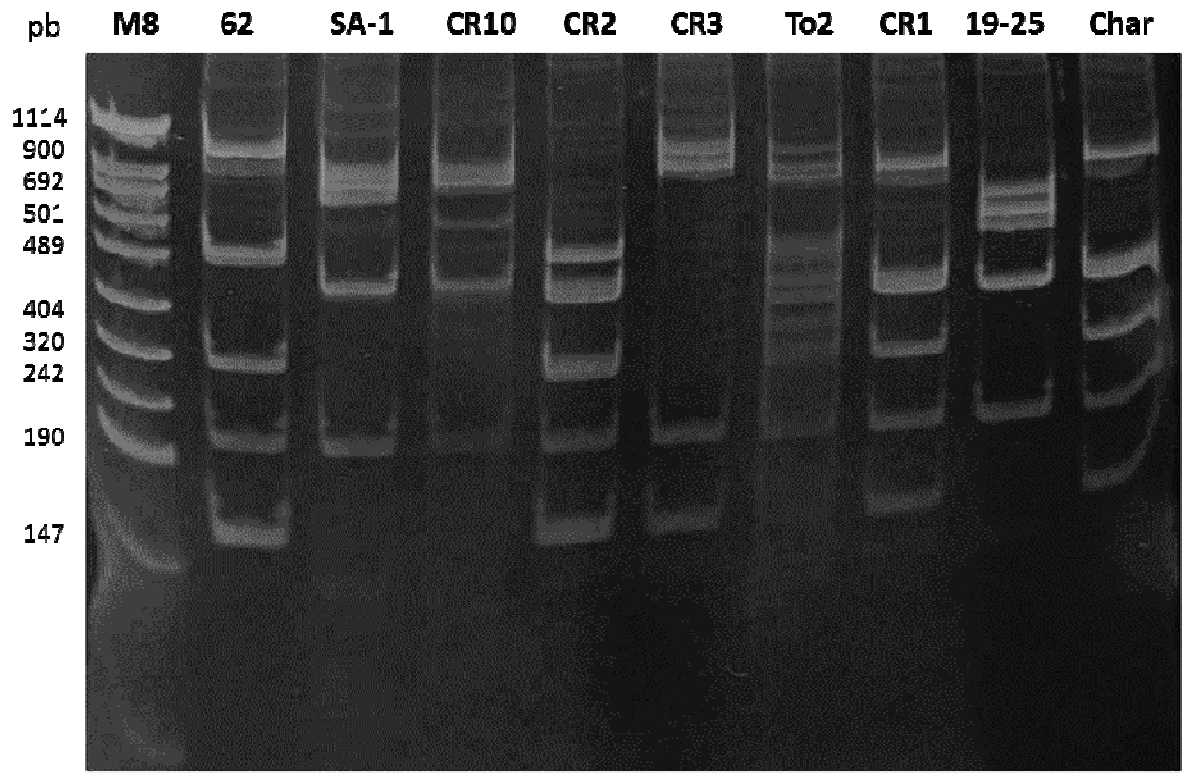
pocijepanih fragmenata. Restrikcijske obrasce pozitivnih uzoraka usporedila sam s restrikcijskim obrascima referentnih izolata.

Restrikcijskom analizom gena *tufB* s restrikcijskim enzimom *Hpa*II utvrdila sam da naši uzorci CR1, CR2, CR3 i CR10 pokazuju restrikcijski obrazac jednak onom referentnog uzorka SA-1 te uzorka 62. Kod uzoraka To1, To2 i To3 nije došlo do cijepanja fragmenta. Prikaz gela na kojem su analizirani rezultati RFLP-a prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Prikaz rezultata poliakrilamidnog gela nakon RFLP analize fitoplazmatskog gena za *tufB* uz korištenje restrikcijske endonukleaze *Hpa*ll. Uzorci (CR1, CR2, CR3 i CR10, To1, To2 i To3) te kukaca (Ho1). Pozitivne kontrole su referenti sojevi fitoplazmi (62, SA-1). Marker M8 (DNA *Molecular Weight Marker 8*).

Restrikcijskom analizom gena *vmp1* restrikcijskim enzimom *Rsa*I utvrdila sam da je svaki od uzoraka (CR1, CR2, CR3, CR10 i To2) imao jedinstveni restrikcijski profil što je bilo sukladno očekivanjima jer se radi o vrlo varijabilnoj genskoj regiji. Uzorak CR10 pokazao je jednaki restrikcijski obrazac kao i referentni soj SA-1. Kod uzorka To2 primijećen je mješoviti restrikcijski obrazac nalik onima uzoraka CR2 i CR3 (Sl. 10.).

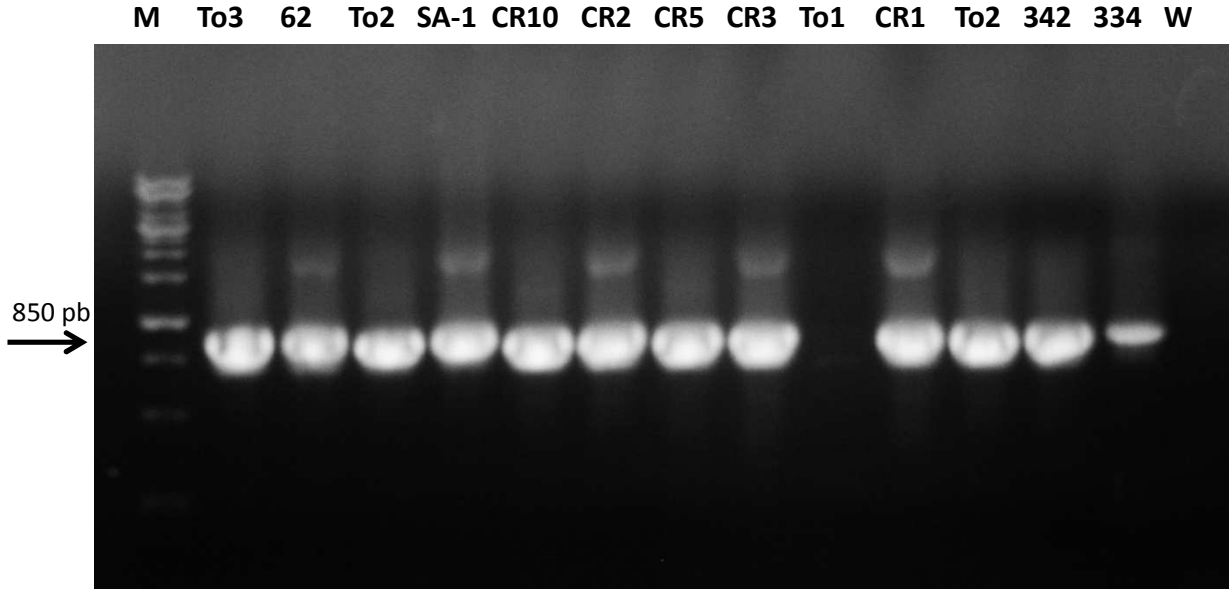


Slika 10. Prikaz rezultata poliakrilamidnog gela nakon RFLP analize fitoplazmatskog gena za *vmp1* uz korištenje restrikcijske endonukleaze *Rsa*l. Uzorci (Cr10, Cr2, Cr3, To2, Cr1), pozitivne kontrole referentnih sojeva (62, SA-1, 19-25, Char) te marker M8 (DNA *Molecular Weight Marker 8*).

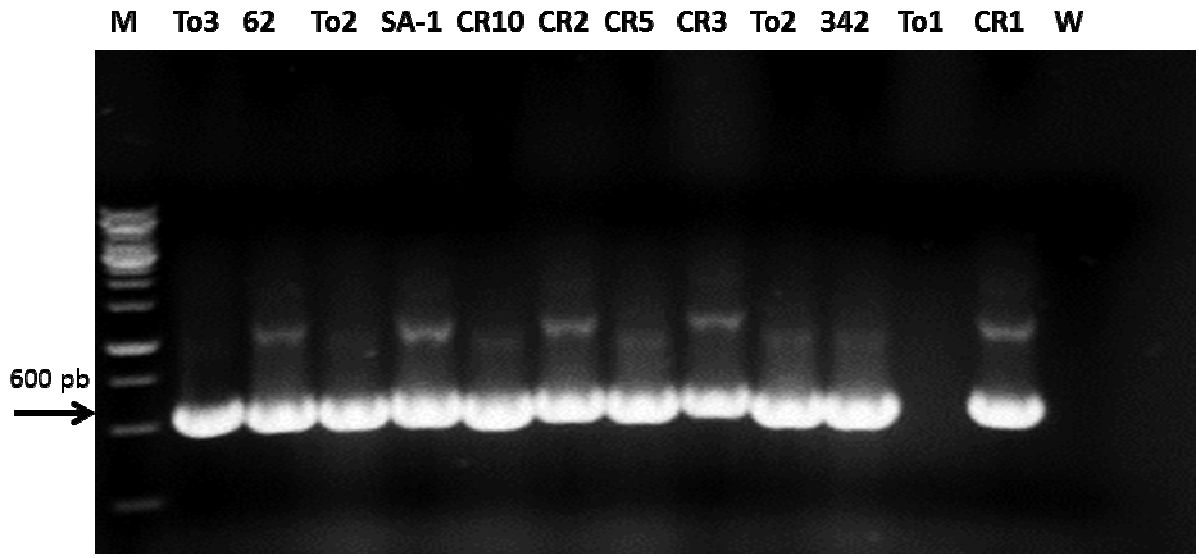
4.2. Filogenetske analize gena *secY*, *stamp* i *vmp1*

4.2.1. Analiza elekroforeze na agaroznom gelu umnoženih gena *secY* i *stamp*

Fragmente fitoplazmatskih gena *secY* i s*tamp* umnožila sam u reakciji direktnog PCR-a koristeći specifične fitoplazmatske početnice PosecF1/R1 (gen *secY*) i StampF/RO (gen s*tamp*). Dobivene umnožene fragmente DNA koristila sam kao kalup u reakciji *nested*-PCR-a sa specifičnim parom početnica PosecF3/R3 (gen *secY*) i StampF1/R1 (gen s*tamp*). Fragment gena *secY* veličine oko 850 pb uspješno je umnožen iz svih uzoraka osim uzorka To1 (Sl. 11.), kao i kod gena *stamp* gdje su dobiveni fragmenti veličine od oko 600 pb (Sl. 12.).



Slika 11. Prikaz rezultata elektroforeze fitoplazmatskog gena *secY* metodom *nested*-PCR-a za uzorke (CR1, CR2, CR3, CR5, CR10, To1, To2 i To3), te uzorke kukca (342 i 334). Pozitivne kontrole su referenti sojevi fitoplazmi (62, SA-1), a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

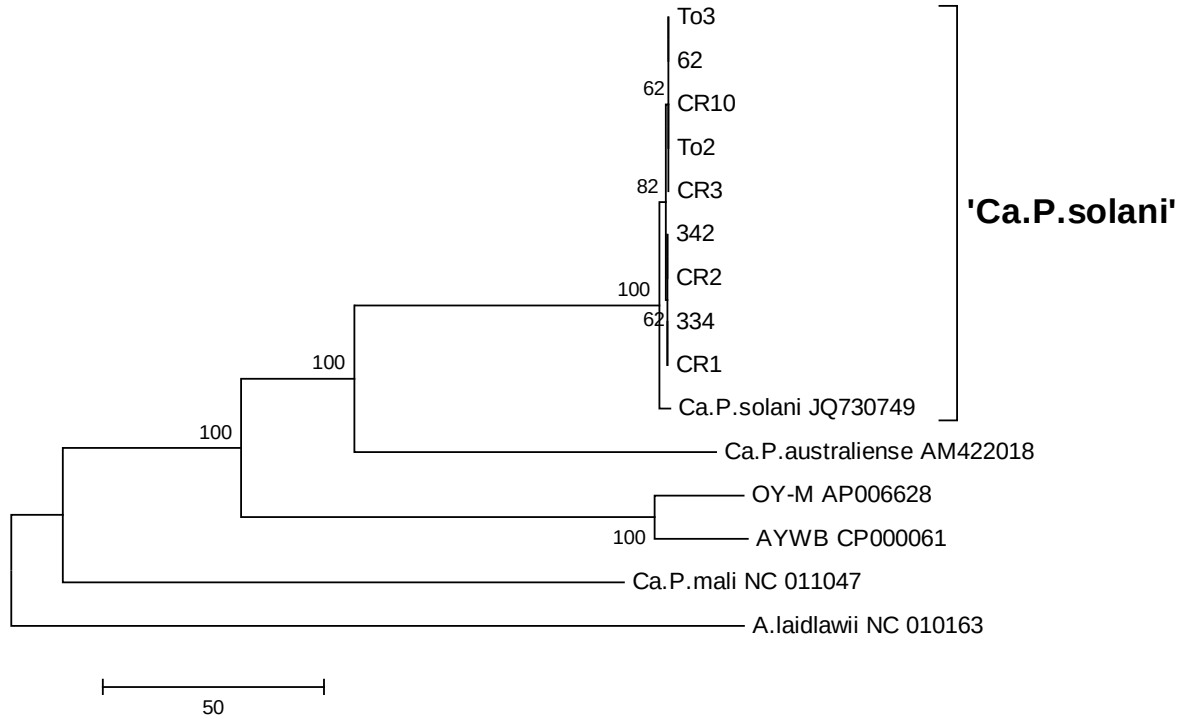


Slika 12. Prikaz rezultata elektroforeze fitoplazmatskog gena *stamp* metodom *nested*-PCR-a za uzorke (CR1, CR2, CR3, CR5, CR10, To1, To2 i To3), te uzorka kukca(342).Pozitivne kontrole su referenti sojevi fitoplazmi (SA-1, 62), a negativna kontrola je reakcijska smjesa s dodatkom vode (W). Marker 1kb (M).

4.2.2. Računalna analiza nukleotidnih slijedova sekvenci gena *secY*

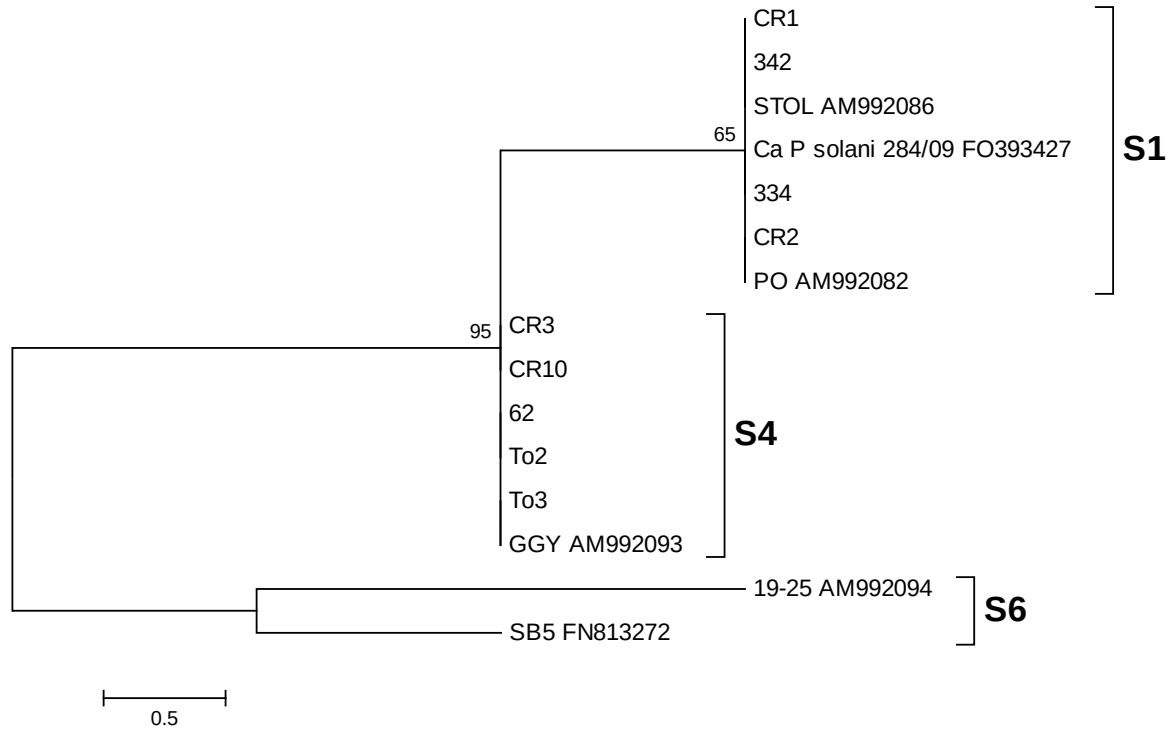
Dobivene nukleotidne slijedove sekvenci gena *secY*, *stamp* i *vmp1* filogenetski sam analizirala uz pomoć računalnih metoda na nukleotidnom i aminokiselinskom nivou. Dobivena filogenetska stabla prikazuju granjanje sojeva fitoplazmi uslijed nastalih nukleotidnih promjena. Pri tom sam za određivanje evolucijskih udaljenosti između analiziranih nukleotidnih slijedova koristila metodu *neighbour joining* (Saitou i Nei, 1987), dok sam za računanje udaljenosti nukleotidnih slijedova koristila model *number of differences*. Za procjenu pogreške modela korištena je statistička metoda *bootstrap* (Felsenstein, 1985) uz 500 ponavljanja.

Na Slici 13. prikazano je grananje fitoplazmatskih vrsta '*Ca*. P. mali', '*Ca* P. australiense', OY-M, AYWB, '*Ca* P. solani' te uzorci gena *secY* od svog zajedničkog pretka *Acholeplasma laidlawii*. Filogenetska analiza potvrdila je da su se svi ispitivani uzorci odvojili zajedno u istu granu s vrstom '*Ca*. P. solani' što potvrđuje da se u uzorcima nalazi upravo ta vrsta fitoplazmi.

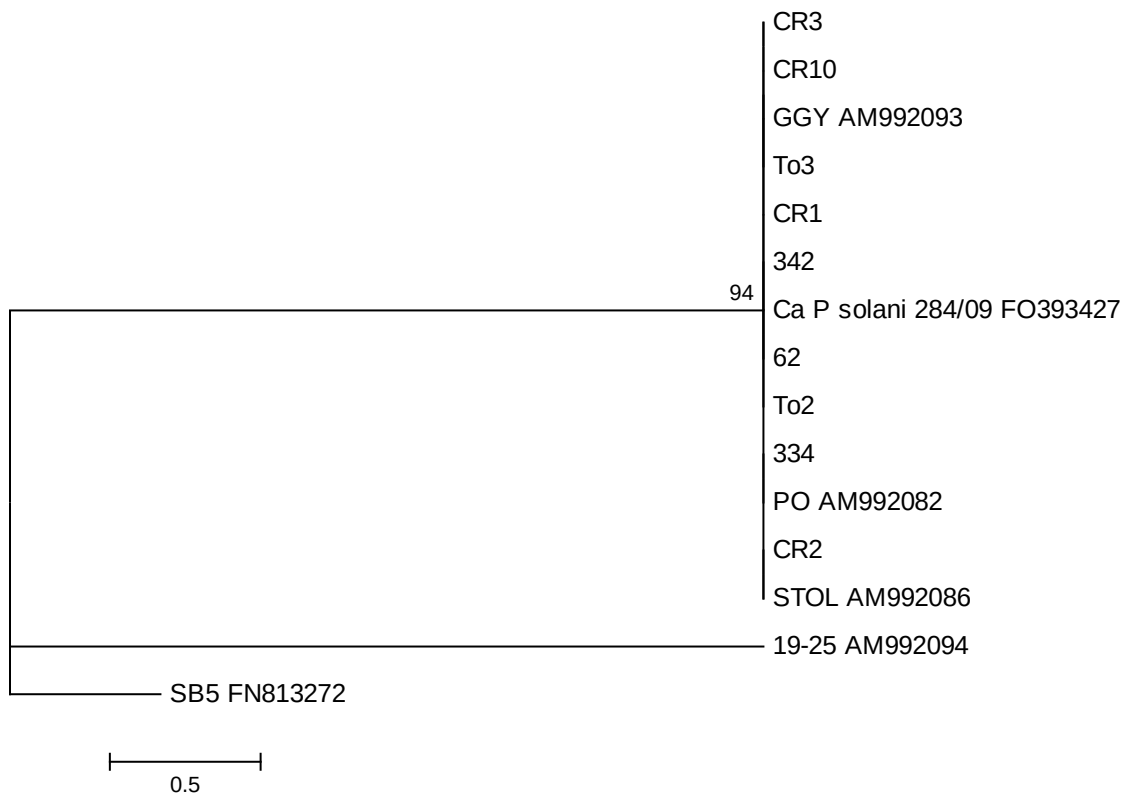


Slika 13. Filogenetsko stablo grupiranja ispitivanih uzoraka za gen *secY* zajedno s vrstom'*Ca*. P. solani'

Filogenetsko stablo promatrano unutar izolata ispitivanih uzoraka za gen *secY* pokazuje grananje u dvije grane gdje su su svi naši analizirani uzorci izdvojili u jednu granu. Unutar te grane došlo je do razdvajanja u dvije zasebne skupine (S1 i S4) zbog nastale promjene u nukleotidnom slijedu (Sl. 14.). Uzorci CR1, 342, 334 i CR2 izdvojili su se zajedno s referentnom vrstom '*Ca*. P. solani' zbog prisutnosti dušične baze G na poziciji 459 nukleotidnog slijeda, dok je na istoj toj poziciji u uzocima CR3, CR10, To2 i To3 došlo do izmjene dušične baze G u A. Od svih nukleotidnih izmjena koje su se dogodile unutar gena *secY* u uzorcima značajne su samo one promjene koje rezultiraju izmjenom za kod aminokiselina, no analizirani uzorci nisu pokazali promjene u aminokiselinskom slijedu što je vidljivo iz Slike 15.



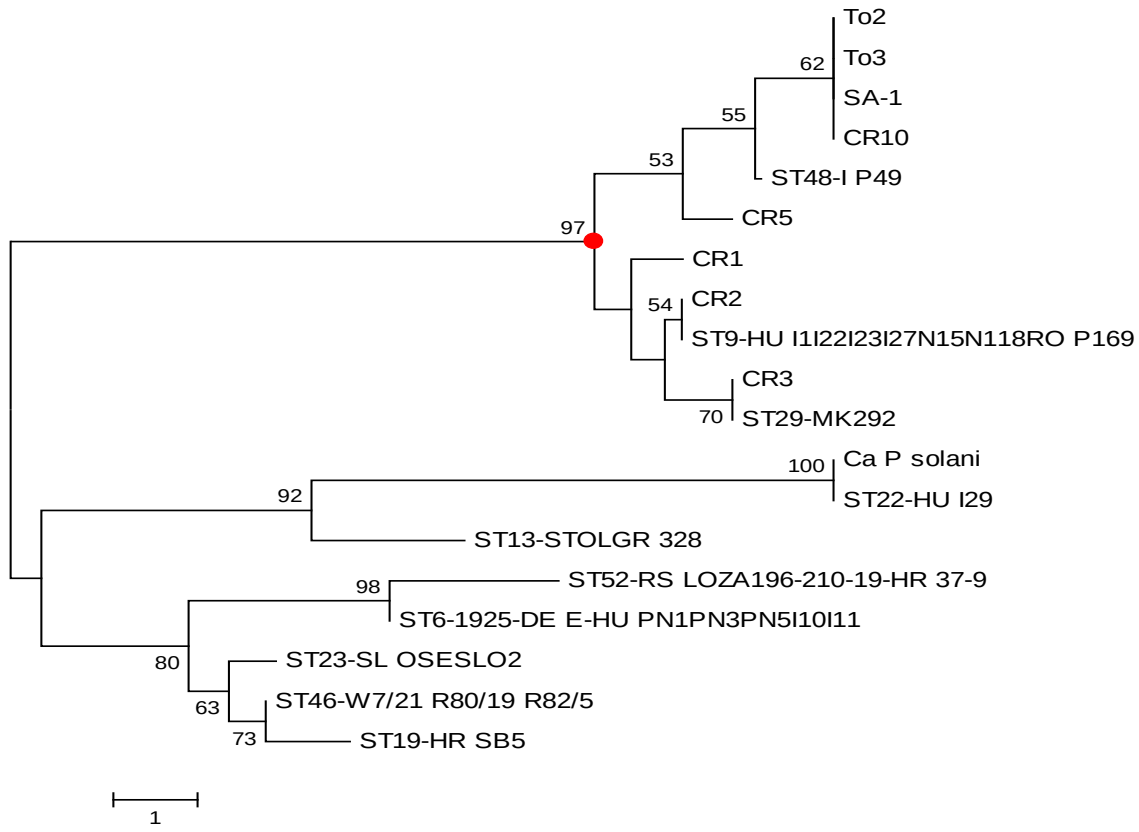
Slika 14. Filogenetsko stablo prikazuje grupiranje uzoraka na temelju promjene u nukleotidnom slijedu za gen *secY* fitoplazme '*Ca*. P. solani'



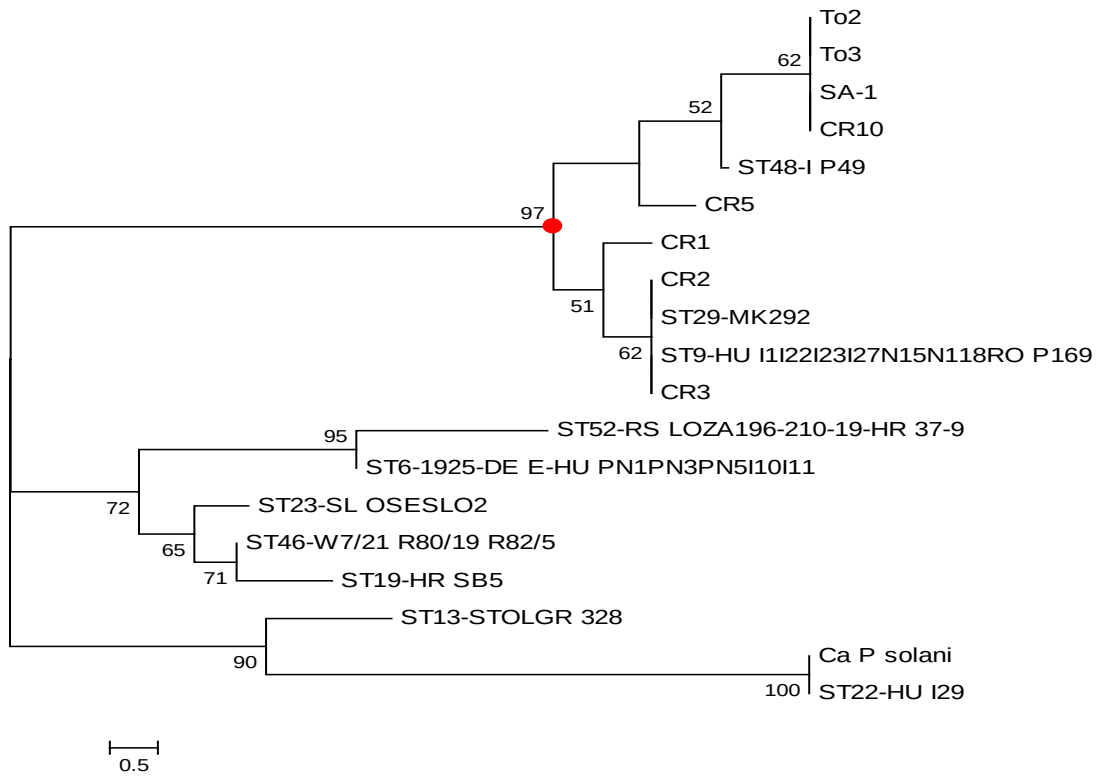
Slika 15. Filogenetsko stablo s prikazom grupiranja uzoraka u istu skupinu jer nije došlo do izmjene koda za sintezu slijeda aminokiselina kodiranog gena *secY* fitoplazme '*Ca*. P. solani'

4.2.3. Računalna analiza nukleotidnih slijedova sekvenci gena *stamp*

Gen *stamp* specifičan je za vrstu '*Ca*. P solani' i kodira za antigenski membranski protein, što za posljedicu ima puno veći broj izmjena u odnosu na gen *secY*. Iz Slike 16. vidljivo je da filogenetsko stablo ukazuje na veću raznolikost unutar vrste jer su se uzorci grupirali u više skupina. Od ukupno 7 uzoraka njih 5 pokazuje različite genotipove. Jednaki genotip pronalazimo kod uzoraka To2, To3 i CR10, dok uzorci CR5, CR1, CR2 i CR3 imaju međusobno različite genotipove. Unatoč jako velikoj varijabilnosti, filogenetsko stablo konstruirano na temelju promjena u aminokiselinskom slijedu ukazuje da je riječ o vrlo srodnim genotipovima jer su se grupirali u istu granu (Sl. 17.).



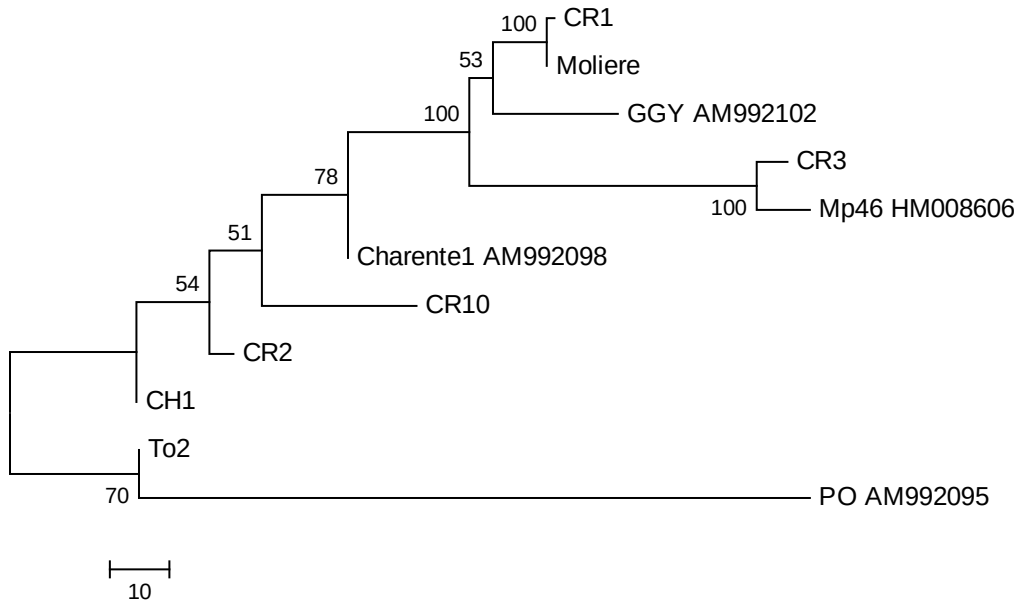
Slika 16. Filogenetsko stablo prikazuje grupiranje uzoraka na temelju promjene u nukleotidnom slijedu za gen *stamp* fitoplazme '*Ca*. P. solani'



Slika 17. Filogenetsko stablo prikazuje grupiranje uzoraka na temelju promjene u aminokiselinskom slijedu kodiranom genom *stamp* fitoplazme '*Ca*. P. solani'

4.2.4. Računalna analiza nukleotidnih slijedova sekvenci gena *vmp1*

Kao i kod gena *stamp*, filogenetsko stablo gena *vmp1* ukazuje na još veću raznolikost unutar uzoraka iste vrste (Sl. 18.) jer se također radi u varijabilnom membranskom proteinu karakterističnom za vrstu. Zanimljivo je da se uzorak To2 izdvojio u drugu granu, što se podudara s rezultatima dobivenih RFLP analizom.



Slika 18. Filogenetsko stablo prikazuje grupiranje uzoraka na temelju promjene u nukleotidnom slijedu za gen *vmp1* fitoplazme '*Ca*. P. solani'

5. RASPRAVA

Fitoplazme su unutarstanični paraziti mnogih gospodarski značajnih biljaka i hemolimfe kukca-vektora, dok je fitoplazmatska vrsta '*Candidatus* Phytoplasma solani' jedna od fitoplazmi s najširim krugom prirodnih domaćinskih vrsta, a karakteristična je za europski kontinent. U Hrvatskoj molekularna istraživanja ove fitoplazmatske vrste započinju istraživanjima žutice vinove loze 1997. godine (Šarić i sur., 1997) te su dosada kao uzročnici potvrđeni na vinovoj lozi i kukcu-vektoru *Hyalesthes obsoletus*, (Šarić i sur., 1997; Šeruga i sur., 2002; Mikec i sur., 2006; Šeruga Musić i sur., 2009) te na vrstama roda *Prunus* (marelica, breskva, trešnja), *Malus* (jabuka), *Pyrus* (kruška) kao i kukcima-vektorima roda *Cacopsylla* (Križanac i sur., 2010)

Dosadašnja istraživanja fitoplazmi iz skupine 16SrXII-A upućuju na značajnu gensku varijabilnost unutar navedene skupine (Langer i Maixner, 2004; Šeruga Musić i sur., 2008; Cimerman i sur., 2009; Pacifico i sur., 2009, Fialova i sur., 2009). Molekularne analize genske regije 16S rDNA nisu uvijek dovoljne za točnu i preciznu identifikaciju i klasifikaciju izolata pojedinih ribosomskih skupina fitoplazmi (osobito iz 16SrXII-A skupine) jer pokazuju nisku varijabilnost između njih, usprkos postojanju biološke i genomske raznolikost između dotičnih izolata (Langer i Maixner, 2004; Pacifico i sur., 2009).

U uzorcima ukrasne vrste *Catharanthus roseus* L. (Don.) (madagaskarski zimzelen) prikupljenim u užem centru grada Zagreba na javnim površinama, dokazala sam zarazu fitoplazmatskom vrstom '*Candidatus* Phytoplasma solani' (ribosomska podskupina 16SrXII-A) što ujedno predstavlja i prvi nalaz ove fitoplazme u toj biljnoj vrsti u Hrvatskoj. Pristunost iste fitoplazme potvrđena je i u rajčicama na koje je izvršen je prijenos fitoplazmi cijepljenjem iz prikupljenih biljaka madagaskarskog zimzelena.

Kako bih podobnije istražila gensku varijabilnost analiziranih izolata provela sam multigensku tipizaciju analizom gena *tufB, vmp1*, *secY* i *stamp*. Restrikcijskom analizom gena *tufB* utvrdila sam da uzorci (CR1, CR2, CR3 i CR10) pokazuju jedan restrikcijski obrazac (VK-II ili tuf b) od ukupno tri poznata restrikcijska obrasca (VK-I ili tuf a; VK-II ili tuf b i VK-III ili tuf c) tipična za stolbur(16SrXII-A podskupina)-fitoplazme (Langer i Maixner, 2004). Zanimljivo je da je VK-II ili tuf b obrazac najrašireniji obrazac u Europi (Langer i

Maixner, 2004; Cimerman i sur., 2009; Fialova i sur., 2009; Murolo i sur., 2010). S obzirom da su navedeni literaturni izvori uočili specifičnu vezu između vektora-kukaca, biljnih korova-domaćina i tipa VK-obrasca fitoplazmi, bilo bi zanimljivo provesti dodatna istraživanja na potencijalnim kukcima-vektorima.

Sekvenciranje i filogenetska analiza gena *secY* pokazala je veću konzerviranost ovog gena i prisutnost samo dva genotipa kao rezultat samo jedne nukleotidne promjene, čime je potvrđeno kako gen *secY* nije pogodan kao molekularni marker za istraživanje varijabilnosti fitoplazmatske vrste '*Ca*. P solani'.

Restrikcijskom endonukleazom *Rsa*I razgradila sam umnožene fragmente fitoplazmatskog gena *vmp1* pri čemu je svaki od uzoraka (CR1, CR2, CR3, CR10 i To2) imao jedinstveni restrikcijski profil od ukupno najmanje 21 postojećih obrasaca tipičnih za stolbur-fitoplazme. U samo nekoliko uzoraka, uspjeli smo dokazati najmanje 4 različita restrikcijska obrasca. Dobiveni rezultati su bili sukladni s očekivanjima jer se radi o genu koji kodira za membranski protein, što ga čini izloženim snažnom selekcijskom pritisku koji se očituje u iznimnoj varijabilnosti. Upravo radi izrazito varijabilne genske regije, što je posljedica ponavljajućih slijedova, smatra se da upravo gen *vmp1* omogućuje stoblur-fitoplazmama adaptaciju na nove domaćine-biljke i kukce. Sekvenciranjem i filogenetskom analizom ovog gena potvrđena je prisutnost 5 genotipova kod analiziranih uzoraka. Slično je pokazala i filogenetska analiza gena *stamp* koji kodira za antigenski membranski protein i također je uključen u interakcije s kukcima domaćinima i prilagodbe okolišnim uvjetima, gdje je pronađeno 5 različitih genotipova. Geni za varijabilni membranski protein *vmp1* kao i gen *stamp* specifični su i jedinstveni upravo za vrstu '*Ca*. P solani' te ovakvi rezultati nisu iznenađujući.

Preciznija i detaljnija klasifikacija fitoplazmi ribosomske skupine 16SrXII-A (vrsta '*Ca*. P. solani') vrlo je važna u određivanju epidemiologije, odnosno točnog uzroka i porijekla novih pojava ekonomskih važnih fitoplazmoza te predviđanju smjera njihovog širenja, pri čemu multigenska tipizacija predstavlja obećavajuću metodu za razlikovanje među genetički srodnim izolatima, što nije moguće postići samo na temelju analiza gena za 16S rRNA.

6. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu u uzorcima ukrasnih biljaka vrste *Catharathus roseus* L. (Don.) prikupljenim u užem centru grada Zagreba, specifičnim umnažanjem gena za 16S rRNA lančanom reakcijom polimeraze dokazala sam zarazu fitoplazmom vrste '*Candidatus* Phytoplasma solani' što predstavlja prvi nalaz fitoplazmi na ovoj značajnoj ukrasnoj biljnoj vrsti u Hrvatskoj. Prisutnost iste fitoplazmatske vrste dokazala sam i u biljakama rajčice na koje je zaraza fitoplazmama izvršena putem cijepljenja.

Filogenetske i restrikcijske analize dodatnih molekularnih markera - gena *tufB, vmp1*, *secY* i *stamp* pokazale su da među pronađenim izolatima postoji značajna genska varijabilnost unatoč pripadnosti istoj vrsti. Također sam utvrdila da su se fitoplazmatski geni *secY* (2 genotipa) i *tufB* (1 genotip) pokazali konzerviranijima i manje varijabilnim za razliku od gena *vmp1* i *stamp* (5 genotipova kod oba gena) koji su se pokazali znatno varijabilnijim i informativnijim markerima omogućivši preciznije razlučivanje između blisko povezanih izolata. Razlozi veće varijabilnosti gena *vmp1* i *stamp* leže u činjenici da su oni specifični i jedinstveni upravo za ovu vrstu te kodiraju za membranski proteini koji su u stalnoj interakciji s okolišem te su izloženi pozitivnom selekcijskom pritisku.

7. LITERATURA

Alma A., Bosco D., Danielli A., Bertaccini A., Vibrio M., Arzone A (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs, and adults of *Scaphoideus titanus Ball* reared on healthy plants. *Insect Mol Biol* **6**: 115-121.

Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-Padieu E., Foissac X (2007): Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Dorée Phytoplasma Strain Clusters and Group 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. *Appl Environ Microb* **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*. *Eu J f P Path* **2**: 213-227.

Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S.A., Jancso Radek A., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., Hogenhout S.A (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol* **188**: 3682–3696.

Beanland L., Hoy C.W., Miller S.A., Nault LR (2000): Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (*Homoptera*: *Cicadellidae*). *Ann Entomol Soc Am* **93**: 271–276.

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

Bressan A., Girolami V., Boudon-Padieu, E (2005): Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115**: 283-290.

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

Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac X (2009): Striking Diversity of *vmp1*, a Variable Gene Encoding a Putative Membrane Protein of the Stolbur Phytoplasma. *Appl Environ Microb* **75**: 2951–2957.

Cirillo V.P. (1993): Transport systems in mycoplasmas. *Subcell. Biochem* **20**: 293-310.

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. *Ann Phytopathol Soc Jap* **33**: 259-266.

Elliot S.L., Adler F.R., Sabelis MW (2003): How virulent should a parasite be to its vector? *Ecology* **84**: 2568-2574.

Fabre A., Danet J.L., Foissac X (2011): The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* **2**: 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 J.-L., Šafárová D., Foissac X., Navrátil M (2009): Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in South Moravia. *J Plant Pathol* **91**: 411-416.

Filer D., Furano AV (1980): Portions of the gene encoding elongation factor Tu are highly conserved in prokaryotes. *J Biol Chemistry* **255**: 728-734.

Gasparich GE (2002): Spiroplasmas:evolution, adaptation and diversity. *Front. Biosci.* **7**: d619-640.

Glass J.I., Lefkowitz E.J., Glass J.S., Heiner C.R., Chen E.Y., Cassell GH (2000): The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* **407**: 757–762.

Gundersen D.E., Lee I.-M., Schaff D.A., Harrison N.A., Chang C.J., Davis R.E., Kinsbury 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.

Gundersen D.E., Lee I.-M., Rehner S.A., Davis R.E., Kingsbury DT (1994): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J Bacteriol* **176**: 5244-5254.

Ho K., Tsai C., Chung T (2001): Organization of ribosomal RNA genes from a loofah witches' broom phytoplasma. *DNA Cell Biol* **20**: 115-122.

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

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

Jones J.D., Dangl JL (2006): The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

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

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

Križanac I., Mikec I., Budinščak Ž., Šeruga Musić, M., Škorić D (2010): Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. *J Plant Dis Prot* **117**: 206-213.

Kube M., Mitrovic J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E (2012): Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *Sci World J* **2012**: 185942.

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

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., Bottner-Parker K.D., Zhao Y., Davis R.E., Harrison NA (2010): Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on the *secY* gene. *Int J Syst Evol Microbiol* doi:ijs.0.019695-0.

Lee I.-M., 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**: 87-91.

Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal DE (2000): Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 221–255.

Lherminier J., Prensier G., Boudon-Padieu E., Caudwell A (1990): Immunolabelling of grapevine flavescence doree MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. *J Histochem Cytochem* **38**: 79-85.

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

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

Marcone C., Lee I.M., Davis R.E., Ragozzino A., Seemüller E (2000): Classification of aster yellow-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1703-1713.

Martini M., Lee I.-M., Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan A.J., Osler R (2007): Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Bacteriol* **57**: 2037–2051.

Mikec I., Križanac I., Budinščak Ž., Šeruga Musić M., Krajačić M., Škorić D (2006): Phytoplasmas and their potential vectors in vineyards of indigenous Croatian varieties. In *Proceedings of the 15th Meeting of the ICVG 2006*, Stellenbosch, Republic of South Africa.

Moya-Raygoza G., Nault LR (1998): Transmission biology of maize bushy stunt Phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera:*Cicadellidae*). *Ann Entomol Soc Am* **91**: 668-676.

Murolo S., Marcone C., Prota V., Garau R., Foissac X., Romanazzi G (2010): Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *J Appl Microbiol*. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04835.

Murral D.J., Nault L.R., Hoy C.W., Madden L., Miller SA (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera:*Cicadellidae). J Econ Entomol* **89**: 1223-1232.

Murray R.G., Schleifer EKH (1994): Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 174-176.

Nakashima K., Hayashi T (1995): Multiplication and distribution or rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephytettix cincticeps Ann Phytopathol Soc Jpn* **61**: 519-528.

Oshima K., Maejima K., Namba S (2013): Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Front Microbiol* **4**: 230.

Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H.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. *Nat Genet* **36**: 27–29.

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 Stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology* **99**: 711-715.

Quaglino F., Zhao Y., Casati P. Bulgari D., Bianco P., Wei W., Davis RE (2013): '*Candidatus* Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbus and bois noir related diseases of plants. *IJSEM Papers, 10.1099/ijs.0.44750-0.*

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

Saitou N., Nei M (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.

Schaff D.A., Lee I.-M., Davis R (1992): Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochem Bioph Res Co* **186**: 1503-1509.

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

Seemüller E., Schneider B., Mäurer R., Ahrens U., Daire X., Kison H., Lorenz K.H., Firrao G., Avinent L., Sears B.B., Stackenbrandt E (1994): Phylogenetic classification of phytopatogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 440-446.

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

Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.Y., Yamaji Y., Nishigawa H.,Ugaki M., Namba S (2006): Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4252-7.

Šarić A., Škorić D., Bertaccini A., Vibio M., Murari E (1997): Molecular detection of phytoplasmas infecting grapevines in Slovenia and Croatia. In *Proceedings of the 12th Meeting of the ICVG 1997*, Lisbon, Portugal

Šeruga M., Ćurković Perica M., Škorić D., Kozina B., Mirošević N., Šarić A., Bertaccini A., Krajačić M (2000): Geographical Distribution of Bois Noir Phytoplasmas Infecting Grapevines in Croatia. *Phytopathology* **148**: 239-242.

Šeruga Musić M., Škorić D., Budinščak Ž., Križanac I., Mikec I (2009): Survey of phytoplasma diversity in heavily grapevine yellows-affected areas of Croatia. *Le Progrès Agricole et Viticole Hors Série*: 206-207.

Šeruga Musić M., Krajačić M., Škorić D (2008): The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *J Microbiol Meth* **73**: 69-72.

Šeruga M., Škorić D., Kozina B., Krajačić M (2002): Phytoplasmas in Croatian indigenous grapevine cultivars. In *Proceedings of the 14th Congress of the International Organization for Mycoplasmology*, Vienna, Austria.

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

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

Toruño T.Y., Šeruga Musić M., Simi S., Nicolaisen M., Hogenhout SA (2010): Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol Microbiol* **77**: 1406–1415.

Tran-Nguyen L.T.T., Kube M., Schneider B., Reinhardt R., Gibb KS (2008): Comparative genome analysis of '*Candidatus* Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and '*Ca*. Phytoplasma asteris' Strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol* **190**: 3979-3991.

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

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

Whitcomb R.F., Tully ED (1989): *The Mycoplasmas*, Vol. V. San Diego: *Academic Press, Inc*.

Woese CR (1987): Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221–271.

Yogev D., Sela S., Bercovier H., Razin S (1988): Elongation factor (EF-Tu) gene probe detects polymorphism in *Mycoplasma* strains. *FEMS Microbiol Lett* **50**: 145-149.

http://www.clustal.org

http://dna-_barcoding.blogspot.com/2012_12_01_archive.html

https://dna.macrogen.com/

http://www.genecodes.com/

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

http://www.megasoftware.net

http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3156718_pone.0023242.g001&req=4

http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC_005303&ref=index_15.html

http://137.204.42.130/person/collectionseptember_2003.pdf

https://www.bordeaux.inra.fr/umr1090/coll_isola.htm

8. PRILOG

Prilog 1. Ispis nukleotidnog slijeda gena *secY* za pojedini uzorak fitoplazmi. Naziv uzoraka u skladu sa popisom uzoraka u Tablici 1. poglavlja 3.1.1. Biljni materijali.

>To3

CTTTTTGGTTTAGGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAATTTTTA
CAAAAACTTTTACCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCGGTAAAC
GTAAACTTAACCTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGACAAACT
TTTGGAATGATTCAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGATCCCTTT
AATTGCCGCTGCTGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCAACTCTC
AAGGAATTGGTAATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAATAATTT
AATTGACTCTTTAAAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTACCAAC
AATTTTGACCCAAAATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTGCTTTT
ATTTTTAATTGTAACTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGTACAAT
ACGCTCGCAATCAAAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAAATTAA
CACTGCTGGAGTAATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTTCAAA
ATGTTAATCCCAATAATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAATTATTT
AACTAATATTGACATCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATTATTGT
TTTTTCTTTTTTCTCTACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAGCATTT
ATCCAAACAAGATGCCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAACGA

>To2

GGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAATTTTTACAAAAACTTTTA
CCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCGGTAAACGTAAACTTAAC
CTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGACAAACTTTTGGAATGATT
CAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGATCCCTTTAATTGCCGCTGC
TGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCAACTCTCAAGGAATTGGTA
ATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAATAATTTAATTGACTCTTTA

AAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTACCAACAATTTTGACCCAA
AATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTGCTTTTATTTTTAATTGTAA
CTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGTACAATACGCTCGCAATCA
AAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAAATTAACACTGCTGGAGTA
ATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTTCAAAATGTTAATCCCAAT
AATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAATTATTTAACTAATATTGACA
TCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATTATTGTTTTTTCTTTTTTCTC
TACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAGCATTTATCCAAACAAGATG
CCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAACGA

>CR3

GGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAATTTTTACAAAAACTTTTA
CCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCGGTAAACGTAAACTTAAC
CTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGACAAACTTTTGGAATGATT
CAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGATCCCTTTAATTGCCGCTGC
TGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCAACTCTCAAGGAATTGGTA
ATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAATAATTTAATTGACTCTTTA
AAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTACCAACAATTTTGACCCAA
AATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTGCTTTTATTTTTAATTGTAA
CTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGTACAATACGCTCGCAATCA
AAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAAATTAACACTGCTGGAGTA
ATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTTCAAAATGTTAATCCCAAT
AATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAATTATTTAACTAATATTGACA
TCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATTATTGTTTTTTCTTTTTTCTC
TACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAGCATTTATCCAAACAAGATG
CCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAACGA

>CR2

GGTTTAGGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAATTTTTACAAAA
ACTTTTACCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCGGTAAACGTAAA
CTTAACCTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGACAAACTTTTGGA

ATGATTCAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGATCCCTTTAATTGC
CGCTGCTGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCAACTCTCAAGGGA
TTGGTAATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAATAATTTAATTGAC
TCTTTAAAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTACCAACAATTTTG
ACCCAAAATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTGCTTTTATTTTTAA
TTGTAACTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGTACAATACGCTCGC
AATCAAAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAAATTAACACTGCTG
GAGTAATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTTCAAAATGTTAATC
CCAATAATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAATTATTTAACTAATAT
TGACATCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATTATTGTTTTTTCTTTT
TTCTCTACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAGCATTTATCCAAACA
AGATGCCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAACGA

>CR1

GGTTTAGGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAATTTTTACAAAA
ACTTTTACCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCGGTAAACGTAAA
CTTAACCTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGACAAACTTTTGGA
ATGATTCAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGATCCCTTTAATTGC
CGCTGCTGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCAACTCTCAAGGGA
TTGGTAATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAATAATTTAATTGAC
TCTTTAAAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTACCAACAATTTTG
ACCCAAAATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTGCTTTTATTTTTAA
TTGTAACTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGTACAATACGCTCGC
AATCAAAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAAATTAACACTGCTG
GAGTAATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTTCAAAATGTTAATC
CCAATAATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAATTATTTAACTAATAT
TGACATCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATTATTGTTTTTTCTTTT
TTCTCTACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAGCATTTATCCAAACA
AGATGCCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAACGA

>CR10

GGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAATTTTTACAAAAACTTTTA
CCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCGGTAAACGTAAACTTAAC
CTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGACAAACTTTTGGAATGATT
CAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGATCCCTTTAATTGCCGCTGC
TGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCAACTCTCAAGGAATTGGTA
ATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAATAATTTAATTGACTCTTTA
AAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTACCAACAATTTTGACCCAA
AATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTGCTTTTATTTTTAATTGTAA
CTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGTACAATACGCTCGCAATCA
AAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAAATTAACACTGCTGGAGTA
ATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTTCAAAATGTTAATCCCAAT
AATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAATTATTTAACTAATATTGACA
TCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATTATTGTTTTTTCTTTTTTCTC
TACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAGCATTTATCCAAACAAGATG
CCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAACGA

>62

GGTTTAGGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAATTTTTACAAAA
ACTTTTACCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCGGTAAACGTAAA
CTTAACCTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGACAAACTTTTGGA
ATGATTCAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGATCCCTTTAATTGC
CGCTGCTGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCAACTCTCAAGGAA
TTGGTAATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAATAATTTAATTGAC
TCTTTAAAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTACCAACAATTTTG
ACCCAAAATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTGCTTTTATTTTTAA
TTGTAACTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGTACAATACGCTCGC
AATCAAAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAAATTAACACTGCTG
GAGTAATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTTCAAAATGTTAATC
CCAATAATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAATTATTTAACTAATAT
TGACATCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATTATTGTTTTTTCTTTT

TTCTCTACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAGCATTTATCCAAACA
AGATGCCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAACGA

>342

TCAAAACTTTTTGGTTTAGGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAA
TTTTTACAAAAACTTTTACCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCG
GTAAACGTAAACTTAACCTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGA
CAAACTTTTGGAATGATTCAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGAT
CCCTTTAATTGCCGCTGCTGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCA
ACTCTCAAGGGATTGGTAATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAAT
AATTTAATTGACTCTTTAAAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTA
CCAACAATTTTGACCCAAAATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTG
CTTTTATTTTTAATTGTAACTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGT
ACAATACGCTCGCAATCAAAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAA
ATTAACACTGCTGGAGTAATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTT
CAAAATGTTAATCCCAATAATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAAT
TATTTAACTAATATTGACATCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATT
ATTGTTTTTTCTTTTTTCTCTACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAG
CATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAA
CGA

>334

TCAAAACTTTTTGGTTTAGGCATTTATCCTTATATTACAGCTTCTATTGTAGTTCAA
TTTTTACAAAAACTTTTACCTATTTGCCGTGAGTGGAAAGAACAAGGCCAAATCG
GTAAACGTAAACTTAACCTTTTAACTAGGGCTTTAGCTTTATTATTTGTTTTTGGA
CAAACTTTTGGAATGATTCAAAAAACAAGTGATTCATTGGCAGTTTGCTTTTTGAT
CCCTTTAATTGCCGCTGCTGGATGTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGATTTAATCA
ACTCTCAAGGGATTGGTAATGGAACTTCTATTTTAATTATGGCCTCAATGAGTAAT
AATTTAATTGACTCTTTAAAAGAAATAAAACAAAATTATTACGACAATTTATTTA
CCAACAATTTTGACCCAAAATTGCTAACACAATTTATTTTAATTATCTTAGTATTG
CTTTTATTTTTAATTGTAACTGTGATTGTCCAAATTACTTCTTTAAAAATACCAGT

ACAATACGCTCGCAATCAAAGTCCATCAAAAAGTAATAGTTATATCCCTTTTAAA
ATTAACACTGCTGGAGTAATGCCTGTAATTTTGGCAAATGCCTTGATGCAACCTTT
CAAAATGTTAATCCCAATAATTAAAAATAATCAAGGTTTTGAGAATTTTGTCAAT
TATTTAACTAATATTGACATCGTTAATTTTGCTTTGAGCTTGCATATTTTATTAATT
ATTGTTTTTTCTTTTTTCTCTACTTTTATGAATGTTAATCCTGAAGATATTTCCGAG
CATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTGTTGGTTTTAGACCAGGAGAACAAACAA
CGA

Prilog 2. Ispis nukleotidnog slijeda gena *stamp* za pojedini uzorak fitoplazmi. Naziv uzoraka u skladu sa popisom uzoraka u Tablici 1. poglavlja 3.1.1. Biljni materijali.

>CR1

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTACTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAGGTAAAGATTT
ACCAACAGGAACAGAAACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAATCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGA
TGTTACAGAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACT
CTTAAATCTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTTAAACGCA
GAGATCTTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTCT
GGACATCAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCTG
GAGTTGCTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

>CR2

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTACTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAGGTAAAGATTT
ACCAACAGGAACAGACACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAATCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGA
TGTTACAGAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACT
CTTAAATCTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTTAAACGCA
GAGATCTTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTCT

GGACATCAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCTG
GAGTTGCTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

>CR3

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTACTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAGGTAAAGATTT
ACCAACAGGAACAGACACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAATCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGA
TGTTACAGAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACT
CTTAAATCTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTAAAACGC
AGAGATCTTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTC
TGGACATCAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCT
GGAGTTGCTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

>CR10

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTATTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAAGTAAAGATTT
ACCATCAGGAACAGAAACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGATGTTACA
GAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACTCTTAAAT
CTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTTAAACGCAGAGATC
TTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTCTGGACAT
CAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCTGGAGTTG
CTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

>SA-1

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTATTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAAGTAAAGATTT
ACCATCAGGAACAGAAACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA

TCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGATGTTACA
GAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACTCTTAAAT
CTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTTAAACGCAGAGATC
TTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTCTGGACAT
CAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCTGGAGTTG
CTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

>To2

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTATTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAAGTAAAGATTT
ACCATCAGGAACAGAAACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGATGTTACA
GAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACTCTTAAAT
CTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTTAAACGCAGAGATC
TTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTCTGGACAT
CAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCTGGAGTTG
CTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

>To3

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTATTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAAGTAAAGATTT
ACCATCAGGAACAGAAACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGATGTTACA
GAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACTCTTAAAT
CTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTTAAACGCAGAGATC
TTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTCTGGACAT
CAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCTGGAGTTG
CTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

>CR5

ATGCAAAACACAAAAAAATCTTTAGTTATTAAATTAACTACTTTATTTGTTGTTGC
TTTTGTTAGTTTGTTTGCTGCGACTTCAGCTTTTGCTGCTTTCGGAGGTAAAGATTT
ACCATCAGGAACAGACACAAAAGAAGTTGCTATCAGCACAGATGATGTAACAAA
TCAAAGTGAACTTGTAAAAGCTTTGAAAAAAATTGAAGCATTAAAAGATGTTACA
GAAAAGGATTTTGATGCTGTATTAAGCACCGATAAAAGAGAGATAACTCTTAAAT
CTAAAGATGGCGGACAATTTAAAGCTGGTGAAATTAAAGTTAAACGCAGAGATC
TTAATGATACAGAAAAAGCCGAAAAAGAAGCTGAAAAAGGTTCATTCTGGACAT
CAACTCTTTTTATCGTTCTTTACGTTGTAGCTGGTGTTTTAGTTGTAGCTGGAGTTG
CTTTCTTTGTTATTAAAAAAAGAAGACAATAA

Prilog 3. Ispis nukleotidnog slijeda gena *vmp1* za pojedini uzorak fitoplazmi. Naziv uzoraka u skladu sa popisom uzoraka u Tablici 1. poglavlja 3.1.1. Biljni materijali.

>CR1

AATGTCGTTTTGACTTTCGCTTCAACTAAACATTTGGTAGCTGCAGCCAGTACAAC
TGCTTCTAATTTGGAAGGAACAGTAACATATAATAACACCACCCCAACCATAGCA
CAATTAAATAGTTTGTTAAAATCAACAAATACAGCGATTATTTTAACTAGTGAAG
AAAGCAGAAACCCTAATCATCAATCAGTTTTAAATAAAGTTTTAAACCCTGGCCA
AAATTTATCTTCAGAGATGGTTAATATTAGTTTTAACAGCAGCACTTCTGAATTAA
AAATAGCAGTGGCAAGCAGTTGTTGTACAATAACAGGCTCAGAAGTTGTTTTTAA
CCAAATATCAGTCACCCAAGATTTAAGCACTTTCACAAAAACTCCAACAGATCAA
GCAATTACTGTTACACAAGCAGAATCTACAAATCCAACCCAAGGGACTGTAAATA
AGTTCTTACAAACAGCTGGTTCATTGACTGTAGGTACTGATGTAACATTTACATTT
AACGCTAACGAAAGAAAAGCAACCCTTGCTGTTGTTGCAAATTCTACTAGAGCAC
AAGGTGATAATGTTGTATTTACTAATGTAACAGTAACAGTAGAAAAACAAGATTT
AAGCACTTTCACACACGATGATAAAAATAAAGCAATTACTATTACACAAGCAGA
AGTTACAACTCAAACCCAAGCGACTGTAAATAAGTTCTTACAAACACCTGACACA
TTGACTTTAGGTACTGATGTAACAATTACATTTAATGCTAACGAAAGAAAAGCAA
CCCTTACTGCGGCTCCAAATTCTACTAAAGTACAAGGTGATAATGTTGTATTTACT
AATGTAACAGTAGAAAAACCAGCATTAAACACTTTCACACACGATGATAAAAAT

AAAGCAATTACTGTTACACAAGCAGAAGTTACAAGTAAAGACCAAAATGCTTTA
AATAAATTCTTAAAACAAGCTGGTTCATTAACTGTAAATACTGATGCAACAATTG
AATTTGATACTACCAACAAAAAAGCAACCCTTACTGCGGCTCAAAATTCTACTAA
AGCACAAGGTAGTGTTGTATTTACTAATGTAACAGTAGAAAAACCAGCATTAAAC
ACAACATTAACAGTAAAAGAGTTAGGTCAAATAAATGCAAGAACTCAAGCTGCA
GTTAAAGCTGCAATGTTAAGTAAAAATACTAATTTACAAAATGTAGACCAAAATA
GATTTACAATTACTTTAGATACTGATGCTAGCAAAAGTAACGCAAAAGTAACGCA
TCCAGATTTTGCTGGTGAAGTAGAAGTTTCATTTAGCGTTCAACTTAAATTAGAAT
CTATC

>CR2

CCTAATCAAACAACATTGTCATTAAACAATGTCGTTTTGACTTTCGCTTCAACTAA
ACATTTGGTAGCTGCAGCCAGTACAACTGCTTCTAATTTGGAAGGAACAGTAACA
TATAATAACACCACCCCAACCATAGCACAATTAAATAGTTTGTTAAAATCAACAA
ATACAGCGATTATTTTAACTAGTGAAGAAAGCAGAAACCCTAATCATCAATCAGT
TTTAAATAAAGTTTTAAACCCTGGCCAAAATTTATCTTCAGAGATGGTTAATATTA
GTTTTAACAGCAGCACTTCTGAATTAAAAATAGCAGTGGCAAGCAGTTGTTGTAC
AATAACAGGCTCAGAAGTTGTTTTTAACCAAATATCAGTCACCCAAGATTTAAGC
ACTTTCACAAAAACTCCAACAGATCAAGCAATTACTGTTACACAAGCAGAATCTA
CAAATCCAACCCAAGGGACTGTAAATAAGTTCTTACAAACAGCTGGTTCATTGAC
TGTAGGTACTGATGTAACAATTACATTTAACGCTAACGAAAGAAAAGCAACCCTT
GCTGTTGTTGCAAATTCTACTAGAGCACAAGGTGATAATGTTGTATTTACTAATGT
AACAGTAACAGTAGAAAAACAAGATTTAAGCACTTTCACACACGATAATAAAAA
TAAAGCAATTACTATTACACAAGCAGAATCTACAACTCCAACTCAAGACACTTTA
AATAAATTCTTACAAACAGCTGGTTCATTGACTGTAGGTACTGATGTAACATTTA
CATTTAATGCTAACGAAAGAAAAGCAACCCTTGCTTCGGCTCCAGATTCTACTAA
AGTACAAGGTAGTGTTGTATTTACTAATGTAACAGTAGAAAAACAAGATTTAAGC
ACTTTCACAAAACCTACAACTGAAACAATTACTGTTACACAAGCAGAATCTACAA
ATCCAACCCAAGCGACTGTAAATAAGTTATTACAAACAGATGGTTCATT

>CR3

TTGTCATTAAACAATGTCGTTTTGACTTTCTCTTCAACTCGACATTTGGTAGCTGC
AGCCAGTACAACTGCTTCTAATTTGGAAGGAACAGTAACATATAATAAAACAAA
ACCAACCATAGCACAATTAAATAGTTTGTTAAAATCAACAAATACAGCGATTATT
TTAACTAGTGAAGAAAGCAGAAACCCTAATCATCAATCAGTTTTAAATAAAGTTT
TAAACCCTGGCCAAAATTTATCTTCAGAGATGGTTAATATTAGTTTTAACAGCAG
CACTTCTGAATTAAAAATAGCAGTGGCAAGCAGTTGTTGGACAATAACAGGCTCA
GAAGTTGTTTTTAACCAAATATCAGTCACCCAAGATTTAAGCAATTTCACAAAAA
CTCCAACAGATCAAGCAATTACTGTTACACAAGCAGAAGTTACAAGTAAAGACC
AAAATGCTTTAAATAAATTCTTAAAACAAGCTGGTTCATTAACTGTAAATACTGA
TGCAACAATTGAATTTGATACTACCAACAAAAAAGCAACCCTTACTGCGACTCCA
AATTCTACTAAAGCAGAAGGTGATAATGTTGTATTTACTAATGTAACAGTAACAG
TAGAAAAACCACAATTAAACACTTTCACACACGATGATAAAAATAAAGCAATTA
CTGTTACACAAGCAGAAGTTACAACTCAAACCCAAGCGACTGTAAATAAGTTCTT
ACAAACACCTGACACATTGACTTTAGGTACTGATGTAACAATTACATTTAATGCT
AACGAAAGAAAAGCAACCCTTACTGCGGCTCCAAATTCTACTAAAGTACAAGGT
GATAATGTTGTATTTACTAATGTAACAGTAGAAAAACCAGCATTAAGCACTTTCA
CACACGATGATAAAAATAAAGCAATTACTGTTACACAAGCAGAAGTTACAACTC
AAACCCAAGACACTTTAAATAAATTATTAAAAAAAGATGATTCATTAACTGTAAA
TACTGATGCAACAATTGAATTTGATACTACCAACAAAAAAGCAACCCTTACTGCG
GCTCAAAATTCTACTAAAGCACAAGGTAGTGTTGTATTTACTAATGTAACAGTAG
AAAAACCAGCATTAAACACAACATTAACAGTAAAAGAGTTAGGTCAAATAAATG
CAAGAACTCAAGCTGCAGTTAAAGCTGCAATGTTAAGTAAAAATACTAATTTACA
AAATGTAGACCAAAATAGATTTACAATTACTTTAAATACTGATGCTAGCAAAAGT
AACGCAAAAGTAACGCATCCAGATTTTGCTGGTGAAGTAGAAGTTTCATTTAGCG
TTCAACTTAAATTAGA

>CR10

TCATTAAACAATGTCGTTTTGACTTTCGCTTCAACTAAACATTTGGTAGCTGCAGC
CAGTACAACTGCTTCTAATTTGGAAGGAACAGTAACATATAATAACACCACCCCA
ACCATAGCACAATTAAATAGTTTGTTAAAATCAACAAATACAGCGATTATTTTAA
CTAGTGAAGAAAGCAGAAACCCTAATCATCAATCAGTTTTAAATAAAGTTTTAAA

CCCTGGCCAAAATTTATCTTCAGAGATGGTTAATATTAGTTTTAACAGCAGCACTT
CTGAATTAAAAATAGCAGTGGCAAGCAGTTGTTGTACAATAACAGGCTCAGAAG
TTGTTTTTAACCAAATATCAGTCACCCAAGATTTAAGCACTTTCACAAAAACTCCA
ACAGATCAAGCAATTACTGTTACACAAGCAGAAACTACAAATCCAACCCAAGCG
ACTGTAAATAAGTTCTTACAAACACCTGACACATTGACTATAAATACTGATGTAA
CAATTACATTTAATGCTAACGAAAGAAAAGCAACCCTTGCTGTTGTTGCAAATTC
TACTAAAGCACAAGGTAGTGTTGTATTTACTAATGTAACAGTAGAAAAACAAGAT
TTAAGCACTTTCACAAAAACTCCAACAGATCAAGCAATTACTGTTACACAAGCAG
AATCTACAACTCAAACCCAAGACACTTTAAATAAATTCTTAAAAACAGCTAACAA
ATTGACTATAAATACTGATGTAACAATTACATTTAATGCTAACGAAAGAAAAGCA
ACCCTTGCTGTTGTTGCAAATTCTACTAAAGTACAAGGTAGTGTTGTATTTACTAA
TGTAACAGTAGAAAAACAAGATTTAAGCACTTTCACAAAACCTACAACTGAAAC
AATTACTGTTACACAAGCAGAAGTTACAAGTAAAGACCAAAATGCTTTAAATAA
ATTCTTAAAACAAGCTGGTTCATTAACTGTAAATACTGATGCAACAATTGAATTT
GATACTACCAACAAAAAAGCAACTATTATTGCGACTCCCAATTCTACTAAAGCCC
AAGGGAGGGTGGGATTTACAAATGTAACAGTAGAAAAACCC

>To2

TTGTCATTAAACAATGTCGTTTTGACTTTCGCTTCAACTCAACATTTGGTAGCTGC
AGCCAGTACAACTGCTCCTAATTTGGAAGGAACAGTAACATATGATGACACCACC
TCAACCATAGCACAATTAAATAGTTTGTTAAAATCAACAAATACAGCGATTATTT
TAACTAGTGAAGAAAGCAGAAACCCTAATCATCAATCAGTTTTAAATAAAGTTTT
AAACCCTGGCCAAAATTTATCTTCAGAGATGGTTAATATTAGTTTTAACAGCAGC
ACTTCTGAATTAAAAATAGCAGTGGCAAGCAGTTGTTGGACAATAACAGGCTCAG
AAGTTGTTTTTAACCAAATATCAGTCACCCAAGATTTAAGCACTTTCACAAAAAC
TCCAACAGATCAAGCAATTACTGTTACACAAGCAGAAACTACAAATCCAACCCA
AGCGACTGTAAATAAGTTCTTACAAACACCTGACACATTGACTGTAAATACTGAT
GTAACAATTACATTTGATGCTAACGAAAGAAAAGCAACCCTTGCTGCTGCTGCAA
ATTCTACTAAAGCACAAGGTAGTGTTGTAGTTACTACTGTAGCAGTAGAAAAACT
AGATTTAAGCACTTTCACAAAAACTCCAACCGATCATGCAATTACTGTTACACCA
GCAGAAGCTACAGCAGAAACCCCTGACACTTTAGATAAATTCTTAAAAACAGCTA
ACACATTGACTATAAATACTGATGTAACAGATACATTTAATGCTAACGAAAGAAA

AGCAACCCTTGCTGCTGTTGCAGCTTCTACTAAAGTACCATGTAGTGTTGTAGTTA
CTGATTGTATCTGTAGA

9. ŽIVOTOPIS

Curriculum Vitae

Ime i prezime: Tanja Zovkić
Adresa: Prebivalište: Trg kralja Zvonimira 12, 32 270 Županja, Hrvatska

Boravište: Nova cesta 47, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Telefonski brojevi: 032/ 832-112 Broj mobilnog telefona: 098/ 940-50-08

01/ 363 46 01

E-mail: zovkic.tanja@gmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum rođenja: 04.04.1989.

Obrazovanje

2008.-upisan Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer biologije i kemije na Biološkom odsjeku

2008.-završena Prirodoslovno-matematička gimnazija, Veliki kraj 42, Županja

2004.-završena OŠ Mato Lovrak, Alojzija Stepinca 18, Županja

Radno iskustvo

Višegodišnji sudionik projekta “Noć biologije”:

2009.-član organizacijskog tima (koordinacija aktivnosti sa sponzorima projekta, vodstvo grupa posjetitelja po prostorima zavoda za molekularnu biologiju)

2010.-član organizacijskog tima

2011.-član radionice održane na zavodu za animalnu fiziologiju

2014.-osnivač i predavač na radionici: Kolijevka života, „*Omne vivum ex ovo*”

2012.-2013.-rad preko studentskog ugovora za tvrtu T-Hrvatski Telekom (T-HT): završila edukaciju o uslugama, završila edukaciju o teleprodaji i komunikacijskim vještinama

Znanja i vještine

Materinji jezik: Hrvatski

Ostali jezici: Engleski (B2)

Njemački (A1)

Društvene vještine i kompetencije: Podržavam ugodno radno okruženje i zajedništvo kao važan dio posla i uspjeha, toleranciju u međuljudskim odnosima, uvažavanje i poštivanje drugačijeg mišljenja.

Organizacijske vještine i kompetencije: Podjednako sam produktivna u timskom i u samostalnom radu. Pri tome posebnu pažnju pridajem određivanju prioriteta i planiranju unaprijed. Zadatke izvršavam unutar predviđenih rokova, a vrijeme koje imam na raspolaganju koristim na najbolji mogući način za postizanje što boljih rezultata.

Računalne vještine i kompetencije: Vješto korištenje Microsoft Office alata (Word, Excel, PowerPoint), rad s bazama podataka (PubMed).

Vozačka dozvola: Kategorija B

Aktivnosti/Interesi

Druženje s obitelji i prijateljima, odlazak u kino, čitanje i učenje novih vještina te razne sportske aktivnosti u prirodi.