

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jernej PAVŠIČ

**GENSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV FITOPLAZEM SKUPINE AP
V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENE DIVERSITY OF SLOVENIAN PHYTOPLASMA ISOLATES
FROM AP GROUP**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija biologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratorijih Oddelka za biologijo in sistemsko biologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija oddelka za biologijo je dne 03.06.2011 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Marino Dermastia, za recenzenta pa prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Marina DERMASTIA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 11.10.2011

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jernej PAVŠIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 577.21:579.2(497.4)(043.2)=163.6
KG Fitoplazme/fitoplazma AP/fitoplazma PD/fitoplazma ESFY/izdelava oligonukleotidnih začetnikov/ugnezdena reakcija PCR/določanje nukleotidnega zaporedja/16S/23S rRNA/*secY*/*aceF*/*imp*/*pnp*/
KK
AV PAVŠIČ, Jernej
SA DERMASTIA, Marina
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biologije
LI 2011
IN GENSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV FITOPLAZEM SKUPINE AP V SLOVENIJI
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 64 str., 20 preg., 48 sl., 4 pril., 86 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Fitoplazme so bakterije brez celične stene, ki so obligatni paraziti na rastlinah in žuželkah. Fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (skupina AP) povzročajo bolezni na sadnem drevju. Fitoplazme metličavosti jablan (AP), fitoplazme umiranja hrušk (PD) in fitoplazme leptonekroze koščičarjev (ESFY) so razširjene po celotni Sloveniji, na zdrava drevesa se prenašajo s cepljenjem z okuženim cepilnim materialom ter z žuželčjimi prenašalci iz družine bolšic (Psyllidae) in škržatkov (Cicadellidae). Ker je v primeru epidemije poleg eliminacije okuženih dreves potrebno poznati tudi vir okužbe, je nujno poznavanje povezave med geografsko lego, sorto in specifičnim genotipom fitoplazem, saj le tako lahko določimo vir okužbe. Namen naše diplomske naloge je bil razširiti poznavanje raznolikosti genomskega odseka 16S/23S rRNA med slovenskimi izolati fitoplazme PD, ter poiskati neribosomske genomske odseke, ki bi nam v prihodnje omogočili boljše razlikovanje med sorodnimi fitoplazmami iz skupine AP. S pomočjo protokolov JP-A in JP-B ter na novo izdelanega para oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r, smo z ugnezdeno reakcijo PCR pomnožili 1630 bp dolg genomski odsek 16S/23S rRNA, ki pripada različnim slovenskim izolatom fitoplazme PD. Očiščenim produktom PCR smo nato določili nukleotidna zaporedja ter jih primerjali med seboj. Dobili smo tri različne tipe zaporedij, ki smo jih označili z A, B in C. Tip A pripada 20 fitoplazmam, tipa B in C pa le eni oz. dvema fitoplazmama. Le trije različni genotipi nakazujejo majhno genetsko raznolikost ter slabo uporabnost genomskega odseka 16S/23S rRNA za nadaljnje raziskave raznolikosti fitoplazem sadnega drevja v Sloveniji. Neribosomski genomski odseki *imp*, *secY* in *aceF*, ki smo jih analizirali z vzporejanjem v soseske v programu Contig Express, so veliko bolj raznoliki ter posledično uporabnejši za nadaljno genotipizacijo fitoplazem iz skupine AP. Genomski odsek *pnp* se je izkazal za bolj podobnega od ostalih neribosomskih genomskih odsekov, tako da ga priporočamo le za uporabo v metodi MLSA.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.21:579.2(497.4)(043.2)=163.6
CX Phytoplasmas/AP phytoplasma/PD phytoplasma/ESFY phytoplasma/primer design/nested PCR/sequencing/16S/23S rRNA/*secY*/*aceF*/*imp*/*pnp*/
CC
AU PAVŠIČ, Jernej
AA DERMASTIA, Marina
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Program in Biology
PY 2011
TI GENE DIVERSITY OF SLOVENIAN PHYTOPLASMA ISOLATES FROM AP GROUP
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 64 p., 20 tab., 48 fig., 4 ann., 86 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Phytoplasmas are bacteria without cell walls that are obligate parasites in plants and insects. Phytoplasmas from the Apple proliferation group (AP group) cause severe diseases on fruit trees. Apple proliferation phytoplasma (AP), Pear decline phytoplasma (PD) and European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY) are widespread in Slovenia. They are transmitted from the infected to healthy trees by grafting with infected propagating material or by insect vectors from the family psyllids (Psyllidae) or leafhoppers (Cicadellidae). In case of epidemic, we must root out all the infected trees, but also analyze the connection between the genotype, region and the cultivar in order to prevent further spreading of disease from its primary source. The goal of our research was to enlarge our knowledge about the diversity of 16S/23S rRNA genomic region among Slovenian isolates of PD phytoplasma, and also to uncover other nonribosomal genomic regions, that are more diversified and therefore represent better tools for further genotype analyses of closely related phytoplasmas from the AP group. We multiplied the 1630 bp long 16S/23S rRNA genomic region of PD phytoplasma by a nested PCR, which based on the protocols JP-A and JP-B with newly designed primer pair PD1-f/r. We analyzed the nucleotide sequences of the purified PCR products and compare them with each other. The comparison gave us three different genotypes, sequence type A, B and C. A sequence type A belongs to 20, type B to one and type C to two PD phytoplasma isolates in Slovenia. Only three different genotypes indicate low genetic variability of 16S/23S rRNA genomic region among PD phytoplasmas, which is why we do not recommend its use in further genotype analyses of the Slovenian AP group phytoplasmas. In contrast to 16S/23S rRNA, analyses of the nucleotide sequences in a Contig Express showed that nonribosomal genomic regions *imp*, *secY* and *aceF* are far more diverse and therefore we consider them as more useful for genotyping analyses of phytoplasmas from the AP group. A genomic region *pnp* is less diverse than other analyzed nonribosomal genomic regions, thus we recommend its usage for genotyping analyses only as a part of the MLSA method.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 Fitoplazme	2
2.2 Fitoplazme sadnega drevja	8
2.3 Namen diplomskega dela in hipoteze	16
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 Material	17
3.2 Shematičen pregled metodologije, ki smo jo uporabili v diplomu	17
3.3 Reakcije PCR za pomnoževanje DNA fitoplazem iz skupine AP	19
3.4 Agarozna gelska elektroforeza	24
3.5 Izolacija produktov PCR za nadaljnje določanje nukleotidnega zaporedja	26
3.6 Računalniška izdelava oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r, PD5-f/r in JPR1/JPR1	27
3.7 Obdelava nukleotidnih zaporedij	27
4 REZULTATI	28
4.1 Optimizacija diagnostičnega protokola fitoplazem iz skupine ap z ugnezdno reakcijo PCR	28
4.2 Določanje nukleotidnega zaporedja v različnih izolatih fitoplazme PD	30
4.3 Primerjave podobnosti neribosomskih genov ter njihovih aminokislinskih produktov pri fitoplazmah iz skupine AP	39
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	57
5.1 Razprava	57
5.2 Sklepi	62
6 POVZETEK	63
7 VIRI	65
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled oligonukleotidnih začetnikov za reakcije PCR, ki smo jih uporabili v nalogi.	20
Preglednica 2: Zgradba različnih protokolov. Protokol JP-A je končna verzija protokola, ki smo ga med poskusi optimizirali in spreminjali. V nadaljevanju se ta vmesni protokol omenja kot protokol JP-AX, vse razlike glede na protokol JP-A pa so omenjene zraven.	21
Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR po protokolih 1, 2 in JP-A. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so fF/7R.	21
Preglednica 4: Nastavitve programa za reakcijo PCR po protokolih 1, 2 in JP-A.	22
Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice ugnezdene reakcije PCR po protokolih 1 in 2. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so f01/r01.	22
Preglednica 6: Nastavitve programa za ugnezdene reakcije PCR po protokolih 1 in 2.	22
Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR po protokolih 3 in JP-B. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so P1/P7.	22
Preglednica 8: Nastavitve programa za reakcijo PCR po protokolih 3 in JP-B.	22
Preglednica 9: Sestava reakcijske mešanice ugnezdene reakcije PCR po protokolih 3 in JP-B. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so f01/r01 (protokol 3) ali PD1-f/r (protokol JP-B).	23
Preglednica 10: Nastavitve programa za ugnezdene reakcije PCR po protokolu 3.	23
Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-A. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so PD1-f/r.	23
Preglednica 12: Nastavitve programa za ugnezdene reakcije PCR po protokolih JP-A in JP-B.	23
Preglednica 13: Pregled sestavin 50x pufru TAE.	25
Preglednica 14: Sestavine za pripravo agaroznega gela glede na velikost banjice in nosilca.	25
Preglednica 15: Primerjava uspešnosti treh različnih protokolov za ugnezdene reakcije PCR z začetniki, specifičnimi za fitoplazme iz skupine AP.	30
Preglednica 16: Osnovne značilnosti sintetiziranih oligonukleotidnih začetnikov; T _m predstavlja temperaturo, ko se 50% začetnikov veže na DNA; vsebnost GC pove koliko % začetnika je sestavljenega iz gvanina ali citozina.	31
Preglednica 17: Osnovne značilnosti izdelanih oligonukleotidnih začetnikov JPF1/R1; T _m predstavlja temperaturo, ko se 50% začetnikov veže na DNA; vsebnost GC pove koliko % začetnika je sestavljenega iz gvanina ali citozina.	36
Preglednica 18: Primerjava uspešnosti določanja nukleotidnega zaporedja produktov PCR. S temno zeleno barvo so označeni produkti PCR, ki so bili pomnoženi po protokolih JP-A in JP-AX. Vseh šest serij je imelo skupno osnovno reakcijo PCR, nato pa je sledilo šest ugnezdenih reakcij PCR. Z modro barvo so obarvani produkti PCR, pomnoženi po protokolu JP-B.	37
Preglednica 19: Številka vzorcev in njihov tip zaporedja, lokacija nabiranja ter sorta. Z rjavo barvo so označeni vzorci, katerim nismo določili zaporedja. Vzorci s tipom zaporedja A so označeno z zeleno barvo, vzorci s tipom zaporedja B z oranžno in vzorci s tipom zaporedja C z modro barvo.	38
Preglednica 20: Opis nastalih mutacij med zaporedji fitoplazme PD. Za prvotno zaporedje smo vzeli tip A, tipa B in C pa sta mutirana.	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Fitoplazme znotraj celice sitaste cevi. Slika je bila posneta z elektronskim mikroskopom. Foto: Magda Tušek Žnidaršič.	3
Slika 2: Nasad sadnega drevja znotraj mrežnika. Foto: arhiv NIB.	9
Slika 3: Rdečenje in zvijanje listov pri hruški, okuženi s fitoplazmo PD. Foto: Nina Prezelj.	11
Slika 4: Bolezenska znamenja na koščičarju, okuženim s fitoplazmo ESFY. Foto: Barbara Ambrožič Turk.	13
Slika 5: Shematičen prikaz linearnega kromosoma fitoplazme AP (Kube in sod., 2008).	14
Slika 6: Zgradba večjega dela operona rRNA. P1 in P7 sta univerzalna oligonukleotidna začetnika za vse vrste fitoplazem. Dolžine določenih odsekov so simbolične.	14
Slika 7: Shema primerjave različnih protokolov pomnoževanja DNA z za skupino AP specifično ugnezdene reakcije PCR.	17
Slika 8: Shema določanja nukleotidnega zaporedja genomskega odseka 16S/23S rRNA pri fitoplazmah PD.	18
Slika 9: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu 1; 1% agarozni gel; 63/08 je pozitivna kontrola za fitoplazmo AP, 680/08 je pozitivna kontrola za fitoplazmo ESFY, 630/08 je pozitivna kontrola za fitoplazmo PD; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 pa je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR; znak ner. v spodnjem delu slike označuje neredčen vzorec, znak 10x pa predstavlja desetkrat redčen vzorec.	28
Slika 10: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu 3; 1% agarozni gel; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR; M - vzorec z veliko tarčne DNA, S - vzorec s srednjo količino tarčne DNA, Š - vzorec z malo tarčne DNA.	29
Slika 11: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu 2; 1% agarozni gel; velikost fragmentov okoli 1100 bp; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR; M - vzorec z veliko tarčne DNA, S - vzorec s srednjo količino tarčne DNA, Š - vzorec z malo tarčne DNA.	29
Slika 12: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu 1; 1% agarozni gel; velikost fragmentov okoli 1100 bp; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR; M - vzorec z veliko tarčne DNA, S - vzorec s srednjo količino tarčne DNA, Š - vzorec z malo tarčne DNA.	30
Slika 13: Sekundarna struktura ali »hairpin« obeh oligonukleotidnih začetnikov (zgoraj) in njun dimer (spodaj).	31
Slika 14: Sekundarna struktura ali »hairpin« obeh oligonukleotidnih začetnikov (zgoraj) in njun dimer (spodaj).	31
Slika 15: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-AX z začetniki PD1-f/r; 2% agarozni gel; velikost fragmentov je okoli 1730 bp; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.	32
Slika 16: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-AX z začetniki PD5-f/r; 2% agarozni gel; velikost fragmentov je okoli 1730 bp; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.	33
Slika 17: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-AX; 2% agarozni gel; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.	34
Slika 18: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-A; 2% agarozni gel; velikost fragmentov okoli 1730 bp; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.	35
Slika 19: Grafični prikaz mesta vezave oligonukleotidnih začetnikov ter smer delovanja polimeraze. Začetniki so označeni s sivimi kvadrati, puščica, ki izhaja iz njih, pa predstavlja smer in dolžino delovanja polimeraze. S črnima črtama je označena dvojna vijačnica DNA, dolga okoli 1730 bp, ki smo jo predhodno pomnožili. Z rdečo barvo je označeno določanje	

zaporedja, ki ga omogočita začetnika JPF1/JPR1, z zeleno barvo pa določanje zaporedja, ki ga omogočata začetnika PD1-f/r.	36
Slika 20: Primer kromatograma uspelega določanja nukleotidnega zaporedja. Vrhovi so samostojni in se ne prekrivajo.	37
Slika 21: Primer kromatograma neuspelega določanja nukleotidnega zaporedja. Vrhovi se prekrivajo.	37
Slika 22: Grafična predstavitev razlik med tipi zaporedja A, B in C. Zaporedje je dolgo okoli 1630 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki s pomočjo števila nad njimi označujejo dolžino zaporedja. Znaki od M1 do M5 predstavljajo spremembo nukleotida, ki je natančneje opisana v preglednici 20.	39
Slika 23: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja dela gena <i>secY</i> znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Zaporedje je dolgo približno 670 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označena mesta, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-tri zaporedja; PD-pet zaporedij; AP-štiri zaporedja.	40
Slika 24: Grafična predstavitev podobnosti aminokislinskega zaporedja proteina, kodiranega z genom <i>secY</i> , znotraj skupine fitoplazem ESFY, PLN, PD in AP. Aminokislinsko zaporedje je dolgo približno 214 aminokislin. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označene črte, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje v eni AK. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število AK zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-dve zaporedji in PLN-eno zaporedje; PD-pet zaporedij; AP-štiri zaporedja.	40
Slika 25: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>secY</i> pri fitoplazmi ESFY.	41
Slika 26: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>secY</i> pri fitoplazmi PD.	41
Slika 27: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>secY</i> pri fitoplazmi AP.	42
Slika 28: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>secY</i> , pri fitoplazmah ESFY in PLN.	42
Slika 29: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>secY</i> , pri fitoplazmi PD. ...	43
Slika 30: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>secY</i> , pri fitoplazmi AP. ...	44
Slika 31: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja dela gena <i>aceF</i> znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Zaporedje je dolgo približno 750 bp pri fitoplazmah ESFY in PD, ter 706 bp pri fitoplazmi AP. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označena mesta, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-11 zaporedij; PD-sedem zaporedij; AP-šest zaporedij.	45
Slika 32: grafična predstavitev podobnosti aminokislinskega zaporedja proteina, kodiranega z genom <i>aceF</i> , znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Aminokislinsko zaporedje je dolgo približno 250 aminokislin. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označene črte, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje v eni AK. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število AK zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-11 zaporedij; PD-šest zaporedij; AP-štiri zaporedja.	45
Slika 33: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>aceF</i> pri fitoplazmi ESFY.	46
Slika 34: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>aceF</i> pri fitoplazmi PD.	47
Slika 35: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>aceF</i> pri fitoplazmi AP.	48

Slika 36: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>aceF</i> , pri fitoplazmi ESFY.	49
Slika 37: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>aceF</i> , pri fitoplazmi PD....	50
Slika 38: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>aceF</i> , pri fitoplazmi AP....	51
Slika 39: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja dela gena <i>pnp</i> znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Zaporedje gena je dolgo približno 515 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označena mesta, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Število zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-dve zaporedji; PD-osem zaporedij; AP-pet zaporedij.....	52
Slika 40: Grafična predstavitev podobnosti aminokislinskega zaporedja proteina polinukleotidna fosforilaza, kodiranega z genom <i>pnp</i> , znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Aminokislinsko zaporedje je dolgo približno 170 aminokislin. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označene črte, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje v eni AK. Število AK zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-dve zaporedji; PD-pet zaporedij; AP-pet zaporedij.....	52
Slika 41: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>pnp</i> pri fitoplazmi ESFY.	53
Slika 42: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>pnp</i> pri fitoplazmi PD.	53
Slika 43: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena <i>pnp</i> pri fitoplazmi AP.	53
Slika 44: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>pnp</i> , pri fitoplazmi ESFY.	54
Slika 45: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>pnp</i> , pri fitoplazmi PD.....	54
Slika 46: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom <i>pnp</i> , pri fitoplazmi AP.....	54
Slika 47: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja gena <i>imp</i> . Nukleotidno zaporedje je dolgo približno 650 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Uporabili smo 14 nukleotidnih zaporedij fitoplazme ESFY.	55
Slika 48: Poravnava nukleotidnih zaporedij gena <i>imp</i> pri fitoplazmi ESFY.	56

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vseh vzorcev uporabljenih v nalogi. Vse fitoplazme PD so izolirane iz hrušk, vse fitoplazme AP so izolirane iz jablan, vse fitoplazme ESFY so izolirane iz koščičarjev (breskev, marelicica in češplja).

Priloga B: Seznam vseh nukleotidnih zaporedij iz podatkovne baze NCBI, ki smo jih uporabili v nalogi.

Priloga C: Seznam vseh aminokislinskih zaporedij iz podatkovne baze NCBI, ki smo jih uporabili v nalogi.

Priloga D: Poravnava nukleotidnih zaporedij genomskega odseka 16S/23S rRNA pri fitoplazmi PD.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16SrX	oznaka za filogenetsko skupino metličavosti jablan
16S rRNA	16S ribosomska RNA, komponenta 30S podenote ribosomov prokariotov
23S rRNA	23S ribosomska RNA, komponenta 50S podenote ribosomov prokariotov
AK	aminokislina
AP skupina	filogenetska skupina fitoplazem metličavosti jablan (ang. Apple proliferation group)
AP	fitoplazma metličavosti jablan; ' <i>Candidatus</i> phytoplasma mali'
bdH ₂ O	bidestilirana voda
BLAST	algoritem za primerjavo in poravnavo nukleotidnih zaporedij (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
dGTP	deoskigvanozin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
EDTA	etilen diamin tetraocenta kislina (ang. ethylene diamine tetraacetic acid)
ESFY	fitoplazma leptonekroze koščičarjev; ' <i>Candidatus</i> phytoplasma prunorum'
MLSA	analiza zaporedij večih lokusov (ang. multilocus sequence analysis)
NCBI	internetna genska banka (ang. National Center for Biotechnology Information)
NKP	negativna kontrola poskusa reakcije PCR
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PD	fitoplazma umiranja hrušk; ' <i>Candidatus</i> phytoplasma pyri'
RFLP	metoda analize polimorfizmov restrikcijskih fragmentov (ang. restriction fragment length polymorphism)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
TAE	tris-acetat-EDTA pufer
T _m	temperatura vezave oligonukleotidnih začetnikov pri reakciji PCR
U/μl	število enot na volumen
UV	ultravijolična svetloba

SLOVARČEK

- Oligonukleotidni začetnik** je krajše zaporedje nukleotidov, ki se zaradi komplementarnosti veže na želeno mesto na DNA. Uporablja se ga pri pomnoževanju odseka DNA ter pri določanju njegovega nukleotidnega zaporedja.
- Reakcija PCR** je ang. kratica za verižno reakcijo s polimerazo. Je molekularno biološka metoda s katero lahko pomnožimo določen odsek DNA. Toplotno ločenima DNA verigama dodamo kratka oligonukleotidna začetnika, ki se vežeta na začetni in končni del zelenega odseka. Nato encim DNA polimeraza prične z dodajanjem prostih nukleotidov izdelovati komplementarno kopijo. Reakcija je verižna, saj se cikel podvajanja odseka DNA ponovi večkrat. Teoretično tako iz ene kopije DNA v 20 ciklih dobimo več kot milijon kopij.
- Agarozna gelska elektroforeza** je metoda, ki se v biologiji uporablja za ločevanje molekul RNA in DNA glede na njihovo velikost. Z električnim poljem na agaroznem gelu dosežemo potovanje negativno nabitih nukleinskih kislin proti pozitivno nabitemu koncu agaroznega gela. Ker krajše molekule DNA in RNA potujejo hitreje od daljših, se po nekaj časa ločijo zaradi večje prepotovane poti.

1 UVOD

V nalogi se bomo posvetili fitoplazmam, ki okužujejo sadno drevje v Sloveniji.

Fitoplazme so bakterije brez celične stene, ki povzročajo veliko škode na gospodarsko pomembnih rastlinah. Tako velikost njihovih celic, kakor tudi velikost njihovega genoma, sta med najmanjšimi med bakterijami. Fitoplazme so obligatni zajedavci, katerih preživetje in pomnoževanje je odvisno od dveh zelo različnih gostiteljev – rastlin in žuželk iz redu enakokrilcev (Hemiptera). V rastlini se nahajajo in razmnožujejo v floemu, med njimi pa se prenašajo z žuželkami, ki pridobijo fitoplazme med sesanjem rastlinskega soka. Posledica prilagojenosti na parazitski način življenja je redukcija večine metabolnih procesov. Njihovo preživetje v gostitelju je odvisno od interakcij z okoljem, ki ga predstavlja citoplazma gostiteljske celice. Ravno zato so fitoplazme razvile veliko strategij za uspešen sprejem večine hranil in ostalih metabolitov v celico. Prav tako so kljub odsotnosti gibalnih struktur sposobne pasivno ali aktivno prehajati med celicami gostitelja in ga v celoti kolonizirati. Okužijo lahko več kot 1000 različnih rastlin ter oslabijo njihovo rast in razmnoževanje, včasih povzročijo celo odmiranje rastlin. Zaradi nezmožnosti gojenja *in vitro* se o njih tudi 50 let po odkritju še vedno ne ve veliko. Poznavanje fitoplazem tako temelji na molekularno bioloških metodah, s pomočjo katerih se ugotavlja njihovo zgradbo, delovanje in sorodnost.

Sadjarjem največ skrbi povzročajo fitoplazme iz skupine metličavosti jablan, ki napadajo sadno drevje in uničujejo pridelek. Fitoplazma metličavosti jablan je odgovorna za bolezen na jablanah (*Malus domestica*), fitoplazma umiranja hrušk povzroča bolezen hrušk (*Pyrus spp.*), medtem ko je fitoplazma leptonekroze koščičarjev razlog za obolenja na koščičarjih (*Prunus spp.*). Po večini so razširjene po celotni Sloveniji, med drevesi pa se pretežno prenašajo s cepljenjem dreves z okuženim cepilnim materialom ter z žuželčimi prenašalci iz družine bolšic (Psyllidae) in škržatkov (Cicadellidae). Zaradi resnosti in pogostosti okužb je potreben stalni nadzor nad sadilnim in razmnoževalnim materialom v drevesnicah in matičnih nasadih. Le ta vključuje njihovo detekcijo s pomočjo molekularno bioloških metod, med katerimi prevladujeta verižna reakcija s polimerazo v realnem času (PCR v realnem času) in analiza dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) v kombinaciji z ugnezdjeno reakcijo PCR. Ker je v primeru epidemije poleg eliminacije okuženih dreves potrebno poznati tudi vir okužbe, je nujno poznavanje povezave med geografsko lego, sorto in specifičnim genotipom fitoplazem, saj le tako lahko določimo vir okužbe.

V diplomski nalogi bomo poskusili z izboljšanjem molekularnih metod povečati poznavanje raznolikosti genomskega odseka 16S/23S rRNA med slovenskimi fitoplazmami umiranja hrušk ter povezati te razlike z geografskimi območji, letom nabiranja in sortami, iz katerih so bile fitoplazme izolirane. Prav tako bomo s pomočjo genskih bank poiskali še kakšen drug gen ali genomski odsek, ki bi nam omogočal boljše razlikovanje med sorodnimi fitoplazmami sadnega drevja, kot to na osnovi literature predvidevamo za genomski odsek 16S/23S rRNA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FITOPLAZME

2.1.1 Osnovne informacije in odkritje fitoplazem

Fitoplazme so zelo majhni rastlinski patogeni, ki povzročajo ogromno škode na gospodarsko pomembnih rastlinah. Večji del življenja preživijo v rastlinskem floemu, kjer se prehranjujejo z rastlinskim sokom, med rastlinami pa se prenašajo s pomočjo živalskih prenašalcev. Zaradi parazitskega načina življenja in vezanosti na gostitelja so do sedaj spodleteli vsi poskusi gojenja fitoplazem *in vitro* (Weintraub in Jones, 2010).

V začetku 20. stoletja so menili, da bolezni, kot je na primer rumenenje listov, povzročajo virusi, pa čeprav virusov niso uspeli identificirati v rastlinskem materialu (Lee in sod., 2000). Leta 1967 je Doi s sodelavci v okuženem rastlinskem tkivu našel delce, ki so spominjali na živalske bakterije iz redu Mycoplasma. Poimenoval jih je mikoplazmam podobni organizmi (ang. Mycoplasma-like organisms), s čimer je dokazal, da rumenenje rastlin ne povzročajo le virusi (Doi in sod., 1967). Od takrat dalje je bila fitoplazma identificirana kot povzročitelj skoraj 1000 različnih bolezni na kulturnih in divjih rastlinah (Weintraub in Jones, 2010).

2.1.2 Morfološke in genomske značilnosti

Fitoplazme so bakterije brez celične stene, ki jih obdaja enojna plazmalema (Doi in sod., 1967). Pod elektronskim mikroskopom izgledajo okrogla, redkeje nitasta telesa. V premeru merijo 200-800 nm, zato veljajo za najmanjše bakterije (Lee in sod., 2000). Posledica prilagojenosti na parazitsko življenje je redukcija genoma, čigar velikost znaša 530-1350 kbp, kar je najmanjši znani genom med bakterijami (Marccone in sod., 1999). Genom je sestavljen iz enega kromosoma, pri nekaterih fitoplazmah vključuje tudi nekaj plazmidov. Kromosom, ki je največkrat krožni in le redko linearen, vsebuje le med 500 in 750 genov, tako da v fitoplazmah ne poteka večina metabolnih poti drugih živih organizmov. Manjkajo jim geni za biosintezo aminokislin ter maščobnih kislin, geni Krebsovega cikla, oksidativne fosforilacije in fosfotransferaznega sistema. Prav tako jim manjkajo geni pentoza-fosfatne poti, ki bi jim omogočila reducirajočo moč ter gradnike za sintezo nukleotidov. Za razliko od vseh ostalih bakterij ne kodirajo F_0F_1 -ATPaz, temveč imajo le gene za P-ATPazo. Ta za svoje delovanje ne potrebuje produktov oksidativne fosforilacije, saj izkorišča aktivni transport različnih substratov čez membrano. Tudi nezmožnost sinteze aminokislin, maščobnih kislin ter nukleotidov uspešno nadomeščajo z velikim številom različnih transportnih sistemov, od katerih so najštevilčnejši transportni sistemi ABC (Oshima in sod., 2004). Vsebnost G+C baznih parov je nizka, saj predstavlja le od 21 do 29% celotnega genoma (Kollar in Seemüller, 1989).

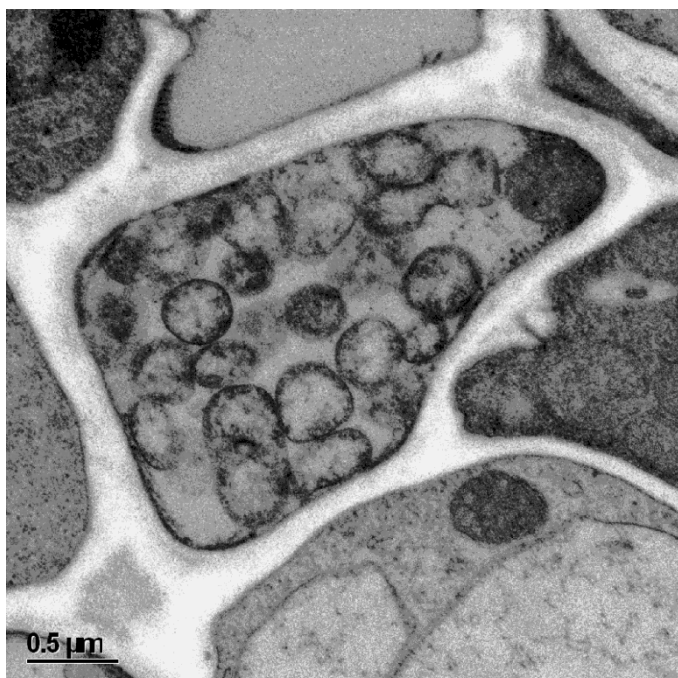
2.1.3 Življenjski cikel fitoplazem

Fitoplazme so skupaj z dvema vrstama spiroplazem posebne med rastlinskimi patogeni, saj

se lahko razmnožujejo znotraj dveh gostiteljev iz različnih kraljestev. So obligatni paraziti/simbionti tako rastlin kot žuželk. Fitoplazme se z rastline na rastlino lahko prenašajo vegetativno s cepljenjem, s pomočjo živalskih prenašalcev ali redkeje s pomočjo parazitskih rastlin (*Cuscuta* spp.) (Weintraub in Jones, 2010).

2.1.3.1 Rastline kot habitat fitoplazem

Fitoplazme pridejo v rastlino preko sline, ki jo prenašalna žuželka spusti v listni floem med prehranjevanjem z rastlinskim sokom. Fitoplazme se v rastlinskem gostitelju nahajajo in razmnožujejo izključno v floemu. Zaradi svoje majhnosti in pleomorfne oblike se z lahkoto prerinejo skozi sitaste ploščice, pore med celicami sitastih cevi. Ta sposobnost jim omogoča pasivno potovanje iz okuženega lista v ostale dele rastline, ki so povezani s floemom (Weintraub in Beanland, 2006). Ob pomanjkanju genov, ki kodirajo gibalne strukture, naj bi se fitoplazme najprej pritrdile na celično steno sitastih cevi, nato pa s pomočjo celičnih delitev počasi širile proti nadzemnim organom. Pomembno vlogo imajo tudi celice spremljevalke, ki obdajajo celice sitastih cevi, saj naj bi oskrbovale fitoplazme z metaboliti, ki jih sitaste cevi ne proizvajajo (Christensen in sod., 2005). Lahko pa predstavljajo tudi mesto kolonizacije fitoplazem, čeprav mehanizmi še niso poznani (Christensen in sod., 2004). Kolonizacija fitoplazem po rastlini je odvisna od vrste patogena in gostitelja ter interakcij med njima, tako da je skoraj pri vsaki rastlini različna (Seemüller in sod., 1984a). Število različnih rastlin, ki jih napade ena vrsta fitoplazme, je odvisno predvsem od spektra rastlin, s katerimi se prehranjujejo njeni živalski prenašalci (Hogenhout in sod., 2008)



Slika 1: Fitoplazme znotraj celice sitaste cevi. Slika je bila posneta z elektronskim mikroskopom. Foto: Magda Tušek Žnidaršič.

2.1.3.2 Živali kot habitat za fitoplazme

Fitoplazme se med rastlinami prenašajo z žuželkami iz redu enakokrilcev (Hemiptera), ki se prehranjujejo s sesanjem floemskega soka rastlin. Po večini te žuželke pripadajo družinama škržatkov (Cicadellidae) in bolšic (Psyllidae) (Weintraub in Beanland, 2006). Nekatere fitoplazme imajo specifične prenašalce in se lahko prenašajo le z eno ali nekaj vrstami žuželk, medtem ko imajo druge lahko tudi 24 različnih žuželčjih prenašalcev (Seemüller in sod., 2002). Ko se žuželka prehranjuje na rastlini, okuženi s fitoplazmami, skupaj s floemskim sokom posrka tudi fitoplazme. Prebavna pot jih vodi do srednjega črevesa, kjer se pritrdijo na njegovo steno in pričnejo razmnoževati. Skozi pore v njegovi bazalni membrani se prerinejo do hemolimfe, katere kroženje jim omogoči naselitev vseh žuželčjih organov. Da lahko žuželka okuži novo rastlino, se morajo fitoplazme preriniti skozi steno žleze slinavke v slino. Nekaj fitoplazem lahko tudi ostane v sekretornih celicah slinavke, kjer se močno namnožijo. Posledično se poveča njihova koncentracija v slini, ki jo bodo žuželke ob novem prehranjevanju vbrizgale v rastlinski floem. Fitoplazme potrebujejo približno tri tedne, da se v žuželki namnožijo do takšne mere, da se lahko prenesejo na novo rastlino. Temu času pravimo latentna perioda in se med različnimi žuželkami lahko razlikuje (Webb in sod., 1999). Žuželke ostanejo okužene celo svoje življenje, vendar so prenosi fitoplazem na potomce zelo redki (Kawakita in sod., 2000). Fitoplazme delujejo na žuželke večinoma pozitivno, saj le te kažejo izboljšane sposobnosti prezimovanja, večjo plodnost in daljše življenje (Beanland in sod., 2000). V določenih primerih pa delujejo na žuželko negativno, saj npr. okužba ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus*) s fitoplazmo FD prizadene njegovo življenjsko dobo, plodnost in migracije (Papura in sod., 2009).

2.1.4 Patogeni učinki fitoplazem na rastline

2.1.4.1 Nastanek bolezni

Fitoplazme se v sitastih cevah namnožijo do takšne mere, da delno zamašijo sitaste cevi in posledično oslabijo floemski transport po rastlini. Motena distribucija sladkorjev po rastlini se kaže v njihovi spremenjeni razporejenosti v različnih rastlinskih organih. Tako se velike količine sladkorjev, ki bi morale priti do mladih listov, brstov in korenin, pričnejo nabirati predvsem v zrelih listih (Braun in Sinclair, 1978). Posledično pride do poslabšanja fizioloških funkcij, kot so zmanjšana fotosinteza, stomatalna prevodnost in respiracija korenin, spremenjen sekundarni metabolizem ter porušeno hormonsko ravnovesje rastline (Leon in sod., 1996). Kot posledica fizioloških motenj se na rastlini pojavijo vidna bolezenska znamenja, ki so natančneje opisana v nadaljevanju.

2.1.4.2 Vzroki za patogenost

Na razvoj bolezni vplivajo virulenca sevov, interakcije med različnimi fitoplazmami, koncentracija fitoplazem v floemu, produkcija toksinov, podrtje hormonsko ravnovesje ter pritrjevanje patogenov na celično membrano gostitelja (Weintraub in Jones, 2010).

2.1.4.2.1 Virulenca

Raziskave so pokazale velike razlike v virulenci različnih fitoplazem, tako da jih lahko na podlagi simptomatologije razvrstimo v tri skupine. Prva skupina je avirulentna ali pa povzroča le milejša bolezenska znamenja, druga skupina je srednje virulentna, medtem ko je tretja skupina zelo virulentna in povzroča zelo hude poškodbe na rastlini (Seemüller in Schneider, 2007).

2.1.4.2.2 Interakcije med različnimi fitoplazmami

Ena rastlina je lahko naenkrat okužena tudi z več različno virulentnimi vrstami ali sevi fitoplazem, pri čemer pride do interference med njimi. V primeru sočasnih okužb prevladajo bolezenska znamenja, ki so značilna za virulentnejši sev fitoplazme. Če pa sta bili okužbi časovno zamaknjeni, se bodo običajno pokazala bolezenska znamenja tiste vrste fitoplazme, ki je prva okužila rastlino, ne glede na njuno stopnjo virulence (Sinclair in Griffiths, 2000). V določenih primerih pa lahko pride do skupinskega zavrtja, fenomena, ki ima za posledico nevtralizacijo obeh tekmujočih fitoplazem. To se odrazi v milejših bolezenskih znamenjih, v skrajnem primeru pa si rastlina celo opomore in izgubi vsa bolezenska znamenja (Berges in Seemüller, 2002).

2.1.4.2.3 Koncentracija fitoplazem

Koncentracija fitoplazem je prav tako eden od vzrokov za njeno patogenost. Visoke koncentracije fitoplazem se pojavljajo predvsem v zelatih rastlinah, medtem ko so nizke koncentracije značilne za lesnate rastline (Berges in Seemüller, 2000). V nekaterih lesnatih rastlinah so našli tako nizke kot tudi visoke koncentracije fitoplazme. Raziskave na lesnatih rastlinah so pokazale, da je nižja koncentracija fitoplazem veliko bolj virulentna kot visoka koncentracija. Razlog za to je velika občutljivost sitastih cevi na fitoplazemske okužbe, zato floem propade še preden se uspejo fitoplazme namnožiti do visokih koncentracij (Kartte in Seemüller, 1991a, b). Različne koncentracije fitoplazem in posledično različno močna bolezenska znamenja se lahko pojavijo tudi znotraj enega rastlinskega rodu, le da so razlike ločene geografsko (Braun in Sinclair, 1976).

2.1.4.2.4 Produkcija toksinov

Obstaja več hipotez o fitoplazemski produkciji ali indukciji toksičnih metabolitov, ki potujejo v druga neokužena tkiva in tam povzročajo različna bolezenska znamenja, kot so nekroze sitastih elementov (Braun in Sinclair, 1976; Schneider, 1977). Vseeno pa so to le nepotrjene hipoteze, saj do sedaj še ni bilo neposrednega dokaza o detekciji ali karakterizaciji toksičnih substanc. Prav tako še niso odkrili fitoplazemskih genov, ki bi spominjali na tipične patogene gene drugih fitopatogenih bakterij (Weintraub in Jones, 2010).

2.1.4.2.5 Porušeno hormonsko ravnovesje

V nekaterih okuženih rastlinah je bilo dokazano porušeno hormonsko ravnovesje, saj so se koncentracije določenih rastlinskih hormonov zelo razlikovale v primerjavi z zdravimi rastlinami (León in sod., 1996). Ni pa še jasno ali fitoplazme sintetizirajo rastlinske rastne regulatorje, ali pa samo spremenijo koncentracijo rastlinskih hormonov (Weintraub in Jones, 2010).

2.1.4.2.6 Imunodominantni proteini

Fitoplazme naj bi se pritrjevale na membrano gostiteljskih celic s pomočjo membranskih proteinov adhezinov, ki se v nekaterih fitoplazemskih vrstah organizirajo v specializirane strukture. Študije so pokazale, da večji del membranskih proteinov predstavljajo imunodominantni membranski proteini (IDP). Vsi IDP so zgrajeni iz centralne hidrofilne regije, ki naj bi bila na zunanji površini fitoplazmine plazmaleme, ter iz ene ali dveh hidrofobnih transmembranskih domen. Zaradi njihove zgradbe in pogostosti naj bi imeli ravno IDP vlogo adhezinov ter bili odgovorni za interakcije med fitoplazmami in njihovim gostiteljem (Hogenhout in sod., 2008). Fitoplazme se pritrjujejo na notranjo površino membrane gostitelja, s čimer kažejo veliko podobnost s sorodnimi mikoplazmami (Marcone in Ragozzino, 1996a). Sodeč po že znanih dejstvih o mikoplazmah pa naj bi bilo ravno pritrjevanje na membrano gostiteljskih celic predpogoj pri razvoju patogenosti (Hogenhout in sod., 2008).

2.1.4.3 Bolezenska znamenja pri okužbi s fitoplazmo

Bolezenska znamenja okuženih rastlin so lahko specifična in nespecifična, variirajo glede na vrsto fitoplazme in okužene rastline, stopnjo bolezni, okoljske dejavnike ter starost rastline pri okužbi (Lee in sod., 2000). Najpogostejši specifični bolezenski znamenji sta razbarvanje cvetov (virescenca) ter motnje v razvoju cveta (filodija, povečani popki, prekomeren razvoj cveta). Običajno pride tudi do pojava sterilnosti, metličavosti, etiolacije, podaljševanja in krajšanja internodijev, povečanja prilistov ter izvensezonske rasti. Manj specifična oz. nespecifična bolezenska znamenja so najpogostejša pri lesnatih rastlinah. Mednje spadajo rumenenje, rdečenje, pomanjšanje in zvijanje listov. Listne žile lahko postanejo večje, bele ter včasih celo propadejo zaradi nekroze. Prehitro lahko pride do defoliacije ter do jesenskega obarvanja listov. Sadeži ne zrastejo do normalne velikosti. Poslabšana je rast rastlin, le te lahko postanejo redkeje olistane. Lahko pa pride celo do postopnega odmiranja lesnate rastline. V redkih primerih so okužbe prikrite skozi celotno življenje rastlin, lahko pa se pojavijo začasna bolezenska znamenja, ki potem tudi izginejo (Weintraub in Jones, 2010).

2.1.5 Sistematika fitoplazem

Zaradi nezmožnosti gojenja v razmerah *in vitro* so v prvih desetletjih po odkritju fitoplazem raziskave temeljile le na elektronski in fluorescenčni mikroskopiji. Šele v

začetku osemdesetih let se je z vpeljavo molekulske bioloških metod znanje o fitoplazmah močno povečalo. Največ zaslug za to ima vpeljava verižne reakcije s polimerazo (reakcija PCR) ter ugnezdene reakcije PCR, analize polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) ter analize nukleotidnih zaporedij (Weintraub in Jones, 2010). Glavna tarča filogenetskih raziskav je bil gen 16S rRNA (Bertaccini, 2007), saj le ta spada med najbolj ohranjene gene med bakterijami in arhejami (Weisburg in sod., 1991). S pomočjo gena 16S rRNA ter nekaterih vzdrževalnih proteinov so dokazali, da imajo fitoplazme skupno evolucijsko razvojno pot, ter da izhajajo iz bakterij pozitivnih po Gramu z nizko vsebnostjo G+C baznih parov iz skupine *Bacillus-Clostridium* (Woese in sod., 1980; Sears in Kirkpatrick, 1994). Fitoplazme tako predstavljajo monofiletsko skupino, v kateri pa je zaradi zasedanja različnih bioloških in geografskih niš prišlo do velikega razvejanja na filogenetskem drevesu fitoplazem (Gundersen in sod., 1994). Ravno zaradi dognanj o njihovem skupnem izvoru in sorodnosti so jih leta 1994 na desetem kongresu mednarodne organizacije za mikoplazmologijo iz mikoplazmam podobnih organizmov preimenovali v fitoplazme, ter jih uvrstili v svojo vejo znotraj razreda Mollicutes (Hogenhout in sod., 2008). Deset let zatem (2004) je mednarodni raziskovalni program za primerjalno mikoplazmologijo sprejel sklep o uveljavitvi nove taksonomske skupine '*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*' za klasifikacijo fitoplazem, ki temelji na zaporedju gena 16S rRNA.

Za uvrstitev v nov takson '*Ca. Phytoplasma*' mora biti zaporedje njenega gena 16S rRNA daljše od 1200 bp ter ne sme kazati več kot 97,5 % podobnosti z nukleotidnim zaporedjem vseh do sedaj znanih taksonov '*Ca. Phytoplasma*'. Dokončno poimenovanje novega taksona '*Candidatus* *Phytoplasma*' pa je vrstno ime, ki običajno izraža gostitelja ali pa geografsko lokacijo prvega odkritja te fitoplazme. Sev fitoplazme, ki je bil uporabljen pri poimenovanju novega taksona '*Candidatus* *Phytoplasma*', je referenčni sev. Vsi ostali sevi, ki sicer pripadajo istemu '*Ca. Phytoplasma*' a z njim kažejo minimalno genetsko razliko, so sorodni sevi. Zaradi velike ohranjenosti gena 16S rRNA so za natančnejše določanje filogenetskih povezav v uporabi tudi druga pravila. Neka nova fitoplazma lahko pridobi status novega taksona '*Ca. Phytoplasma*' kljub več kot 97,5 % podobnosti gena 16S rRNA z že obstoječim '*Ca. Phytoplasma*'. V tem primeru morata obe fitoplazmi jasno predstavljati ločeni ekološki populaciji, za kar morajo biti izpolnjeni trije pogoji. Fitoplazmi se morata razlikovati v gostiteljski specifičnosti, prenašalcih in v vsaj enem molekulske ali serološke označevalcu (IRPCM, 2004). Do leta 2010 je bilo objavljenih več kot 1500 zaporedij gena 16S rRNA, na podlagi katerih so bile fitoplazme uvrščene v 28 potrjenih taksonov '*Candidatus* *Phytoplasma*', ter v 15 potencialnih novih taksonov '*Candidatus* *Phytoplasma*'. Na podlagi analize dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) gena 16S rRNA so predstavniki '*Candidatus* *Phytoplasma*' razvrščeni v 30 skupin, ki so označene z oznakami od 16SrI-16SrXXX (Weintraub in Jones, 2010).

Za določanje ožjih sorodnosti znotraj teh skupin so v zadnjem času pričeli analizirati tudi druge gene. Ti kažejo manjšo ohranjenost kot ribosomski gen 16S rRNA in so zato uporabnejši za uvrščanje fitoplazem v podskupine. Mednje sodijo geni, ki kodirajo ribosomski protein (rp), geni *secY*, *secA*, *tuf*, 23S rRNA ter genomski odsek 16S/23S rRNA z vmesno regijo. Gen *secY* in gen za ribosomski protein sta najbolj variabilna med fitoplazmami ter zato najuporabnejša za natančnejše določevanje njihove filogenije (Martini in sod., 2007).

2.2 FITOPLAZME SADNEGA DREVJA

Fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (skupina AP, 16SrX) povzročajo veliko škode na sadnem drevju iz družine rožnic (Rosaceae). Gospodarsko najpomembnejše fitoplazme sadnega drevja v Sloveniji in tudi v Evropi so fitoplazma metličavosti jablan ('*Candidatus phytoplasma mali*', v nadaljevanju AP), fitoplazma umiranja hrušk ('*Candidatus phytoplasma pyri*', v nadaljevanju PD) ter fitoplazma leptonekroze koščičarjev ('*Candidatus phytoplasma prunorum*', v nadaljevanju ESFY) (Seemüller in Schneider, 2004). Vse te fitoplazme so uvrščene na I.A.II karantenski seznam škodljivih organizmov v Evropski skupnosti (Škodljivi organizmi ... , 2010), PD in AP pa tudi na EPPO A2 seznam (EPPO A2 list ... , 2010).

2.2.1 Pojavljanje po rastlini

Fitoplazme se nahajajo le v funkcionalnem floemu. Najvišja koncentracija v stebelu je dosežena ob koncu poletja in v začetku jeseni. Po nekaj letih se rekolonizacija stebela lahko pojavi le za nekaj tednov, ali pa se sploh ne pojavi več. Temu pojavu začasnega ali stalnega umika bolezenskih znamenj pravimo »ozdravitev« (ang. recovery). Takšna drevesa, za razliko od tistih z intenzivno koloniziranim nadtalnim delom, ne kažejo karakterističnih bolezenskih znamenj, zaradi česar delujejo zdrava (Seemüller, 1988; Seemüller in sod., 1984b). V nekaterih primerih temperatura okolice prav tako vpliva na pojavljanje bolezenskih znamenj. V Franciji so se pri temperaturah 21-25 °C bolezenska znamenja pojavljala, medtem ko so le ta bila zaustavljena pri 29-32 °C (Ducroquet in sod., 1986).

2.2.2 Prenašanje med rastlinami

Fitoplazme iz skupine metličavosti jablan prenašajo žuželke iz družine bolšic (Psyllidae) in škržatkov (Cicadellidae). K širjenju bolezní veliko pripomore tudi vegetativno razmnoževanje. Ker koncentracija fitoplazme v nadzemnih delih doseže višek proti koncu poletja in v začetku jeseni, so tudi cepiči, pridobljeni v tistem obdobju, nevarnejši za prenos okužbe na zdravo drevje (Pedrazzoli in sod., 2008). V zadnjem času je vse večja nevarnost prenosa okužbe tudi s cepiči, odvzetimi sredi zime. Pojav je posledica vse milejših zim, ki omogočajo preživetje fitoplazem v floemu nadzemnih delov rastline tudi v najhladnejših mesecih (Lešnik in sod., 2009; Garcia-Chapa in sod., 2003). Ugotovljen je bil tudi prenos fitoplazme AP preko koreninskih mostičkov, povezav, ki lahko nastanejo med koreninami dveh sosednjih dreves (Ciccotti in sod., 2007). Prav tako naj bi bil možen prenos fitoplazme ESFY preko plodov (Nečas in sod., 2008). Vse tri fitoplazme se pojavljajo v Sloveniji, njihova prisotnost je bila dokazana v večini slovenskih območij (Brzin in sod., 2005).

2.2.3 Detekcija fitoplazem in nadzor širjenja bolezní

Ker se fitoplazme prenašajo z žuželkami ter z razmnoževalnim in sadilnim materialom, je

za dober nadzor nad fitoplazmami pomembna hitra detekcija potencialnih okužb. Fitosanitarni ukrepi Republike Slovenije odredjajo stalen nadzor nad pridelavo sadilnega in razmnoževalnega materiala v drevesnicah, matičnih nasadih in zarodiščih podlag (Pravilnik o ukrepih, 2004; Pravilnik o trženju, 2006). Poznamo različne metode dokazovanja prisotnosti fitoplazem v vzorcih. Pogosto le te temeljijo na molekularno bioloških metodah, kot je ugnezdena verižna reakcija s polimerazo (ang. nested PCR) v kombinaciji z metodo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) (Brzin in sod., 2001). V zadnjem času se pogosto uporablja tudi metodo PCR v realnem času (ang. real time PCR), ki je hitrejša, občutljivejša ter posledično uporabnejša v diagnostiki (Baric in Dalla-Via, 2003; Nikolić in sod., 2010). Za določanje fitoplazme AP se uporablja tudi serološki test ELISA, ki je hitrejši kot metoda ugnezdene reakcije PCR, a tudi manj občutljiv (Brzin in sod., 2003). Detekcija fitoplazem je možna tudi z nespecifično mikroskopsko metodo barvanja DNA z barvilom DAPI (Brzin in sod., 2005). Ker se najznačilnejša bolezenska znamenja pojavljajo pozno poleti ter v jeseni, je to sicer najprimernejši čas za vzorčenje in testiranje, pa čeprav so poganjki problematični za analizo. Razlog za to je visoka koncentracija inhibitorjev reakcije PCR v poganjkih, ki se poveča ravno jeseni (Brzin in sod., 2005). Ker je bolezen zaradi prepovedi uporabe antibiotikov skoraj nemogoče ozdraviti, imajo postopki preprečevanja širjenja bolezni zelo veliko vlogo. Glavne strategije pri nadzoru fitoplazemskih obolenj so pridobivanje odpornih in tolerantnih genotipov, odklanjanje občutljivih sort, nove nasade pa se postavlja le na območjih, kjer se bolezen še ni pojavila. Zelo pomembno vlogo ima odkrivanje prikritih okužb na sadilnem materialu ter v koreninah navidez zdravih dreves. V primeru prvih znakov pojavljanja bolezni v sadovnjaku je potrebno bolezen čimprej zatreti. Izrjavati je potrebno vsa okužena drevesa, čeprav bi si kasneje lahko opomogla. Prav tako je nujna uporaba insekticidov, s katerimi preprečimo tako prenos bolezni iz sosednjih območij, kot tudi razširjanje bolezni znotraj okuženega sadovnjaka (Osler in sod., 2001). Na območjih z visokim infekcijskim pritiskom fitoplazem pa je zaradi težavnega vzdrževanja zdravih rastlin na odprtem predlagana uporaba mrežnika (slika 2), ki preprečuje s fitoplazmo okuženim žuželkam prihod v sadovnjak (Ambrožič Turk in sod., 2010).



Slika 2: Nasad sadnega drevja znotraj mrežnika. Foto: arhiv NIB.

2.2.4 Fitoplazemske bolezni sadnega drevja

2.2.4.1 Metličavost jablan (Apple proliferation)

2.2.4.1.1 Osnovni podatki

Metličavost jablan je najpogostejša bolezen jablan v Evropi, katere povzročitelj je fitoplazma metličavosti jablan (Apple proliferation; AP), po novem '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Seemüller in Schneider, 2004). Bolezen je bila prvič omenjena leta 1950 v Italiji, v Evropi pa je bila verjetno prisotna že v začetku 20. stoletja (Jones in Aldwinckle, 1990). Bolezen se pretežno pojavlja na jablani (*Malus domestica*), najdena pa je bila tudi na leski (*Corylus* spp.) (Marcone in sod., 1996b), hruški (*Pyrus communis*) (Del Serrone in sod., 1998), japonski slivi (*Prunus salicina*) (Seemüller in Schneider, 2004), slivi (*Prunus domestica*), breskvi (*Prunus armeniaca*) in češnji (*Prunus avium*) (Mehle in sod., 2007). Živalski prenašalci, odgovorni za prenos bolezni, so iz družine bolšic (Psyllidae), in sicer *Cacopsylla picta* (Jarausch in sod., 2003) in *C. melanoneura* (Tedeschi in Alma., 2004), redkeje pa iz družine škržatkov (Cicadellidae), in sicer *Fieberiella florii* (Krczal in sod., 1988).

2.2.4.1.2 Bolezenska znamenja

Bolezen vpliva na spremembe v koreninskem sistemu, stebelu, listih ter sadežih. Najopaznejše specifično bolezensko znamenje je metličavost poganjkov, ki nastane zaradi izgube apikalne dominanc v glavnem poganjku. Posledica izgube apikalne dominanc je razvoj številnih stranskih poganjkov, ki dajejo izgled metle, zaradi česar je bolezen tudi dobila ime. Preostali specifični bolezenski znamenja sta povečanje števila in velikosti prilistov. Nespecifična bolezenska znamenja so rdečenje, kloroze in rumenenje že tako maloštevilnih in manjših listov. Poganjki pogosto zakrnijo, pojavljajo se listne rozete. Okužena drevesa prej odvržejo liste kot zdrava drevesa, prav tako imajo zakasnjeno spomladansko cvetenje. Koreninski sistem imajo slabše razvit, saj sta reducirana tako velikost kot tudi število korenin. Glavni problem sadjarjev pa predstavljajo manj številčni, manjši in neokusni sadeži, ki ne dosegajo tržnih standardov. Inkubacijska doba je odvisna od starosti dreves v času okužbe. Na okuženih sadikah se bolezenska znamenja lahko pojavijo že v prvem letu, medtem ko starejša drevesa praviloma razvijejo bolezenska znamenja šele nekaj let po okužbi. Čez čas lahko bolezenska znamenja izginejo, količina in velikost sadja se skoraj normalizirata, nato pa se bolezenska znamenja lahko znova pojavijo. Takšne prikriti okužbe predstavljajo izvor širjenja fitoplazem (Kartte in Seemüller, 1988).

2.2.4.2 Umiranje hrušk (Pear decline)

2.2.4.2.1 Osnovni podatki

Umiranje hrušk je gospodarsko pomembna bolezen hrušk (Seemüller, 1992), katere povzročitelj je fitoplazma umiranja hrušk (Pear decline; PD), po novem '*Candidatus*

Phytoplasma pyri (Seemüller in Schneider, 2004). Prva okužba s fitoplazmo PD je bila zabeležena v Kanadi leta 1948 (McLarty, 1948), čeprav naj bi se v Severno Ameriko tako kot vse ostale fitoplazme sadnega drevja preselila iz Evrope. Bolezen se največ pojavlja v nasadih hrušk (*Pyrus spp.*) (Seemüller, 1992). Fitoplazmo PD prenašata žuželki iz družine bolšic (Psyllidae), in sicer *Cacopsylla pyri* in *Cacopsylla pyricola* (Jensen in sod., 1964).

2.2.4.2 Bolezenska znamenja

Propad hruške je lahko hiter ali počasen. Pri cepljenih hruškah je stopnja hitrosti njenega propada odvisna od občutljivosti njene podlage in ne od cepiča. Pri hruškah z občutljivo podlago pride do hitrega propada, saj poškodovani floem ne zmore oskrbovati korenin med rastno sezono, kar se odraža v slabem razvoju listja in plodov. Sledita njihovo venenje ter odpad, drevesa pa odmrejo v nekaj tednih. Počasno odmiranje je značilno za odpornejše vrste podlag. Oslabljena je terminalna rast poganjkov, v nekaterih primerih pa se ta popolnoma ustavi. Po nekaj zaporednih rastihih sezonah veje izgledajo le še kot snopi listov. Bolezen učinkuje tudi na liste, saj se število le teh zmanjša, postanejo manjši, usnjati, svetlo zeleni, z navzgor zavihanimi robovi. Jeseni postanejo nenavadno rdeči in prehitro odpadejo. Nekaj časa po okužbi se zmanjšajo tako količina cvetov kot tudi količina in velikost plodov. Večina stranskih korenin odmre, medtem ko glavne korenine ostanejo zdrave. Intenziteta bolezenskih znamenj pri počasnem odmiranju lahko variira med leti, nekatera drevesa si opomorejo, druga pa odmrejo (Schneider, 1977; Seemüller, 1992). Ker so bolezenska znamenja umiranja hrušk, kot so zavrta rast in jesensko rdečenje listov, lahko posledica različnih dejavnikov, so laboratorijske analize prisotnosti fitoplazme PD toliko pomembnejše (Brzin in sod., 2005).



Slika 3: Rdečenje in zvijanje listov pri hruški, okuženi s fitoplazmo PD. Foto: Nina Prezelj.

2.2.4.3 Leptonekroza koščičarjev (European stone fruit yellows)

2.2.4.3.1 Osnovni podatki

Leptonekroza koščičarjev ali bolezen klorotičnega zvijanja listov koščičarjev je pogosta bolezen na koščičarjih, ki jo povzroča fitoplazma leptonekroze koščičarjev (European stone fruit yellows; ESFY), po novem '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' (Seemüller in Schneider, 2004). Razširjena je predvsem v Evropi, kjer so sadne vrste iz rodu *Prunus* na okužbo s fitoplazmo ESFY različno občutljive, prav tako je različno izražanje bolezenskih znamenj. Izrazita bolezenska znamenja in posledično veliko gospodarsko škodo povzroča fitoplazma ESFY predvsem na marelici (*P. armeniaca*), kitajsko japonski slivi (*P. salicina*) in breskvi (*P. persica*) (Carraro in Osler, 2003). Tolerantne vrste sliv, kot so evropska sliva (*P. domestica*), črni trn (*P. spinosa*) in mirabolana (*P. cerasifera*), so sicer dovzetne za okužbo, vendar ne razvijejo bolezenskih znamenj in so prikrit vir za širjenje okužb (Carraro in sod., 2004). Češnja (*P. avium*) je odporna na okužbo z ESFY (Jarausch in sod., 1999). V naravi se bolezen prenaša pretežno s češpljevo bolšico (*Cacopsylla pruni*) (Carraro in sod., 1998), zabeležen pa je tudi že bil prenos z breskovim škržatom (*Empoasca decedens*) (Pastore in sod., 2004).

2.2.4.3.2 Bolezenska znamenja

Prehitro spomladansko olistanje dreves je prvo bolezensko znamenje, ki se pojavi spomladi. Očitno znamenje okužbe je tudi izvensezonsko cvetenje. Kot posledica motenj z oskrbo vode in hranil pride poleti do zvijanja listov ob glavni žili navzgor, že pred jesenjo pa listje porumeni, zaznati je mogoče tudi neenakomerne kloroze. Opazen je metlast izgled poganjkov, ki nastane zaradi odganjanja stranskih brstov na konicah kratkih poganjkov, prav tako lahko brsti odganjajo iz starega lesa. V prerezu debla in vej so vidne nekroze floema, ki so glavni razlog za njihovo odmrtnje, pri občutljivejših vrstah pa povzročijo tudi hiranje dreves. Za sadjarje so največja težava nekakovostni plodovi, ki so poleg premajhne velikosti tudi nepravilnih oblik in slabega okusa (Carraro in Osler, 2003).

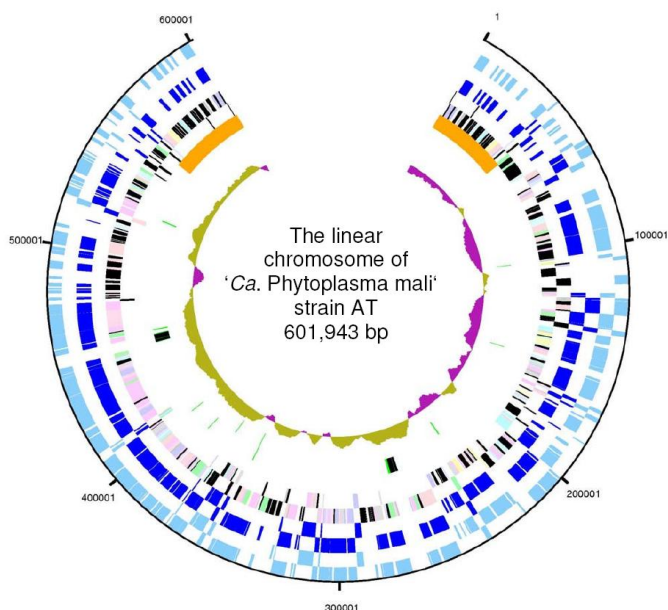


Slika 4: Bolezenska znamenja na koščičarju, okuženim s fitoplazmo ESFY. Foto: Barbara Ambrožič Turk.

2.2.5 Zgradba genoma fitoplazem iz skupine AP

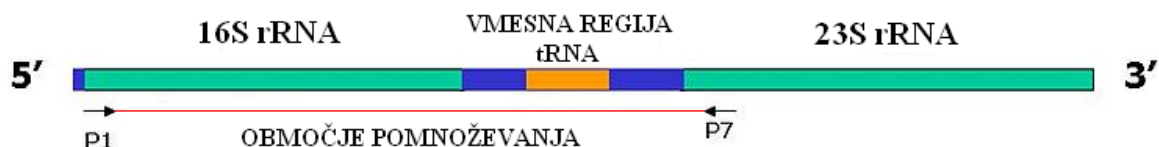
Velikost celotnega genoma fitoplazem sadnega drevja je manjša od večine drugih fitoplazem. Genom fitoplazme AP obsega 601-690 kbp, fitoplazme PD 660 kbp ter fitoplazme ESFY 635 kbp (Marcone in sod., 1999, Kube in sod., 2008). Kljub razliki v restrikcijskih mestih, vsebujeta fitoplazmi ESFY in AP gene v istem zaporedju in na približno istih lokacijah na kromosomu. (Laurer in Seemüller, 1999; Marcone in Seemüller, 2001).

Genom fitoplazem iz skupine metličavosti jablan je edini do sedaj znani fitoplazemski genom, čigar kromosom je linearen in ne krožen (slika 5). Od genomov drugih fitoplazem se loči tudi po odsotnosti plazmidne DNA ter v nižji vsebnosti G-C baznih parov. Le ta je za dobrih 5% manjša od ostalih fitoplazem, saj znaša le 21,6%. Posledica manjšega genoma je tudi manjše število genov, saj jih vsebuje le okoli 500, s čimer jih ima približno 200 manj od ostalih fitoplazem (Kube in sod., 2008).



Slika 5: Shematičen prikaz linearnega kromosoma fitoplazme AP (Kube in sod., 2008).

Fitoplazme vsebujejo dva rRNA operona, ki sta na ločenih pozicijah na kromosomu. Vsak izmed njiju je zgrajen iz genov 16S, 23S in 5S rRNA. Med njimi sta vmesni regiji ITS (internal transcribed spacer), ki vsebujeta gen za tRNA. Dosedanje raziskave so temeljile na odseku, ki se ga pomnoži s pomočjo univerzalnega para oligonukleotidnih začetnikov P1/P7. Odsek je dolg približno 1830 bp in vključuje skoraj celoten gen 16S rRNA, vmesno regijo ITS z genom tRNA ter začetek gena 23S rRNA (slika 6) (Weintraub in Jones, 2010).



Slika 6: Zgradba večjega dela operona rRNA. P1 in P7 sta univerzalna oligonukleotidna začetnika za vse vrste fitoplazem. Dolžine določenih odsekov so simbolične

2.2.6 Taksonomija fitoplazem sadnega drevja, ki temelji na analizah gena 16S rRNA z metodo RFLP

Filogenetske analize kažejo veliko podobnost ohranjenega gena 16S rRNA med fitoplazmami iz skupine metličavosti jablan, kar kaže na veliko filogenetsko povezanost med njimi. Fitoplazmi AP in PD naj bi se v zaporedju gena 16S rRNA razlikovali le za 1,0-1,1%, AP in ESFY za 1,2-1,3% ter PD in ESFY za 1,3-1,5%. Vse tri fitoplazme se razlikujejo za manj kot 2,5%, s čimer ne izpolnjujejo glavnega pogoja za uvrstitev vsake v svoj takson '*Candidatus* Phytoplasma', a so le tega pridobile zaradi pripadnosti ločenim ekološkim populacijam (Seemüller in sod., 1998). Fitoplazmam AP, PD in ESFY je filogenetsko najbližje fitoplazma peach yellow leaf rool (PYLR), ki s fitoplazmo PD kaže 99,6% identičnost, medtem ko si s fitoplazmama AP in ESFY deli 98,4-98,6% zaporedja

gena 16S rRNA (Seemüller in Schneider, 2004). Zaradi velike genetske podobnosti spadata skupaj s fitoplazmo PD v takson '*Ca* Phytoplasma pyri'. V skupino metličavosti jablan pa so nekoč uvrščali tudi fitoplazmo spartium witches'-broom (SpaWB) (Marcione in sod., 1996c), fitoplazmo buckthorn witches'-broom (BWB) (Mäurer in Semüller, 1996) in fitoplazmo allocasuarina yellows (ALLOY) (Gibb in sod., 2003). Podobnost zaporedja njihovega gena 16S rRNA je za malce več kot 2,5% različna od zaporedij ostalih fitoplazem v tej skupini, tako da so vse tri pridobile svoj status '*Candidatus* Phytoplasma'. Fitoplazme iz skupine metličavosti jablan kažejo z ostalimi skupinami največ 93% podobnost v zaporedju gena 16S rRNA. Velika ohranjenost gena 16S rRNA se kaže tudi pri uporabi metode RFLP, saj obstaja le nekaj restriksijskih mest, ki nam pomagajo ločiti fitoplazme sadnega drevja med seboj (Seemüller in Schneider, 2004). Z namenom natančnejšega določanja sorodnosti med sevi fitoplazem znotraj istega taksona '*Candidatus* Phytoplasma', se v zadnjih letih uporablja metoda MLSA (ang. multilocus sequence analysis), ki predstavlja nov standard v molekularni sistematiki mikroorganizmov. Metoda MLSA ni uporabna le za boljši vpogled v filogenijo fitoplazem, temveč tudi za epidemiološke raziskave (Casati in sod., 2011; Danet in sod. 2011).

2.2.7 Novejše raziskave genetske raznolikosti med fitoplazmami sadnega drevja

Danet in sod. (2011) so z metodo MLSA natančneje določili filogenetske odnose med fitoplazmami iz skupine metličavosti jablan v Evropi, kot je bilo to prej mogoče s pomočjo drugih molekularskih analiz gena 16S rRNA. Za tarčne gene so uporabili gen *aceF*, ki sodeluje pri metabolizmu sladkorjev, gen *pnp*, ki sodeluje pri metabolizmu nukleotidov, gen *secY*, ki sodeluje pri izločanju proteinov ter gen *imp*, ki kodira imunodominantne proteine. Rezultati so pokazali veliko genetsko raznolikost ne le med različnimi skupinami fitoplazem, temveč tudi med sevi znotraj istega taksona '*Ca*. Phytoplasma'. Za najboljša filogenetska označevalca sta se izkazala gena *aceF* in *imp*, saj sta fitoplazme iz skupine AP razdelila na 24 oz. 30 različnih genotipov, medtem ko sta gena *pnp* in *secY* dala 15 oz 12 različnih genotipov. Za vsak sev posebej so združili genotipe vseh štirih genov ter tako dobili njegov haplotip ali genetsko linijo. Zabeležili so 73 različnih haplotipov, ki kažejo na veliko genetsko raznolikost med fitoplazmami iz skupine AP v Evropi. Prav tako je bila zabeležena prva genska rekombinacija med dvema fitoplazmama, in sicer med '*Ca*. *P. pyri*' in '*Ca*. *P. prunorum*' (Danet in sod. 2011).

V severni Italiji so metodo MLSA uporabili za natančnejšo diferenciacijo sevov fitoplazme AP iz različnih območij. Za analizo so uporabili gene, ki kodirajo proteine povezane s patogenezo (geni PR-1, PR-2, PR-3), gen *secY* ter ribosomski genomski območji (del genov 16S in 23S rRNA z vmesno regijo ter gena za ribosomske proteine *rplV-rpsC*). Največ različnih genotipov so zabeležili z analizo gena *rplV-rpsC*, in sicer šest, genomski odsek 16S/23S rRNA z vmesno regijo je dal štiri, regija z geni PR-1, PR-2 in PR-3 je dala tri genotipe, medtem ko je bil gen *secY* enak med vsemi izolati fitoplazme AP. Skupaj so določili 12 različnih haplotipov, od katerih vsak ustreza svoji genetski liniji. Določene genetske linije so pogostejše kot druge, tudi geografsko so nekatere linije omejene le na eno območje, spet druge se pojavljajo povsod po Evropi (Casati in sod., 2011).

Vmesna regija med genoma 16S rDNA in 23S rDNA sestoji iz približno 230 nukleotidov in je bolj heterogena kot gen 16S rDNA. Fitoplazmi PD in ESFY se razlikujeta za 1,5%, AP in PD za 1,9%, medtem ko se AP in ESFY razlikujeta za 3% (Seemüller in Schneider, 2004).

2.3 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA IN HIPOTEZE

Glavni namen diplomske naloge je bil omogočiti vpogled v raznolikost ohranjenega genomskega odseka 16S-23S rRNA pri izolatih fitoplazme PD na območju Slovenije. V ta namen smo morali optimizirati protokole za ugnezdno reakcijo PCR ter izdelati nov par oligonukleotidnih začetnikov. Pridobljeno znanje bi lahko pomagalo pri epidemioloških raziskavah razširjenosti fitoplazme PD v Sloveniji. Poleg tega smo želeli *in silico* poiskati tudi druge neribosomske gene oz. genomske odseke, ki bi bili zaradi manjše ohranjenosti uporabnejši za razlikovanje sorodnih fitoplazem sadnega drevja.

Na osnovi objavljenih člankov smo sklepali na majhno raznolikost genomskega območja 16S/23S rRNA med izolati fitoplazme PD. Prav tako smo predvidevali, da so drugi neribosomski genomske odseki boljše orodja za razlikovanje med sorodnimi fitoplazmami sadnega drevja.

3 MATERIAL IN METODE

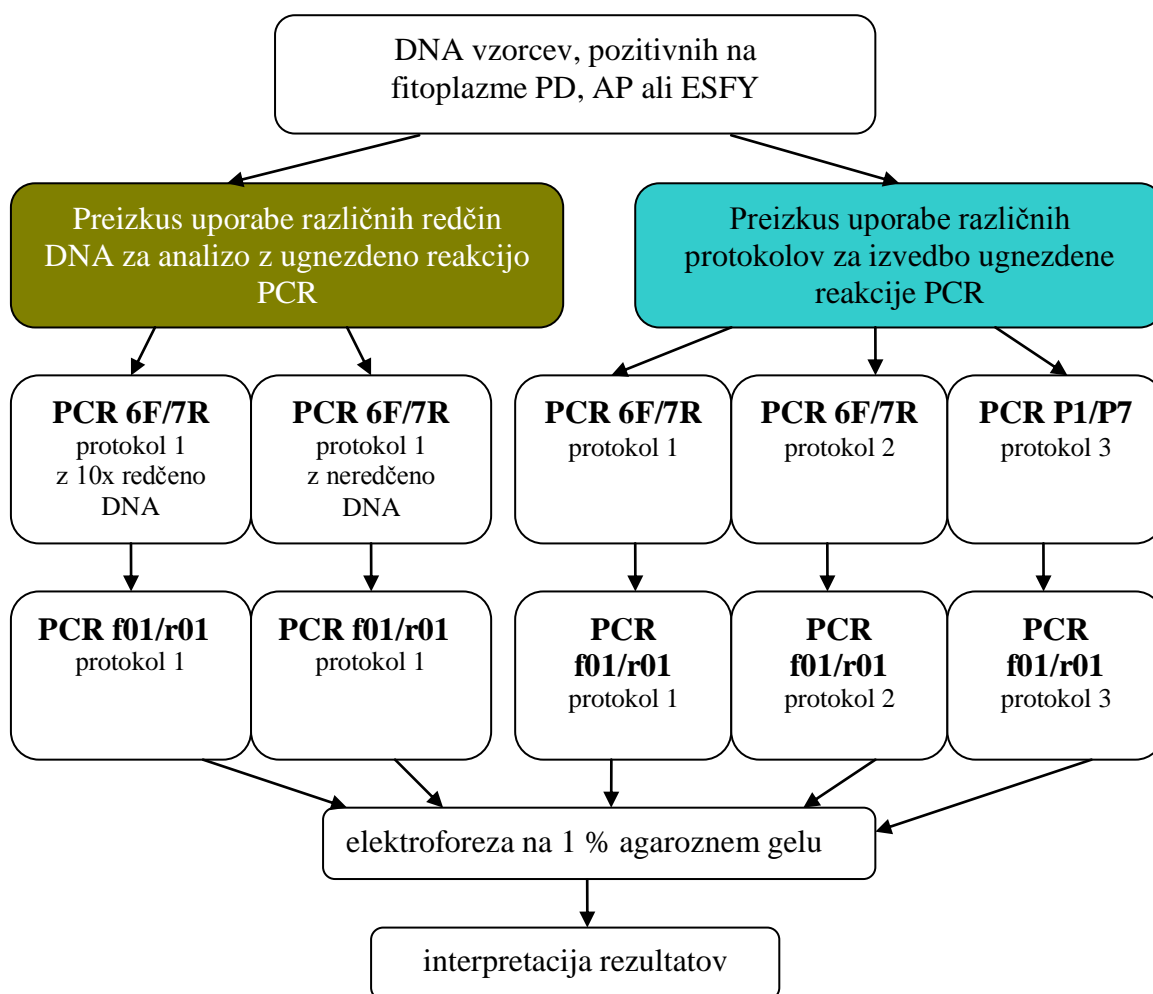
3.1 MATERIAL

Molekulska raznovrstnost slovenskih izolatov fitoplazme AP, PD in ESFY smo določali na vzorcih DNA, ki so bili predhodno izolirani in okarakterizirani kot pozitivni na fitoplazme AP, PD oziroma ESFY v okviru pregleda stanja okuženosti sadnega drevja s fitoplazmami v Sloveniji.

Seznam vseh vzorcev uporabljenih v nalogi je v prilogi 1.

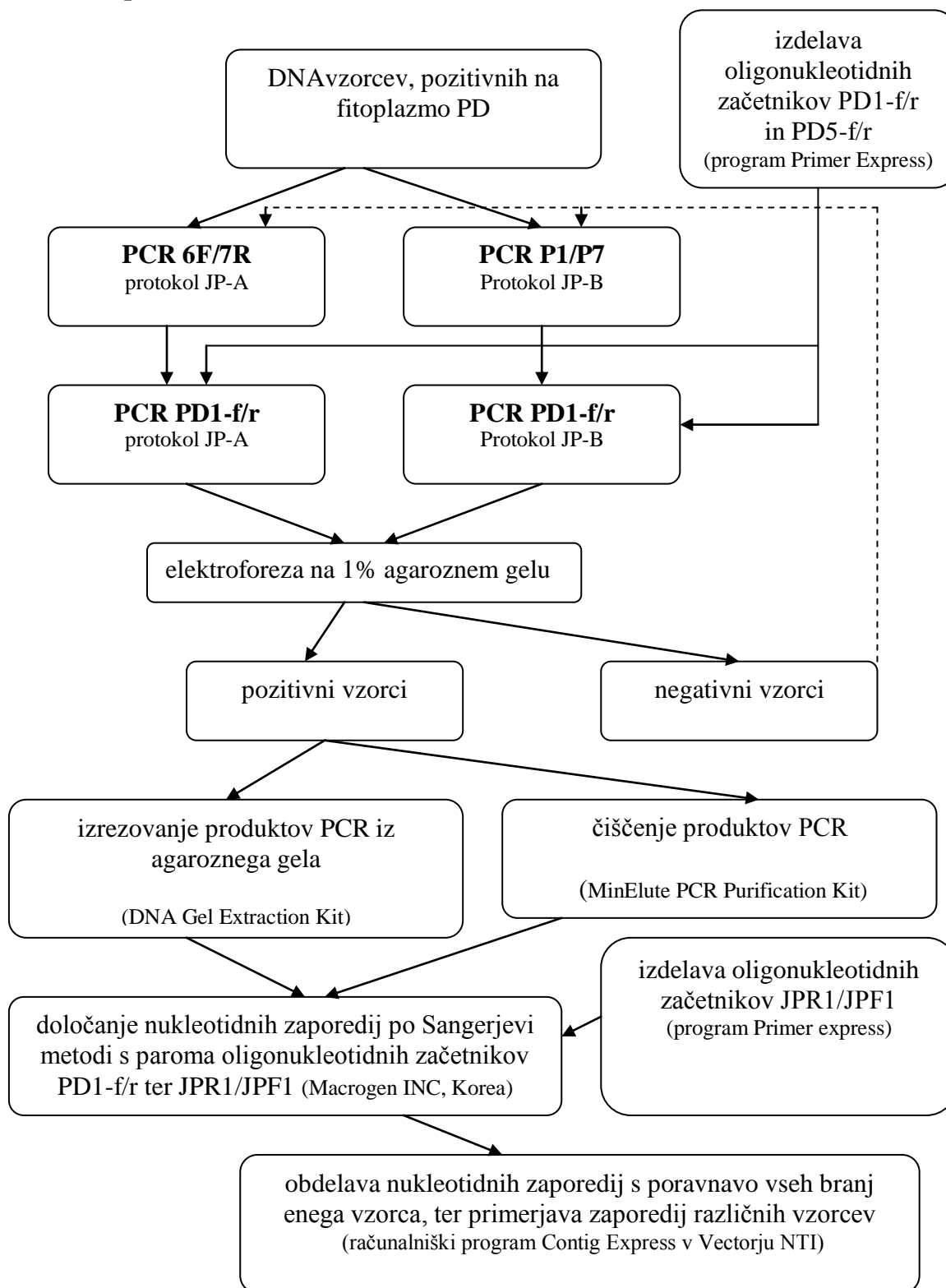
3.2 SHEMATIČEN PREGLED METODOLOGIJE, KI SMO JO UPORABILI V DIPLOMI

3.2.1 Primerjava različnih protokolov pomnoževanja DNA z za AP skupino specifično ugnezdeno reakcijo PCR



Slika 7: Shema primerjave različnih protokolov pomnoževanja DNA z za skupino AP specifično ugnezdeno reakcijo PCR.

3.2.2 Določanje nukleotidnega zaporedja genomskega odseka 16S/23S rRNA pri fitoplazmah PD



Slika 8: Shema določanja nukleotidnega zaporedja genomskega odseka 16S/23S rRNA pri fitoplazmah PD.

3.3 REAKCIJE PCR ZA POMNOŽEVANJE DNA FITOPLAZEM IZ SKUPINE AP

Za skupino AP specifične ugnezdene reakcije PCR smo izvajali za optimizacijo diagnostičnega protokola ter za pridobitev produktov reakcije PCR, katerim smo nato določili nukleotidno zaporedje. V obeh primerih smo pomnoževali genomski odsek 16S/23S rRNA.

1. Optimizacija za skupino AP specifične ugnezdene reakcije PCR (slika 7):
 - Preizkus uporabe različnih redčin DNA za analizo z ugnezdeno reakcijo PCR.
 - Preizkus uporabe različnih protokolov (označeni kot protokol 1, 2 in 3) za izvedbo ugnezdene reakcije PCR.
2. Pomnoževanje genomskega odseka 16S/23S rRNA fitoplazem PD za določitev nukleotidnega zaporedja (slika 8):
 - Optimizacija in primerjava uspešnosti pomnoževanja DNA z novima paroma oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r ter PD5f-r.
 - Pomnožitev dela genoma fitoplazem PD s parom oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r po protokolu JP-A oziroma JP-B.

3.3.1 Material

- rokavice brez smukca
- polistirenska posoda z ledom
- stojalo za eppendorfove epruvete
- sterilne eppendorfove epruvete (200 µl, 1.5 ml, 2 ml)
- pipete s sterilnimi nastavki s filtri (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl)
- avtomatska pipeta
- odlagalnik za rabljen material
- vrtinčnik (Vibromix 10, Tehtnica®)
- namizna centrifuga za eppendorfove epruvete (Eppendorf MiniSpin® plus)
- naprava za centrifugiranje in vrtinčenje (Centrifuge/Vortex Multi Spin MSC-3000)
- komora za pripravo reakcijskih mešanic PCR (BIOSAN DNA/RNA cleaner UVT-S-AR)
- komora za dodajanje DNA v reakcijsko mešanico PCR (BIOSAN DNA/RNA cleaner UVC/T-M-AR)
- komora za dodajanje produktov PCR v reakcijsko mešanico PCR (EHRET, Biosafe 2)
- aparatura PCR System 9700 GeneAmp PCR Cyclor (Perkin Elmer)
- zamrzovalnik, ki ohranja temperaturo - 20°C (NALGENE™ LabTop Cooler)
- avtoklavirana bidestilirana H₂O
- oligonukleotidni začetniki (preglednica 1)
- kemikalije reakcije PCR proizvajalca Applied Biosystems
 - 10x PCR Buffer II, Applied Biosystems/Roche, Cat. Št. 58002026-1
 - MgCl₂, 25 mM, Applied Biosystems/Roche, Cat. Št. 58002032-1
 - dNTP MIX, 10mM, Applied Biosystems/Roche

- AmpliTaq[®] DNA Polymerase 5U/μl, Applied Biosystems/Roche, Cat. Št. 58002040-1
- kemikalije reakcije PCR proizvajalca Promega
 - 5x green GoTaq Reaction buffer, Promega, Cat. Št. M791A
 - PCR nukleotidi dATP, Cat. Št. U120D
 - PCR nukleotidi dGTP, Cat. Št. U121A
 - PCR nukleotidi dCTP, Cat. Št. U122D
 - PCR nukleotidi dTTP, Cat. Št. U123U
 - GoTaq DNA Polymerase, Promega, Cat. Št. M830A
- komplet za reakcije PCR proizvajalca Invitrogen
 - Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity, 5U/ μl, Invitrogen, Cat. Št. 11304011

Preglednica 1: Pregled oligonukleotidnih začetnikov za reakcije PCR, ki smo jih uporabili v nalogi.

Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje (5' → 3')	Tarča	Vir
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	16S rRNA	Deng in Hiruki, 1991
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	23S rRNA	
6F	GAGTTTGATCCTGGCTCAGGAT	16S rRNA	Modificiran P1 (Hren in sod., 2007)
7R	CGTCCTTCATCGGCTCTT	23S rRNA	Enak kot P7
f01	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT	16S rRNA	Lorenz in sod., 1995
r01	AAGTGCCCAACTAAATGAT	16S rRNA	
PD1-f	TGGCGGCGTGCCTAATA	16S rRNA	Ustvarjeno v okviru diplomske naloge
PD1-r	TCCACTGTGCGCCCTTA	23S rRNA	
PD5-f	CTGGCGGCGTGCCTAATA	16S rRNA	Ustvarjeno v okviru diplomske naloge
PD5-r	CCAAGGCATCCACTGTGC	23S rRNA	

3.3.2 Metoda

Vse reakcije PCR smo naredili po istih postopkih; razlikovale so se v sestavi reakcijske mešanice PCR (preglednica 3, 5, 7, 9, 11), redčenju začetnih vzorcev DNA, redčenju produktov PCR ter v nastavitvah programa za reakcijo PCR (preglednica 4, 6, 8, 10, 12), ki je potekala v aparaturi PCR System 9700 Gene Amp PCR cycler (preglednica 2).

Uporabljali smo pipete s filtri.

- A. Priprava vzorcev za dodajanje v reakcijsko mešanico PCR (izolirana DNA ali produkti PCR).
- B. Izolirano DNA smo odtalili, zvrtnčili in centrifugirali. Priprava desetkratnih redčin DNA (36 μl sterilne bidestilirane H₂O in štiri μl izolirane DNA) ter 30x in 100x redčin produktov PCR. Redčene vzorce smo zvrtnčili in centrifugirali. Priprava reakcijske mešanice PCR:
 - 1) V komori za pripravo reakcijskih mešanic PCR smo odtalili vse kemikalije. Nato smo jih zvrtnčili ter centrifugirali.

- 2) Količina in vrsta kemikalij, ki smo jih dodali pri različnih reakcijskih mešanicah PCR, je navedena v preglednicah 3, 5, 7, 9, 11. Zaradi možnosti napake pri pipetiranju smo vedno pripravili deset procentov več reakcijske mešanice, kot smo jo dejansko potrebovali za določeno število reakcij.
- 3) Pripravljeno reakcijsko mešanico smo zvrtnčili ter centrifugirali, nato pa razdelili v označene 200 µl eppendorfove epruvete. Reakcijske mešanice smo do analize hranili na ledu.

C. Dodajanje vzorcev z začetno DNA ali produktov PCR v reakcijsko mešanico PCR in vstavljanje le teh v napravo za pomnoževanje DNA.

- 1) V komori za dodajanje produktov PCR ali začetne DNA smo dodali dva µl DNA oziroma produkta PCR, zvrtnčili in centrifugirali.
- 2) Reakcije PCR smo izvajali v aparaturi PCR System 9700 Gene Amp PCR cycler po protokolu, kot je navedeno v preglednici 4, 6, 8, 10, 12.
- 3) Uspešnost pomnoževanja DNA smo preverili z gelsko elektroforezo.

Preglednica 2: Zgradba različnih protokolov. Protokol JP-A je končna verzija protokola, ki smo ga med poskusi optimizirali in spreminjali. V nadaljevanju se ta vmesni protokol omenja kot protokol JP-AX, vse razlike glede na protokol JP-A pa so omenjene zraven.

Ime protokola	Redčenje vzorcev DNA	Sestava reakcijske mešanice za reakcijo PCR	Nastavitve programa za reakcijo PCR	Redčenje produktov PCR	Sestava reakcijske mešanice za ugnezdjeno reakcijo PCR	Nastavitve programa za ugnezdjeno reakcijo PCR
protokol 1	10x ali 0x	preglednica 3	preglednica 4	100x	preglednica 5	preglednica 6
protokol 2	/	preglednica 3	preglednica 4	/	preglednica 5	preglednica 6
protokol 3	/	preglednica 7	preglednica 8	30x	preglednica 9	preglednica 10
JP-A	/	preglednica 3	preglednica 4	/	preglednica 11	preglednica 12
JP-B	/	preglednica 7	preglednica 8	/	preglednica 9	preglednica 12

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR po protokolih 1, 2 in JP-A. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so 6F/7R.

Reakcijska mešanica PCR	Končna koncentracija	µl za eno reakcijo
Sterilna bdH ₂ O		16,28
10x pufer PCR	1x	4
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	4
dNTP mix (10 mM)	150 µM	0,6
Začetnik 6F (2,5 µM)	0,4 µM	6,4
Začetnik 7R (2,5 µM)	0,4 µM	6,4
Polimeraza <i>AmpliTaq</i> (5U/ µl)	4 U/100 µl	0,32
Skupaj		38

Preglednica 4: Nastavitve programa za reakcijo PCR po protokolih 1, 2 in JP-A.

Predhodna denaturacija	95°C / 2 min
Denaturacija	96°C / 30 s
Vezava začetnikov	50°C / 30 s
Podaljševanje	72°C / 3 min
Število ciklov	40
Končno podaljševanje	72°C / 10 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice ugnezdene reakcije PCR po protokolih 1 in 2. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so f01/r01.

Reakcijska mešanica PCR	Končna koncentracija	μl za 1 reakcijo
Sterilna bdH ₂ O		17,8
10x pufer PCR	1x	4
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	4
dNTP mix (10 mM)	150 μM	0,6
Začetnik (f01 (2,5 μM)	0,35 μM	5,6
Začetnik r01 (2,5 μM)	0,35 μM	5,6
Polimeraza <i>AmpliTaq</i> (5U/ μl)	5 U/100 μl	0,4
Skupaj		38

Preglednica 6: Nastavitve programa za ugnezdenu reakcijo PCR po protokolih 1 in 2.

Predhodna denaturacija	95°C / 1 min
Denaturacija	94°C / 30 s
Vezava začetnikov	54°C / 30 s
Podaljševanje	72°C / 1 min 30 s
Število ciklov	35
Končno podaljševanje	72°C / 10 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR po protokolih 3 in JP-B. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so P1/P7.

Reakcijska mešanica PCR	Končna koncentracija	μl za 1 reakcijo
Sterilna bdH ₂ O		32,750
5x <i>green GoTaq</i> pufer	1x	10
dNTP mix (10mM)	200 μM	1
Začetnik P1 (10 μM)	0,4 μM	2
Začetnik P7 (10 μM)	0,4 μM	2
Polimeraza <i>GoTaq</i> 5U/μl	1,25 U	0,250
Skupaj		48

Preglednica 8: Nastavitve programa za reakcijo PCR po protokolih 3 in JP-B.

Predhodna denaturacija	94°C / 2 min
Denaturacija	94°C / 1 min
Vezava začetnikov	55°C / 1 min
Podaljševanje	72°C / 2 min
Število ciklov	36
Končno podaljševanje	72°C / 8 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

Preglednica 9: Sestava reakcijske mešanice ugnezdene reakcije PCR po protokolih 3 in JP-B. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so f01/r01 (protokol 3) ali PD1-f/r (protokol JP-B).

Reakcijska mešanica PCR	Končna koncentracija	μl za 1 reakcijo
Sterilna bdH ₂ O		32,750
5x <i>green GoTaq</i> pufer	1x	10
dNTP mix (10mM)	200 μM	1
Začetnik f01 ali PD-f (10 μM)	0,4 μM	2
Začetnik r01 ali PD1-r (10 μM)	0,4 μM	2
Polimeraza <i>GoTaq</i> 5U/μl	1,25 U	0,250
Skupaj		48

Preglednica 10: Nastavitve programa za ugnezdjeno reakcijo PCR po protokolu 3.

Predhodna denaturacija	94°C / 2 min
Denaturacija	94°C / 1 min
Vezava začetnikov	50°C / 1 min
Podaljševanje	72°C / 2 min
Število ciklov	38
Končno podaljševanje	72°C / 8 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-A. Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni pri tej reakciji, so PD1-f/r.

reakcijska mešanica PCR	Končna koncentracija	μl za 1 reakcijo
Sterilna bdH ₂ O		37,7
10x pufer PCR	1x	5
MgSO ₄ (50 mM)	2 mM	2
dNTP mix (10 mM)	200 μM	1
Začetnik PD1-f (10 μM)	0,2 μM	1
Začetnik PD1-r (10 μM)	0,2 μM	1
Polimeraza Platinum <i>Taq</i> (5U/ μl)	1,5 U/100 μl	0,3
Skupaj		48

Preglednica 12: Nastavitve programa za ugnezdjeno reakcijo PCR po protokolih JP-A in JP-B.

Predhodna denaturacija	94°C / 2 min
Denaturacija	94°C / 30 s
Vezava začetnikov	53°C / 30 s
Podaljševanje	68°C / 2 min
Število ciklov	35
Končno podaljševanje	68°C / 10 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

3.4 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili za preverjanje uspešnosti pomnožitve DNA in za preverjanje uspešnosti izolacije produktov PCR za nadaljnje določanje nukleotidnih zaporedij.

3.4.1 Material

- nitrilne rokavice
- parafilm
- škarje
- Agarozna, Sigma, A-9539
- erlenmajerica
- tehtnica, Sartorius, BP 310 S
- laboratorijski pribor
- banjica za elektroforezo, Biorad
- glavnički in nosilci za gele, Biorad
- pipete z nastavki
- EDTA, Sigma, E-5140
- Tris-HCL, Sigma, T-5594
- bd H₂O
- papirnate brisače
- mikrovalovna pečica
- libela
- nanašalni pufer 6x Loading Dye, Fermentas
- 50% glicerol
- raztopina etidijevega bromida, 10mg/ml, Sigma, E-1510
- označevalec dolžine fragmentov Gene Ruler[®] 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Cat. Št. SM0321
- vir električne napetosti, Biorad Powerpack 3000
- računalnik povezan z aparaturom za fotografiranje gelov v UV spektru, Biosystematica, UVI prosystem

3.4.2 Metoda

Od tretjega koraka dalje smo vedno uporabljali nitrilne rokavice, saj je etidijev bromid za človeka kancerogen.

1. Najprej smo pripravili 50 x koncentriran pufer TAE. V preglednici 13 so našteje kemikalije, ki smo jih uporabili pri sestavi pufera TAE. Po koncu priprave smo pufer 50x redčili, tako da smo dobili 1x pufer TAE.
2. Nanašalni pufer (6x loading dye) smo redčili z glicerolom z namenom odstranitve lis na agaroznem gelu pri slikanju pod UV lučjo. Zmešali smo 500 µl 50% glicerola s 50 µl 6 x koncentriranega nanašalnega pufera.

- Pri pripravi agaroznega gela smo morali biti pozorni na velikost banjice in nosilca, ki smo ju uporabili. Sestave agaroznih gelov glede na velikosti banjice in nosilca so predstavljene v preglednici 14.

Preglednica 13: Pregled sestavin 50x pufra TAE.

50x pufer TAE	Za 1000 ml:
Tris – Base	242 g
Ledocetna kislina	57,1 ml
0.5 M EDTA (ph=8.0)	100 ml
bd H ₂ O	dopolnimo do končnega volumna 1000 ml

Preglednica 14: Sestavine za pripravo agaroznega gela glede na velikost banjice in nosilca.

Nosilec	Volumen	Sestavina	1% agarozni gel	2% agarozni gel	Etidijev bromid
Manjši za malo banjico	40 ml	1x TAE	40 ml	40 ml	0,2 µl
		agarozna	0,4 g	0,8 g	
Manjši za srednjo banjico	60 ml	1x TAE	60 ml	60 ml	0,3 µl
		agarozna	0,6 g	1,2 g	
Večji za srednjo banjico	80 ml	1x TAE	80 ml	80 ml	0,4 µl
		agarozna	0,8 g	1,6 g	
Večji za veliko banjico	180 ml	1x TAE	180 ml	180 ml	0,9 µl
		agarozna	1,8 g	3,6 g	

- Agarozo in pufer TAE smo dali v erlenmajerico. Ustje erlenmajerice smo zatesnili s papirnato brisačo ter jo segrevali v mikrovalovni pečici do vretja oz. dokler se agarozna ni raztopila.
- Ohlajeni raztopini agaroze smo dodali etidijev bromid (10mg/ml) ter dobro premešali. Agarozo smo razlili po nosilcu z glavničkom.
- Trden agarozni gel smo skupaj z nosilcem prenesli v banjico za elektroforezo. Dolili smo 1x pufer TAE in z njim prekrili agarozni gel. Nato smo odstranili glavniček.
- Na parafilm smo nanesli od dva do pet µl velike kapljice razredčenega nanašalnega pufra (6x loading dye in 50% glicerol). Prvi kapljici smo dodali en µl dolžinskega označevalca (Gene Ruler[®] 100 bp DNA Ladder Plus), ju premešali na parafilmu in prenesli v prvo luknjico na gelu. Ostalim kapljicam smo dodali 12-25 µl produktov PCR, jih na parafilmu premešali ter prenesli v luknjice na gelu.
- Pokrov banjice smo zaprli, s čimer smo banjico povezali z virom električne napetosti. Elektroforeza je potekala 30-60 min pri 70-100 V, 400 mA in 250 W.
- Po končani elektroforezi smo gel prenesli v aparaturo za fotografiranje gelov v UV spektru, ter ga fotografirali s pomočjo računalniškega programa UVI Photo MV.

3.5 IZOLACIJA PRODUKTOV PCR ZA NADALJNJE DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREJA

3.5.1 Čiščenje produktov PCR iz elektroforeznega gela s pomočjo kompleta DNA Gel Extraction Kit

3.5.1.1 Material

- elektroforezni gel s produkti PCR
- rezila za enkratno uporabo
- DNA Gel Extraction Kit, Millipore Corporation, Bedford, MA, Cat. Št. LSKG ELO 50
- očala za gledanje modre svetlobe
- transiluminator modre svetlobe
- navadne in nitrilne rokavice
- namizna centrifuga Eppendorf 5417R

3.5.1.2 Metoda

Produkte PCR smo izrezali iz gela ter jih očistili s kompletom DNA Gel Extraction Kit po navodilu proizvajalca (DNA Gel Extraction Kit, Millipore Corporation, Bedford, MA, Cat. Št. LSKG ELO 50).

3.5.2 Čiščenje produktov PCR z uporabo kompleta MiniElute[®] PCR purification Kit

3.5.2.1 Material

- produkti PCR
- MiniElute[®] PCR purification kit, Qiagen, Cat. Št. 28004
- namizna centrifuga Eppendorf 5417R
- rokavice
- pipeta z nastavki (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl)
- eppendorf epruvete z varnostnim zapiralom (1,5 ml)
- stojalo za eppendorfove epruvete

3.5.2.2 Metoda

Produkte PCR smo očistili z uporabo kompleta MiniElute[®] PCR purification Kit po navodilu proizvajalca (MiniElute PCR Purification Kit, Qiagen, Cat. Št. 28004).

Odstopanja od navodil proizvajalca:

- Pri produktih PCR, pomnoženih po protokolu JP-B, je bila reakcijska mešanica zelena. Zaradi tega nismo mogli zaznati morebitne spremembe barve, ki bi nastala kot posledica neustreznega pH po dodatku pufra PB z indikatorjem pH.

Neustrezen pH smo zaznali s papirnatim indikatorjem pH, ter ga popravili z dodajanjem 10 μ l 3 M natrijevega acetata.

- očiščen produkt PCR smo dvakrat eluirali z 10 μ l pufru EB.

3.6 RAČUNALNIŠKA IZDELAVA OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV PD1-F/R, PD5-F/R IN JPR1/JPF1

Iz podatkovne baze NCBI Nucleotide smo v program Primer Express prenesli objavljeno zaporedje gena, ki smo ga želeli pomnožiti. V programu smo si izbrali želene začetne parametre (velikost začetnikov od 17-23 nukleotidov, velikost amplikona vsaj 1500 bp, vsebnost GC v začetniku 40-60%, T_m začetnika 52-59°C). Program je našel veliko parov začetnikov, ki so ustrezali danim parametrom, zato smo med njimi poiskali tiste, ki niso tvorili nezaželenih sekundarnih struktur. Najprimernejšim parom začetnikov smo s pomočjo orodja BLAST poiskali vsa homologna zaporedja v bazi podatkov NCBI Nucleotide. Ujemanja začetnikov z nukleotidnimi zaporedji drugih organizmov so pomenile nezadostno specifičnost začetnikov, zato smo le te izločili iz izbora.

3.7 OBDELAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

3.7.1 Nukleotidna zaporedja prebranih vzorcev

Nukleotidno zaporedje so določili v MacroGen INC, Korea. Vsak vzorec je bil bran štirikrat, dvakrat z dvema smiselničima začetnikoma (PD1-f ter JPF1) in dvakrat z dvema protismiselničima začetnikoma (PD1-r ter JPR1). S hitrim vpogledom smo ugotovili katera nukleotidna zaporedja so bila dovolj uspešno prebrana ($QV \geq 20$ je moral biti nad 700), ter le ta prenesli v nadaljnjo računalniško obdelavo. Da smo lahko uspešno analizirali zaporedje enega vzorca, so morala biti uspešna vsa štiri branja. Najprej smo na kromatogramih preverili, če so vrhovi dovolj čisti, in odrezali slabo prebran začetek in konec zaporedja. Nato smo vsa štiri zaporedja vzporedili v soseške (ang. contig) s pomočjo programa Contig Express. Neujemanja med smiselničimi in protismiselničimi zaporedji smo preverili na kromatogramih s primerjanjem kakovosti vrhov neujemajočih nukleotidov. Nukleotid s kakovostnejšim vrhom smo sprejeli kot pravilno prebran. Po končani analizi vsakega izmed zaporedij smo jih vse vzporedili v soseško in jih primerjali med seboj. V kolikor smo po ponovnem ogledu kromatograma razlike še vedno smatrali za pravilne, smo jih lahko zabeležili kot mutacije.

3.7.2 Primerjava nukleotidnih zaporedij iz baze podatkov NCBI

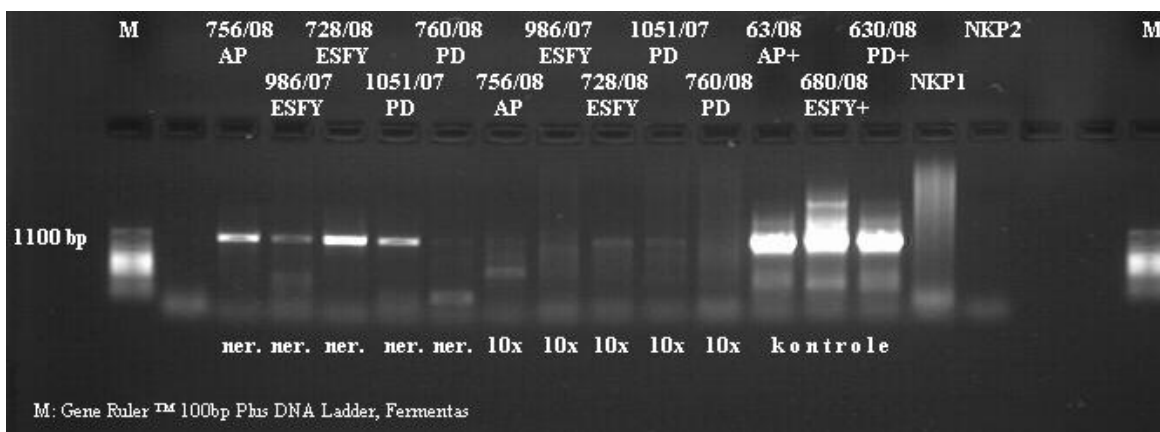
V bazi podatkov NCBI Nucleotide smo poiskali določen gen zelenega tipa fitoplazme, ter s pomočjo orodja BLAST pridobili vsa podobna nukleotidna zaporedja tega gena, ki so kdajkoli bila objavljena v podatkovni bazi. Vsa dobljena zaporedja smo prenesli v program Contig Express, kjer smo s pomočjo vzporejanja le teh pridobili podatke o njihovi podobnosti znotraj različno širokega sorodstva fitoplazem.

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA DIAGNOSTIČNEGA PROTOKOLA FITOPLAZEM IZ SKUPINE AP Z UGNEZDENO REAKCIJO PCR

4.1.1 Primerjava uspešnosti reakcije PCR po protokolu 1 z desetkrat redčeno ter neredčeno DNA

Poskus je zajemal pet vzorcev DNA, ki so bili predhodno okarakterizirani kot pozitivni na fitoplazme tipa AP, PD in ESFY. Vsak vzorec DNA smo testirali dvakrat; prvič kot neredčeno DNA, drugič pa smo jih pred reakcijo PCR desetkrat redčili. Vse vzorce smo pomnoževali po protokolu 1. Rezultati poskusa so prikazani na sliki gelske elektroforeze (slika 9).

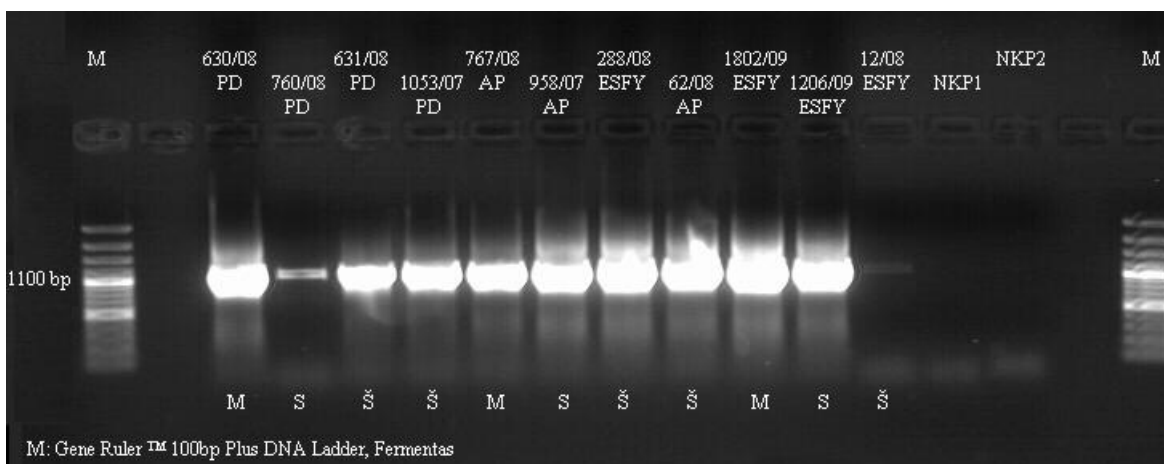


Slika 9: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu 1; 1% agarozni gel; 63/08 je pozitivna kontrola za fitoplazmo AP, 680/08 je pozitivna kontrola za fitoplazmo ESFY, 630/08 je pozitivna kontrola za fitoplazmo PD; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 pa je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR; znak ner. v spodnjem delu slike označuje neredčen vzorec, znak 10x pa predstavlja desetkrat redčen vzorec.

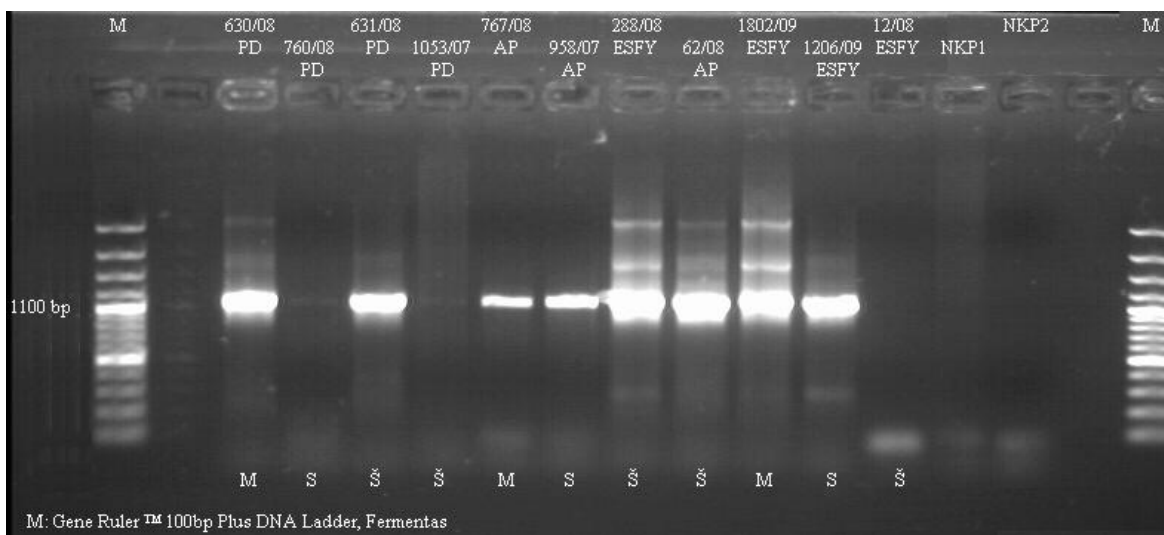
Testiranje neredčenih vzorcev DNA po protokolu 1 kaže večjo uspešnost pomnoževanja, saj so bili vsi vzorci pozitivni. Od tega je bil šibko pozitiven le vzorec 760/08, medtem ko so bili ostali štirje vzorci močno pozitivni. V primeru testiranja desetkrat redčene DNA smo dobili šibek signal le za tri vzorce (756/08, 728/08 in 1051/07), medtem ko sta vzorca 986/07 in 760/08 negativna.

4.1.2 Preizkus uporabe različnih protokolov za izvedbo ugnezdene reakcije PCR, specifične za fitoplazme iz skupine AP

Primerjali smo občutljivost treh protokolov za izvedbo ugnezdene reakcije PCR z začetniki, specifičnimi za fitoplazme iz skupine AP. V poglavju 3.3 so primerjani protokoli označeni kot protokol 1, 2 in 3. V primerjavo smo vključili vzorce z različno koncentracijo fitoplazemske DNA fitoplazem AP, PD in ESFY. Koncentracija fitoplazemske DNA je bila ocenjena na podlagi rezultatov specifičnih testov reakcije PCR v realnem času. Rezultati vseh treh reakcij so vidni na slikah gelske elektroforeze (slika 10, 11, 12).



Slika 10: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu 3; 1% agarozni gel; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR; M - vzorec z veliko tarčne DNA, S - vzorec s srednjo količino tarčne DNA, Š - vzorec z malo tarčne DNA.



Slika 11: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu 2; 1% agarozni gel; velikost fragmentov okoli 1100 bp; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR; M - vzorec z veliko tarčne DNA, S - vzorec s srednjo količino tarčne DNA, Š - vzorec z malo tarčne DNA.



Slika 12: Produkti ugnezdena reakcije PCR po protokolu 1; 1% agarozni gel; velikost fragmentov okoli 1100 bp; NKP1 je negativna kontrola poskusa reakcije PCR, NKP2 je negativna kontrola poskusa ugnezdena reakcije PCR; M - vzorec z veliko tarčne DNA, S - vzorec s srednjo količino tarčne DNA, Š - vzorec z malo tarčne DNA.

Protokol 3 (slika 10) se je izkazal kot najobčutljivejši, saj smo dobili pozitiven rezultat za vseh 11 vzorcev. Pri protokolu 1 (slika 12) smo dobili pozitiven rezultat le za šest vzorcev (630/08, 631/08, 288/08, 62/08, 1802/09, 1206/09), medtem ko je bilo pet vzorcev negativnih (760/08, 1053/07, 767/08, 958/07, 12/08). Protokol 2 (slika 11) je dal boljše rezultate kot protokol 1 (slika 12), saj je kar deset vzorcev pozitivnih, negativen pa le eden (12/08). Vzorca 760/08 in 1053/07 sta bila sicer zelo šibko pozitivna in bi se njune produkte PCR težko uporabilo za določanje nukleotidnega zaporedja. Prikaz uspešnosti vseh treh protokolov je prikazan v preglednici 15.

Preglednica 15: Primerjava uspešnosti treh različnih protokolov za ugnezdeno reakcijo PCR z začetniki, specifičnimi za fitoplazme iz skupine AP.

Vrsta protokola	Uspešno pomnoženi vzorci PD	Uspešno pomnoženi vzorci AP	Uspešno pomnoženi vzorci ESFY	Skupno število uspešno pomnoženih vzorcev
Protokol 3	4/4	4/4	3/3	11/11
Protokol 2	4/4	4/4	2/3	10/11
Protokol 1	2/4	2/4	2/3	6/11

4.2 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA V RAZLIČNIH IZOLATIH FITOPLAZME PD

4.2.1 Sinteza oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r in PD5-f/r ter optimizacija njihove uporabe pri ugnezdeni reakciji PCR

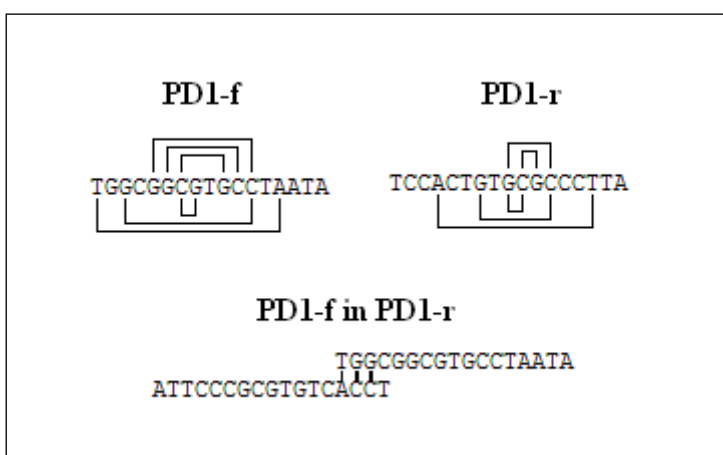
4.2.1.1 Primerjava zgradbe in lastnosti obeh parov začetnikov

Produkti ugnezdena reakcije PCR z oligonukleotidnimi začetniki f01/r01 so dolgi okoli 1100 baznih parov. Naš namen pa je bil pomnožiti maksimalno dolžino nukleotidnega zaporedja, ki ga dobimo po prvem pomnoževanju z univerzalnimi začetniki, in je dolgo okoli 1750 baznih parov. S pomočjo programa Primer Express smo izdelali dva para oligonukleotidnih začetnikov. Oba smiselna in oba protismiselna začetnika se vežeta na DNA le nekaj deset baznih mest proč od mesta vezave univerzalnih začetnikov 6F/7R in

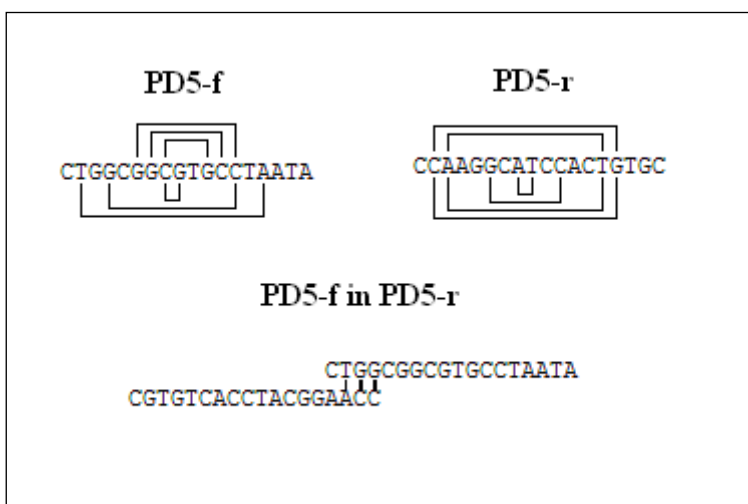
P1/P7. Tako nam oba para začetnikov omogočata pomnožitev več kot 1700 bp dolgega fragmenta, ki vključuje del gena 16S rRNA in 23S rRNA ter vmesno regijo med njima. Lastnosti obeh parov oligonukleotidnih začetnikov so v preglednici 16 ter na slikah 13 in 14.

Preglednica 16: Osnovne značilnosti sintetiziranih oligonukleotidnih začetnikov; T_m predstavlja temperaturo, ko se 50% začetnikov veže na DNA; vsebnost GC pove koliko % začetnika je sestavljenega iz gvanina ali citozina.

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje (5' → 3')	Število baz	T _m [°C]	Tarča	Vsebnost GC
PD1-f	TGGCGGCGTGCCTAATA	17	55.2	16S rRNA	58.8 %
PD1-r	TCCACTGTGCGCCCTTA	17	55.2	23S rRNA	58.8 %
PD5-f	CTGGCGGCGTGCCTAATA	18	58.2	16S rRNA	61.1 %
PD5-r	CCAAGGCATCCACTGTGC	18	58.2	23s rRNA	61.1 %



Slika 13: Sekundarna struktura ali »hairpin« obeh oligonukleotidnih začetnikov (zgoraj) in njun dimer (spodaj).

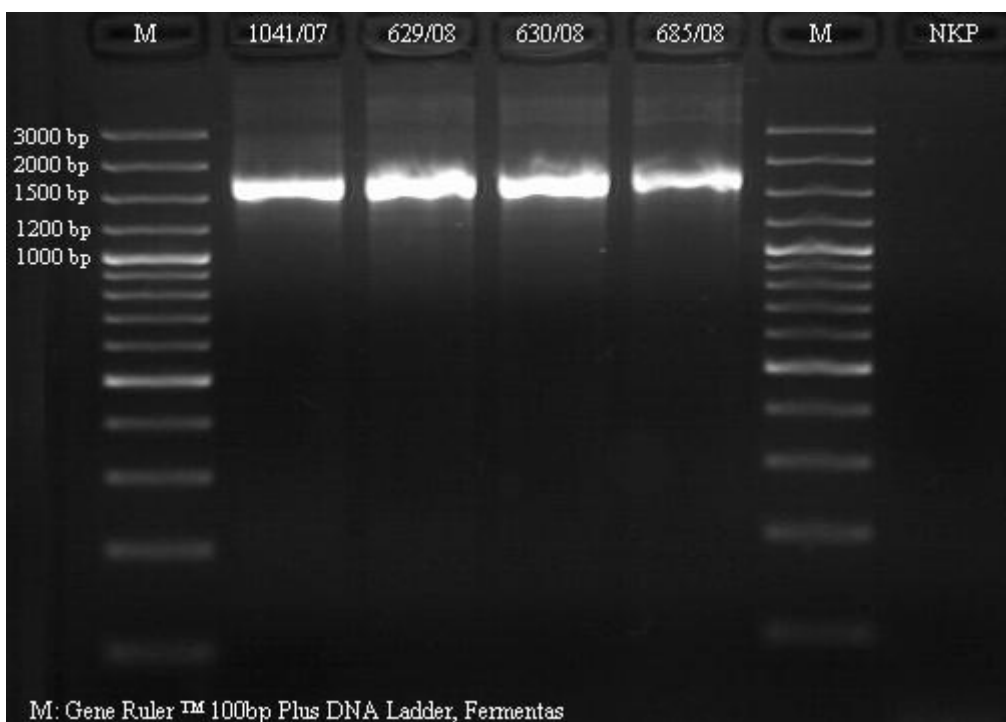


Slika 14: Sekundarna struktura ali »hairpin« obeh oligonukleotidnih začetnikov (zgoraj) in njun dimer (spodaj).

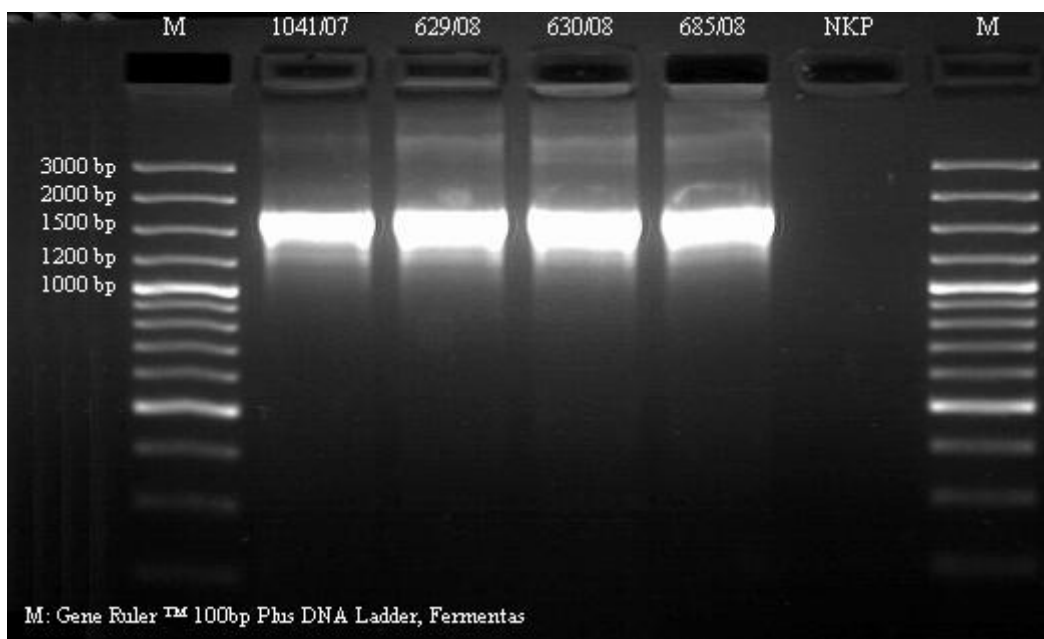
Kot je razvidno iz preglednice 16 in slik 13 ter 14, imata oba para oligonukleotidnih začetnikov isto T_m , primerno dolžino ter visoko vsebnost GC, ki je pomembna pri obstojnosti začetnikov. Njun dimer ne tvori nezaželenih oblik, saj se le te pojavijo, ko se smiselni začetnik popolnoma prilega protismiselnemu začetniku, ali pa če se začetnika prilegata s 3' koncem drug na drugega. Teoretična velikost amplicona po ugnezdni reakciji PCR z začetnikoma PD1-f/r je 1725 bp, z začetnikoma PD5-f/r pa 1734 bp.

4.2.1.2 Primerjava rezultatov ugnezdene reakcije PCR z uporabljenima paroma začetnikov

Oba začetnika smo uporabili v ugnezdni reakciji PCR. Za testne vzorce smo vzeli vzorce fitoplazme PD (1041/07, 629/08, 630/08 in 685/08). Uporabili smo protokol JP-AX. Pri ugnezdni reakciji PCR z začetnikoma PD1-f/r smo uporabili koncentracijo polimeraze 3U/100 μ l, pri reakciji z začetnikoma PD5-f/r pa 2U/100 μ l. Temperatura vezave oligonukleotidnih začetnikov je bila 52 °C. Na spodnjih dveh slikah (slika 15 in 16) so vidni rezultati obeh ugnezdenih reakcij PCR.



Slika 15: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-AX z začetniki PD1-f/r; 2% agarozni gel; velikost fragmentov je okoli 1730 bp; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.

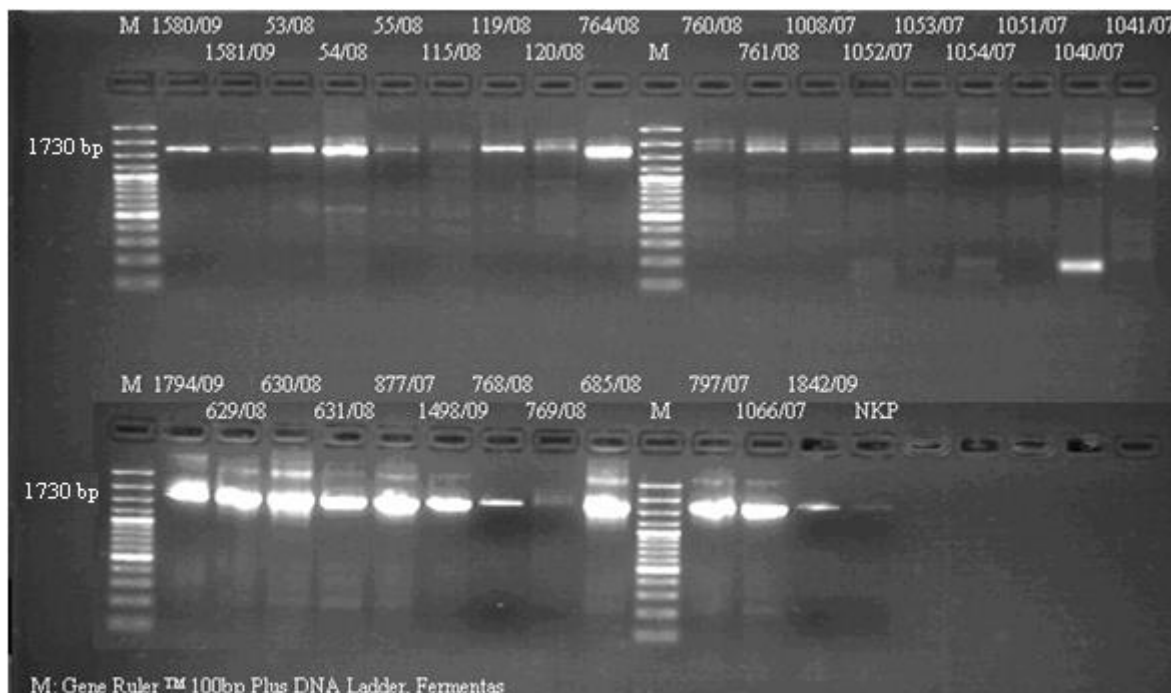


Slika 16: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-AX z začetniki PD5-f/r; 2% agarozni gel; velikost fragmentov je okoli 1730 bp; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.

Oba para začetnikov sta se izkazala kot uspešna, saj so bili vsi štiri vzorci fitoplazme PD pomnoženi, fragmenti DNA pa kažejo velikost okoli 1730 bp. Pri nadaljnjem pomnoževanju vzorcev smo uporabljali začetnike PD1-f/r. Koncentracija polimeraze Platinum *Taq* je bila primerna pri obeh poskusih, torej je koncentracija 2 U/100 μ l zadostna za potek ugnezdene reakcije PCR.

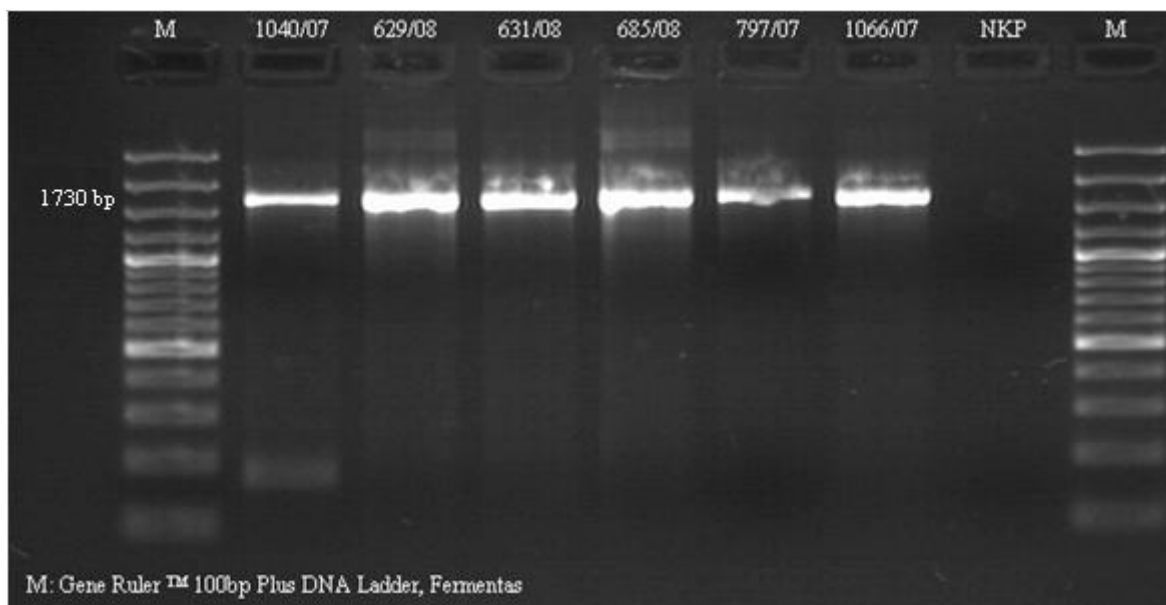
4.2.1.3 Optimizacija uporabe začetnikov PD1-f/r pri ugnezdni reakciji PCR

Ugnezdeno reakcijo PCR smo izvajali po protokolu JP-AX z začetniki PD1-f/r. Vezava začetnikov je bila pri 52 °C, koncentracija polimeraze pa 2U/100 μ l. Analizirali smo 30 vzorcev DNA, ki so bili že predhodno potrjeni kot pozitivni na fitoplazmo PD (preglednica 19). Rezultati ugnezdene reakcije PCR so vidni na sliki 17. Uspešno pomnožene produkte PCR smo nato očistili in poslali na določanje nukleotidnega zaporedja.



Slika 17: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-AX; 2% agarozni gel; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.

Kar nekaj vzorcev je po ugnezdeni reakciji PCR dalo poleg specifičnih tudi nespecifične pomnožke (produkti ugnezdene reakcije PCR, ki so na gelu vidni kot krajši ali daljši od specifičnih). Odločili smo se spremeniti do tedaj uporabljen protokol JP-AX, tako da smo koncentracijo polimeraze Platinum *Taq* zmanjšali iz dva na 1,5 U/100 μ l, temperaturo vezave začetnikov pa zvišali iz 52 °C na 53 °C. Uporabili smo protokol JP-A. V poskus smo vključili le tistih nekaj vzorcev, pri katerih smo s prvim protokolom JP-AX dobili poleg specifičnih tudi nespecifične pomnožke. Rezultati novega poskusa so na sliki 18.



Slika 18: Produkti ugnezdene reakcije PCR po protokolu JP-A; 2% agarozni gel; velikost fragmentov okoli 1730 bp; NKP je negativna kontrola poskusa ugnezdene reakcije PCR.

4.2.2 Čiščenje produktov PCR z uporabo kompletov DNA Gel Extraction Kit in MinElute PCR Purification Kit.

Z uporabo kompleta DNA Gel Extraction Kit smo očistili pet vzorcev (1580/09, 1581/09, 53/08, 1040/07, 630/08). Metoda, ki temelji na uporabi kompleta MinElute PCR Purification Kit, pa je bila uporabljena pri čiščenju osmih vzorcev (115/08, 1052/07, 1053/07, 1051/07, 1794/09, 877/07, 768/08, 685/08). Določanje nukleotidnega zaporedja vzorcev, ki so bili očiščeni na en ali drugi način, je potekalo s parom oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r. Z uporabo kompleta DNA Gel Extraction Kit je bilo uspešno prebranih šest od desetih zaporedij. Z uporabo kompleta MinElute PCR Purification Kit pa je bilo od 16 branj uspešnih le osem. Kljub temu smo zaradi enostavnosti samega čiščenja v nadaljevanju za čiščenje produktov PCR uporabljali komplet MinElute PCR Purification Kit.

4.2.3 Določanje nukleotidnega zaporedja produktov PCR

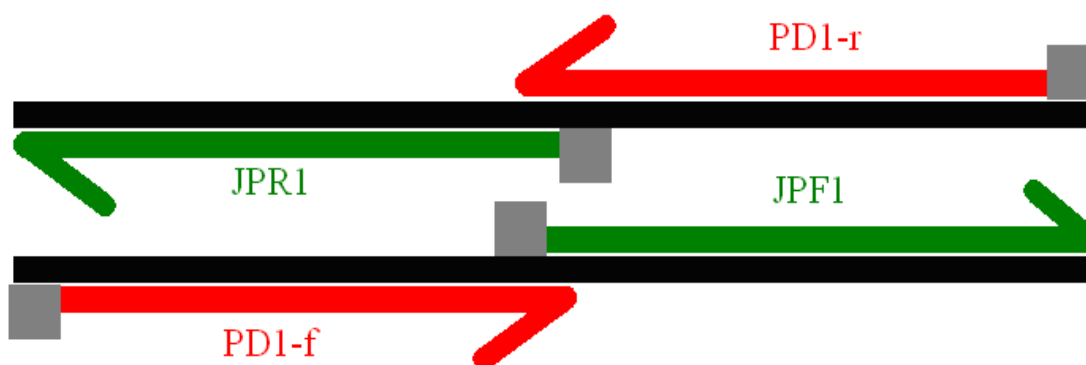
4.2.3.1 Optimizacija postopka določanja nukleotidnega zaporedja produktov PCR

Nukleotidna zaporedja pomnoženih vzorcev smo najprej poskusili določiti s pomočjo para oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r. Celoten pomnoženi odsek DNA naj bi bil dolg okoli 1730 baznih parov, z enim branjem pa lahko dobro preberemo le 900 bp dolgo zaporedje. Torej nam branje z le enim parom začetnikov ni dalo celotnega 1730 bp dolgega smiselnega in protismiselnega zaporedja. Z namenom kakovostne določitve celotnega nukleotidnega zaporedja smo v programu Primer Express izdelali nov par oligonukleotidnih začetnikov JPF1 in JPR1. Njune lastnosti so predstavljene v preglednici

17. Oba začetnika se vežeta na DNA približno na sredini amplikona (slika 19). S tem smo celoten del zaporedja pokrili tako z branjem v smiselni smeri kakor tudi z branjem v protismiselni smeri.

Preglednica 17: Osnovne značilnosti izdelanih oligonukleotidnih začetnikov JPF1/R1; T_m predstavlja temperaturo, ko se 50% začetnikov veže na DNA; vsebnost GC pove koliko % začetnika je sestavljenega iz gvanina ali citozina.

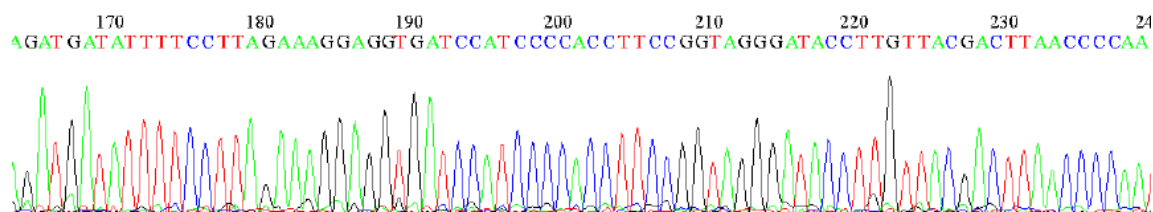
Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje (5' → 3')	Število baz	T _m [°C]	Vsebnost GC
JPF1	GCATTAAGTACTCCGCCTGAGT	22	56	50 %
JPR1	AAACAACATGATCCACCGCT	20	57	45%



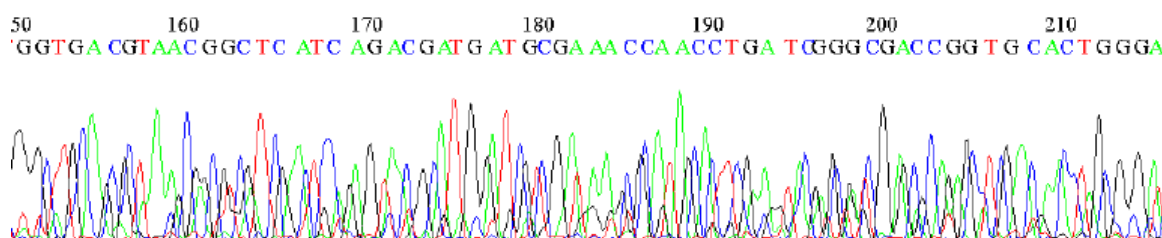
Slika 19: Grafični prikaz mesta vezave oligonukleotidnih začetnikov ter smer delovanja polimeraze. Začetniki so označeni s sivimi kvadrati, puščica, ki izhaja iz njih, pa predstavlja smer in dolžino delovanja polimeraze. S črnima črtama je označena dvojna vijačnica DNA, dolga okoli 1730 bp, ki smo jo predhodno pomnožili. Z rdečo barvo je označeno določanje zaporedja, ki ga omogočata začetnika JPF1/JPR1, z zeleno barvo pa določanje zaporedja, ki ga omogočata začetnika PD1-f/r.

4.2.3.2 Primerjava uspešnosti določanja nukleotidnega zaporedja produktov PCR, pomnoženih z različnimi protokoli

Določanje nukleotidnega zaporedja ni bilo uspešno za vsak vzorec. Primer kromatograma uspešno prebranega nukleotidnega zaporedja je viden na sliki 20, primer kromatograma neuspelega branja pa na sliki 21. V optimalnih razmerah bi za določitev nukleotidnega zaporedja 30 vzorcev s štirimi oligonukleotidnimi začetniki opravili 120 branj. Ker pa branje ni vedno uspelo, smo morali neuspešno prebrane produkte PCR ponovno pomnožiti z ugnezdno reakcijo PCR ter jih nato poslati na novo branje. Tako smo opravili 268 branj, od tega 220 narejenih po protokolih JP-A in JP-AX ter 48 po protokolu JP-B. Uspešnost določanja nukleotidnega zaporedja produktov PCR enega in drugega protokola je vidna v preglednici 18.



Slika 20: Primer kromatograma uspelega določanja nukleotidnega zaporedja. Vrhovi so samostojni in se ne prekrivajo.



Slika 21: Primer kromatograma neuspelega določanja nukleotidnega zaporedja. Vrhovi se prekrivajo.

Preglednica 18: Primerjava uspešnosti določanja nukleotidnega zaporedja produktov PCR. S temno zeleno barvo so označeni produkti PCR, ki so bili pomnoženi po protokolih JP-A in JP-AX. Vseh šest serij je imelo skupno osnovno reakcijo PCR, nato pa je sledilo šest ugnezenih reakcij PCR. Z modro barvo so obarvani produkti PCR, pomnoženi po protokolu JP-B.

Datum branja vzorcev	Število vseh branj	Število zadovoljivih branj	Razmerje med uspelimi in neuspelimi branji
22.2.2009	26	14	53%
12.3.2009	7	4	57%
12.4.2009	104	50	48%
14.4.2009	53	13	25%
18.5.2009	30	9	30%
25.5.2009	17	1	5%
16.6.2009	33	28	85%
29.7.2009	15	11	73%

4.2.3.3 Analiza in primerjava nukleotidnega zaporedja genomskega odseka 16S/23S rRNA fitoplazme PD

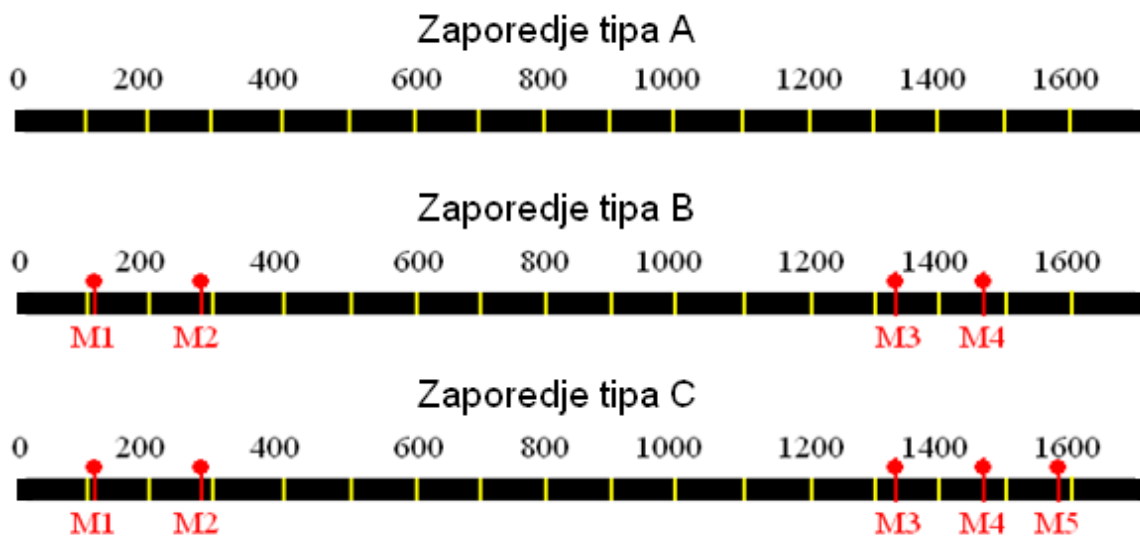
Od 30 izolatov PD, ki smo jih uporabili v raziskavi (preglednica 19), smo po osmih branjih dobili popolna zaporedja 23 vzorcev, dolga okoli 1630 bp. Začetek in konec zaporedja smo morali skrajšati za približno 50 baznih parov na vsakem koncu, saj so bili le ti zaradi slabega začetnega delovanja polimeraze slabše prebrani. Vzporeditve v soseske s programom Contig Express v Vectorju NTI so pokazale tri različne tipe zaporedij, ki smo jih označili kot tip zaporedja A, B in C. Poravnave celotnih nukleotidnih zaporedij so natančneje prikazane v prilogi D.

Preglednica 19: Številka vzorcev in njihov tip zaporedja, lokacija nabiranja ter sorta. Z rjavo barvo so označeni vzorci, katerim nismo določili zaporedja. Vzorci s tipom zaporedja A so označeno z zeleno barvo, vzorci s tipom zaporedja B z oranžno in vzorci s tipom zaporedja C z modro barvo.

Številka vzorca/letnica	Tip zaporedja	Lokacija vzorca	Sorta
797/07	A	okolica Kranja	Bezgomovka
877/07	A	okolica Ljubljane	Konferans
1008/07	A	okolica Celja	Pakhamb
1040/07	C	okolica Celja	Kledžo
1041/07	C	okolica Celja	Rdeča Viljamovka
1051/07	/	okolica Celja	?
1052/07	A	okolica Celja	?
1053/07	A	okolica Celja	?
1054/07	A	okolica Celja	?
1066/07	A	okolica Novega Mesta	Viljamovka
53/08	A	okolica Celja	?
54/08	A	okolica Celja	?
55/08	A	okolica Celja	?
115/08	A	okolica Celja	Viljamovka
119/08	/	okolica Celja	Viljamovka
120/08	A	okolica Celja	?
629/08	A	okolica Ljubljane	Viljamovka
630/08	A	okolica Ljubljane	Viljamovka
631/08	A	okolica Ljubljane	Kledžo
685/08	A	okolica Maribora	Viljamovka
760/08	/	okolica Celja	Viljamovka
761/08	/	okolica Celja	Viljamovka
764/08	B	okolica Celja	Rdeča Viljamovka
768/08	A	okolica Maribora	Viljamovka
769/08	/	okolica Maribora	Viljamovka
1498/09	A	okolica Maribora	Avranška
1580/09	A	okolica Velenja	Julijska Leptica
1581/09	/	okolica Velenja	Hardijeva
1794/09	A	okolica Ljubljane	David
1842/09	/	okolica Ptuja	Boskova Steklenina

Tipu zaporedja A pripada 20 vzorcev, tipu B eden ter tipu C dva vzorca. Vsi trije vzorci, ki odstopajo od osnovnega tipa A, so bili nabrani v okolici Celja. Vzorca 764/08 in 1041/7 sta bila najdena na sorti rdeča Viljamovka, medtem ko je bil vzorec 1040/07 izoliran iz sorte Kledžo. Oba vzorca s tipom zaporedja C sta bila nabrana leta 2007, medtem ko je bil vzorec s tipom B nabran leta 2008. Vseh ostalih 20 vzorcev ima zaporedje tipa A, čeprav so si leto nabiranja, geografska pozicija ter sorta med seboj različni. Razlika med tipoma zaporedja A in B je v štirih bazah, razlika med tipoma B in C je v eni bazi, razlika med tipoma A in C pa je v petih bazah. Grafični prikaz lokacij razlik med tipi zaporedij je

podan na sliki 22. Natančneje pa so mutacije, ki so povzročile različne tipe zaporedij, predstavljene v preglednici 20.



Slika 22: Grafična predstavitev razlik med tipi zaporedja A, B in C. Zaporedje je dolgo okoli 1630 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki s pomočjo števila nad njimi označujejo dolžino zaporedja. Znaki od M1 do M5 predstavljajo spremembo nukleotida, ki je natančneje opisana v preglednici 20.

Preglednica 20: Opis nastalih mutacij med zaporedji fitoplazme PD. Za prvotno zaporedje smo vzeli tip A, tipa B in C pa sta mutirana.

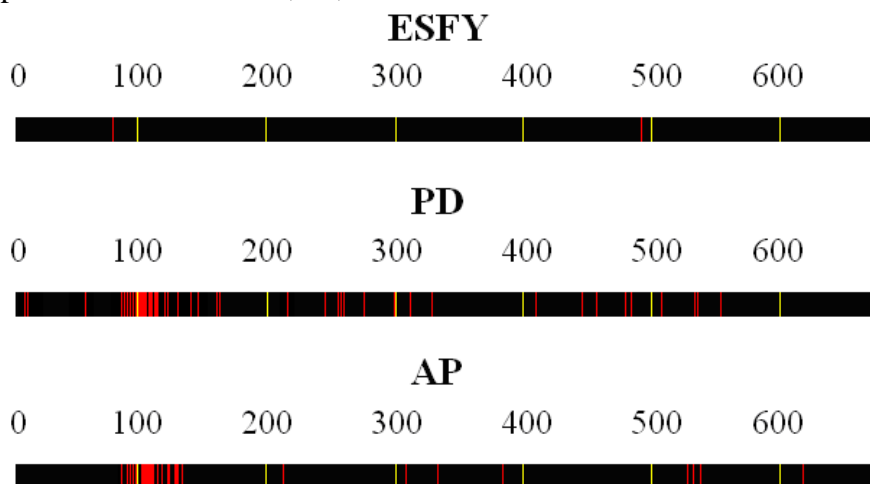
Oznaka mutacije	Nukleotid pri tipu A	Nukleotid pri tipu B in/ali C	Vrsta mutacije
M1	C	T	tranzicija
M2	A	C	transverzija
M3	C	T	tranzicija
M4	A	/	delecija
M5	/	A	adicija

4.3 PRIMERJAVE PODOBNOSTI NERIBOSOMSKIH GENOV TER NJIHOVIH AMINOKISLINSKIH PRODUKTOV PRI FITOPLAZMAH IZ SKUPINE AP

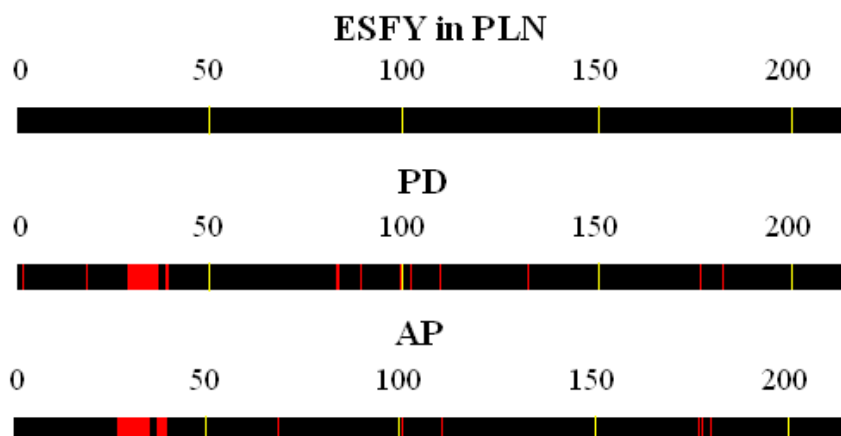
Za boljše razlikovanje med različnimi genotipi fitoplazem iz istega taksona '*Ca. phytoplasma*', smo za vsako fitoplazmo iz skupine AP (fitoplazma PD, AP in ESFY) poiskali gen ali genomski odsek, ki bi lahko postal nov kandidat pri iskanju različnih genotipov. Razlike med nukleotidnimi zaporedji določenih genov ali genomskih odsekov so grafično predstavljene za vsak odsek posebej. Prav tako so grafično predstavljene razlike v AK zaporedju proteina, ki ga kodira posamezni gen. Seznam uporabljenih nukleotidnih zaporedij je v prilogi B, seznam AK zaporedij pa je v prilogi C. Do obeh vrst zaporedij smo dostopali na internetni podatkovni bazi NCBI.

4.3.1 Primerjava podobnosti dela gena *secY* ter njegovih aminokislinskih produktov pri fitoplazmah iz skupine AP

Spodaj sta prikazani podobnosti nukleotidnega (slika 23) in AK (slika 24) zaporedja dela gena *secY*. Poravnave nukleotidnih zaporedij fitoplazem ESFY, PD in AP so natančneje predstavljene na slikah 25, 26 in 27. Poravnave AK zaporedij istih fitoplazem pa so prikazane na slikah 28, 29, 30.



Slika 23: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja dela gena *secY* znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Zaporedje je dolgo približno 670 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označena mesta, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-tri zaporedja; PD-pet zaporedij; AP-štiri zaporedja.



Slika 24: Grafična predstavitev podobnosti aminokislinskega zaporedja proteina, kodiranega z genom *secY*, znotraj skupine fitoplazem ESFY, PLN, PD in AP. Aminokislinsko zaporedje je dolgo približno 214 aminokislilin. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označene črte, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje v eni AK. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število AK zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-dve zaporedji in PLN-eno zaporedje; PD-pet zaporedij; AP-štiri zaporedja.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110					
> FN598207	1	AAGT	TGGAAACACAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT							
> FN598205	1	AAGT	TGGAAACACAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT							
> FN598206	1	AAGT	TGGAAACACAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT							
Conljg 2																	
	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230					
> FN598207	119	A	TATCGTTTTTTT	TAGCTAC	TGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA						
> FN598205	119	A	TATCGTTTTTTT	TAGCTAC	TGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA						
> FN598206	119	A	TATCGTTTTTTT	TAGCTAC	TGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA						
Conljg 2																	
	240	250	270	280	290	300	310	320	340	350							
> FN598207	239	A	TAACTCTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGC	AATACGATAAAAAT	TAAATTTTTTCTTATTTTAT	TATTTATTTTAT	TTTTAATATCTAC	TGTTAAATTTAT	TAGCTACTTTT							
> FN598205	239	A	TAACTCTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGC	AATACGATAAAAAT	TAAATTTTTTCTTATTTTAT	TATTTATTTTAT	TTTTAATATCTAC	TGTTAAATTTAT	TAGCTACTTTT							
> FN598206	239	A	TAACTCTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGC	AATACGATAAAAAT	TAAATTTTTTCTTATTTTAT	TATTTATTTTAT	TTTTAATATCTAC	TGTTAAATTTAT	TAGCTACTTTT							
Conljg 2																	
	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640
ITTTTTTAAACAAATACCAATTTTTAACAAATTAAGTTATAAAGATAAAAATATAGATTTTATAGTATATCTACTAGTTTAAAGAAATTTTTTTGTTGTTAAATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTTAAATGTAATAATCTCAATGATCTCC ITTTTTTAAACAAATACCAATTTTTAACAAATTAAGTTATAAAGATAAAAATATAGATTTTATAGTATATCTACTAGTTTAAAGAAATTTTTTTGTTGTTAAATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTTAAATGTAATAATCTCAATGATCTCC ITTTTTTAAACAAATACCAATTTTTAACAAATTAAGTTATAAAGATAAAAATATAGATTTTATAGTATATCTACTAGTTTAAAGAAATTTTTTTGTTGTTAAATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTTAAATGTAATAATCTCAATGATCTCC +																	

Slika 25: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *secY* pri fitoplazmi ESFY.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
> FN598208	1	AAGGT	GAAATCGGACACAAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT		
> FN598212	1	GAAGT	TGGACACAAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT		
> FN598211	1	GAAAT	CGGACACAAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT		
> FN598210	1	GAAAT	CGGACACAAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT		
> FN598209	1	AAGGT	GAAATCGGACACAAAAAT	TAATTCGTTTTAATTCGTTTTT	TAGCTATTTTAT	TAGCTATGTTTCCAAAGT	TATTTAAATGATTA	TAATAAATAAAT	TGAATATTT	TAAGATAGATAT		
Conljg 3												
	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
> FN598208	119	G	AATTAAGAATAAGATA	TACATTCATTTTTT	TAGCTACTGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA	
> FN598212	114	G	AATTAAGAATAAGATA	TACATTCATTTTTT	TAGCTACTGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA	
> FN598211	114	G	AATTAAGAATAAGATA	TACATTCATTTTTT	TAGCTACTGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA	
> FN598210	114	G	AATTAAGAATAAGATA	TACATTCATTTTTT	TAGCTACTGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA	
> FN598209	112	G	AATTAAGAATAAGATA	TACATTCGTTTTT	TAGCTACTGGAACAGC	TATTTCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGC	TAAAGGGATTGGTAATGGAAC	TTCAAATTTAAT	TGGTGGAA	TGAGTAG	TGGAGTA	
Conljg 3												
	240	250	270	280	290	300	310	320	330	340	350	
> FN598208	239	G	TGGAAATGAGTAGCGGAG	TATTTACTACTTTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGCCT	TAAAGAAATTAATTTTTTCTTGGTTATTTTAT	TATTTATTTTATTTTAAATATCTACCATT					
> FN598212	234	G	TGGAAATGAGTAGCGGAG	TATTTACTACTTTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGCCT	TAAAGAAATTAATTTTTTCTTGGTTATTTTAT	TATTTATTTTAAATATCTACCATT					
> FN598211	234	G	TGGAAATGAGTAGCGGAG	TATTTACTACTTTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGCCT	TAAAGAAATTAATTTTTTCTTGGTTATTTTAT	TATTTATTTTAAATATCTACCATT					
> FN598210	234	G	TGGAAATGAGTAGCGGAG	TATTTACTACTTTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGCCT	TAAAGAAATTAATTTTTTCTTGGTTATTTTAT	TATTTATTTTAAATATCTACCATT					
> FN598209	232	G	TGGAAATGAGTAGCGGAG	TATTTACTACTTTTCAAAAAAT	TTTGAATTTGGCCT	TAAAGAAATTAATTTTTTCTTGGTTATTTTAT	TATTTATTTTAAATATCTACCATT					
Conljg 3												
	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470
> FN598208	359	A	TAAATTTTATGCTGTTTT	AAAAATTCCTATTTATTTT	TCCATAAACAAGCTCAAGT	TAGAAAAATACATTCCTTTAAAAAT	TAAATGTTTCCGAGTATTTACCAAT	TTTAACTCTT				
> FN598212	354	A	TAAATTTTATGCTGTTTT	AAAAATTCCTATTTATTTT	TCCATAAACAAGCTCAAGT	TAGAAAAATACATTCCTTTAAAAAT	TAAATGTTTCCGAGTATTTACCAAT	TTTAACTCTT				
> FN598211	354	A	TAAATTTTATGCTGTTTT	AAAAATTCCTATTTATTTT	TCCATAAACAAGCTCAAGT	TAGAAAAATACATTCCTTTAAAAAT	TAAATGTTTCCGAGTATTTACCAAT	TTTAACTCTT				
> FN598210	354	A	TAAATTTTATGCTGTTTT	AAAAATTCCTATTTATTTT	TCCATAAACAAGCTCAAGT	TAGAAAAATACATTCCTTTAAAAAT	TAAATGTTTCCGAGTATTTACCAAT	TTTAACTCTT				
> FN598209	352	A	TAAATTTTATGCTGTTTT	AAAAATTCCTATTTATTTT	TCCATAAACAAGCTCAAGT	TAGAAAAATACATTCCTTTAAAAAT	TAAATGTTTCCGAGTATTTACCAAT	TTTAACTCTT				
Conljg 3												
	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590
> FN598208	479	A	CATGCAAGCATTTTTT	TATGTTTTTATCAATAATATATCA	TTTTTAAACCAATTAAGTT	TAAAAAAATAAAATTAAGAATTTAT	TAGTATGTC	TAATAGTTT	TAGGAAT	TTTTTTTT		
> FN598212	474	A	CATGCAAGCATTTTTT	TATGTTTTTATCAATAATATATCA	TTTTTAAACCAATTAAGTT	TAAAAAAATAAAATTAAGAATTTAT	TAGTATGTC	TAATAGTTT	TAGGAAT	TTTTTTTT		
> FN598211	474	A	CATGCAAGCATTTTTT	TATGTTTTTATCAATAATATATCA	TTTTTAAACCAATTAAGTT	TAAAAAAATAAAATTAAGAATTTAT	TAGTATGTC	TAATAGTTT	TAGGAAT	TTTTTTTT		
> FN598210	474	A	CATGCAAGCATTTTTT	TATGTTTTTATCAATAATATATCA	TTTTTAAACCAATTAAGTT	TAAAAAAATAAAATTAAGAATTTAT	TAGTATGTC	TAATAGTTT	TAGGAAT	TTTTTTTT		
> FN598209	472	A	CATGCAAGCATTTTTT	TATGTTTTTATCAATAATATATCA	TTTTTAAACCAATTAAGTT	TAAAAAAATAAAATTAAGAATTTAT	TAGTATGTC	TAATAGTTT	TAGGAAT	TTTTTTTT		
Conljg 3												
	600	610	620	630	640	650	660					
GTTTGTTAAATGATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTGTAATGTTAATATTAATGATATTTT GTTTGTTAAATGATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTGTAATGTTAATATTAATGATATTTT GTTTGTTAAATGATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTGTAATGTTAATATTAATGATATTTT GTTTGTTAAATGATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTGTAATGTTAATATTAATGATATTTT GTTTGTTAAATGATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTGTAATGTTAATATTAATGATATTTT GTTTGTTAAATGATTTTTTCTCTTTTTTAACTCTTTTTGTAATGTTAATATTAATGATATTTT												

Slika 26: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *secY* pri fitoplazmi PD.

Table with multiple rows of DNA sequence alignments. The top row shows sequences for accessions FN598213, FN598216, FN598215, FN598214, and Conlign 1, aligned at positions 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110. Subsequent rows show alignments at positions 120-230, 240-350, 360-470, and 480-590. The bottom row shows alignments at positions 600-650. Gaps in the sequences are indicated by dashes.

Slika 27: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *secY* pri fitoplazmi AP.

Table with multiple rows of protein alignments. The top row shows an alignment for accession AD033803 at position 1, protein sequence MLKNIKLIFNSKLISRIVFTLFIIFILGRSIQIPFLPVNISAIMKI FKKFNQQLINFDLSNFMNLLSLSIYPPYITVS, length 80. This is followed by gaps indicated by dashes. The next row shows alignment for AD033803 at position 81, protein sequence IFIQLVQKLIPHLKEWREQGEVQKQLNRLIRFLAILLAMFQSYLMMNKYNIELFKDKIYISFFLATGTAISIWLDLIT, length 160. This is followed by alignments for CBI62631 and CBI62633 at positions 1, 59, and 59. The table continues with alignments for AD033803 at positions 161, 241, 321, and 401, with corresponding protein sequences and lengths.

Slika 28: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *secY*, pri fitoplazmah ESFY in PLN.

CBI62635		-----		
AD033885	1	MLKKIKLIFKSKLILRFVFTLFIIIFVFLGRSIQIPFLGPQIKKIFDDIYKTLNLSFQLINFDLKS LNLSLSIYPYITV	80	
CBI62636		-----		
CBI62638		-----		
CBI62634		-----		
CBI62635	1	-----IGQQKLNRLTRFLAILLAMFQSYLMINK-----YNIEFKDKIYISFFLATGTAISW	52	
AD033885	81	SIFIQLVQKLIPYLKEWREQGEIGQQKLNRLTRFLAILLAFQSYLMINK-----YNIEFKDKIYISFFLATGTAISW	154	
CBI62636	1	-----EIGQQKLNRLTRFLAILLALFQSYLMINK-----YNIEFKDKIYISFFLATGTAISW	53	
CBI62638	1	-----EWGQQKLNRLTRFLAILLAMFQSYLMINSKFNIFNINIDIKDKIYISFFLATGTAISW	59	
CBI62634	1	-----GEIGQQKLNRLTRFLAILLAMFQSYLMINSKFNIFNINIDIKDKIYISFFLATGTAISW	60	
CBI62635	53	LSDLITARGIGNGTSILINVGMSNAVFTTFQKIFEFWPIKKIQFFSLFLLLFILISTIIIIYLAVLKIPIIYPNKQSQVE	132	
AD033885	155	LSDLITARGIGNGTSILINVGMSNAVFTTFQKIFEFWPIKKIQFFSLFLLLFILISTIIIIYLAVLKIPIIYPNKQSQVE	234	
CBI62636	54	LSDLITARGIGNGTSILINVGMSNAVFTTFQKIFEFWPIKKIQFFSLFLLLFILISTIIIIYLAVLKIPIIYPNKQSQVE	133	
CBI62638	60	LSDLITARGIGNGTSILINVGMSNAVFTTFQKIFEFWPIKKIQFFSLFLLLFILISTIIIIYLAVLKIPIIYPNKQSQVE	139	
CBI62634	61	LSDLITARGIGNGTSILINVGMSNAVFTTFQKIFEFWPIKKIQFFSLFLLLFILISTIIIIYLAVLKIPIIYPNKQSQVE	140	
CBI62635	133	NYIPLKINVPGVLPPIILTSTLQAFFMFFINNISFFNQLSYKDKIIEFISMSNSLGIIFVCLMIFFSFLTSFVIVNINDI	212	
AD033885	235	NYIPLKINVPGVLPPIILTSTLQAFFMFFINNISFFNQLSYKDKIIEFISMSNSLGIIFVCLMIFFSFLTSFVIVNINDI	314	
CBI62636	134	NYIPLKINVPGVLPPIILTSTLQAFFMFFINNISFFNQLSYKDKIIEFISMSNSLGIIFVCLMIFFSFLTSFVIVNINDI	213	
CBI62638	140	NYIPLKINVPGVLPPIILTSTLQAFFMFFINNISFFNQLSYKDKIIEFISMSNSLGIIFVCLMIFFSFLTSFVIVNINDI	219	
CBI62634	141	NYIPLKINVPGVLPPIILTSTLQAFFMFFINNISFFNQLSYKDKIIEFISMSNSLGIIFVCLMIFFSFLTSFVIVNINDI	220	
CBI62635	213	S-----	213	
AD033885	315	SEHLSKQDAYIENCRPGKQTTEKISYDFFRITLIGVLFMVFLLFILPLLISKFFNFTEFKIGGTGFLIIVGVSIETLQQIS	394	
CBI62636	214	S-----	214	
CBI62638	220	S-----	220	
CBI62634	221	S-----	221	
CBI62635		-----		
AD033885	395	STANKEDYARIF 406		
CBI62636		-----		
CBI62638		-----		
CBI62634		-----		

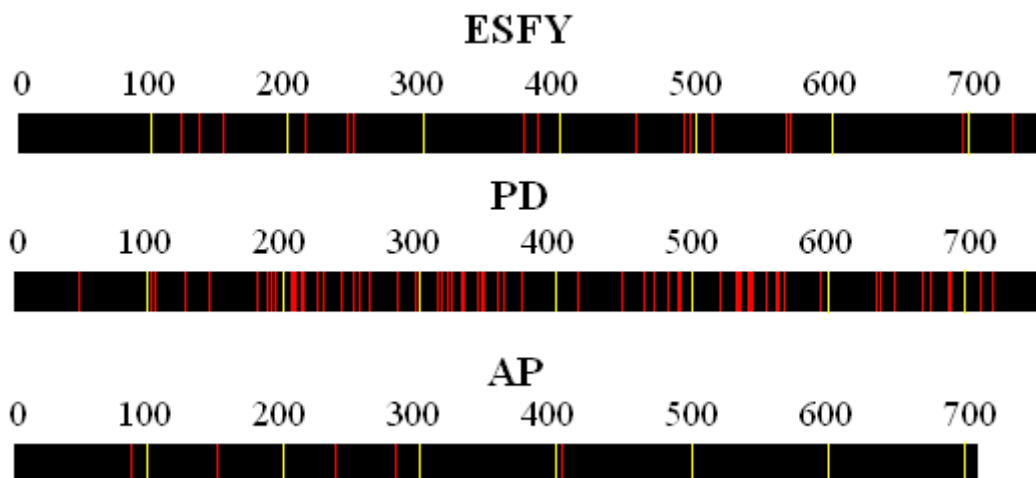
Slika 29: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *secY*, pri fitoplazmi PD.

YP_002004392	1	MLKKIKLIFNSKLI FRFIFLFIIFILGRSIQIPFLNVQIQITIIQLLKGLTTS DKFLINFDLNMFNLLSLSIYPYITI	80
CBI62639		-----	
CBI62640		-----	
CBI62641		-----	
YP_002004392	81	SIFIQLVQKFI PHLKEWREQGEV GKQKLNRLTRFLAILLAMFQSYLMINKYSGNKESGGEIIFIGEKLYISFFLATGTAIA	160
CBI62639	1	-----VGKQKLNRLTRFLAILLAMFQSYLMINKYSGNKESGGEIIFIGEKLYISFFLATGTAIA	58
CBI62640	1	-----VGKQKLNRLTRFLAILLAMFQSYLMINKYSSSE-----LLIPEKLYISFFLATGTAIA	53
CBI62641	1	-----VGKQKLNRLTRFLAILLAMFQSYLMINKYSS-K-----IDYDPKLYISFFLATGTAIA	52
YP_002004392	161	IWLSDLITAKGVGN GTSILINVMSSGVITTFQKIFAFWNTDKIKFFALLFLLFILISTIIVYLATLKIPIIYPNKKSQ	240
CBI62639	59	IWLSDLITAKGVGN GTSILINVMSSGVITTFQKIFAFWNTDKIKFFALLFLLFILISTIIVYLATLKIPIIYPNKKSQ	138
CBI62640	54	IWLSDLITAKGVGN GTSILINVMSSGVITTFQKIFAFWNTDKIKFFALLFLLFILISTIIVYLATLKIPIIYPNKKSQ	133
CBI62641	53	IWLSDLITAKGVGN GTSILINVMSSGVITTFQKIFAFWNTDKIKFFALLFLLFILISTIIVYLATLKIPIIYPNKKSQ	132
YP_002004392	241	VENYIPLKINVPGLPIILTSTMQAFFMFCINNIPFFNQLKCKDKIIEFISISTNLGIIFFVCLIIFFSFLTAFLIVNTN	320
CBI62639	139	VENYIPLKINVPGLPIILTSTMQAFFMFCINNIPFFNQLKCKDKIIEFISISTNLGIIFFVCLIIFFSFLTAFLIVNTN	218
CBI62640	134	VENYIPLKINVPGLPIILTSTMQAFFMFCINNIPFFNQLKCKDKIIEFISISTNLGIIFFVCLIIFFSFLTAFLIVNTN	213
CBI62641	133	VENYIPLKINVPGLPIILTSTMQAFFMFCINNIPFFNQLKCKDKIIEFISISTNLGIIFFVCLIIFFSFLTAFLIVNTN	212
YP_002004392	321	DIAEHLKQDAYIENCRPGKQTVEKISYDFFRITIIIGVFFMIFLFWLPLLSKGFDFKEFKIGGTGFLIIVGVSIETLQQ	400
CBI62639	219	DIA-----	221
CBI62640	214	DIA-----	216
CBI62641	213	DIA-----	215
YP_002004392	401	ISSTANKEDYAKIF	414
CBI62639		-----	
CBI62640		-----	
CBI62641		-----	

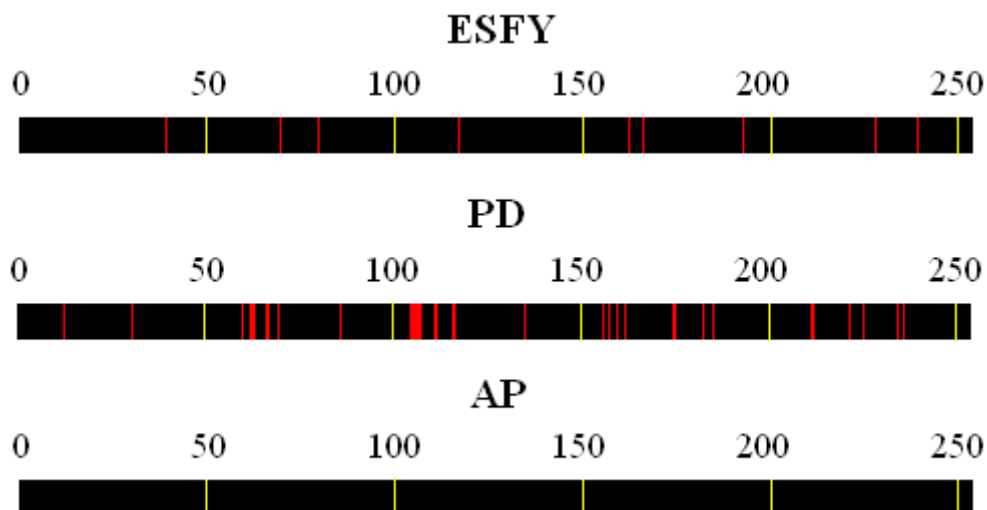
Slika 30: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *secY*, pri fitoplazmi AP.

4.3.2 Primerjava podobnosti dela gena *aceF* ter njegovih aminokislinskih produktov pri fitoplazmah skupine AP

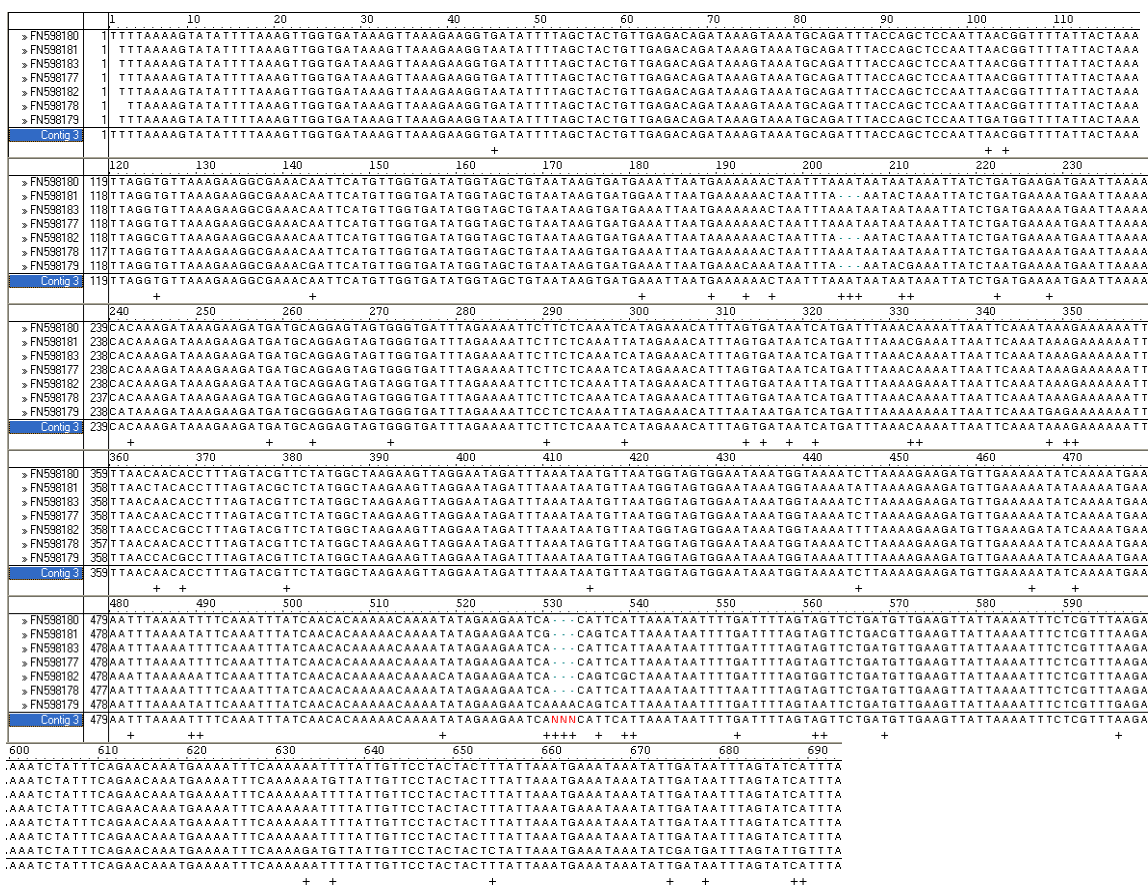
Spodaj sta prikazani podobnosti nukleotidnega (slika 31) in AK (slika 32) zaporedja dela gena *aceF*. Poravnave nukleotidnih zaporedij fitoplazem ESFY, PD in AP so natančneje predstavljene na slikah 33, 34 in 35. Poravnave AK zaporedij istih fitoplazem pa so prikazane na slikah 36, 37 in 38.



Slika 31: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja dela gena *aceF* znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Zaporedje je dolgo približno 750 bp pri fitoplazmah ESFY in PD, ter 706 bp pri fitoplazmi AP. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označena mesta, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-11 zaporedij; PD-sedem zaporedij; AP-šest zaporedij.



Slika 32: grafična predstavitev podobnosti aminokislinskega zaporedja proteina, kodiranega z genom *aceF*, znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Aminokislinsko zaporedje je dolgo približno 250 aminokislin. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označene črte, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje v eni AK. Debelejša rdeča črta pa pomeni dve ali več zaporednih neujemanj. Število AK zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-11 zaporedij; PD-šest zaporedij; AP-štiri zaporedja.



Slika 34: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *aceF* pri fitoplazmi PD.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
> FN598189	1	TTTAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACCAGCTCCAAATAATGGGTATTACTAAAT										
> FN598184	1	TTTAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACCAGCTCCAAATAATGGGTATTACTAAAT										
> FN598185	1	TTTAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACCAGCTCCAAATAATGGGTATTACTAAAT										
> FN598187	1	TTTAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACCAGCTCCAAATAATGGGTATTACTAAAT										
> FN598186	1	TTTAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACCAGCTCCAAATAATGGGTATTACTAAAT										
> FN598188	1	TTTAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACCAGCTCCAAATAATGGGTATTACTAAAT										
Longy-2	1	TTTAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACCAGCTCCAAATAATGGGTATTACTAAAT										
	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
> FN598189	119	TAGGAGTTAAAGAAGGTTAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAA TAGGTGATGAAATTCATGAAAC TGAATTTAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGATAGTTGGAG										
> FN598184	119	TAGGAGTTAAAGAAGGTTAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAA TAGGTGATGAAATTCATGAAAC TGAATTTAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGATAGTTGGAG										
> FN598185	119	TAGGAGTTAAAGAAGGTTAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAA TAGGTGATGAAATTCATGAAAC TGAATTTAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGATAGTTGGAG										
> FN598187	119	TAGGAGTTAAAGAAGGTTAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAA TAGGTGATGAAATTCATGAAAC TGAATTTAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGATAGTTGGAG										
> FN598186	119	TAGGAGTTAAAGAAGGTTAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAA TAGGTGATGAAATTCATGAAAC TGAATTTAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGATAGTTGGAG										
> FN598188	119	TAGGAGTTAAAGAAGGTTAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAA TAGGTGATGAAATTCATGAAAC TGAATTTAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGATAGTTGGAG										
Longy-2	119	TAGGAGTTAAAGAAGGTTAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAA TAGGTGATGAAATTCATGAAAC TGAATTTAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGATAGTTGGAG										
	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
> FN598189	239	ATTTAGAAAAATCTCTTCAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTTAATTAAGTGAAAAAAAATTTCAACCCTCCCTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGT										
> FN598184	239	ATTTAGAAAAATCTCTTCAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTTAATTAAGTGAAAAAAAATTTCAACCCTCCCTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGT										
> FN598185	239	ATTTAGAAAAATCTCTTCAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTTAATTAAGTGAAAAAAAATTTCAACCCTCCCTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGT										
> FN598187	239	ATTTAGAAAAATCTCTTCAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTTAATTAAGTGAAAAAAAATTTCAACCCTCCCTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGT										
> FN598186	239	ATTTAGAAAAATCTCTTCAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTTAATTAAGTGAAAAAAAATTTCAACCCTCCCTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGT										
> FN598188	239	ATTTAGAAAAATCTCTTCAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTTAATTAAGTGAAAAAAAATTTCAACCCTCCCTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGT										
Longy-2	239	ATTTAGAAAAATCTCTTCAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTTAATTAAGTGAAAAAAAATTTCAACCCTCCCTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGT										
	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470
> FN598189	359	TAGGAAATAGATTTAAATAAGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAAATCTTGAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAA										
> FN598184	359	TAGGAAATAGATTTAAATAAGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAAATCTTGAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAA										
> FN598185	359	TAGGAAATAGATTTAAATAAGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAAATCTTGAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAA										
> FN598187	359	TAGGAAATAGATTTAAATAAGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAAATCTTGAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAA										
> FN598186	359	TAGGAAATAGATTTAAATAAGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAAATCTTGAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAA										
> FN598188	359	TAGGAAATAGATTTAAATAAGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAAATCTTGAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAA										
Longy-2	359	TAGGAAATAGATTTAAATAAGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAAATCTTGAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAA										
	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590
> FN598189	479	ATAAAAAGAACCAACATCAATAAATCTTGAATTTAGTAGTTTGTAGTGAAGTTATAAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAAATGAAAAATTTCAAAAAATGCTA										
> FN598184	479	ATAAAAAGAACCAACATCAATAAATCTTGAATTTAGTAGTTTGTAGTGAAGTTATAAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAAATGAAAAATTTCAAAAAATGCTA										
> FN598185	479	ATAAAAAGAACCAACATCAATAAATCTTGAATTTAGTAGTTTGTAGTGAAGTTATAAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAAATGAAAAATTTCAAAAAATGCTA										
> FN598187	479	ATAAAAAGAACCAACATCAATAAATCTTGAATTTAGTAGTTTGTAGTGAAGTTATAAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAAATGAAAAATTTCAAAAAATGCTA										
> FN598186	479	ATAAAAAGAACCAACATCAATAAATCTTGAATTTAGTAGTTTGTAGTGAAGTTATAAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAAATGAAAAATTTCAAAAAATGCTA										
> FN598188	479	ATAAAAAGAACCAACATCAATAAATCTTGAATTTAGTAGTTTGTAGTGAAGTTATAAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAAATGAAAAATTTCAAAAAATGCTA										
Longy-2	479	ATAAAAAGAACCAACATCAATAAATCTTGAATTTAGTAGTTTGTAGTGAAGTTATAAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAAATGAAAAATTTCAAAAAATGCTA										
	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710
	TTGTTCTCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATGATAAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTTAAAAATTTGAAGCAGATTTCAAAAAATTTAAATTAACCTTACATGGC											
	TTGTTCTCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATGATAAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTTAAAAATTTGAAGCAGATTTCAAAAAATTTAAATTAACCTTACATGGC											
	TTGTTCTCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATGATAAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTTAAAAATTTGAAGCAGATTTCAAAAAATTTAAATTAACCTTACATGGC											
	TTGTTCTCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATGATAAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTTAAAAATTTGAAGCAGATTTCAAAAAATTTAAATTAACCTTACATGGC											
	TTGTTCTCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATGATAAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTTAAAAATTTGAAGCAGATTTCAAAAAATTTAAATTAACCTTACATGGC											
	TTGTTCTCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATGATAAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTTAAAAATTTGAAGCAGATTTCAAAAAATTTAAATTAACCTTACATGGC											

Slika 35: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *aceF* pri fitoplazmi AP.

CBI62602	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62601	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62594	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62595	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62592	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62597	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62599	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62598	1	LKVYFKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	80
CBI62593	1	----FKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	76
CBI62596	1	----FKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	76
CBI62600	1	----FKIGDKVKEGDILVTVETDKVNSDVSAPINGFITKIQVKEGQMIYVGD	76
CBI62602	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62601	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62594	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62595	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62592	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62597	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62599	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62598	81	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	160
CBI62593	77	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	156
CBI62596	77	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	156
CBI62600	77	DKEDDAGVVGDLENSSQI IETFDNHI SNEINNLSEKKILTPPLVRSMAKKLGID	156
CBI62602	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62601	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62594	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62595	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62592	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62597	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62599	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62598	161	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	240
CBI62593	157	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	236
CBI62596	157	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	236
CBI62600	157	LKHSILSTKIQNIKEKEEQTLFKNFDFNSSSDTEFIKITRLRRTISEQMKISK	236
CBI62602	241	ATSKNIKLTYL 251	
CBI62601	241	ATSKNIKLTYL 251	
CBI62594	241	ATSKNIKLTYL 249	
CBI62595	241	ATSKNIKLTYL 249	
CBI62592	241	ATSKNIKLTYL 249	
CBI62597	241	ATSKNIKLTYL 249	
CBI62599	241	ATSKNIKLTYL 248	
CBI62598	241	ATSKNIKLTYL 248	
CBI62593	237	ATSKNIKLTYL 247	
CBI62596	237	ATSKNIKLTYL 247	
CBI62600	237	ATSKNIKLTYL 247	

Slika 36: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *aceF*, pri fitoplazmi ESFY.

CBI62607	1	LKVYFKVGDQVKEGMLLATVETDKVNADLPAPINGFITKLGVKEGETIHVGDMAVAVISDEINEKTNLNT-KLSDENELKH	79
CBI62603	1	LKVYFKVGDQVKEGMLLATVETDKVNADLPAPINGFITKLGVKEGETIHVGDMAVAVISDEINEKTNLNMNKLSDENELKH	80
CBI62608	1	LKVYFKVGDQVKEGMLLATVETDKVNADLPAPINGFITKLGVKEGETIHVGDMAVAVISDEINEKTNLNT-KLSDENELKH	79
CBI62604	1	LKVYFKVGDQVKEGMLLATVETDKVNADLPAPINGFITKLGVKEGETIHVGDMAVAVISDEINEKTNLNMNKLSDENELKH	80
CBI62605	1	LKVYFKVGDQVKEGMLLATVETDKVNADLPAPIDGFFITKLGVKEGETIHVGDMAVAVISDEINETMNLNT-KLSMENELKH	79
CBI62606	1	LKVYFKVGDQVKEGMLLATVETDKVNADLPAPINGFITKLGVKEGETIHVGDMAVAVISDEINEKTNLNMNKLSDDELKH	80
CBI62607	80	KDKEDDAGVVGDLNSSQIIEYFSDNHDLMKINSMEKILITPLVRSMAKKGIDLNMVWNGSGINGKILKEDVERYQNMEN	159
CBI62603	81	KDKEDDAGVVGDLNSSQIIEYFSDNHDLMKINSMEKILITPLVRSMAKKGIDLNMVWNGSGINGKILKEDVERYQNMEN	160
CBI62608	80	KDKEDDAGVVGDLNSSQIIEYFSDNYDLMEINSMEKILITPLVRSMAKKGIDLNMVWNGSGINGKILKEDVERYQNEK	159
CBI62604	81	KDKEDDAGVVGDLNSSQIIEYFSDNHDLMKINSMEKILITPLVRSMAKKGIDLNMVWNGSGINGKILKEDVERYQNMEN	160
CBI62605	80	KDKEDDAGVVGDLNSSQIIEYFSDNHDLMKINSMEKILITPLVRSMAKKGIDLNMVWNGSGINGKILKEDVERYQNMEN	159
CBI62606	81	KDKEDDAGVVGDLNSSQIIEYFSDNHDLMKINSMEKILITPLVRSMAKKGIDLNMVWNGSGINGKILKEDVERYQNMEN	160
CBI62607	160	LKYSNLSLSTQKQNIIEE-QSLNMFDFSSSDVEVIKISRLRKSISEQMKISKNFIVPTLLNEINIDNLVSRFRKLRSEADY	238
CBI62603	161	LKFSNLSLSTQKQNIIEE-HSLNMFDFSSSDVEVIKISRLRKSISEQMKISKNFIVPTLLNEINIDNLVSRFRKLRSEADY	239
CBI62608	160	LKNSNLSLSTQKQNIIEE-QSLNMFDFSSSDVEVIKISRLRKSISEQMKISKNFIVPTLLNEINIDNLVSRFRKLRSEADY	238
CBI62604	161	LKFSNLSLSTQKQNIIEE-HSLNMFDFSSSDVEVIKISRLRKSISEQMKISKNFIVPTLLNEINIDNLVSRFRKLRSEADY	239
CBI62605	160	LKYSNLSLSTQKQNIIEE-QSLNMFDFSSSDVEVIKISRLRKSISEQMKISKNFIVPTLLNEINIDNLVSRFRKLRSEADY	239
CBI62606	161	LKFSNLSLSTQKQNIIEE-HSLNMFDFSSSDVEVIKISRLRKSISEQMKISKNFIVPTLLNEINIDNLVSRFRKLRSEADY	237
CBI62607	239	KNIKLTYM	246
CBI62603	240	KNIKLTYM	247
CBI62608	239	KNIKLTYM	246
CBI62604	240	KNIKLTYM	247
CBI62605	240	KNIKLTYM	247
CBI62606		-----	

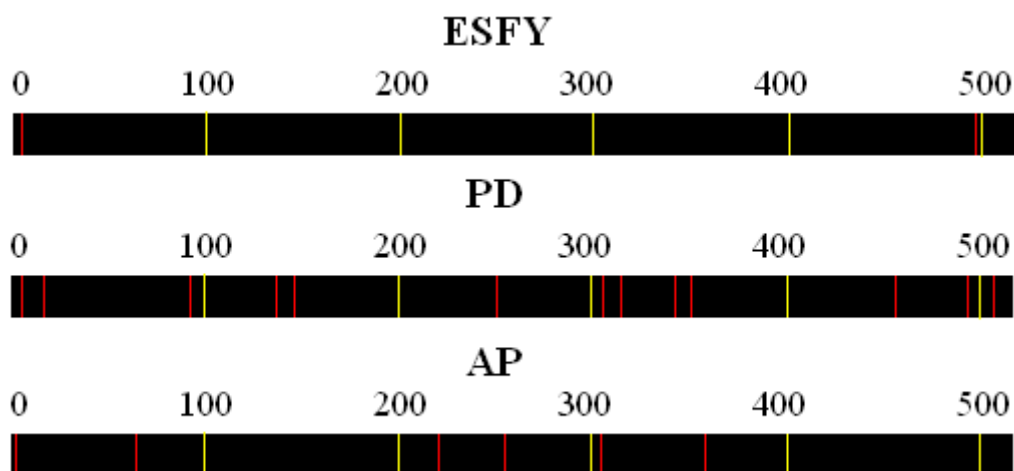
Slika 37: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *aceF*, pri fitoplazmi PD.

YP_002004194	1	MFELEKADVGEIDEGTVLKVYFQIGDKVKEGDILVTVETDKVNADLPAPINGWITKLGVKEGEMIHVGMVAIIIGDEIH	80
CBI62612	1	-----LKVYFQIGDKVKEGDILVTVETDKVNADLPAPINGWITKLGVKEGEMIHVGMVAIIIGDEIH	62
CBI62610	1	-----LKVYFQIGDKVKEGDILVTVETDKVNADLPAPINGWITKLGVKEGEMIHVGMVAIIIGDEIH	62
CBI62611	1	-----LKVYFQIGDKVKEGDILVTVETDKVNADLPAPINGWITKLGVKEGEMIHVGMVAIIIGDEIH	62
YP_002004194	81	ETELKKADKEDDAGVVGDLNENSSQIIETFNHNHVLNENINLSEKKILTTPLVRSMAKKGIDLNNVNGSGINGKILKEDVE	160
CBI62612	63	ETELKKADKEDDAGVVGDLNENSSQIIETFNHNHVLNENINLSEKKILTTPLVRSMAKKGIDLNNVNGSGINGKILKEDVE	142
CBI62610	63	ETELKKADKEDDAGVVGDLNENSSQIIETFNHNHVLNENINLSEKKILTTPLVRSMAKKGIDLNNVNGSGINGKILKEDVE	142
CBI62611	63	ETELKKADKEDDAGVVGDLNENSSQIIETFNHNHVLNENINLSEKKILTTPLVRSMAKKGIDLNNVNGSGINGKILKEDVE	142
YP_002004194	161	RYQENLNKNSTSTIQKQNIKEQQSLNMLDFSSFDSEVIKISRLRKAISEQMKISKNAIVPTLLNEINIDNLIAPFRKKLK	240
CBI62612	143	RYQENLNKNSTSTIQKQNIKEQQSLNMLDFSSFDSEVIKISRLRKAISEQMKISKNAIVPTLLNEINIDNLIAPFRKKLK	222
CBI62610	143	RYQENLNKNSTSTIQKQNIKEQQSLNMLDFSSFDSEVIKISRLRKAISEQMKISKNAIVPTLLNEINIDNLIAPFRKKLK	222
CBI62611	143	RYQENLNKNSTSTIQKQNIKEQQSLNMLDFSSFDSEVIKISRLRKAISEQMKISKNAIVPTLLNEINIDNLIAPFRKKLK	222
YP_002004194	241	FEADSKNIKLTMYAFIMKAIIVIVLKEFPIFNSSFNEVKDEIIKKKNINLGIADVTEGLIIVPNIKNADKMNILELAKELE	320
CBI62612	223	FEADSKNIKLTMY-----	235
CBI62610	223	FEADSKNIKLTMY-----	236
CBI62611	223	FEADSKNIKLTMYAFIMKAIIVIVLKE-----	248
YP_002004194	321	IIAKETREKRVKSIEKLNKGTFTITNFGALGLIYGTPPIINYPETAILGIGTIIKKPIVEQEEIIIANMLPLSLTIDHRIID	400
CBI62612		-----	
CBI62610		-----	
CBI62611		-----	
YP_002004194	401	GADGGRFLKRFQEILNLS	419
CBI62612		-----	
CBI62610		-----	
CBI62611		-----	

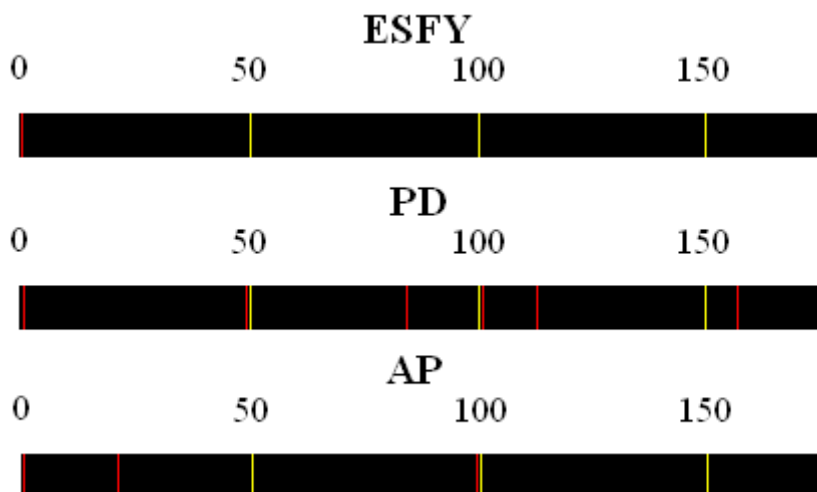
Slika 38: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *aceF*, pri fitoplazmi AP.

4.3.3 Primerjava podobnosti dela gena *pnp* ter njegovih aminokislinskih produktov pri fitoplazmah skupine AP

Spodaj sta prikazani podobnosti nukleotidnega (slika 39) in AK (slika 40) zaporedja dela gena *pnp*. Poravnave nukleotidnih zaporedij fitoplazem ESFY, PD in AP so natančneje predstavljene na slikah 41, 42 in 43. Poravnave AK zaporedij istih fitoplazem pa so prikazane na slikah 44, 45 in 46.



Slika 39: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja dela gena *pnp* znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Zaporedje gena je dolgo približno 515 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označena mesta, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Število zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-dve zaporedji; PD-osem zaporedij; AP-pet zaporedij.



Slika 40: Grafična predstavitev podobnosti aminokislinskega zaporedja proteina polinukleotidna fosforilaza, kodiranega z genom *pnp*, znotraj fitoplazem ESFY, PD in AP. Aminokislinsko zaporedje je dolgo približno 170 aminokislin. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja, z rdečo barvo pa so označene črte, ki označujejo razlike med zaporedji iste fitoplazme. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje v eni AK. Število AK zaporedij, ki smo jih uporabili v primerjavi podobnosti: ESFY-dve zaporedji; PD-pet zaporedij; AP-pet zaporedij.

Slika 41: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *pnp* pri fitoplazmi ESFY.

Slika 42: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *pnp* pri fitoplazmi PD.

Slika 43: Poravnava nukleotidnih zaporedij dela gena *pnp* pri fitoplazmi AP.

CBI62616	1	VKIGITLEIFEKVLKQAKKDRIKILNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMISINPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDI	80
CBI62617	1	VKIGITLEIFEKVLKQAKKDRIKILNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMISINPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDI	80
CBI62616	81	MQDGKIYIMHQNMKIIVDLTIIYIRNFKLKKIKVETVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGVEGFIHISKLENYRVDKVE	160
CBI62617	81	MQDGKIYIMHQNMKIIVDLTIIYIRNFKLKKIKVETVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGVEGFIHISKLENYRVDKVE	160
CBI62616	161	DVLKIGQIIL	170
CBI62617	161	DVLKIGQIIL	170

Slika 44: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *pnp*, pri fitoplazmi ESFY.

CBI62619	1	KVKIGITLEIFEKVLKQAKKDRIKILNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMISINPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDI	80
CBI62618	1	KIKIGITLEIFEKVLKQAKKDRIKILNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMISINPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDI	80
CBI62622	1	KVKIGITLEIFEKVLKQAKKDRIKILNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMISINPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDI	80
CBI62624	1	KVKIGITLEIFEKVLKQAKKDRIKILNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMISINPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDI	80
CBI62623	1	KVKIGITLEIFEKVLKQAKKDRIKILNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMISINPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDI	80
CBI62619	81	IMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTIIYIKNFKLKKIKVETVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGVEGFIHISKLENYKVDKV	160
CBI62618	81	IMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTIIYIKNFKLKKIKVETVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGVEGFIHISKLENYKVDKV	160
CBI62622	81	IMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTIIYIKNFKLKKIKVETVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGVEGFIHISKLENYKVDKV	160
CBI62624	81	IMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTIIYIKNFKLKKIKVETVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGVEGFIHISKLENYKVDKV	160
CBI62623	81	IMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTIIYIKNFKLKKIKVETVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGVEGFIHISKLENYKVDKV	160
CBI62619	161	EDVLKIGQVIL	171
CBI62618	161	EDVLKIGQVIL	171
CBI62622	161	EDVLKIGQVIL	171
CBI62624	161	EDVLKIGQVI-	170
CBI62623	161	EDVLKIGQII-	170

Slika 45: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *pnp*, pri fitoplazmi PD.

YP_002004412	481	KSLVAGVAMGLIVDDIDKINHYTILSDIEGLEDYQGDIDFKIAGTKVGTALQLDIRKIGITLEIFEKVLQAKKDRIKI	560
CBI62629	1	-----VKIGITLEIFEKVLQAKKDRIKI	23
CBI62628	1	-----VKIGITLEIFEKVLQAKKDRIKI	23
CBI62626	1	-----IKGITLEIFEKVLQAKKDRIKI	23
CBI62630	1	-----VKIGITLEIFEKVLQAKKDRIKI	23
YP_002004412	561	LNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMILIKPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDIMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTVIYI	640
CBI62629	24	LNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMILIKPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDIMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTVIYI	103
CBI62628	24	LNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMILIKPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDIMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTVIYI	103
CBI62626	24	LNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMILIKPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDIMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTVIYI	103
CBI62630	24	LNEMEKVINKSRNEVSKYAPKVKMILIKPEKIRDIIIGSGGKIINQIIIEKHDNVKIDIMQDGKIYIMHQNMKIIVDLTVIYI	103
YP_002004412	641	QNFLKKIKVENVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGIEGFIHISKLENYKVDKVEDVLKIGQIILVKCIKINERGGID	720
CBI62629	104	QNFLKKIKVENVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGIEGFIHISKLENYKVDKVEDVLKIGQIIL-----	170
CBI62628	104	QNFLKKIKVENVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGIEGFIHISKLENYKVDKVEDVLKIGQIIL-----	170
CBI62626	104	QNFLKKIKVENVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGIEGFIHISKLENYKVDKVEDVLKIGQIIL-----	170
CBI62630	104	QNFLKKIKVENVYEVKILRFVVDKMDKTFGAIAEIFPGIEGFIHISKLENYKVDKVEDVLKIGQIIL-----	170

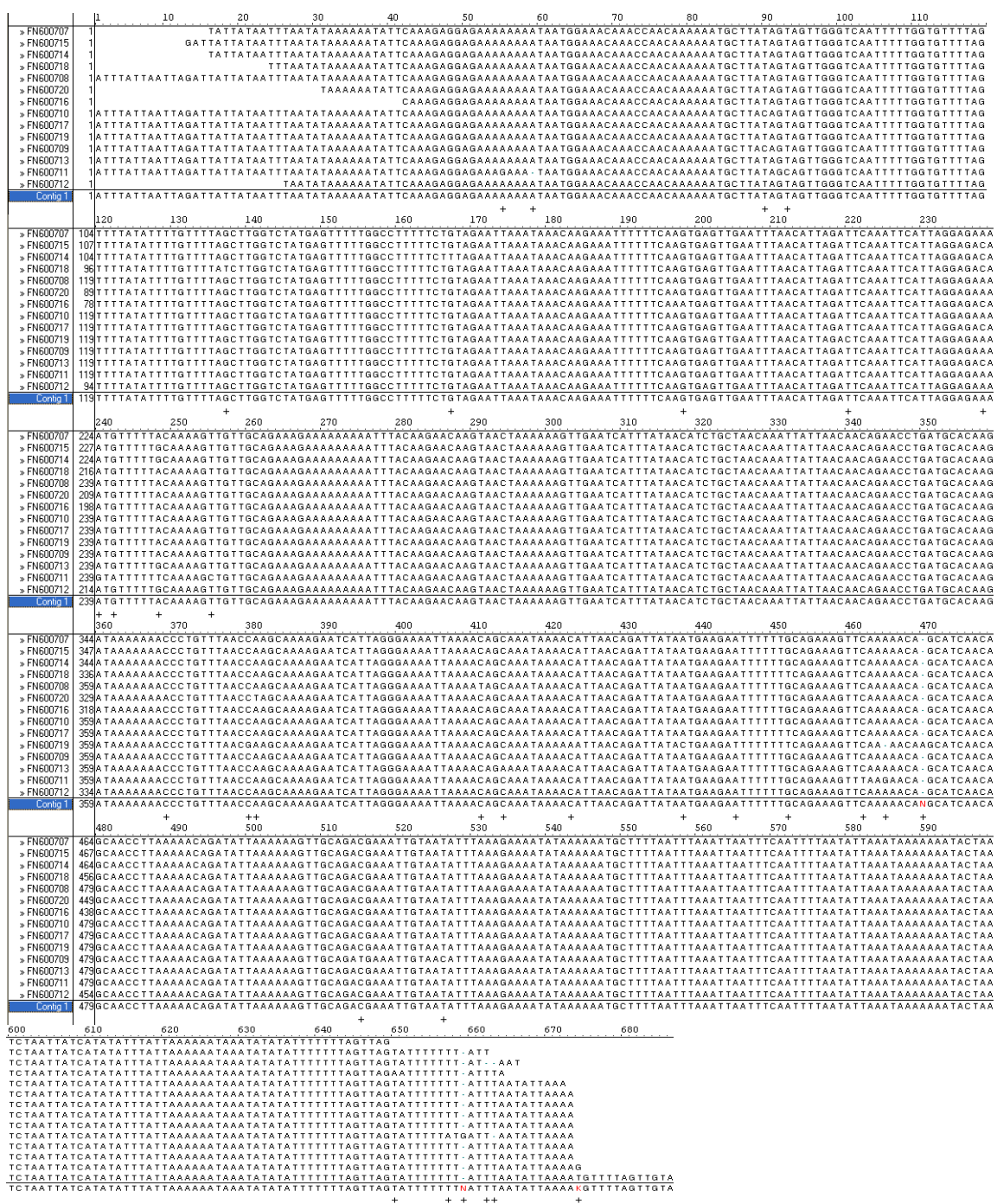
Slika 46: Poravnava AK zaporedij proteina, kodiranega z genom *pnp*, pri fitoplazmi AP.

4.3.4 Podobnost gena *imp* pri fitoplazmi ESFY

Spodaj je prikazana podobnost nukleotidnega zaporedja pri genu *imp* (slika 47). Poravnava nukleotidnih zaporedij fitoplazme ESFY je natančneje predstavljena na sliki 48.



Slika 47: Grafična predstavitev podobnosti nukleotidnega zaporedja gena *imp*. Nukleotidno zaporedje je dolgo približno 650 bp. Z rumeno barvo so označene črte, ki skupaj s številom nad njimi označujejo dolžino zaporedja. Ena rdeča črta predstavlja neujemanje na enem nukleotidnem mestu. Uporabili smo 14 nukleotidnih zaporedij fitoplazme ESFY.



Slika 48: Poravnava nukleotidnih zaporedij gena *imp* pri fitoplazmi ESFY.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Neredčeni začetni vzorci DNA dajo pri ugnezdene reakciji PCR boljše rezultate kot desetkrat redčeni vzorci DNA

Ugnezdene reakcija PCR po protokolu 1 je pokazala, da dobimo boljše rezultate s pomnoževanjem neredčenih začetnih vzorcev DNA, saj je bilo pozitivnih vseh pet vzorcev, od tega en šibko pozitiven (slika 9). Z desetkratnim redčenjem pa smo dobili šibko pozitivne le tri vzorce, dva pa sta bila negativna. Večja uspešnost ugnezdene reakcije PCR z neredčenimi vzorci pomeni, da v vzorcih ni bilo inhibitorjev reakcije PCR, ki bi lahko otežili delovanje DNA polimeraze ali njenih kofaktorjev. Redčenje zmanjša količino inhibitorjev reakcije PCR, s čimer omogoči boljše pomnoževanje DNA. Hkrati pa tudi zmanjša količino kopij tarčne DNA, kar ob odsotnosti inhibitorjev poslabša rezultate ugnezdene reakcije PCR.

5.1.2 Primerjava uspešnosti protokolov 1, 2 in 3 pri ugnezdene reakciji PCR

Protokol 3 se je izkazal za najučinkovitejšega, saj smo z njegovo uporabo uspešno pomnožili vseh 11 vzorcev (slika 10 in preglednica 15). Protokola 2 in 1 sta bila slabša, saj smo z njima uspešno pomnožili le deset oziroma šest vzorcev, od katerih jih je nekaj bilo šibko pozitivnih (sliki 11 in 12 ter preglednica 15). Večja uspešnost protokola 2 v primerjavi s protokolom 1 kaže na to, da 100x redčenje produktov PCR ne izboljša končnega rezultata, temveč ga poslabša. Sklepamo, da je bilo v začetnih vzorcih malo inhibitorjev reakcije PCR, tako da s 100x redčenjem vplivamo pretežno le na zmanjšanje števila kopij začetne DNA v vzorcih. Razlike v uspešnosti protokolov 2 in 3 pa kažejo na to, da smo pri protokolu 3 uspešno inhibirali prisotne inhibitorje reakcije PCR, pri tem pa nismo negativno vplivali na zmanjšanje števila kopij začetne DNA v vzorcu. Za uspeh je mogoče bilo ključnega pomena 30x redčenje, ki je vplivalo tako na zadostno zmanjšanje inhibitorjev kot tudi na ohranitev zadostne količine začetne DNA v vzorcu. Možno je tudi, da inhibitorji ne delujejo na polimerazo *GoTaq* in kofaktorje, prisotne v pufru 5x *green GoTaq*, ki smo jih uporabili v reakcijski mešanici pri protokolu 3. Verjetno gre dobre rezultate pripisati obema razlogoma.

Število kopij začetne DNA v vzorcih, ki je bilo predhodno preverjeno z reakcijo PCR v realnem času, pri naših rezultatih ni igralo vloge, saj so bili pri protokolih 1 in 2 šibko pozitivni ali negativni vzorci z veliko, srednjo in malo količino začetne DNA.

5.1.3 Primerjava uspešnosti protokolov JP-AX in JP-A

Protokol JP-A se je izkazal za boljšega kot JP-AX. Pri protokolu JP-AX so na gelski elektroforezi pasovi s produkti PCR videti zelo široki, kar je lahko posledica prevelike koncentracije polimeraze (slika 17). Pri protokolu JP-A smo zmanjšali njeno koncentracijo iz 2 na 1,5 U/100 µl, ter tako dobili tanjše pasove (slika 18). Poleg tega smo pri protokolu

JP-A zvišali temperaturo vezave oligonukleotidnih začetnikov PD1-f/r iz 52 °C na 53 °C. Glede na to, da je optimalna T_m teh dveh začetnikov 55,2 °C (preglednica 16), naj bi s tem povišali specifičnost vezave oligonukleotidnih začetnikov na homologna mesta na DNA ter posledično preprečili njune nehomologne vezave na druga mesta na produktu PCR. Primerjava istih vzorcev, pomnoženih po obeh protokolih, nam pokaže, da imajo vsi vzorci pri protokolu JP-AX dva pasova produktov PCR, medtem ko imajo vzorci, pomnoženi s protokolom JP-A, le en pas. S tem smo potrdili, da povišanje T_m poveča specifičnost vezave začetnikov.

5.1.4 Čiščenje produktov PCR z uporabo kompletov DNA Gel Extraction Kit in MinElute PCR Purification Kit je približno enako uspešno

Pri uporabi kompleta DNA Gel Extraction Kit smo dobili 60% uspešnih branj, medtem ko smo pri uporabi kompleta MinElute PCR Purification Kit dobili 50% uspešnih branj. Primerjave uspešnosti med obema so nesmiselne, saj smo obe metodi uporabili pri čiščenju različnih vzorcev.

5.1.5 Protokol JP-B je boljši od protokolov JP-A in JP-AX

Protokola JP-A in JP-AX se nista izkazala za uspešna, saj z njuno uporabo nismo uspeli določiti nukleotidnih zaporedij vseh vzorcev (preglednica 18). Niti s pomočjo šestih ponovitev ugnezdena reakcije PCR, katerim je vedno sledilo določanje nukleotidnega zaporedja, nam ni uspelo uspešno prebrati zaporedja težjih vzorcev. Uporaba protokola JP-B pa nam je omogočila uspešna branja večine tistih težjih vzorcev, ki jih z uporabo protokolov JP-A in JP-AX nismo uspeli uspešno prebrati. Razlag za razliko v uspešnosti protokolov bi lahko bilo več. Ker so vsi vzorci, narejeni po protokolih JP-A in JP-AX, bili pomnoženi z isto reakcijo PCR po protokolu JP-AX, je to morda razlog za slabši uspeh. Za vsako naslednjo serijo branj smo uporabili produkte PCR, ki že pri predhodnem branju niso dali dobrih rezultatov. Možno je torej, da so bili produkti PCR slabo pomnoženi že v reakciji PCR, tako da vnovična ugnezdena reakcija PCR ni mogla izboljšati uspeha branj. Pri uporabi protokola JP-B pa smo znova opravili reakcijo PCR, s katero smo morda bolje pomnožili produkte PCR v težavnih vzorcih, kot nam je to predhodno uspelo s protokolom JP-AX. Razlog za izrazito večjo uspešnost protokola JP-B je lahko tudi različna sestava reakcijske mešanice PCR med obema protokoloma (preglednica 3, 7, 9 in 11). Njena specifična sestava pri protokolu JP-B očitno omogoča boljše delovanje polimeraze. Glede na odsotnost redčenj pri obeh protokolih (preglednica 2) lahko sklepamo, da so pri protokolu JP-B kemikalije (pufer 5x *green GoTaq* in polimeraza *GoTaq*) manj občutljive na prisotnost inhibitorjev.

5.1.6 Analiza nukleotidnega zaporedja genomskega odseka 16S/23S rRNA, je pokazala tri različne genotipe fitoplazme PD v Sloveniji

Z analizo nukleotidnih zaporedij genomskega odseka 16S-23S rRNA z vmesno regijo smo iz zaenkrat pridobljenih vzorcev iz Slovenije dobili tri različne genotipe fitoplazme PD.

Vsak genotip pripada svojemu tipu zaporedja, katere smo označili z A, B in C. Zaporedje tipa A pripada 20, zaporedje tipa B enemu ter zaporedje tipa C dvema fitoplazmama PD. Vsa tri zaporedja, ki pripadajo tipoma B in C, smo našli v okolici Celja (preglednica 19). Razlike med različnimi tipi zaporedji so glede na njihovo dolžino 1630 bp zelo majhne. Tip zaporedja B se od tipa A loči v štirih nukleotidih, tip zaporedja C pa v petih. Tipa zaporedij B in C se med seboj ločita le v enem nukleotidu (slika 22, priloga D). Mutacije so razlog za vseh pet razlik med različnimi tipi zaporedij. V naši raziskavi smo jih označili z oznakami od M1 do M5. Mutacije od M1 do M4 so se zgodile tako na tipu zaporedja B kot tudi na tipu C, medtem ko se je mutacija M5 zgodila le na tipu zaporedja C (slika 22).

Vse tri fitoplazme iz skupine sadnega drevja se v nukleotidnem zaporedju gena 16S rRNA razlikujejo za največ 1,5% in tako kažejo največjo podobnost tega gena med vsemi fitoplazmami (Seemüller in sod., 1998). Ravno zato smo v naši nalogi poleg gena 16S rRNA poskusili analizirati še del gena 23S rRNA ter vmesno regijo med njima. Na tem odseku smo pričakovali večjo genomsko raznolikost, saj pri fitoplazmah sadnega drevja znaša raznolikost vmesne regije 1,5-3% (Seemüller in Schneider, 2004). Takšne domneve potrjujejo tudi rezultati raziskave iz severne Italije, kjer so z analizo genomskega odseka 16S-23S rRNA dobili štiri različne genotipe fitoplazme AP (Casati in sod., 2011), medtem ko so v Španiji z analizo genomskega odseka z genom 16S rRNA in delom vmesne regije prav tako dobili štiri različne genotipe fitoplazme PD (Martin in sod., 2001). V Sloveniji pa smo na genomskega odseku 16S-23S rRNA dobili tri različne genotipe fitoplazme PD. Glede na manjše geografsko območje kot v severni Italiji in Španiji, najdba le treh različnih genotipov fitoplazme PD ni tako presenetljiva.

Podobnost genomskega odseka 16S-23S rRNA med slovenskimi fitoplazmami PD znaša okoli 99,7%. Takšna visoka podobnost je bila tudi pričakovana, saj izbrani genomski odsek vsebuje najbolj ohranjen gen med bakterijami (Weisburg in sod., 1991).

Mutacije M1, M2 in M3 so zagotovo nastale na genu 16S rRNA. Tranziciji in transverzija očitno niso letalno vplivale na zgradbo molekule rRNA, saj drugače fitoplazme ne bi preživele. Mutaciji M4 in M5 sta na mestih večkratnih ponovitev nukleotida A. Pri zaporedjih tipa B in C naj bi na mestu M4 prišlo do delecije enega nukleotida A, tako da jih je namesto osem le sedem. Pri zaporedju tipa C pa naj bi na mestu M5 prišlo do adicije enega nukleotida A, tako da jih je pet namesto štiri (preglednica 20, slika 22 in priloga D). Ker pri dolgih nukleotidnih ponovitvah pogosteje prihaja do napak v branju, smo vsako zaporedje prebrali v obe smeri, tako da smo ovrgli možnost napak (slika 19). Mutaciji M4 in M5 sta se verjetno zgodili na območju vmesne regije. Ker ta regija vsebuje območji na obeh straneh gena tRNA, ki ne kodirata ničesar (slika 6), predvidevamo, da se mutacije v njej lažje ohranjajo.

Možno bi bilo, da je prišlo pred letom 2007 v okolici Celja do serije neškodljivih mutacij na eni fitoplazmi PD. Le ta se je lahko razširila na druga sadna drevesa s pomočjo bolšic. Možen je tudi prenos s cepljenjem, a bi se fitoplazma v tem primeru verjetno razširila tudi v druge kraje in predvsem na večjo količino hrušk. Vrsta sorte očitno ne igra vloge pri razširjanju mutirane fitoplazme, saj sta bili okuženi sorti Kledžo in Rdeča Viljamovka.

5.1.7 Analize neribosomskih genov nam dajo večji vpogled v genotipsko raznolikost fitoplazem sadnega drevja

5.1.7.1 Del gena *secY* je najprimernejši kandidat za boljše razlikovanje med sorodnimi fitoplazmami iz skupine AP

Analiza objavljenih nukleotidnih zaporedij gena *secY* (slika 23) je pokazala, da imajo tri fitoplazme ESFY 99,7% podobnost (slika 25), štiri fitoplazme AP približno 95% (slika 27) ter pet fitoplazem PD 93% podobnost nukleotidnega zaporedja dela gena *secY* (slika 26). Razlike v AK zaporedjih (slika 24) se pri vseh treh fitoplazmah ujema z razlikami v nukleotidnih zaporedjih. Visoka podobnost pri fitoplazmi ESFY bi poleg le treh vzorcev lahko bila tudi posledica vzorčenja na bližnjih geografskih lokacijah. Fitoplazmi AP in PD pa kljub relativno majhnemu številu vzorcev kažeta največjo raznolikost od vseh analiziranih genov (slika 23, 31, 39 in 47). Pri obeh fitoplazmah je zanimivo območje nukleotidnega zaporedja med 95. in 115. nukleotidom. Očitno je pri nekaterih fitoplazmah prišlo do obsežne delecije ali adicije. Pri določenih fitoplazmah PD manjka na tem območju 17 nukleotidov, pri fitoplazmah AP pa 16 nukleotidov. Prav tako se ta razlika pozna pri AK zaporedjih, saj na približno istem odseku manjka šest AK pri PD in pet AK pri AP. Sklepamo, da se takšna velika sprememba verjetno pozna tudi pri delovanju transportnega sistema, kodiranega z genom *secY*.

Zanimiva je primerjava naših rezultatov z rezultati drugih raziskav. V raziskavi raznolikosti dela gena *secY* med fitoplazmami iz skupine AP so dobili le 12 različnih genotipov na območju celotne Evrope. Tako se je gen *secY* izkazal za najmanj raznolik gen v njihovi raziskavi, v katero so bili vključeni tudi geni *imp*, *pnp* ter *aceF* (Danet in sod., 2011). V severni Italiji se je del gena *secY* prav tako izkazal za zelo ohranjenega, saj je za razliko od drugih genov, ki jih v naši raziskavi sicer nismo analizirali, dal le en genotip (Casati in sod., 2011).

Del gena *secY* je po našem mnenju najprimernejši kandidat za nadaljnje raziskave različnih genotipov pri fitoplazmah PD in AP. Pri obeh najdemo veliko potencialnih restriktijskih mest, saj se mutacije pojavljajo skoraj po celotnem genu. Za natančnejše ugotovitve glede njegove uporabnosti za genotipizacijo fitoplazem ESFY pa nismo imeli na voljo dovolj podatkov za analizo.

5.1.7.2 Del gena *aceF* je dober kandidat za nadaljnje raziskave raznolikosti predvsem pri fitoplazmi PD

V naši raziskavi se je podobnost dela gena *aceF* zelo razlikovala med različnimi fitoplazmami. Med sedmimi fitoplazmami PD se nukleotidno zaporedje dela gena *aceF* razlikuje za približno 8% (slika 31 in 34), medtem ko se med 11 fitoplazmami ESFY (slika 31 in 33) in šestimi fitoplazmami AP (slika 31 in 35) razlikuje za 2% oz. 0,7%. AK zaporedje pri fitoplazmah PD in ESFY je po raznolikosti podobno njunima nukleotidnima zaporedjema, saj se ujema tako v podobnosti kot tudi v mestih raznolikosti (slika 32, 36 in 37). AK zaporedje štirih fitoplazem AP pa je popolnoma enako (slika 32 in 38), s čimer ne kaže velikih razlik z 99,3% podobnostjo nukleotidnega zaporedja iste fitoplazme.

V raziskavi raznolikosti dela gena *aceF*, v katero so bile vključene evropske fitoplazme iz skupine AP, je ta genomski odsek dal kar 24 genotipov, s čimer se je pokazal za manj raznolikeya le v primerjavi z genom *imp*, ki je dal 30 genotipov (Danet in sod., 2011).

Menimo, da je predvsem pri fitoplazmi PD del gena *aceF* zelo primeren za genotipske raziskave, saj sta zelo raznolika tako njegovo nukleotidno kot tudi AK zaporedje. Prav tako ima ta del gena veliko potencialnih restrikijskih mest. Smiselna bi po našem mnenju bila tudi njegova uporaba pri fitoplazmah ESFY, saj je 2% raznolikost kar primerna za nadaljnjo genotipizacijo. Nekoliko dvomimo v njegovo uporabnost pri razlikovanju med različnimi sevi fitoplazme AP. Kot zelo podobna so se izkazala tako nukleotidna kot tudi AK zaporedja. A glede na veliko število različnih genotipov tega gena v drugi raziskavi, bi najbrž za natančnejšo oceno njegove uporabnosti pri fitoplazmah AP bilo potrebno pridobiti še več podatkov iz različnih lokacij po Evropi.

5.1.7.3 Del gena *pnp* je najmanj primeren za določanje različnih genotipov

Del gena *pnp* je v naši raziskavi pokazal 98,5% podobnost med osmimi fitoplazmami PD (slika 39 in 42), medtem ko se je med petimi fitoplazmami AP (slika 39 in 43) ter dvema fitoplazmama ESFY (slika 39 in slika 41) z manj kot 1% raznolikosti pokazal kot zelo ohranjen. Podobno raznolikost kažejo tudi AK zaporedja vseh treh fitoplazem (slika 40, 44, 45 in 46).

Tudi v raziskavi raznolikosti evropskih fitoplazem iz skupine AP je del gena *pnp* dal le 15 različnih genotipov, s čimer v podobnosti zaostal le za delom gena *secY* (Danet in sod., 2011).

Omenjeni genski odsek izgleda najbolj ohranjen med vsemi neribosomskimi geni, ki smo jih analizirali v nalogi. Prav tako se naši rezultati glede raznolikosti dela gena *pnp* dokaj ujemajo z rezultati druge raziskave. Sklepamo, da je omenjeni gen uporaben le pri genotipizaciji fitoplazme PD, kjer kaže zadovoljivo raznolikost, medtem ko dvomimo v njegovo uporabnost pri fitoplazmah AP in ESFY. Menimo, da čeprav je del gena *pnp* kot samostojen genski odsek najmanj uporaben za določanje genotipov pri fitoplazmah iz skupine AP, bi zagotovo bil uporaben pri metodi MLSA, kjer bi v kombinaciji z drugimi geni pripomogel k novim haplotipom.

5.1.7.4 Gen *imp* se je izkazal kot najboljše orodje za določanje različnih genotipov pri fitoplazmah ESFY

V naši raziskavi podobnosti gena *imp* smo imeli na voljo 14 fitoplazem ESFY. Gen kaže približno 96% podobnost, potencialna mesta za restrikcijo pa se nahajajo po celotni dolžini gena (slika 47 in 48). Če njegovo raznolikost med fitoplazmami ESFY primerjamo z raznolikostjo ostalih genov (*pnp*, *aceF* in *secY*) pri fitoplazmi ESFY, vidimo, da je gen *imp* najbolj raznolik (slika 23, 31, 39 in 47).

Tudi v drugi raziskavi, kjer so analizirali raznolikost gena *imp* med evropskimi fitoplazmami iz skupine AP, se je le ta izkazal za najbolj raznolikega, saj je dal kar 30 različnih genotipov, kar je bilo največ od vseh genomskih odsekov, ki so jih uporabili v raziskavi (Danet in sod., 2011).

Kar 4% raznolikost, ki je skoraj enakomerno razporejena po celotni dolžini nukleotidnega zaporedja, je po našem mnenju dober indikator, da je gen *imp* primeren za nadaljnje raziskave pri fitoplazmah ESFY. Žal nismo imeli podatkov o njegovi raznolikosti pri fitoplazmah PD in AP, a upoštevajoč rezultate druge raziskave sklepamo, da je gen *imp* primeren za genotipizacijo tudi pri fitoplazmah PD in AP.

5.2 SKLEPI

- Določili smo najprimernejši način izvedbe ugnezdene reakcije PCR za ugotavljanje prisotnosti fitoplazem iz skupine AP.
- Glede na genomski odsek 16S-23S rRNA se v Sloveniji nahajajo 3 različni genotipi fitoplazme PD.
- Neribosomski deli genov *secY*, *aceF* ter gen *imp* bi lahko bili dobra orodja za določanje raznolikosti sorodnih fitoplazem sadnega drevja.

6 POVZETEK

Fitoplazme so bakterije brez celične stene, ki povzročajo veliko škode na gospodarsko pomembnih rastlinah. Njihov genom je najmanjši med bakterijami. So obligatni zajedavci na rastlinah in žuželkah iz reda enakokrilec (Hemiptera). V rastlini se nahajajo in razmnožujejo v floemu, med njimi pa se prenašajo z žuželkami, ki pridobijo fitoplazme med sesanjem rastlinskega soka. Posledica prilagojenosti na parazitski način življenja je redukcija večine metabolnih procesov. Njihovo preživetje v gostitelju je odvisno od interakcij z okoljem, ki ga predstavlja citoplazma gostiteljske celice. Ravno zato so fitoplazme razvile veliko strategij za uspešen sprejem večine hranil in ostalih metabolitov v celico. Okužijo lahko več kot 1000 različnih rastlin ter oslabijo njihovo rast in razmnoževanje, včasih povzročijo celo odmiranje rastlin. Zaradi nezmožnosti gojenja *in vitro* poznavanje fitoplazem temelji na molekulsko bioloških metodah, s pomočjo katerih se ugotavlja njihovo zgradbo, delovanje in sorodnost.

Sadjarjem največ skrbi povzročajo fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (skupina AP), ki napadajo sadno drevje in uničujejo pridelek. Fitoplazma metličavosti jablan (AP) je odgovorna za bolezen na jablanah (*Malus domestica*), fitoplazma umiranja hrušk (PD) povzroča bolezen hrušk (*Pyrus spp.*), medtem ko je fitoplazma leptonekroze koščičarjev (ESFY) razlog za obolenja na koščičarjih (*Prunus spp.*). Razširjene so po celotni Sloveniji, med drevesi pa se pretežno prenašajo s cepljenjem dreves z okuženim cepilnim materialom ter z žuželčjimi prenašalci iz družine bolšic (Psyllidae) in škržatkov (Cicadellidae), možen pa je tudi prenos preko koreninjskim mostičkov. Zaradi resnosti in pogostosti okužb je potreben stalni nadzor nad sadilnim in razmnoževalnim materialom v drevesnicah in matičnih nasadih. Le ta vključuje njihovo detekcijo s pomočjo molekulsko bioloških metod, med katerimi prevladujeta verižna reakcija s polimerazo v realnem času (reakcija PCR v realnem času) in analiza dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) v kombinaciji z ugnezdjeno reakcijo PCR. Pred okužbo z žuželčjimi prenašalci se sadjarji lahko zavarujejo z uporabo insekticidov ali gojenjem znotraj mrežnika. Ker je v primeru epidemije poleg eliminacije okuženih dreves potrebno poznati tudi vir okužbe, je nujno poznavanje povezave med geografsko lego, sorto in specifičnim genotipom fitoplazem, saj le tako lahko določimo vir okužbe. Fitoplazme iz skupine AP imajo največjo podobnost gena 16S rRNA med vsemi fitoplazmami, saj le ta znaša najmanj 98,5%. Večja raznolikost naj bi bila na področju vmesne regije med obema ribosomskima genoma (16S in 23S rRNA). Geni ali genomske odseki *pnp*, *aceF*, *secY* in *imp* so na podlagi tuje literature veliko manj podobni med fitoplazmami iz skupine AP, kot to velja za genomske odseki 16S/23S rRNA.

Glavni namen diplomske naloge je bil, da z izboljšanjem molekulskih metod povečamo poznavanje raznolikosti genomskega odseka 16S/23S rRNA med slovenskimi fitoplazmami umiranja hrušk. Razlike med najdenimi genotipi smo nato poskusili povezati z geografskimi območji, letom nabiranja in sortami, iz katerih so bile fitoplazme izolirane. V nadaljevanju naloge smo s pomočjo genskih bank poiskali štiri druge neribosomske gene ali genomske odseke (*pnp*, *imp*, *secY* in *aceF*), ki naj bi na osnovi tujih poročil omogočali boljše razlikovanje med sorodnimi fitoplazmami sadnega drevja, kot nam to omogoča genomske odseki 16S/23S rRNA.

Najprej smo s pomočjo uporabe različnih protokolov za ugnezdno reakcijo PCR pomnožili več vzorcev izhodne DNA, ki pripada fitoplazmam iz skupine AP. Nato smo uspešnost pomnožitve produktov PCR preverili z agarozno gelsko elektroforezo, ter tako določili najprimernejši protokol za pomnoževanje DNA. Ta protokol smo nato uporabili za pomnožitev vseh 30 izolatov fitoplazme PD. Prav tako smo v programu Primer Express izdelali par oligonukleotidnih začetnikov PD1f/r, s pomočjo katerega smo lahko pomnožili okoli 1730 bp dolgo zaporedje na genomskem odseku 16S/23S rRNA. Produkta PCR smo nato očistili z uporabo kompletov DNA Gel Extraction Kit ali MinElute PCR Purification Kit. Očiščene produkte PCR smo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja v Južno Korejo, kamor smo poleg produktov PCR poslali tudi 2 para oligonukleotidnih začetnikov, PD1-f/r ter JPF1/JPR1. Slednjega smo prav tako izdelali v programu Primer Express za pomoč pri branju celotnega zaporedja produktov PCR. Vsak vzorec je bil bran štirikrat, dvakrat z dvema smiseljnima začetnikoma (PD1-f in JPF1) in dvakrat z dvema protismiseljnima začetnikoma (PD1-r in JPR1). Nato smo vsa štiri zaporedja vzporedili v soseške s pomočjo programa Contig Express, ter tako določili 1630 bp dolgo nukleotidno zaporedje danega izolata fitoplazme PD. Zaporedja smo primerjali med seboj, da bi ugotovili število različnih genotipov na območju Slovenije. V drugem delu diplome smo s pomočjo internetne podatkovne baze NCBI pridobili veliko število objavljenih nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij neribosomskih genov ali genomskih odsekov, ki jih tuji viri navajajo kot bolj raznolike od genomskega odseka 16S/23S rRNA. Tudi ta zaporedja smo vzporedili v soseške s pomočjo programa Contig Express, ter tako dobili vpogled v njihovo podobnost.

Ugotovili smo, da je protokol JP-B najprimernejši za pomnoževanje DNA fitoplazem iz skupine AP. Od 30 vzorcev fitoplazme PD nam je s protokoloma JP-A in JP-B uspelo uspešno prebrati 23 vzorcev. Z analizo genomskega odseka 16S/23S rRNA smo dobili 3 različne genotipe fitoplazme PD, ki smo jih poimenovali tipi zaporedja A, B in C. Tip zaporedja A pripada 20 vzorcem, medtem ko tipa B in C pripadata enemu oziroma dvema vzorcema. Tipa B in C se pojavljata le v okolici Celja, od tipa zaporedja A pa se razlikujeta le v štirih oz. petih nukleotidnih mestih. Pokazali smo, da je genomski odsek 16S/23S rRNA zelo podoben, kar je bilo glede na tujo literaturo tudi pričakovati. Analize ostalih neribosomskih genomskih odsekov so pokazale, da so le ti zaradi večje raznolikosti boljše orodja za razlikovanje med sorodnimi fitoplazmami iz skupine AP. Za najboljše orodje pri genotipizaciji se je izkazal genomski odsek *secY*, saj je njegova podobnost nizka tako pri fitoplazmah PD kot tudi pri AP. Genomski odsek *aceF* se je pokazal kot najboljše orodje za genotipizacijo fitoplazem PD, a slabo orodje za razlikovanje med fitoplazmami ESFY in AP. Za nadaljnjo genotipizacijo fitoplazme ESFY priporočamo gen *imp*, saj le ta kaže najmanjšo podobnost od vseh analiziranih genomskih odsekov pri fitoplazmi ESFY. Genomski odsek *pnp* se je izkazal za najmanj primernega za nadaljnje določanje različnih genotipov fitoplazem iz skupine AP, zato ga priporočamo le za uporabo v metodi MLSA. V Sloveniji bi za boljše razlikovanje med fitoplazmami iz skupine AP poleg analize konzervativnega genomskega odseka 16S/23S rRNA bilo potrebno analizirati tudi druge neribosomske genomске odseke. Glede na rezultate naše naloge bi lahko analizirali genomске odseke *secY*, *aceF* ter *imp*, medtem ko bi v analizo z metodo MLSA lahko vključili tudi genomski odsek *pnp*.

7 VIRI

Ambrožič Turk, B., Fajt, N., Seljak, G., Veberič, R., Mehle, N., Boben, J., Dreo, T. in Ravnikar, N. (2010). Occurrence of European stone fruit yellows (ESFY) in Slovenia – possibilities of healthy mother plants cultivation in insect-proof nethouse. V: Rallo, Luis (ed.). *Science and Horticulture for people: abstracts. Internatinal Society for Horticultural Science: 268.*

Baric, S. in Dalla-Via, J. (2003). A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 57: 135-145.

Beanland, L., Hoy, C. W., Miller, S. A. in Nault, L. R. (2000). Influence of Aster Yellows Phytoplasma on the Fitness of Aster Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 271-276.

Berges, R. in Seemüller, E. (2000). Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145-1152.

Berges, R. in Seemüller, E. (2002). Impact of phytoplasma infection of common alder (*Alnus glutinosa*) depends on strain virulence. *Forest Pathology*, 32: 357-363.

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

Braun, E.J. in Sinclair, W.A. (1976). Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. *Phytopathology*, 66: 598-607.

Braun, E.J. in Sinclair, W.A. (1978). Translocation in phloem necrosis-diseased American elm seedlings. *Phytopathology*, 68: 1733-1737.

Brzin, J., Petrovič, N., Seljak, G., Osler, R., Ermacora, P., Loi, N., Carraro, L., Ferrini, F., Reffati, E. in Ravnikar, M. (2001). Prvi rezultati laboratorijskih analiz zastopanosti fitoplazem na sadnem drevju v Sloveniji. *Zbornik predavanj in referatov 5. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin: 217-221.*

Brzin, J., Ermacora, P., Osler, R., Lor, N., Ravnikar, M. in Petrovič, N. (2003). Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110: 476-483.

Brzin, J., Petrovič, N., Boben, J., Hren, M., Kogovšek, P., Mehle, N., Žezlina, I., Seljak, G., in Ravnikar, M. (2005). Fruit tree phytoplasmas. *Lectures and papers presented at the 7th Slovenian Conference on Plant Protection: 248-252.*

Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P. in Refatti, E. (1998). Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology*, 80: 233-239.

Carraro, L. in Osler, R. (2003). European stone fruit yellows: a destructive disease in the mediterranean basin. V: Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. (ur.). Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *CIHEAM. Options Mediterraneennes Serie B*, 45: 113-117.

Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P. in Loi, N. (2004). Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Horticulturae*, 657: 449-453.

Casati, P., Quaglino, F., Stern, A.R., Tedeschi, R., Alma, A. in Bianco, P.A. (2011). Multiple gene analyses reveal extensive genetic diversity among '*Candidatus* Phytoplasma mali' populations. *Annals of Applied Biology*, 158: 257-266.

Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Bragagna, P., Deromedi, M., Filippi, M., Forno, F. in Mattedi, L. (2007). Transmission of '*Candidatus* Phytoplasma mali' by root bridgers under natural and experimental conditions. *Bulletin of insectology*, 60: 387-388.

Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. in Schulz, A. (2004). Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17:1175-1184.

Christensen, N.M., Axelsen, B.K., Nicolaisen, M. in Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, vol. 10, št. 11: 526-535.

Danet, J.L., Blakishiyeva, G., Cimerman, A., Sauvion, N., Marie-Jeanne, V., Lebonne, G., Lavina, A., Batlle, A., Križanac, I., Škorić, D., Ermacora, P., Serce, C.U., Caglayan, K., Jarausch, W. in Foissac, X. (2011). Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter species recombination. *Microbiology*, 157: 438-450.

Del Serrone, P., La Starza, S., Krystai, L., Kölber, M. in Barba, M. (1998). Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. *Journal of Plant Pathology*, 80: 53-58.

Deng, S. in Hiruki, D. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53-61.

DNA Gel Extraction Kit, Millipore Corporation, Bedford, MA, Cat. Št. LSKG ELO 50

Doi, M., Tetranaka, M., Yora, K. in Asuyama, H. (1967). Mycoplasma or PLT-group-like organism found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom, aster yellow or paolownia witches'-broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259-266.

Ducroquet, J.P., Dosba, F., Lansac, M. in Mazy, K. (1986). Effect of temperature on symptom expression of apple proliferation, *Agronomie*, 6: 897-903.

EPPO A2 list of pests recommended for regulation of quarantine pests, EPPO (4.10.2010). <http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>, (29.7.2011).

Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A, Lavina, A. in Batlle, A. (2003). Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested PCR in different pear cultivars. *Plant pathology*, 52:513-520.

Gibb, K.S., Tran-Nguyen, L.T.T. in Randles, J.W. (2003). A new phytoplasma detected in the South Australian native perennial shrub, *Allocasuarina muelleriana*. *Annals of Applied Biology*, 142: 357-364.

Gundersen, D.E., Lee, I.M., Rehner, S.A., Davis, R.E. in Kingsbury, D.T. (1994). Phylogeny of phytoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 176: 5244-5254.

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

Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K. in Ravnikar, M. (2007). Real time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology*, 56: 785-796.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243-1255.

Jarausch, W., Eyquard, J.P., Mazy, K., Lansac, M. in Dosba, F. (1999). High level of resistance of sweet cherry (*Prunus avium*) towards European stone fruit yellows phytoplasmas. *Advances in Horticultural Science*, 13: 108-112.

Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G., Dickler, E. in Seemüller, E. (2003). First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant disease*, 87: 101.

Jensen, D.D., Griggs, W.H., Gonzales, C.Q. in Schneider, H. (1964). Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology*, 54: 1346-1351.

Jones, A.L. in Aldwinckle, H.S. (1990). *Compendium of apple and pear diseases*, ZDA, The American Phytopathological Society, tretja izdaja.

Kartte, S. in Seemüller, E. (1988). Variable response within the genus *Malus* to the apple proliferation disease. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 95: 25-34.

Kartte, S. in Seemüller, E. (1991a). Histopathology of apple proliferation in *Malus* taxa and hybrids of different susceptibility. *Journal of Phytopathology*, 131: 149-160.

Kartte, S. in Seemüller, E. (1991b). Susceptibility of grafted *Malus* taxa and hybrids to apple proliferation disease. *Journal of Phytopathology*, 131: 137-148.

Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K. in Sato, M. (2000). Identification of Mulberry Dwarf Phytoplasmas in the Genital Organs and Eggs of Leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90: 909-914.

Kollar, A. in Seemüller, E. (1989). Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology*, 127: 177-186.

Krczal, G., Krczal, H. in Kunze, L. (1988). Fieberiella florii (Stål), a vector of apple proliferation agent. *Acta Horticulturae*, 235: 99-106.

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

Laurer, U. in Seemüller, E., (1999). Physical Map of the Chromosome of the Apple Proliferation Phytoplasma. *Journal of Bacteriology*, 182: 1415-1418.

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

León, R., Santamaria, J.M., Alpizar, L., Escamilla, J.A. in Oropeza C. (1996). Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytologist*, 134: 227-234.

Lešnik, M., Ravnikar, M., Mehle, N., Brzin, J. in Lešnik, M. (2009). Obseg prenosa fitoplazme AP ('*Candidatus Phytoplasma mali*') v odvisnosti od načina cepljenja. *Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo*: 249-254.

Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U. in Seemüller, E. (1995). Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85: 771-776.

Marcone, C. in Ragozzino, A. (1996a). Comparative ultrastructural studies on genetically different phytoplasmas using scanning electron microscopy. *Petria*, 6(2): 125-136.

Marcone, C., Ragozzino, A. in Seemüller, E. (1996b). Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. *Plant pathology*, 45: 857-863.

- Marcone, C., Ragozzino, A., Del Serrone, P., Aloj, B., Barca, M. in Seemüller, E. (1996c). Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium witches'-broom disease. *Plant Diseases*, 80: 365-371.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. in Seemüller, E. (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805-810.
- Marcone, C. in Seemüller, E., (2001). A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology*, 147: 1213-1221.
- Martin, R., Carazo, G., Arribas, C., Colino, I., Santiago, R. in De Blas, C. (2001). Four spanish isolates of pear decline phytoplasma are related to other european phytoplasmas of the apple proliferation group. *Journal of Phytopathology*, 149: 481-484.
- Martini, M., Lee, I.M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J. in Osler, R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037-2051.
- Mäurer, R. in Seemüller, E. (1996). Witches' broom of *Rhamnus catharticus*: a new phytoplasma disease. *Journal of Phytopathology*, 144: 221-223.
- McLarty, H.R. (1948). Killing of pear trees. *Ann Rep Canadian Plant Dis Surv*, 28: 77.
- Mehle, N., Brzin, J., Boben, J., Hren, M., Frank, J., Petrovič, N., Gruden, K., Dreo, T., Žežlina, I., Seljak, G. in Ravnkar, M. (2007). First report of '*Candidatus* Phytoplasma mali' in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. *Plant pathology*, 56: 721.
- MiniElute[®] PCR purification kit, Qiagen, Cat. Št. 28004
- Nečas, T., Maskova, V. in Krska, B. (2008). The possibility of ESFY phytoplasma transmission: trough flowers and seeds. *Acta horticulturae*, 781: 443-447.
- Nikolić, P., Mehle, N., Gruden, K., Ravnkar, M. in Dermastia, M. (2010). A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and cellular probes*, 24: 303-309.
- Oshima, K., Kikizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. in Namba, S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of plant pathogenic phytoplasma. *Nature genetics*, 36: 27-29.
- Osler, R., Petrovič, N., Ermacora, P., Seljak, G., Brzin, J., Loi, N., Cararro, L., Ferrini, F. in Refatti, E. (2001). Control strategies of apple proliferation, a serious disease occurring both in Slovenia and in Italy. *Lectures and papers presented at the 5th Slovenian Conference on Plant Protection*, 238-243.

Papura, D., Delmotte, F., Giresse, X., Salar, P., Danet, J.L., Van Halden, M., Foissac, X. in Malembic-Maher, S. (2009). Comparing the spatial genetic structures of the Flavenescence dorée phytoplasma and its leafhopper vector *Scaphoideus titanus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 867-876.

Pastore, M., Raffone, E., Santonastaso, M., Priore, R., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. in Simeone, A.M. (2004). Phytoplasma detection in *Empoasca decedens* and *Empoasca spp.* and their possible role as vectors of European stone fruit yellows (16SrX-B) phytoplasma. *Acta Horticulturae*, 657: 507-511.

Pedrazzoli, F., Filippi, M., Deromedi, M., Bragagna, P., Battocletti, I. Bianchedi, P.L., Ciccotti, A.M. in Stoppa, G. (2008). Apple proliferation transmission by grafting in different periods of the year. *Acta Horticulturae*, 781: 489-493.

Pravilnik o trženju razmnoževalnega materiala in sadik sadnih rastlin, namenjenih za pridelavo sadja. Uradni list RS, št 17/2006 (17.2.2006).
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=71749>, (31.7.2011).

Pravilnik o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje fitoplazme European Stonefruit Yellows. Uradni list RS, št. 140/04 (17.12.2004).
http://www.furs.si/law/slo/zvr/slo/ESFY_140_2004.pdf, (31.7.2011).

Rapacioli, M., Rofman, E. in Flores, V. (2006). The genetic code degeneration 1: Rules governing the code degeneration and the spatial organization of the codon informative properties. *Rapport de recherche n° 5938*.
<http://hal.inria.fr/docs/00/08/38/50/PDF/RR-5938.pdf>, (4.8.2011).

Schneider, H. (1977). Indicator hosts for pear decline: symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. *Phytopathology*, 67: 592-601.

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

Seemüller, E., Kunze, L. in Schaper, U., (1984a). Colonization behavior of MLO and symptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 525-532.

Seemüller, E., Scharper, U. in Zimbelmann, F. (1984b). Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371-382.

Seemüller, E. (1988). Colonization patterns of mycoplasma-like organisms in trees affected by apple proliferation and pear decline. *Tree Mycoplasmas and Mycoplasma Diseases*, 179-192.

Seemüller, E. (1992). Pear decline. *Plant diseases of international Importance*, v *Diseases of Fruit Crops*: 308-334.

Seemüller, E, Kison, H, Lorenz, K.H., Schneider, B., Marcone, C., Smart, C.D. in Kirkpatrick, B.C. (1998). Detection and identification on fruit tree phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *New Technologies to Improve Phytodiagnosis. Advances in the Detection of Plant Pathogens by Polymerase Chain Reaction*: 56-66.

Seemüller, E, Garnier, M. in Schneider, B. (2002). Mycoplasmas of Plants and Insects. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*: 91-116.

Seemüller, E. in Schneider, B. (2004). '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and european stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1217-1226.

Seemüller, E in Schneider, B. (2007). Differences in virulence and genomic features of strains of '*Candidatus* Phytoplasma mali', the apple proliferation agent. *Phytopathology*, 97: 964-970.

Sinclair, W.A. in Griffiths, H.M., (2000). Variation of ash yellows phytoplasmas. *Plant Disease*, 84: 1112-1120.

Škodljivi organizmi, katerih vnos in širjenje v državah članicah se prepove. FURS, (15.1.2010).
http://www.furs.si/law/EU/zvr/zakonodaja_CIRCA/SLO_circa/seznami_SI/I_A_II_SI.pdf
(29.7.2011).

Tedeschi, R. in Alma, A., (2004). Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 97: 8-13.

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

Weintraub, P.G. in Beanland, L., (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91-111.

Weintraub, P.G. in Jones, P. (2010). *Phytoplasmas: genomes, plant hosts, and vectors*, Preston, AMA Dataset.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. in Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.

Woese, C.R., Maniloff, J. in Zablen, L.B. (1980). Phylogenetic analysis of phytoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 77: 494-498.

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem moji mentorici prof. dr. Marini Dermastia, idejni vodji moje diplomske naloge, ki me je usmerjala ter svetovala med izdelavo moje diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi mojima delovnim mentoricama mag. Nataši Mehle in dr. Petri Nikolić za uvajanje, pomoč in svetovanje pri praktičnem laboratorijskem delu.

Hvala tudi recenzentki prof. dr. Darji Žgur Bertok ter predsednici diplomske komisije, prof. dr. Marjani Regvar, za konstruktivne kritike in pripombe.

Hvala Zdenki Repanšek Tavčar iz Referata za študente biologije za pomoč pri urejanju študijskih problemov.

Lepo bi se zahvalil tudi ostalim sodelavcem Nacionalnega Inštituta za Biologijo, ki so mi bili med izdelavo diplome vedno pripravljene pomagati.

Velika zahvala gre seveda staršem, ki so me finančno in moralno podpirali skozi ves študij.

In seveda se zahvaljujem tudi vsem sošolcem in prijateljem, ki ste mi naredili študij bolj zanimiv.

PRILOGE

Priloga A: Seznam vseh vzorcev uporabljenih v nalogi. Vse fitoplazme PD so izolirane iz hrušk, vse fitoplazme AP so izolirane iz jablan, vse fitoplazme ESFY so izolirane iz koščičarjev (breskev, marelica in češplja).

Številka vzorca/leto odvzema vzorca	Vrsta fitoplazme	Lokacija nabiranja	Sadno drevo/sorta
797/07	PD	okolica Kranja	Bezgomovka
877/07	PD	okolica Ljubljane	Konferans
1008/07	PD	okolica Celja	Pakhamb
1040/07	PD	okolica Celja	Kledžo
1041/07	PD	okolica Celja	Rdeča Viljamovka
1051/07	PD	okolica Celja	?
1052/07	PD	okolica Celja	?
1053/07	PD	okolica Celja	?
1054/07	PD	okolica Celja	?
1066/07	PD	okolica Novega Mesta	Viljamovka
53/08	PD	okolica Celja	?
54/08	PD	okolica Celja	?
55/08	PD	okolica Celja	?
115/08	PD	okolica Celja	Viljamovka
119/08	PD	okolica Celja	Viljamovka
120/08	PD	okolica Celja	?
629/08	PD	okolica Ljubljane	Viljamovka
630/08	PD	okolica Ljubljane	Viljamovka
631/08	PD	okolica Ljubljane	Kledžo
685/08	PD	okolica Maribora	Viljamovka
760/08	PD	okolica Celja	Viljamovka
761/08	PD	okolica Celja	Viljamovka
764/08	PD	okolica Celja	Rdeča Viljamovka
768/08	PD	okolica Maribora	Viljamovka
769/08	PD	okolica Maribora	Viljamovka
1498/09	PD	okolica Maribora	Avranška
1580/09	PD	okolica Velenja	Julijska Lepotica
1581/09	PD	okolica Velenja	Hardijeva
1794/09	PD	okolica Ljubljane	David
1842/09	PD	okolica Ptuja	Boskova Steklenina
986/07	ESFY - breskev	okolica Nove Gorice	breskev / ?
12/08	ESFY – češplja	okolica Celja	češplja / Domača Sliva
288/08	ESFY – breskev	okolica Nove Gorice	breskev / ?
680/08	ESFY – breskev	okolica Ptuja	breskev / ?
728/08	ESFY – marelica	okolica Ljubljane	marelica / Goldrich
1206/09	ESFY- marelica	oklica Krškega	marelica / ?
1802/09	ESFY - breskev	okolica Celja	breskev / Red Heven

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Seznam vseh vzorcev uporabljenih v nalogi. Vse fitoplazme PD so izolirane iz hrušk, vse fitoplazme AP so izolirane iz jablan, vse fitoplazme ESFY so izolirane iz košičarjev (breskev, marelicica in češplja).

958/07	AP	okolica Velenja	Idared
62/08	AP	okolica Celja	Zlata Parmena
63/08	AP	okolica Celja	Alkmene
756/08	AP	okolica Celja	Šamp. Reneta
767/08	AP	okolica Celja	Carjevič

Priloga B: Seznam vseh nukleotidnih zaporedij iz podatkovne baze NCBI, ki smo jih uporabili v nalogi.

Vrsta fitoplazme	Gen ali del gena, ki ga predstavlja dano nukleotidno zaporedje	Oznaka nukleotidnega zaporedja v podatkovni bazi NCBI
ESFY	<i>secY</i>	FN598207.1
ESFY	<i>secY</i>	FN598205.1
ESFY	<i>secY</i>	FN598206.1
AP	<i>secY</i>	FN598215.1
AP	<i>secY</i>	FN598216.1
AP	<i>secY</i>	FN598214.1
AP	<i>secY</i>	FN598213.1
PD	<i>secY</i>	FN598209.1
PD	<i>secY</i>	FN598211.1
PD	<i>secY</i>	FN598210.1
PD	<i>secY</i>	FN598208.1
PD	<i>secY</i>	FN598212.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598174.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598176.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598170.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598167.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598173.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598168.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598175.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598171.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598169.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598172.1
ESFY	<i>aceF</i>	FN598166.1
AP	<i>aceF</i>	FN598189.1
AP	<i>aceF</i>	FN598188.1
AP	<i>aceF</i>	FN598186.1
AP	<i>aceF</i>	FN598187.1
AP	<i>aceF</i>	FN598185.1
AP	<i>aceF</i>	FN598184.1
PD	<i>aceF</i>	FN598181.1
PD	<i>aceF</i>	FN598183.1
PD	<i>aceF</i>	FN598177.1
PD	<i>aceF</i>	FN598179.1
PD	<i>aceF</i>	FN598178.1
PD	<i>aceF</i>	FN598182.1
PD	<i>aceF</i>	FN598180.1
ESFY	<i>pnp</i>	FN598191.1
ESFY	<i>pnp</i>	FN598190.1

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Seznam vseh nukleotidnih zaporedij iz podatkovne baze NCBI, ki smo jih uporabili v nalogi.

AP	<i>pnp</i>	FN598201.1
AP	<i>pnp</i>	FN598202.1
AP	<i>pnp</i>	FN598200.1
AP	<i>pnp</i>	FN598204.1
AP	<i>pnp</i>	FN598203.1
PD	<i>pnp</i>	FN598192.1
PD	<i>pnp</i>	FN598193.1
PD	<i>pnp</i>	FN598199.1
PD	<i>pnp</i>	FN598196.1
PD	<i>pnp</i>	FN598195.1
PD	<i>pnp</i>	FN598194.1
PD	<i>pnp</i>	FN598198.1
PD	<i>pnp</i>	FN598197.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600720.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600712.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600710.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600708.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600717.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600713.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600709.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600716.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600715.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600718.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600714.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600707.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600711.1
ESFY	<i>imp</i>	FN600719.1

Priloga C: Seznam vseh aminokislinskih zaporedij iz podatkovne baze NCBI, ki smo jih uporabili v nalogi.

Vrsta fitoplazme in skupina	Gen ali del gena, ki kodira dano AK zaporedje	Oznaka aminokislinskega zaporedja v podatkovni bazi NCBI
ESFY	<i>secY</i>	CBI62633.1
ESFY	<i>secY</i>	CBI62631.1
AP	<i>secY</i>	YP_002004392.1
AP	<i>secY</i>	CBI62639.1
AP	<i>secY</i>	CBI62640.1
AP	<i>secY</i>	CBI62641.1
PD	<i>secY</i>	CBI62635.1
PD	<i>secY</i>	ADO33885.1
PD	<i>secY</i>	CBI62636.1
PD	<i>secY</i>	CBI62638.1
PD	<i>secY</i>	CBI62634.1
PLN	<i>secY</i>	ADO33803.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62601.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62602.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62597.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62594.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62595.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62600.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62598.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62592.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62599.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62596.1
ESFY	<i>aceF</i>	CBI62593.1
AP	<i>aceF</i>	CBI62611.1
AP	<i>aceF</i>	CBI62612.1
AP	<i>aceF</i>	YP_002004194.1
AP	<i>aceF</i>	CBI62610.1
PD	<i>aceF</i>	CBI62607.1
PD	<i>aceF</i>	CBI62603.1
PD	<i>aceF</i>	CBI62608.1
PD	<i>aceF</i>	CBI62604.1
PD	<i>aceF</i>	CBI62605.1
PD	<i>aceF</i>	CBI62606.1
ESFY	<i>pnp</i>	CBI62616.1
ESFY	<i>pnp</i>	CBI62617.1
AP	<i>pnp</i>	YP_002004412.1
AP	<i>pnp</i>	CBI62628.1
AP	<i>pnp</i>	CBI62626.1

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga C: Seznam vseh aminokislinskih zaporedij iz podatkovne baze NCBI, ki smo jih uporabili v nalogi.

AP	<i>pnp</i>	CBI62629.1
AP	<i>pnp</i>	CBI62630.1
PD	<i>pnp</i>	CBI62619.1
PD	<i>pnp</i>	CBI62618.1
PD	<i>pnp</i>	CBI62622.1
PD	<i>pnp</i>	CBI62624.1
PD	<i>pnp</i>	CBI62623.1

Priloga D: Poravnava nukleotidnih zaporedij genomskega odseka 16S/23S rRNA pri fitoplazmi PD.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
>1052/07	1												
>695/08	1												
>1054/07	1												
>768/08	1												
>629/08	1												
>1066/07	1												
>630/08	1												
>1520/09	1												
>53/08	1												
>1041/07	1												
>1794/09	1												
>877/07	1												
>1008/07	1												
>54/08	1												
>631/08	1												
>797/07	1												
>1053/07	1												
>764/08	1												
>1040/07	1												
>120/08	1												
>55/08	1												
>115/08	1												
>1498/09	1												
Contig 1	1												
	1	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	230	
>1052/07	1												
>695/08	83												
>1054/07	93												
>768/08	96												
>629/08	97												
>1066/07	100												
>630/08	100												
>1520/09	101												
>53/08	101												
>1041/07	101												
>1794/09	103												
>877/07	104												
>1008/07	104												
>54/08	109												
>631/08	109												
>797/07	109												
>1053/07	110												
>764/08	109												
>1040/07	114												
>120/08	114												
>55/08	114												
>115/08	116												
>1498/09	119												
Contig 1	119												
		240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
>1052/07	236												
>695/08	203												
>1054/07	213												
>768/08	216												
>629/08	217												
>1066/07	220												
>630/08	220												
>1520/09	221												
>53/08	221												
>1041/07	221												
>1794/09	223												
>877/07	224												
>1008/07	224												
>54/08	227												
>631/08	229												
>797/07	229												
>1053/07	230												
>764/08	229												
>1040/07	234												
>120/08	234												
>55/08	234												
>115/08	236												
>1498/09	236												
Contig 1	236												
		360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470
>1052/07	206												
>695/08	323												
>1054/07	333												
>768/08	336												
>629/08	337												
>1066/07	340												
>630/08	340												
>1520/09	341												
>53/08	341												
>1041/07	341												
>1794/09	343												
>877/07	344												
>1008/07	344												
>54/08	347												
>631/08	349												
>797/07	349												
>1053/07	350												
>764/08	349												
>1040/07	354												
>120/08	354												
>55/08	354												
>115/08	356												
>1498/09	359												
Contig 1	359												

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga D: Poravnava nukleotidnih zaporedij genomskega odseka 16S/23S rRNA pri fitoplazmi PD.

Table showing nucleotide sequence alignment for Priloga D. The table is organized into columns representing positions (e.g., 960-1070, 1080-1190, 1200-1310, 1320-1430). Each row contains a sequence identifier (e.g., 1052/07, 685/08, 1054/07) and a corresponding nucleotide sequence. The sequences are aligned across the columns, with some gaps indicated by dashes. The table is divided into sections by 'Contig 1' labels.

se nadaljuje

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jernej PAVŠIČ

**GENSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV FITOPLAZEM
SKUPINE AP V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij biologije

Ljubljana, 2011