

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Petra MLINAR

**MOLEKULSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV  
FITOPLAZME, POVZROČITELJICE  
METLIČAVOSTI JABLAN**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Petra MLINAR

**MOLEKULSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV FITOPLAZME,  
POVZROČITELJICE METLIČAVOSTI JABLAN**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

**MOLECULAR DIVERSITY OF PHYTOPLASMA ISOLATES, THE  
CAUSATIVE AGENT OF APPLE PROLIFERATION**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Ekologija in Biodiverziteta na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Nacionalnega inštituta za biologijo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Marino Dermastia, somentorico dr. Natašo Mehle in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Lejla Pašić  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marina Dermastia  
Nacionalni inštitut za biologijo, Biotehnologija in sistemska biologija

Članica: dr. Nataša Mehle  
Nacionalni inštitut za biologijo, Biotehnologija in sistemska biologija

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: september, 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Petra Mlinar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 582:634.10:579.8(497.4)(043.2)=163.6
- KG fitoplazma, '*Candidatus* Phytoplasma mali', metličavost jablan, sekvenciranje, ugnezdna PCR, genotip, haplotip, raznolikost
- AV MLINAR, Petra, dipl. biol. (UN)
- SA DERMASTIA, Marina (mentorica)/MEHLE, Nataša (somentorica)/ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij ekologije in biodiverzitete
- LI 2015
- TY MOLEKULSKA PESTROST IZOLATOV FITOPLAZME, POVZROČITELJICE METLIČAVOSTI JABLAN
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
- OP XI, 58 str., 21 pregl., 13 sl., 10 pril., 64 vir.
- IJ sl
- JJ sl/en
- AI Fitoplazme so bakterije brez celične stene, ki naseljujejo floem rastlin ter žuželke in spadajo v razred *Mollicutes*. Povzročajo bolezni rastlin, v naravi pa jih prenašajo in razširjajo žuželke, ki se hranijo s floemom okuženih rastlin. Metličavost jablan je karantenska bolezen, ki jo povzroča fitoplazma '*Candidatus* Phytoplasma mali'. Okužbe s fitoplazmo v sadovnjakih predstavljajo velik problem sadjarjem, saj negativno vplivajo na količino pridelka in posledično povzročajo ekonomsko škodo. V magistrski nalogi smo s sekvenciranjem ugnezdenih produktov PCR analizirali slovenske izolate '*Ca. P. mali*' in jih uvrstili v eno od genskih podskupin ter proučili ali obstaja povezava med tipom fitoplazme in njegovo geografsko razširjenostjo. Ugotovili smo, da na podlagi gena *aceF* razlikujemo v Sloveniji pet genotipov, na podlagi gena *secY* šest, na podlagi gena *pnp* tri ter na podlagi gena *imp* sedem genotipov. Z analizo zaporedij več lokusov pa smo odkrili 16 različnih haplotipov. Ker se večina haplotipov pojavlja po vsej Sloveniji, nekateri pa le enkrat, težko govorimo o njihovi geografski specifičnosti. Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da je genska raznolikost '*Ca. P. mali*' v Sloveniji visoka.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 582:634.10:579.8(497.4)(043.2)=163.6
- CX phytoplasma, '*Candidatus Phytoplasma mali*', apple proliferation, sequencing, nested PCR, genotype, haplotype, diversity
- AU MLINAR, Petra
- AA DERMASTIA, Marina (supervisor)/MEHLE, Nataša (co-supervisor)/ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biology, Field: Ecology and Biodiversity
- PY 2015
- TY Molecular diversity of phytoplasma, the causative agent of apple proliferation
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Biology)
- NO XI, 58 str., 21 pregl., 13 sl., 10 pril., 64 vir.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Phytoplasmas are phloem-restricted wall-less bacteria belonging to the class *Mollicutes*. They are associated with plant diseases and transmitted from plant to plant by sap feeding insects. '*Candidatus Phytoplasma mali*' is a causative agent of apple proliferation which is a quarantine disease affecting apple growing regions in Europe. The disease causes severe yield damage and therefore economic loss. Slovenian '*Ca. P. mali*' isolates were analysed by using molecular tools (sequencing of the nested PCR products) in order to obtain information about genetic diversity of '*Ca. P. mali*' in Slovenia. Furthermore, the correlation between phytoplasma genotype and its geographic distribution was tried to be established. In Slovenia five different '*Ca. P. mali*' genotypes can be distinguished based on *aceF* gene, six genotypes based on *secY* gene, three genotypes based on *pnp* and seven different genotypes based on *imp* gene. In addition, multi locus sequence analysis was made and it showed that 16 different haplotypes are present in Slovenia. We could not establish the correlation between haplotype and its geographic distribution since most of the haplotypes can be observed in different Slovenian areas or they are present only once. All in all, molecular diversity of '*Ca. P. mali*' in Slovenia is high.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>X</b>
<b>SLOVARČEK</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 SPLOŠNO O FITOPLAZMAH IN ZGODOVINSKO OZADJE	3
<b>2.1.1 Morfološke značilnosti</b>	<b>3</b>
2.2 DETEKCIJA IN KLASIFIKACIJA FITOPLAZEM	3
<b>2.2.1 Taksonomija fitoplazem</b>	<b>3</b>
<b>2.2.2 Analiza genoma</b>	<b>4</b>
<b>2.2.3 Primerjava genomov</b>	<b>4</b>
2.3 OKUŽBA RASTLIN IN RAZVOJ BOLEZNI	5
<b>2.3.1 Bolezenska znamenja</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2 Prenašalci okužbe</b>	<b>5</b>
<b>2.3.3 Razvoj bolezni in odziv rastline</b>	<b>5</b>
<b>2.3.4 Dejavniki, ki vplivajo na razvoj bolezni</b>	<b>5</b>
<b>2.3.5 Odpornost rastlin</b>	<b>6</b>
2.4 POVEZAVA MED FITOPLAZMAMI, PRENAŠALCI IN GOSTITELJSKIMI RASTLINAMI	6
<b>2.4.1 Taksonomske skupine prenašalcev</b>	<b>6</b>
<b>2.4.2 Prenos fitoplazme preko prenašalca</b>	<b>6</b>
<b>2.4.3 Odnos med prenašalcem, fitoplazmo in rastlino</b>	<b>7</b>
2.5 EKOLOGIJA, EKONOMSKI VPLIV IN DIAGNOSTIKA OKUŽB S FITOPLAZMO	7
<b>2.5.1 Razširjenost fitoplazem</b>	<b>7</b>
<b>2.5.2 Zasedanje ekoloških niš</b>	<b>7</b>
<b>2.5.3 Ekonomski vpliv in kontrola bolezni</b>	<b>8</b>
<b>2.5.4 Metode zaznavanja fitoplazem</b>	<b>8</b>
2.6 SKUPINA AP	9
<b>2.6.1 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' in 'Candidatus Phytoplasma prunorum'</b>	<b>9</b>
<b>2.6.2 'Candidatus Phytoplasma pyri'</b>	<b>9</b>
<b>2.6.3 'Candidatus Phytoplasma prunorum'</b>	<b>10</b>

2.7	' <i>CANDIDATUS</i> PHYTOPLASMA MALI'	10
2.7.1	<b>Metličavost jablan</b>	<b>10</b>
2.7.2	<b>Širjenje AP z žuželčjimi prenašalci</b>	<b>11</b>
2.7.3	<b>Kako preprečiti širjenje bolezni</b>	<b>12</b>
2.7.4	<b>Genom '<i>Ca. P. mali</i>' in dosedanje raziskave</b>	<b>12</b>
3	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>15</b>
3.1	SHEMATIČEN PRIKAZ POSTOPKA	15
3.2	MATERIALI	16
3.2.1	<b>PCR in ugnezdena PCR</b>	<b>16</b>
3.2.2	<b>Agarozna gelska elektroforeza</b>	<b>18</b>
3.2.3	<b>Čiščenje produktov PCR</b>	<b>19</b>
3.2.4	<b>Računalniška obdelava nukleotidnih zaporedij</b>	<b>20</b>
3.3	METODE	20
3.3.1	<b>PCR in ugnezdena PCR</b>	<b>20</b>
3.3.2	<b>Agarozna gelska elektroforeza</b>	<b>22</b>
3.3.3	<b>Čiščenje produktov PCR</b>	<b>23</b>
3.3.4	<b>Pošiljanje vzorcev na sekvenciranje in analiza dobljenih zaporedij</b>	<b>23</b>
4	<b>REZULTATI</b>	<b>24</b>
4.1	PREVERJANJE USPEŠNOSTI REAKCIJ PCR Z AGAROZNO GELSKO ELEKTROFOREZO	24
4.2	PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ČIŠČENJA PRODUKTA PCR	24
4.3	RAZNOLIKOST ŠTIRIH RAZLIČNIH GENOV ZA AP	26
4.3.1	<b>Rezultati analize genov <i>aceF</i>, <i>secY</i>, <i>pnp</i> in <i>imp</i></b>	<b>26</b>
4.3.2	<b>Raznolikost gena <i>aceF</i> APf v Sloveniji</b>	<b>29</b>
4.3.3	<b>Raznolikost gena <i>secY</i> APf v Sloveniji</b>	<b>31</b>
4.3.4	<b>Raznolikost gena <i>pnp</i> APf v Sloveniji</b>	<b>33</b>
4.3.5	<b>Raznolikost gena <i>imp</i> APf v Sloveniji</b>	<b>35</b>
4.3.6	<b>Primerjava slovenskih genotipov APf z genotipi genske banke NCBI</b>	<b>37</b>
4.4	HAPLOTIPI APF PRISOTNI V SLOVENIJI	41
4.4.1	<b>Raznolikost haplotipov v Sloveniji</b>	<b>41</b>
4.4.2	<b>Kartografski prikaz raznolikosti haplotipov v Sloveniji</b>	<b>44</b>
4.4.3	<b>Filogenetski odnos haplotipov APf v Sloveniji</b>	<b>45</b>
5	<b>RAZPRAVA</b>	<b>46</b>
5.1	PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ČIŠČENJA PRODUKTA PCR	46
5.2	RAZNOLIKOST APF V SLOVENIJI	46
5.2.1	<b>Raznolikost gena <i>aceF</i> za APf v Sloveniji</b>	<b>47</b>
5.2.2	<b>Raznolikost gena <i>secY</i> za APf v Sloveniji</b>	<b>47</b>
5.2.3	<b>Raznolikost gena <i>pnp</i> za APf v Sloveniji</b>	<b>48</b>
5.2.4	<b>Raznolikost gena <i>imp</i> za APf v Sloveniji</b>	<b>49</b>
5.3	RAZNOLIKOST SLOVENSkih HAPLOTIPOV APF	50
5.3.1	<b>Raznolikost haplotipov APf po posameznih krajih v Sloveniji</b>	<b>50</b>
5.3.2	<b>Filogenetski odnosi haplotipov APf v Sloveniji</b>	<b>50</b>
6	<b>SKLEPI</b>	<b>51</b>
7	<b>POVZETEK</b>	<b>52</b>
8	<b>VIRI</b>	<b>53</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri delu.....	16
Pregl. 2: Ostali laboratorijski pripomočki, ki smo jih uporabili pri delu .....	16
Pregl. 3: Kemikalije, ki smo jih uporabili pri delu .....	17
Pregl. 4: Oligonukleotidni začetniki (povzeto po Danet in sod., 2011) .....	17
Pregl. 5: Naprave, ki smo jih uporabili v elektroforeznici .....	18
Pregl. 6: Ostali pripomočki za delo v laboratoriju in elektroforeznici .....	18
Pregl. 7: Kemikalije in raztopine, ki smo jih uporabili v elektroforeznici .....	18
Pregl. 8: Pregled sestavin 50x pufra TAE (za 1000 mL) .....	19
Pregl. 9: Kompleti za čiščenje produktov PCR .....	19
Pregl. 10: Ostali pripomočki in naprave za čiščenje produktov PCR .....	19
Pregl. 11: Kemikalije, njihove koncentracije in končni volumen 1 reakcije.....	20
Pregl. 12: Pogoji reakcije PCR.....	21
Pregl. 13: Pogoji ugnezdene PCR reakcije.....	21
Pregl. 14: Mase in volumni sestavin za pripravo gela glede na nosilec .....	22
Pregl. 15: Primerjava treh različnih metod čiščenja PCR produkta s časovnim okvirom... 25	
Pregl. 16: Podatki o izolatih z genotipi za gene <i>aceF</i> , <i>secY</i> , <i>pnp</i> in <i>imp</i> ter njihovi genotipi .....	26
Pregl. 17: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi A1-A5 (primerjava je narejena za dolžino 593 bp, v oklepaju je podano število neujemanj) .....	29
Pregl. 18: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi S1-S6 (primerjava je narejena za dolžino 494 bp, v oklepaju je podano število neujemanj) .....	31
Pregl. 19: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi P1-P3 (primerjava je narejena za dolžino 400 bp, v oklepaju je podano število neujemanj) .....	33
Pregl. 20: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi I1-I7 (primerjava je narejena za dolžino 510 bp, v oklepaju je podano število neujemanj) .....	35
Pregl. 21: Določitev haplotipov in njihova raznolikost ter pogostost po posameznih krajih v Sloveniji.....	42



## KAZALO SLIK

Sl. 1: Shema določevanja nukleotidnega zaporedja fitoplazme AP za gene <i>aceF</i> , <i>secY</i> , <i>pnp</i> , <i>imp</i> .....	15
Sl. 2: Primer 1 % agarozne gelske elektroforeze ugnezenih produktov PCR (zgoraj levo za gen <i>aceF</i> , zgoraj desno za gen <i>secY</i> , spodaj levo za gen <i>pnp</i> in spodaj desno za gen <i>imp</i> ). NKP - negativna kontrola ugnezdene PCR reakcije; PK - pozitivna kontrola; M – marker (Gene Ruler TM 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas); D – oznake vzorcev.....	24
Sl. 3: Raznolikost genotipov gena <i>aceF</i> za AP v Sloveniji ter pogostost in raznolikost genotipov gena <i>aceF</i> po posameznih krajih in v letih 2012-2015 v Sloveniji....	30
Sl. 4: Raznolikost genotipov gena <i>secY</i> za AP v Sloveniji ter pogostost in raznolikost genotipov gena <i>aceF</i> po posameznih krajih in v letih 2012-2015 v Sloveniji....	32
Sl. 5: Raznolikost genotipov gena <i>pnp</i> za AP v Sloveniji ter pogostost in raznolikost genotipov gena <i>aceF</i> po posameznih krajih in v letih 2012-2015 v Sloveniji ....	34
Sl. 6: Raznolikost genotipov gena <i>imp</i> za AP v Sloveniji ter pogostost in raznolikost genotipov gena <i>aceF</i> po posameznih krajih in v letih 2012-2015 v Sloveniji....	36
Sl. 7: Evolucijski odnos slovenskih genotipov <i>aceF</i> AP in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati (s črnim kvadratom so označeni genotipi, ki so prisotni zgolj v Sloveniji).....	37
Sl. 8: Evolucijski odnos slovenskih genotipov <i>secY</i> AP in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati (s črnim kvadratom so označeni genotipi, ki so prisotni zgolj v Sloveniji).....	38
Sl. 9: Evolucijski odnos slovenskih genotipov <i>pnp</i> AP in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati. ....	39
Sl. 10: Evolucijski odnos slovenskih genotipov <i>imp</i> AP in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati (s črnim kvadratom so označeni genotipi, ki so prisotni zgolj v Sloveniji).....	40
Sl. 11: Raznolikost haplotipov AP v Sloveniji.....	43
Sl. 12: Razporejenost haplotipov po posameznih krajih v Sloveniji.....	44
Sl. 13: Filogenetski odnosi haplotipov AP v Sloveniji. Oznake nad vejami prikazujejo odstotek v koliko primerih je med testom samo-vzorčenja (200 ponovitev) prišlo do takšnega združevanja haplotipov. ....	45

## KAZALO PRILOG

Pril. A: Poravnava dobljenih zaporedij (A1, A2, A3, A4 in A5) in zaporedij iz baze podatkov NCBI (FN598186, FN598184, FN598187, FN598188) za gen <i>aceF</i> . Z rumeno je označen odsek, ki smo ga primerjali za določitev genotipov A1, A2, A3, A4 in A5.....	1
Pril. B: Poravnava dobljenih zaporedij (S1, S2, S3, S4, S5 in S6) in zaporedij iz baze podatkov NCBI (HM237289, FN598213, HM237294, FN598214) za gen <i>secY</i> . Z rumeno je označen odsek, ki smo ga primerjali za določitev genotipov S1, S2, S3, S4, S5 in S6. ....	2
Pril. C: Poravnava dobljenih zaporedij (P1, P2 in P3) in zaporedij iz baze podatkov NCBI (FN598202, FN598204, FN598203, FN598200) za gen <i>pnp</i> . Z rumeno je označen odsek, ki smo ga primerjali za določitev genotipov P1, P2 in P3. ....	3
Pril. D: Poravnava dobljenih zaporedij (I1, I2, I3, I4, I5, I6 in I7) in zaporedij iz baze podatkov NCBI (FN600733, FN600736, FN600734, FN600730, FN600731) za gen <i>imp</i> . Z rumeno je označen odsek, ki smo ga primerjali za določitev genotipov I1, I2, I3, I4, I5, I6 in I7. ....	4
Pril. E: Poravnave prvih dobljenih zaporedij genotipov z zaporedji po ponovnem sekveniranju novih produktov ugnezdene PCR. Primerjava je bila narejena le na vzorcih (D201/12/ <i>imp</i> , D48-2/15/ <i>imp</i> , D940/13/ <i>aceF</i> , D201/12/ <i>aceF</i> , D401/12/ <i>secY</i> , D940/13/ <i>secY</i> ) kjer smo odkrili edinstveno zaporedje-zaporedje odkrito le pri enem vzorcu .....	1
Pril. F: Primerjava slovenskih genotipov <i>aceF</i> z genotipi iz genske banke NCBI. ....	1
Pril. G: Primerjava slovenskih genotipov <i>secY</i> z genotipi iz genske banke NCBI .....	2
Pril. H: Primerjava slovenskih genotipov <i>pnp</i> z genotipi iz genske banke NCBI.....	3
Pril. I: Primerjava slovenskih genotipov <i>imp</i> z genotipi iz genske banke NCBI .....	4
Pril. J: Vrednosti Ct izolatov določene z metodo PCR v realnem času (vir podatkov: NIB arhiv).....	5

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AP skupina	filogenetska skupina treh fitoplazem- ' <i>Candidatus</i> phytoplasma mali', ' <i>Candidatus</i> phytoplasma pyri' in ' <i>Candidatus</i> phytoplasma prunorum'
APf	fitoplazma, ki povzroča bolezen metličavost jablan- ' <i>Candidatus</i> phytoplasma mali'
Acc. No.	številka dostopnosti (ang. Accession number)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etidijev bromid
PCR	verižna reakcija s polimerazo
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
ML	metoda največjega verjetja

## SLOVARČEK

MLSA	analiza zaporedij več lokusov (ang. multilocus sequence analysis)
NCBI	genska banka (ang. National Center for Biotechnology Information)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. restriction fragment length polymorphism)
SSPC	analiza polimorfizmov zaporedij (ang. single strand confirmation polymorphism)
ML	Metoda največjega verjetja (ang. maximum likelihood)

## 1 UVOD

Okužbe v sadovnjakih predstavljajo velik problem sadjarjem, saj negativno vplivajo na količino pridelka in posledično povzročajo ekonomsko škodo. Metličavost jablan je karantenska bolezen, ki jo povzroča fitoplazma '*Candidatus Phytoplasma mali*' ('*Ca. P. mali*'). Bolezen je razširjena po večini najpomembnejših regij v Evropi, kjer poteka pridelava jabolk (Casati in sod., 2011). Bolezenska znamenja, ki jih opazimo na drevesih okuženih s '*Ca. P. mali*', so metličavost stranskih poganjkov, povečani prilisti, razbarvani listi in zmanjšani plodovi. Okužena drevesa običajno ne propadejo, bolezenska znamenja lahko izginijo iz površinskih delov, vendar korenine ostanejo okužene (Seemueller in sod., 2008).

Fitoplazma '*Ca. P. mali*' se lahko prenaša z razmnoževalnim in sadilnim materialom, preko koreninskih mostičev in z žuželčjimi prenašalci iz rodu *Cacopsylla*. Glavna prenašalca sta bolšici *Cacopsylla picta* (Foerster) in *Cacopsylla melanoneura* (Foerster), prenaša pa jo lahko tudi škržatek *Fiebertiella florii* (Stål) (Ciccoti in sod., 2007; Lešnik in sod., 2008; Tedeschi in sod., 2007).

'*Ca. P. mali*' je vrsta v ožjem sorodstvu z vrstama '*Ca. P. pyri*', ki povzroča umiranje hrušk in '*Ca. P. prunorum*', ki povzroča leptonekrozo koščičarjev. Našteti patogeni imajo več kot 97.5 % podobno gensko zaporedje 16S rRNA in spadajo v skupino AP oz. 16Sr-X (Schneider in Seemueller, 2009).

Z molekulskimi analizami genomskih neribosomskih območij PR-1, PR-2, PR-3, genov 16S/23S rDNA, *rplV-rpsC*, *aceF*, *secY*, *pnp*, *imp* in *hflB* so prikazali veliko genetsko pestrost '*Ca. P. mali*'. Pri določenih genotipih lahko opazimo specifično geografsko in epidemiološko razširjenost, prav tako pa je moč opaziti razlike v virulenci posameznih izolatov (Casati in sod., 2011; Danet in sod., 2011; Franova in sod., 2013; Schneider in sod., 2009). Za Slovenijo nimamo podatkov o raznolikosti '*Ca. P. mali*'.

## 1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

V nalogi bomo z molekularnimi metodami analizirali slovenske izolate '*Ca. P. mali*' in jih uvrstili v eno od genskih podskupin ter proučili ali obstaja povezava med tipom fitoplazme in njegovo geografsko razširjenostjo.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Molekulska pestrost fitoplazme '*Ca. P. mali*' v Sloveniji je visoka.
- Pričakujemo da bo, podobno kot so ugotovili Danet in sod. (2011), analiza zaporedij genov *aceF* in *imp* prikazala višjo gensko raznolikost fitoplazme '*Ca. P. mali*', kakor analiza zaporedij genov *secY* in *pnp*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SPLOŠNO O FITOPLAZMAH IN ZGODOVINSKO OZADJE

Fitoplazme so bakterije brez celične stene, ki naseljujejo floem rastlin ter žuželke in spadajo v razred *Mollicutes*. Povzročajo bolezni rastlin, v naravi pa jih prenašajo in razširjajo žuželke, ki se hranijo s floemom okuženih rastlin (Lee in sod., 2000). Ker fitoplazem ne znamo rutinsko gojiti v razmerah *in vitro* brez prisotnosti gostitelja, označujemo njihovo ime rodu '*Candidatus*' (Firrao in sod., 2005). Včasih so prepoznali in uvrščali fitoplazme v sistem na podlagi bioloških lastnosti kot so bolezenska znamenja okuženih rastlin, razširjenost fitoplazem na gostiteljskih rastlinah in odnosov fitoplazem z žuželčjimi prenašalci. Raziskave na molekularnem nivoju pa nam danes omogočajo bolj natančno prepoznavanje in določanje posameznih skupin fitoplazem (Lee in sod., 2000).

Fitoplazme so od odkritja leta 1967 na Japonskem prepoznane kot edinstvena skupina rastlinskih patogenov. Bolezni rastlin, kot so »rumenenje« so opazili že ob koncu 19. stoletja in jih povezovali z virusi, vendar se je izkazalo, da mnoge izmed teh bolezni ne povzročajo virusi, temveč fitoplazme (Weintraub in Jones, 2010). Fitoplazme in virusi so si podobni v načinu širjenja okužbe, bolezenskih znamenjih, ki jih povzročajo in dejstvu, da oboje lahko prenašajo žuželke. Morfološke in ultrastrukturne značilnosti pa fitoplazme povezujejo z mikoplazmami, zato so fitoplazme včasih imenovali 'mikoplazmam podobni organizmi' (Bertaccini in Duduk, 2009). Tako kot fitoplazme, tudi mikoplazme spadajo v razred *Mollicutes*. Za razliko od mikoplazem, ki so živalski in človeški patogeni, fitoplazem ne znamo gojiti *in vitro* (Lee in Davis, 1986). Ime fitoplazme se je uveljavilo leta 1994, od leta 1997 (ICSBS, 1997) pa jih taksonomsko uvrščamo med '*Candidatus Phytoplasma*'.

#### 2.1.1 Morfološke značilnosti

Doi in sodelavci so leta 1967 prvič opisali morfološko zgradbo fitoplazem. To so celice pleomorfne oblike, podobno velike kot mikoplazme. So brez celične stene, obdane z enojno notno celično membrano in so občutljive na antibiotik tetraciklin. Prvim ugotovitvam, da so fitoplazme pleomorfne celice, katerih velikost je lahko od 200-800  $\mu\text{m}$ , so sledila spoznanja o filamentozni morfologiji fitoplazem. Z mikroskopijo v temnem polju lahko vidimo, da v prosojnih prevajalnih tkivih rastlin okuženih s fitoplazmami, prevladujejo filamentozna telesca (Lee in Davis, 1992).

### 2.2 DETEKCIJA IN KLASIFIKACIJA FITOPLAZEM

#### 2.2.1 Taksonomija fitoplazem

Molekularne analize (PCR- verižna reakcija s polimerazo, nested PCR- ugnezdena verižna reakcija s polimerazo, RFLP- analiza polimorfizmov dolžin restriksijskih fragmentov, sekvenciranje, MLSA-več lokusna analiza zaporedij) so veliko bolj zanesljive za določanje in identifikacijo fitoplazem kot biološki kriteriji (podobnost in raznolikost bolezenskih znamenj, rastlinski gostitelj, žuželčji prenašalec).

Gensko zaporedje 16S rRNA je visoko ohranjeno zaporedje in je zanesljivo orodje za klasifikacijo fitoplazem (Lee in sod., 2000). Analiza genov, ki določajo zaporedje 16S rRNA prikazuje, da so se fitoplazme razvile in imajo skupen evolucijski izvor z bakterijsko

skupino *Bacillus-Clostridium*. Za obe skupini je značilno, da imata nizko vsebnost G+C baznih parov ter sta pozitivni po Gramu (Weisburg in sod., 1989). Fitoplazme so se nato znotraj razreda *Mollicutes* razvile v samostojno skupino. Številni divergentni sevi znotraj te skupine pa so posledica nadaljnje evolucije in prilagoditve na širok razpon bioloških in geografsko-ekoloških niš (Gundersen in sod., 1994; Lee in sod., 2000).

Z molekularnimi analizami (PCR, RFLP) zaporedja 16S rRNA fitoplazme razdelimo v 30 različnih skupin, imenovanih 16Sr skupin (Weintraub in Jones, 2010). Danes velja, da nove vrste fitoplazem definiramo na podlagi neujemanja zaporedja 16S rDNA z ostalimi fitoplazmami. Določili so arbitrarno mejo za opis nove vrste fitoplazme. Nova vrsta se mora od že opisanih vrst razlikovati za 2,5 %, poleg tega pa moramo poznati več kot 1200 bp dolgo gensko zaporedje (Firrao in sod., 2004). Za določitev nove vrste moramo upoštevati tudi edinstvene biološke lastnosti kot sta gostiteljska specifičnost in prenašalci.

Pogosto se zgodi, da so si ozko sorodni sevi tako zelo podobni, da med njimi ne moremo razlikovati na podlagi analize zaporedja 16S rRNA. Zato je potrebna analiza dodatnih genskih markerjev, na primer analiza genov *tuf*, 16/23S rRNA z vmesno regijo, *secY* (Weintraub in Jones, 2010). Dodati velja, da različni genski markerji različno razlikujejo med podskupinami skupine fitoplazem (Lee in sod., 2000).

### 2.2.2 Analiza genoma

V bazi NCBI (NCBI, 2015) je celotno nukleotidno zaporedje objavljeno za 13 vrst fitoplazem. Odkrili so, da se genomi med seboj razlikujejo v velikosti, sestavi, prisotnosti oz. odsotnosti metabolnih poti in številu ponovitev genskih odsekov. Fitoplazme so podvržene hitri genomski evoluciji in se stalno spreminjajo, kar je posledica njihovega življenjskega cikla in prilagajanja. V naravi stalno krožijo med rastlinsko gostiteljico in prenašalci, od njih je namreč odvisno njihovo preživetje in razširjanje. Sekvenciranje genoma je znanstvenikom omogočilo, da so odkrili številne proteine, s katerimi so lahko opisali, kako fitoplazme vplivajo na delovanje rastlin in prenašalnih žuželk. To so proteini, nameščeni na celično površino fitoplazem, ki omogočajo vezavo z mikrofilamenti v žuželčjem črevesju in s proteini, katerih tarča so celična jedra rastlinskih celic (Weintraub in Jones, 2010).

### 2.2.3 Primerjava genomov

S primerjavo štirih genomov ('*Ca. P. asteris*' liniji OY-M in AY-WB, '*Ca. P. australiense*', in '*Ca. P. mali*') so Kube in sodelavci (2012) prikazali določene podobnosti med fitoplazmami. Vse fitoplazme imajo z AT bogat genom, podobno število tRNA genov in dve kopiji rRNA operona. Zaradi majhnega števila genov, ki zapisujejo reducirano število metabolnih poti glede na ostale bakterije, je genom fitoplazem majhen (pod 900 kbp). To pa je posledica evolucijske prilagoditve na okolje, ki je bogato s hranili in povišane odvisnosti od gostitelja. Metabolne poti, ki pa so še vedno ohranjene, so prisotne pri večini fitoplazem. Fitoplazme imajo relativno veliko število transportnih sistemov, glede na njihovo velikost genoma. Med skupinami obstajajo tudi razlike. Pri fitoplazmi '*Ca. P. mali*' zasledimo linearen kromosom, pri ostalih treh fitoplazmah pa je kromosom krožen. Prav tako pri fitoplazmi '*Ca. P. mali*' opazimo najmanj kodirajočih zaporedij pa tudi nepopolne



ponovitve zaporedij, ki bi omogočale transpozicijo in zato je pričakovano njen genom najbolj ohranjen.

## 2.3 OKUŽBA RASTLIN IN RAZVOJ BOLEZNI

### 2.3.1 Bolezenska znamenja

Fitoplazme povzročajo okužbe na številnih poljščinah, zelenjadnicah, okrasnih rastlinah, sadnem drevju ter vinogradih in tako povzročajo ogromno ekonomsko škodo. Bolezenska znamenja okuženih rastlin so zelo različna. Odvisna so od vrste fitoplazme in stopnje okužbe in so posledica porušenega hormonskega ravnovesja rastline ali motnje delovanja rastnih regulatorjev v rastlini. Razlikujemo med specifičnimi in nespecifičnimi bolezenskimi znamenji. Med specifična sodijo virescenca ali razbarvanje listov, filodija ali razvoj cvetnih delov v listu podobne strukture, sterilnost cvetov, metličavost stranskih poganjkov, podaljševanje internodijev, povečana tvorba floema. Fitoplazme večinoma negativno vplivajo na rastline, kljub temu pa poznamo nekaj vrst rastlin, ki so odporne ali pa tolerantne na okužbo s fitoplazmo. Takšne rastline ne izražajo bolezenskih znamenj ali pa so bolezenska znamenja prisotna v milejši obliki in jih imenujemo nespecifična bolezenska znamenja. Nespecifična bolezenska znamenja so najbolj pogosta pri lesnatih rastlinah in vključujejo zvijanje in zmanjšanje listov, povečevanje žil, zmanjšano velikost plodov, prezgodnje jesensko obarvanje (Lee in sod., 2000).

### 2.3.2 Prenašalci okužbe

Fitoplazme se lahko širijo z razmnoževalnim in sadilnim materialom ter z žuželkami, ki so se prej hranile s floemom okuženih rastlin. Fitoplazme lahko prezimijo v prenašalnih žuželkah ali v trajnicah, ki jim omogočajo razširjanje naslednjo pomlad (Lee in sod., 2000).

### 2.3.3 Razvoj boleznin in odziv rastline

Fitoplazme v rastlinah živijo in se razmnožujejo izključno v floemu. S tem oslabijo delovanje sitastih cevi, pri čemer pride do motenj prenosa hranilnih snovi (Marcone in sod., 2009). Zaradi omejenega prenosa hranilnih snovi, rastline kopičijo večje količine ogljikovih hidratov v založnih listih, posledično jim primanjkuje zalog energije v mladih listih in koreninah (Maust in sod., 2003). Prav tako je ob okužbi s fitoplazmo v rastlini oviran prenos aminokislin, ki je prav tako omejen na floem, kar povzroči zmanjšano rast in razvoj rastlin (Lepka in sod., 1999). Prisotnost fitoplazem oslabi tudi fiziološko delovanje rastlin: zmanjša se učinkovitost fotosinteze, prevodnost rež, respiracija korenin, spremeni se sekundarni metabolizem ter nastopi hormonsko neravnovesje v rastlini (Maust in sod., 2003).

### 2.3.4 Dejavniki, ki vplivajo na razvoj boleznin

Razvoj bolezenskih znamenj je odvisen od stopnje okužbe oz. virulence različnih sevov fitoplazme. Ob nižji virulenci seva se izrazijo milejše oblike bolezenskih znamenj ali pa se le-ta sploh ne izrazijo. Ob višji virulenci seva so bolezenska znamenja bolj očitna in lahko popolnoma spremenijo rast in razvoj rastline (Seemüller in Schneider, 2007). Na razvoj boleznin vpliva tudi odnos večih sevov istega taksona znotraj gostiteljske rastline. Predvidevajo, da lahko interakcija med različnimi sevi znotraj istega gostitelja v naravi povzroči, da se izrazijo bolezenska znamenja prevladujočega seva ali vseh sevov. Lahko pa

se bolezenska znamenja izrazijo v blagi obliki ali se sploh ne izrazijo, pri čemer nevirulenten sev onemogoči okužbo virulentnemu sevu (Berges in Seemüller, 2002). Med različnimi vrstami rastlin je koncentracija fitoplazem različna, višja je predvsem pri trajnicah in drugih zelnatih rastlinah, medtem ko so nizke koncentracije značilne za lesnate rastline. Stopnja okužbe rastlin ima kvalitativen in ne kvantitativen izvor, koncentracija tako ni odvisna od virulence seva. V rastlini imajo sevi, ki niso ali pa so manj virulentni, enako stopnjo preživetja in razširjenja kot sevi, ki so bolj virulentni (Seemüller in Schneider, 2007).

### 2.3.5 Odpornost rastlin

Nekatere rastline se uspešno branijo proti okužbi s fitoplazmami. Ozdravijo tako, da povečajo tvorbo obrambnih proteinov ali povečajo tvorbo fenolnih spojin ali tvorijo signalne molekule kot sta na primer  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Z opazovanjem jablan, trte in marelic so odkrili povezavo med rastlinami, ki so prebolele okužbo s fitoplazmami in njihovo povečano tvorbo  $\text{H}_2\text{O}_2$  v floemu. Posamezne rastline, ki so kazale bolezenska znamenja okužbe in zdrave kontrolne rastline niso tvorile  $\text{H}_2\text{O}_2$  v presežkih. Prav tako imajo jablane, ki so prebolele okužbo, povišano koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  v citosolu, medtem ko pri jablanah, ki so okužena oz. zdrava, povišane koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  v citosolu ni moč opaziti (Musetti in Favali, 2003; Musetti in sod., 2004; Musetti in sod., 2005).

## 2.4 POVEZAVA MED FITOPLAZMAMI, PRENAŠALCI IN GOSTITELJSKIMI RASTLINAMI

### 2.4.1 Taksonomske skupine prenašalcev

Ker so fitoplazme omejene na floem rastlin, do njih lahko pridejo in jih razširjajo le žuželke, ki se prehranjujejo s floemom. Najpomembnejše prenašalke fitoplazem spadajo v red polkričev (Hemiptera). To so hemimetabolne žuželke (odrasli osebkovi in nimfe imajo isti način prehranjevanja), ki se selektivno hranijo na točno določenem tkivu in med prehranjevanjem ne ranijo tkiva rastline. Imajo tudi obligatne simbionte, ki se preko ovarijev prenašajo na potomce ravno na takšen način kot se nato na potomce prenašajo fitoplazme. Med najpogostejše žuželčje prenašalce sodijo škržatki (Cicadellidae) in bolšice (Psyllidae) (Weintraub in Beanland, 2006).

### 2.4.2 Prenos fitoplazme preko prenašalca

Ko se neokužena žuželka hrani s floemskim sokom, v katerem so proste aminokisliline in sladkorji, okužene rastline, zaužije tudi delce fitoplazem. Čas hranjenja, ki je potreben, da žuželka pridobi zadostno količino fitoplazem v svoje telo se imenuje obdobje pridobitve oz. angleško 'acquisition access period- AAP' in navadno traja nekaj ur (Purcell, 1982). Znotraj žuželke se zaužiti delci fitoplazem prenesejo od celic srednjega črevesja do hemocela. Naprej se po celotnem telesu prenašajo s hemolimfo do celic žlez slinavk, kjer se fitoplazme lahko namnožijo. Sledi obdobje inkubacije v katerem fitoplazme naselijo celotno žuželko in se dodatno namnožijo, kar traja od 10 dni do 3 tedne. Ko se žuželka nato hrani s floemom zdrave gostiteljske rastline, jo okuži z okuženo slino. Obdobje, ki preteče od začetne pridobitve, do obdobja, ko okužbo lahko žuželka prenese na druge rastline, imenujemo latentno obdobje oz. angleško 'latent period- LP'. Ko se konča latentno obdobje, ki je različno dolgo in odvisno od gostiteljske rastline, se na rastlini začno pojavljati bolezenska znamenja. Ko se v rastlini fitoplazme namnožijo do dovolj visoke

koncentracije, jih lahko žuželke prenašajo naprej na naslednje rastlinske gostitelje (Weintraub in Jones, 2010).

### **2.4.3 Odnos med prenašalcem, fitoplazmo in rastlino**

Specifičnost prenosa fitoplazme s prenašalcem na gostiteljsko rastlino je odvisen od geografskega območja razširjenosti vseh treh. Žuželke ne morejo biti prenašalke okužb, če so omejene na območja, kjer ni fitoplazem. Če pa se žuželčji prenašalci pojavijo v novem geografskem območju, kjer lahko pridejo v stik s fitoplazmo, lahko sledi hitra širitev bolezni (Weintraub in Jones, 2010).

Fitoplazme imajo koristen, škodljiv ali nevtralen vpliv na žuželčje prenašalce. S tem ko okužijo žuželko vplivajo na stopnjo in razširjenost bolezni. Žuželke, ki bodo živele dlje časa, bodo lahko okužile več rastlin in imele več potomcev za njihovo nadaljnje razširjanje. Čas evolucijskega razvoja odnosa fitoplazem in žuželk, pri katerih okužba pomeni zmanjšano možnost preživetja žuželk, je bil po vsej verjetnosti prekratek, saj selekcija še ni izničila negativnih posledic okužbe (Weintraub in Beanland, 2006).

Posamezen žuželčji prenašalec je lahko okužen z več različnimi sevi fitoplazem in tako lahko prenese tudi po več različnih sevov na rastline (Weintraub in Beanland, 2006). Pomemben je tudi odnos med prenašalcem in gostiteljsko rastlino. Polifagni prenašalci lahko okužijo več različnih rastlinskih vrst, uspešnost okužbe pa je odvisna od odpornosti rastlin (Bosco in sod., 1997). Fitoplazme lahko ob okužbi tudi spremenijo delovanje rastlin. Povzročijo, da rastline postanejo čim bolj primerne gostiteljice žuželčjih prenašalcev - rastline zmanjšajo sintezo kemijskih snovi, ki sicer preprečujejo hranjenje z njihovim floemom, lahko pa rastline zaradi okužbe povečajo sintezo lažje prebavljivih nutrientov, ki so hrana za prenašalce in jih tako dodatno privabljajo (Weintraub in Beanland, 2006).

## **2.5 EKOLOGIJA, EKONOMSKI VPLIV IN DIAGNOSTIKA OKUŽB S FITOPLAZMO**

### **2.5.1 Razširjenost fitoplazem**

Fitoplazme se pojavljajo po vsem svetu in povzročajo bolezni na številnih rastlinskih vrstah (iz 98 družin) in številnih žuželkah polkričev (Lee in sod., 2000). Dokazali so, da lahko različni sevi fitoplazem povzročajo podobna bolezenska znamenja, prav tako lahko ozko sorodne vrste fitoplazem povzročajo različne oblike bolezenskih znamenj (Davis in Sinclair, 1998). Geografska izolacija fitoplazem sovпада z razširjenostjo gostiteljskih rastlin in žuželčjih prenašalcev, ki so značilni le za določeno regijo (Lee in sod., 2000; Davis in sod., 1988; Harrison in sod., 1996). Ker pa spreminjamo tako mikro kot makro ekosisteme s tem, da vnašamo tujerodne rastline in žuželke, omogočamo prisotnost in razširjenost fitoplazem na novih območjih. Tako so se lahko nekatere fitoplazme razširile preko vseh kontinentov, druge pa so ostale izolirane v posameznih ekoloških nišah, kjer se neodvisno razvijajo naprej iz starševskih linij (Lee in sod., 2000).

### **2.5.2 Zasedanje ekoloških niš**

Fitoplazme, ki povzročajo okužbe na več različnih rastlinskih gostiteljih in žuželčjih prenašalcih, lahko v naravi zasedajo številne ekološke niše. Kadar si več različnih sevov

deli iste rastlinske gostitelje ali prenašalne žuželke je v gostitelju prisotna mešanica sevov. Ob širjenju okužbe lahko tako posamezni sevi prehajajo na druge gostitelje. Če je koncentracija posameznega seva v eni ekološki niši nizka, se lahko zgodi, da mu nova ekološka niša bolj ustreza in njegova koncentracija se poveča. Prav tako je lahko mešanica sevov v gostitelju razlog, da pride do izmenjave genetske informacije med sevi, kar povzroči evolucionski razvoj fitoplazem. Na novo nastali sevi imajo lahko specifične zahteve do okolja in so lahko omejeni le na določen življenjski prostor. Torej, pogosti stiki med posameznimi populacijami fitoplazem in izolacije posameznih sevov so lahko izhodišče povečanja pestrosti raznolike skupine fitoplazem (Lee in sod., 1992; Lee in sod., 2000).

### 2.5.3 Ekonomski vpliv in kontrola bolezni

Število bolezni, ki jih povzročajo fitoplazme še vedno narašča. Okužbe s fitoplazmo globalno omejujejo in zmanjšujejo pridelok poljščin, sadnih in okrasnih rastlin in tako povzročajo ogromno ekonomsko škodo (Lee in sod., 2000). Ko nastopi bolezen, lahko razlikujemo oz. imamo dve epidemiološki stanji-epidemično in ne-epidemično. Nekatere bolezni ne povzročajo epidemij na samih poljščinah, saj so poljščine le epidemiološki končni gostitelji fitoplazme. To se zgodi, kadar so rezervoar fitoplazem divje rastline kot so npr. pleveli in kadar prenašalne žuželke živijo v naravnih in ne umetnih ekosistemih, kot je npr. njiva. Ker se prenašalne žuželke le občasno hranijo na poljščinah, povzročajo monociklične epidemije. V takem primeru sta izguba pridelka in ekonomska škoda odvisni od gostote in infektivnosti prenašalnih žuželk. Takšne bolezni večinoma niso karantenske bolezni, med ukrepe zatiranja sodi odstranjevanje glavnega rezervoarja fitoplazem- plevela (Weintraub in Jones, 2000).

O policiklični epidemiji pa govorimo, ko žuželčji prenašalci prenašajo bolezen od poljščine do poljščine, takrat poljščine predstavljajo glavni rezervoar fitoplazem, žuželčji prenašalci pa zaključijo svoj življenjski krog na okuženi rastlini. Bolezni, ki se širijo na takšen način se večinoma pojavljajo na trajnicah in poljščinah. V primeru, da so uvrščene na seznam karantensko škodljivih organizmov je obvezno odstranjevanje in uničevanje okuženih rastlin, popis sadilnega materiala in izvedba kemične kontrole nad prenašalnimi žuželkami. Poleg izgubljenega pridelka imamo še večjo ekonomsko škodo, zaradi dragih kontrolnih ukrepov- uporaba pesticidov, poljske raziskave (Weintraub in Jones, 2010).

Pri omejevanju nastanka in širjenja bolezni s fitoplazmami moramo najprej poskrbeti, da preprečimo nastanek bolezni. To storimo tako, da nasadimo zdrave oz. neokužene vrste ali vrste ki so odporne na okužbo s fitoplazmami. Nadzorovati moramo tudi prisotnost žuželčjih prenašalcev in naše tehnike gojenja morajo preprečiti stik s fitoplazmami (Carraro in sod., 1989; Sinclair in sod., 1997).

### 2.5.4 Metode zaznavanja fitoplazem

V naravi zaznavamo okužbe s fitoplazmami z vizualno zaznavo bolezenskih znamenj, v laboratorijih pa lahko izvajamo diagnostične teste, kot npr. serološki test ELISA, nespecifična metoda barvanja DNA z barvilom DAPI ali uporabimo bolj specifične in zanesljivejše molekularne metode (Brzin in sod., 2005). Med najpogostejše molekularne metode zaznavanja okužb s fitoplazmo štejemo PCR, ugnezdno PCR in analizo RFLP, (uporabljamo jih tudi za ugotavljanje molekulske raznolikosti). Danes pa omenjene metode

nadomešča PCR v realnem času, ki je hitrejši in bolj občutljiv kot prej naštete metode (Nikolič in sod., 2010). Za zaznavanje in diagnosticiranje fitoplazem na terenu pa je primerna nova metoda izotermalnega pomnoževanja-LAMP (Kogovšek in sod., 2014).

## 2.6 SKUPINA AP

### 2.6.1 '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' in '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'

Metličavost jablan (AP), umiranje hrušk (PD) in leptonekroza koščičarjev (ESFY) spadajo med ekonomsko najpomembnejše bolezni sadnega drevja. Metličavost jablan povzroča fitoplazma '*Ca. P. mali*', umiranje hrušk '*Ca. P. pyri*' in leptonekrozo koščičarjev '*Ca. P. prunorum*'. Vrsti '*Ca. P. mali*' in '*Ca. P. pyri*' uvrščamo med karantenske organizme v Evropski uniji in sta na seznamu I.A.II iz priloge I. del A Direktive Sveta Evrope št. 2000/29/Es in listi karantensko škodljivih organizmov A2 organizacije EPPO.

S filogenetsko analizo zaporedij 16S rDNA so dokazali, da so si vse tri fitoplazme med sabo skoraj identične in spadajo v skupino AP oz. 16Sr-X (Seemüller in Schneider, 2004). Zaporedja se ujemajo 98.6 % do 99.0 %, kar je nad arbitrarno mejo za razlikovanje med fitoplazmami, ki znaša 97.5 % (Firrao in sod., 2004). Razlikujemo pa jih lahko na podlagi drugih genskih markerjev (na primer genov, ki nosijo zapis za sintezo proteinov ali genov 16S-23S rDNA z vmesno regijo) ter njihovih bioloških in ekoloških značilnostih.

Za vsako vrsto fitoplazme so značilne gostiteljske rastline in bolezenska znamenja, ki jih fitoplazma povzroči na tej rastlini. Prav tako pa vsako fitoplazmo prenašajo specifične žuželke (Seemüller in Schneider, 2004).

Za detekcijo in razlikovanje med vrstami skupine 16Sr-X lahko uporabimo metodi PCR in RFLP. Za hitrejšo zaznavo fitoplazem pa uporabimo PCR v realnem času, ki je zelo občutljiva, specifična in zanesljiva metoda (Nikolič in sod., 2010). V Sloveniji so vse tri vrste potrjeno prisotne (Mehle in sod., 2011).

### 2.6.2 '*Candidatus Phytoplasma pyri*'

Umiranje hrušk (PD), ki jo povzroča '*Ca. P. pyri*', je ena izmed najbolj pomembnih bolezni hrušk (*Pyrus communis*). Okužba s fitoplazmo povzroči bolj ali manj hiter propad drevesa (Weintraub in sod., 2010). '*Ca. P. pyri*' povzroča širok spekter nespecifičnih bolezenskih znamenj, med katere spadajo razbarvanje listov, prisotnost zmanjšanih blede zelenih listov, zvijanje listov, prezgodnje odpadanje listov, zmanjšana velikost plodov, zmanjšana rast rastline kateri sledi propad rastline (Seemüller in sod., 2009). Okužbo s fitoplazmo prenašata žuželki dveh vrst - *Cacopsylla pyricola* in *Cacopsylla pyri* (Carraro in sod., 1998). Širjenja bolezni ne moremo učinkovito zaustaviti; boleznimi se lahko izognemo tako, da posadimo rastline, ki so tolerantne na okužbo s fitoplazmo (Seemüller in sod., 2009). O boleznimi so poročali v Evropi, Severni Ameriki, Mali Aziji in na Tajvanu. V posameznih zveznih državah ZDA je bolezen zmanjšala pridelek hrušk za polovico, v Italiji pa je v letu 1940 povzročila propad 50 000 dreves (Weintraub in sod., 2010). V Sloveniji so opisali visoko molekulsko pestrost fitoplazme '*Ca. P. pyri*' (Pavšič in sod., 2014).

### 2.6.3 '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'

Leptonekroza koščičarjev je ime za bolezen koščičarjev (*Prunus*), ki jih povzroča '*Ca. P. prunorum*'. Bolezen povzroča ekonomsko škodo na marelici (*P. armeniaca*), japonski slivi (*P. salicina*), breskvi (*P. persica*), pa tudi nekaterih divjih koščičarjih (na primer *P. spinosa* in *P. serratina*). Nekatere vrste kot na primer sliva (*P. domestica*) so tolerantne na okužbo s fitoplazmo in kljub okužbi ne kažejo bolezenskih znamenj, nekatere vrste pa so odporne na okužbo, na primer češnja (*P. avium*) (Carraro in sod., 2002). Bolezenska znamenja, ki nastopijo ob okužbi s '*Ca. P. prunorum*' so lahko rumenenje in zvijanje listov, kateremu sledi razbarvanje listov; zmanjšanje in zaviranje dormance, ki lahko vodi do poškodb rastlin ob zmrzali; nekroza in posledična smrt rastline. Posledica okužbe sta tudi rast izven sezone in prezgodnje olistanje dreves pred cvetenjem (Carraro in Osler, 2003; Jarausch in sod., 1998). *Cacopsylla pruni* je edina znana žuželčja prenašalka bolezni. Ker se v praksi okužbe s fitoplazmo ne da ozdraviti, moramo izvajati preventivne ukrepe, kot so sajenje zdravega sadilnega materiala. V okoljih, kjer je visoka stopnja tveganja okužbe (okolja, kjer so prisotne divje rastline) pa moramo posaditi tolerantne ali odporne vrste. Z leptonekrozo koščičarjev imamo težave predvsem v Evropi in na Mediteranu (Carraro in Osler, 2003).

## 2.7 '*CANDIDATUS PHYTOPLASMA MALI*'

### 2.7.1 Metličavost jablan

'*Ca. P. mali*' povzroča metličavost jablan (AP) in je ena najbolj uničujočih bolezni jablan (*Malus x domestica*) v Evropi (Seemüller in Schneider, 2004). Povzroča velike izgube pridelkov in je ne moremo zatreti z biocidnimi in kemičnimi sredstvi (Lešnik in sod., 2009). Bolezenska znamenja, ki nastopijo ob okužbi in so jasno vidna so metličavost stranskih poganjkov, povečani prilisti, razbarvanje listov in zmanjšani plodovi. Okužena drevesa navadno ne propadejo, bolezenska znamenja lahko celo izginejo, vendar njihove korenine ostanejo okužene (Seemüller in sod., 2008). Prikrite oziroma latentne okužbe tako dokazujemo z laboratorijskimi testi korenin, kar pa je bistveno pri nadziranju širjenja bolezni (Brzin in sod., 2003).

V 60. letih 20. stoletja so '*Ca. P. mali*' prvič opazili v severni Italiji, do danes so njeno prisotnost potrdili v večini evropskih držav, kjer so prisotni matični nasadi in drevesnice za gojenje jablan. V največjem obsegu je fitoplazma prisotna v zmernih klimatskih območjih srednje, vzhodne, zahodne in južne Evrope, v zadnjih letih pa je bila njena prisotnost potrjena tudi v azijskem delu Turčije (Weintraub in Jones, 2010; Canik in Ertunc, 2007). V Sloveniji so leta 1985 v okolici Ormoža prvič opazili bolezenska znamenja AP, od tedaj naprej stalno poročajo o njeni prisotnosti (Šarić in Cvjetković, 1985; Brzin in sod., 2005; Lešnik in sod., 2009; Mehle in sod., 2011).

Primarni gostitelji fitoplazme so bolšice medtem ko so rastline le naključni sekundarni gostitelj (Lešnik in sod., 2009). Naravne prenašalka okužbe so žuželke bolšic iz rodu *Cacopsylla* (Hemiptera: Psyllidae) (Purcel, 1982). AP lahko prenašamo tudi z razmnoževalnim in sadilnim materialom (s cepljenjem). Obstajajo pa tudi poročila, da se okužba lahko prenaša preko koreninskega sistema med sosednjimi gostiteljskimi drevesi (Lešnik in sod., 2008).

### 2.7.2 Širjenje AP z žuželčjimi prenašalci

Glavni prenašalki 'Ca. P. mali' sta *C. picta* (Foerster) in *C. melanoneura* (Foerster) (Frisinghelli in sod., 2000). Tedeschi in sodelavci (2006) pa so v nadzorovanem laboratorijskem poskusu ugotovili, da lahko 'Ca. P. mali' prenaša tudi škrdžatek *Fiebertiella florii* (Stål).

Generacijski čas *C. melanoneura* je eno leto. Odrasli okuženi osebki prezimijo na sekundarnih gostiteljskih rastlinah, običajno na iglavcih, ob koncu zime pa kolonizirajo nasade sadnih dreves. Ko se spomladi hranijo na glavnih gostiteljskih rastlinah-jablanah, jih lahko okužijo (Tedeschi in sod., 2002). Spomladi bolšice tudi odložijo jajčeca na sadnih drevesih, iz katerih se nato razvijejo nimfe in kasneje novi odrasli osebki. Pozno pomladi ali zgodaj poleti pa novi odrasli osebki migrirajo na alternativne gostiteljske rastline, kjer ostanejo do konca zime (Tedeschi in sod., 2002).

Bolšica *C. picta* je prisotna le v Evropi in se prehranjuje zgolj na rastlinah iz rodu *Mallus* spp. Kljub različno velikim populacijam v različnih regijah, imajo vse populacije isto populacijsko dinamiko (Jarausch in sod., 2011). Posamezna bolšica zaključí življenjski krog v enem letu in kot odrasel osebek prezimi na iglavcih. Z dreves, na katerih prezimi ob koncu zime, migrira na drevesa jablan, kjer odloži jajčeca. Osebki, ki se na novo razvijejo iz jajčec ostanejo in se hranijo na jablanah do začetka julija, takrat pa kot odrasli osebki migrirajo na prezimovališča (Jarausch in sod., 2011; Tedeschi in sod., 2009). Stopnja okužbe s fitoplazmo 'Ca. P. mali' je visoka na območjih, kjer je visoka gostota populacij *C. picta*. Koncentracija fitoplazem v prezimlih osebkih *C. picta* je visoka, saj se fitoplazme čez zimo v bolšici dodatno namnožijo in lahko okužbo prenesejo tudi na svoje potomce. Primarna okužba novih osebkov *C. picta* pa je posledica prehranjevanja na okuženih drevesih jablan. Prisotnost močno okuženih osebkov *C. picta* ne pomeni višje stopnje okuženosti nasada in tip nasada ne vpliva na pogostost žuželčjih prenašalcev. Stanje nasada je tako lahko odvisno od različnih dejavnikov kot so gostota populacije *C. picta*, vira inokuluma širšega območja in kmetijske dejavnosti območja (Jarausch in sod., 2011).

Za vrsto *C. melanoneura* je prav tako kot za vrsto *C. picta* značilno, da zaključí generacijski čas v enem letu. Obe vrsti imata podoben življenjski krog, vendar je *C. melanoneura* na jablanah prisotna od konca januarja do začetka junija, za razliko od *C. picta*, ki jo zasledimo na jablanah od marca do julija (Mattedi in sod., 2007). *C. melanoneura* je palearktično razširjena in je oligofag družine rožnic (Rosaceae). Prisotna je lahko na glogu (*Crataegus*), jablani (*Malus*) in hruški (*Pyrus* spp.), pri čemer je glavna gostiteljska rastlina bolšice enovrati glog (*Crataegus monogyna*), ki je v bližnjem sorodstvu z jablano in pogosto raste blizu nasadov jablan (Tedeschi in sod., 2009).

V preteklih raziskavah so prišli do spoznanj, da sta lahko na večini opazovanih območjih prisotni obe bolšici (Jarausch in sod., 2011; Mayer in sod., 2009, Tedeschi in sod., 2002), na nekaterih območjih pa je prisotna le ena vrsta (Tedeschi in sod., 2002). V severni Italiji in Nemčiji je glavna prenašalka 'Ca. P. mali' *C. picta* (Frisinghelli in sod., 2000; Jarausch in sod., 2011). V severozahodni Italiji je glavna prenašalka bolezni *C. melanoneura* (Tedeschi in sod., 2002), nemška populacija *C. melanoneura* pa se redko okuži s fitoplazmo ob prehranjevanju na okuženi jablani in ne more prenašati okužbe (Mayer in sod., 2009). V Nemčiji sicer enovrati glog predstavlja glavno gostiteljsko rastlino za *C.*

*melanoneura*, vendar le-ta navadno ni okužen s fitoplazmo. Italijanska populacija *C. melanoneura* pa se lahko pomika med enovratim glogom in jablano, pri čemer je enovrati glog okužen s fitoplazmo, kar najverjetneje vpliva na epidemiologijo območja AP (Tedeschi in sod., 2009).

Kot že omenjeno zgoraj, naj bi fitoplazmo '*Ca. P. mali*' prenašal tudi škržatek *Fiebertiella florii* (Stål). Verjetnost da bi škržatki v naravi okužili jablane je nizka, saj je njihova gostota prenizka. Ker je škržatek polifagna vrsta, lahko prenaša bolezen na druge rastline in tako vpliva na širjenje epidemiologije metličavosti jablan (Tedeschi in Alma, 2006).

V Sloveniji je potrjena prisotnost znanih (*C. picta* in *C. melanoneura*) in domnevnih (*F. florii*) prenašalcev AP. Zabeležena pa je tudi prisotnost dveh domnevnih prenašalcev AP *Philaenus spumarius* in *Artianus manderstjernii* (Mehle in sod., 2011). Širjenje fitoplazem v naravi se povečuje, saj se povečuje številčnost naravnih prenašalcev, zaradi ekološke in integrirane pridelave sadja (Lešnik in sod., 2009).

### 2.7.3 Kako preprečiti širjenje bolezni

Poskrbeti moramo, da ne pridelujemo in sadimo okuženih sadik. Zato je potrebno nadzirati pridelavo sadilnega in razmnoževalnega materiala v drevesnicah, matičnih nasadih in zarodiščih podlag (Lešnik in sod., 2009). Učinkoviti metodi sta sajenje odpornih rastlin in izruvanje obolelih dreves (Seemüller in sod., 2008). Okužbe večinoma povzročajo žuželčji prenašalci, katerih širjenje težko nadzorujemo. Škropljenje z insekticidi ni vedno popolnoma učinkovito, saj med cvetenjem ne smemo škropiti rastlin. Jarausch in sodelavci (2011) svetujejo preprečevanje širjenja bolezni na širšem regijskem območju. Pri čemer moramo spomladi zaustaviti preseljevanje žuželčjih prenašalcev, preprečiti moramo razvoj novih osebkov žuželčjih prenašalcev in onesposobiti mobilnost odraslih osebkov.

Obstajajo tudi alternativne metode preprečevanja širjenja bolezni kot so uporaba bioloških pastí, katerih delovanje temelji na sproščanju informacijskih kemikalij. Bolšico *C. picta* privablja vonj, ki ga oddajajo s '*Ca. P. mali*' okužene jablane. Okužene jablane za razliko od neokuženih sproščajo hlapni  $\beta$ -kariofilen. Z uporabo lepljivih plošč, odišavljenih z  $\beta$ -kariofilenom, ki privablja tako samce kot samice, lahko ulovimo in omejimo prisotnost bolšic *C. picta*. Metodo lahko uporabimo ne glede na to kakšen tip nasada imamo, kakšno obdelovalno prakso vršimo, območje ki na nas obdaja in ne glede na okoljevarstvene zahteve območja (Mayer in sod., 2008).

V laboratoriju so tudi uspešno izvedli poskus, kjer so z vibracijskimi signali vplivali na vedenje škržatkov tako, da so zmotili njihovo parjenje. Eksperiment so sicer izvedli na ameriškem škržatku (*Scaphoideus titanus*), ki je prenašalec fitoplazme povzročiteljice zlate trsne rumenice (Flavescence dorée). S to metodo bi lahko znižali številčnost prenašalcev in tako posredno vplivali in zmanjšali razširjenost fitoplazem (Mazzoni in sod., 2009). Da je metoda uspešna so potrdili tudi poskusi v naravi, kjer so z umetnimi vibracijskimi signali prekinili parjene škržatkov (Eriksson in sod., 2012).

### 2.7.4 Genom '*Ca. P. mali*' in dosedanje raziskave

'*Ca. P. mali*' ima linearen kromosom, za razliko od večine fitoplazem, ki imajo krožen kromosom. Linearen kromosom imata tudi ozko sorodni vrsti '*Ca. P. pyri*' in '*Ca. P.*



prunorum' (Kube in sod., 2008). Kromosom 'Ca. P. mali' je majhen, s številnimi končno obrnjenimi ponovitvami, kovalentno zaprtimi konci lasnic ter z nizko vsebnostjo gvanina in citozina. Za kromosom je značilno majhno število paralognih genov, majhno število insercij za potencialne mobilne elemente DNA ter močno zreducirano število transporterjev ABC aminokislin. Lastnosti kromosoma opredeljujejo močno okrnjen metabolizem fitoplazme (Kube in sod., 2008). Pri 'Ca. P. mali' so odkrili, da je ena najbolj pomembnih poti pridobivanja energije, glikoliza, nepopolna. Predvidevajo da fitoplazma izkorišča maltozo in malat kot vir ogljika in energije. Vendar celotne poti pridobivanja ATP-ja za 'Ca. P. mali' še niso identificirali (Kube in sod., 2008).

Z genetskimi analizami lahko prikažemo kako 'Ca. P. mali' vpliva na okužene rastline. Musetti in sodelavci (2012) so raziskali in primerjali, kako se izražajo številni obrambni geni zdravih, s 'Ca. P. mali' okuženih in ozdravljenih jablan. Ugotovili so, da se geni v listnih tkivih jablan izražajo različno glede na zdravstveno stanje rastline. V listih jablan okuženih s 'Ca. P. mali' in listih jablan z izoblikovanimi bolezenskimi znamenji je izrazito povišana sinteza s patogenostjo povezanih proteinov *MdPR1*, *MdPR2* in *MdPR5*, česar pri zdravih oz. ozdravljenih rastlinah ni. Po drugi strani pa so odkrili, da se poveča izražanje genov povezanih z jasmonatno metabolno potjo v listih ozdravljenih rastlin.

Z genetskimi analizami lahko prikazujemo tudi molekulsko pestrost fitoplazme 'Ca. P. mali'. Z analizo zaporedja gena *hflB* so prikazali polimorfizem znotraj taksona (Schneider in Seemüller, 2009). Za gen *hflB* sumijo, da vpliva na virulenco posameznega genotipa, sodeluje pri membranskem transportu in zavira delovanje proteinov kot je na primer *SecY*. V genomu fitoplazem je lahko do 24 kopij gena, za razliko od ostalih bakterij, ki imajo navadno eno kopijo gena *hflB*. Analizirali so 44 vzorcev rastlin iz Nemčije, Italije in Francije, pri katerih je bila prisotna metličavost jablan. Z SSCP analizo, katero so podprli s sekvenciranjem PCR produktov istih vzorcev, so ugotovili, da lahko na podlagi gena *hflB* ločujemo med dvajsetimi različnimi profili znotraj taksona. Homologija nukleinskih kislin med profili 'Ca. P. mali' je znašala 94,2-100 %.

Casati in sodelavci (2011) so prisotnost fitoplazme 'Ca. P. mali' v nasadih različnih območij SV Italije potrdili z metodo RFLP ob zaznavi PCR pomnožene 16S rDNA izolata. Za razlikovanje znotraj taksona so izvedli analizo MLSA na podlagi razreza produktov štirih različnih segmentov kromosoma izolatov (16S/23S rDNA, PR-1, PR-2, PR-3 neribosomsko območje, geni za ribosomske proteine *rplV*-*rpsC* in gen *secY*). Izmed 60 izolatov so definirali 12 specifičnih haplotipov. Ugotovili so, da sta območji z genetskimi zaporedji 16S/23S rDNA in *rplV*-*rpsC* bolj informativni kot PR-1, PR-2, PR-3 neribosomsko območje in gen *secY*. Ugotovili so tudi, da je genetska pestrost 'Ca. P. mali' v različnih geografskih območjih SV Italije različna in da se določeni genotipi pojavljajo le v določenih regijah.

Podobno so tudi na Češkem z RFLP analizo produktov PCR prikazali raznolikost 'Ca. P. mali'. Za potrditev pravilno izvedenega dela so izvedli še sekvenciranje produktov PCR. 16S rRNA je močno ohranjen gen in zato neprimeren gen za razlikovanje linij znotraj taksona 'Ca. P. mali'. Polimorfizem taksona so potrdili z analizo 16S-23S rDNA z vmesno regijo, pri čemer so definirali 2 različna genotipa. Z analizo ribosomskih genov za proteine so razlikovali med štirimi različnimi genotipi. Z genom za nitroreduktazo in kot-

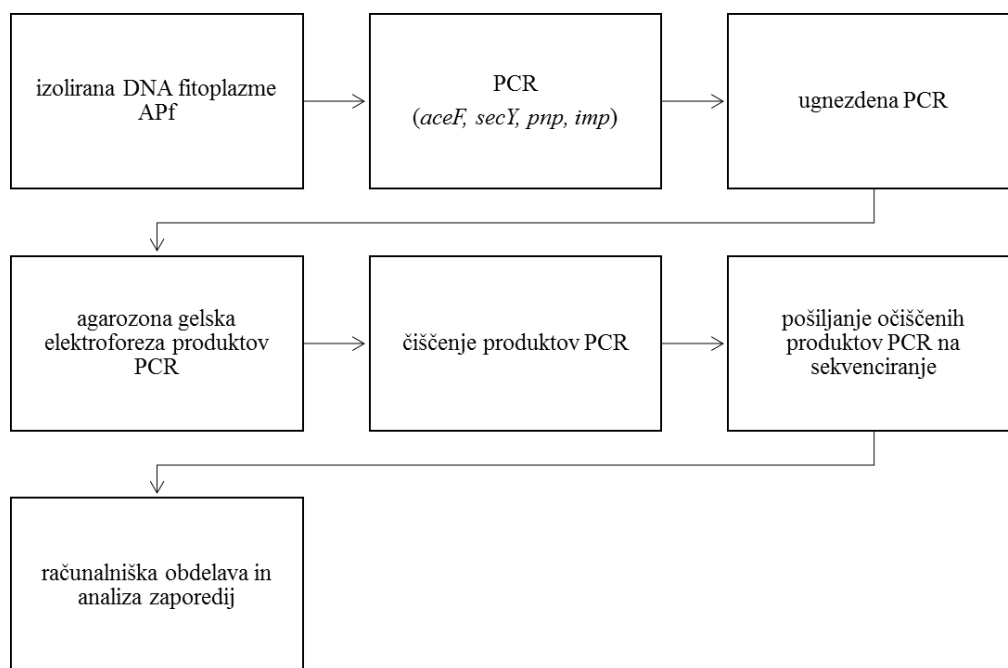
rodonaznim genom pa so pokazali pestrost dodatnih treh genotipov. Ugotovili so tudi, da lahko različne populacije fitoplazem okužijo posamezne jablane, zaradi česar lahko na posamezni jablani zaznamo več različnih genotipov '*Ca. P. mali*' (Fránová in sod., 2013).

Na podlagi analize genov *imp*, *aceF*, *secY* in *pnp*, z ugnezdno metodo PCR, kateri je sledilo sekvenciranje in analiza MLSA so prikazali genetsko pestrost izolatov celotne skupine 16SrX po Evropi (Danet in sod., 2011). Gena *aceF* in *pnp* sodelujeta pri metabolizmu ogljika in nukleotidov. Gena *imp* in *secY* pa imata zapis za imuno dominantna površinska proteina SecY in Imp, ki sodelujeta pri sekreciji proteinov. Filogenetska analiza gena *aceF* jim je omogočila razlikovanje med 24 genotipi, gena *pnp* med 15 genotipi, gena *secY* med 12 genotipi in gena *imp* med 30 genotipi celotne skupine (testirali so 197 izolatov). Identificirali so 73 različnih haplotipov skupine, pri čemer niso odkrili povezave med geografsko razširjenostjo fitoplazme, gostiteljsko rastlino in prenašalno žuželko. Pri analizi 39 izolatov '*Ca. P. mali*' so ugotovili, da z genom *aceF* razlikujejo med šestimi genotipi, genom *pnp* med petimi genotipi, genom *secY* med štirimi genotipi in genom *imp* med sedmimi različnimi genotipi. Filogenetska analiza genov je med drugim prikazala, da naj bi med '*Ca. P. pyri*' in '*Ca. P. prunorum*' v preteklosti prišlo do rekombinacije, iz česar lahko sklepamo da je '*Ca. P. pyri*' inter- specifična rekombinanta.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SHEMATIČEN PRIKAZ POSTOPKA

Postopek določanja molekulske raznovrstnosti slovenskih izolatov '*Ca. P. mali*' (v nadaljevanju APf) je prikazan na sliki 1 in podrobno opisan v nadaljevanju.



Slika 1: Shema določevanja nukleotidnega zaporedja fitoplazme APf za gene *aceF*, *secY*, *pnp*, *imp*

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 PCR in ugnezdna PCR

Molekulska raznovrstnost slovenskih izolatov fitoplazme APf smo določali na vzorcih DNA, ki so bili predhodno izolirani in določeni kot pozitivni na fitoplazmo APf v okviru pregleda stanja okuženosti sadnega drevja s fitoplazmami v Sloveniji. Seznam vseh vzorcev uporabljenih v nalogi je v preglednici 16.

V preglednici 1 in 2 je seznam laboratorijske opreme in pripomočkov, v preglednici 3 in 4 pa seznam kemikalij in oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili pri delu.

Preglednica 1: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri delu

Naziv	Oznaka modela
zamrzovalnik	Liebherr 02255
vrtinčnik	Vibromix 10
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
PCR System 9700 GeneAmp® PCR Cycler	Perkin Elmer

Preglednica 2: Ostali laboratorijski pripomočki, ki smo jih uporabili pri delu

Naziv
rokavice brez smukca
odstranjevalec DNA: DNA remover™, Minerva Biolabs GmbH, Cat. št. 152D1054
papirnate brisače
odpiralnik eppendorfovih epruvet
polistirenska posoda za led
stojalo za eppendorfove epruvete
mikrocentrifugirke za PCR
sterilne eppendorfove epruvete (200 µL, 0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL)
avtoklavirana bidestilirana H <sub>2</sub> O
pipete (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)
sterilni nastavki s filtrom za pipete (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)
odlagalnik odpadnega materiala

Preglednica 3: Kemikalije, ki smo jih uporabili pri delu

Naziv	Proizvajalec (kataloška številka)
10x High Fidelity Buffer	Invitrogen (11304011)
MgSO <sub>4</sub>	Invitrogen (11304011)
dNTP-ji	Applied Biosystems (632275)
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity, 5U/ μL, Invitrogen	Invitrogen (11304011)
oligonukleotidni začetniki (glej Preglednica 4) Eurofins [za: <i>aceF</i> , <i>secY</i> , <i>imp</i> ], IDT [za: <i>imp</i> ]	

Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki (povzeto po Danet in sod., 2011)

Tarčni gen	Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje (5' → 3')
<i>acef</i>	AceFf1	TAAAATTCGCTGATGTTGGCG
	AceFr1	CATCTTTCAATTCATTA AAACTAG
	AceFf2	AGGTATTGAAGAAGGAACTG
	AceFr2	CAACCGCTTTCATAATAAAAAG
<i>secY</i>	SecYMalF1	TTAGGACGTAGTATACAAATCCCNTT
	SecYMalR1	ACAATAATTAAAATCCTGTNCC
	SecYMalF2	AAGAATGGCGTGAACARGGNGA
	SecYMalR2	GCATCTTGTTTAGATAAATGTTC
<i>pnp</i>	Pnpf1	GAAGTTGGTATTACTGCTTTAC
	Pnpr1	GATAAATCTATTTGACCGCG
	Pnpf2	TACAATTAGATATTAAAGTTAAAGG
	Pnpr2	ATTAATTTTAATACATTTTCGC
<i>imp</i>	IMPF1	CAAATGATAAAGCTGATCAA
	IMPR1bis	CAAGACCTTTAAGGCCACATC
	IMPF3	GTTTTATGTTATAATAAACAGTG
	IMPR3mal	CAAAC TATAGTTAAAATTAAGC

### 3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Za agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili produkte ugnezdene reakcije PCR.

V spodnjih preglednicah je seznam naprav (preglednica 5) in ostalih pripomočkov (preglednica 6) ter kemikalij (preglednici 7 in 8), ki smo jih rabili za agarozno gelsko elektroforezo.

Preglednica 5: Naprave, ki smo jih uporabili v elektroforeznici

Naprava	Naziv
vir električne napetosti	Biorad Powepack 3000
mikrovalovna pečica	Sharp
računalnik povezan z aparaturo za fotografiranje gelov v UV spektru	Biosystematica, UVI Prosystem

Preglednica 6: Ostali pripomočki za delo v laboratoriju in elektroforeznici

Naziv
rokavice brez smukca
tehtnica (Sartorius, BP 310 S)
laboratorijski pribor
aluminijasta folija
nitrilne rokavice
erlenmajerica
nosilci za gel, Biorad (8x8cm, 15x10cm)
glavnički, Biorad (8, 15, 20 jamic)
banjica za elektroforezo
pipeta (10 $\mu$ L in 100 $\mu$ L)
nastavki za pipeto
parafilm
bidestilirana voda
škarje

Preglednica 7: Kemikalije in raztopine, ki smo jih uporabili v elektroforeznici

Kemikalija	Proizvajalec (kataložna številka)
agaroza	Sigma (A-9539)
1x TAE (Preglednica 8)	
modificiran TAE	Milipore (2395917)
EDTA	Sigma (E-5140)
nanašalni pufer 6x Loading Dye	MBI Fermentas
označevalec dolžine fragmentov- 100bp DNA ladder	GeneRuler MBI Fermentas (SM0321)

Preglednica 8: Pregled sestavin 50x pufra TAE (za 1000 mL)

Kemikalija	Količina
Tris – Base	242 g
Ledocetna kislina	57,1 mL
0.5 M EDTA (ph=8.0)	100 mL
bd H <sub>2</sub> O	dopolnimo do končnega volumna 1000 mL

### 3.2.3 Čiščenje produktov PCR

V preglednici 9 je seznam kompletov, ki smo jih preizkusili in uporabili za čiščenje produktov PCR, v preglednici 10 pa ostali laboratorijski pripomočki uporabljeni za čiščenje produktov PCR.

Preglednica 9: Kompleti za čiščenje produktov PCR

Komplet	Kataloška številka
DNA Gel Extraction Kit, Millipore Corporation, Bedford, MA	LSKGEL0 50
MiniElute® PCR purification kit, Qiagen	28004
Diffinity RapidTip®, Sigma-Aldrich Co. LLC.	D1947
Rapid PCR Cleanup Enzyme Set, New England Biolabs®	0011411

Preglednica 10: Ostali pripomočki in naprave za čiščenje produktov PCR

Naziv
nitrilne rokavice
UV transiluminator
očala za gledanje modre svetlobe
skalpel
namizna centrifuga, Eppendorf 5417R
rokavice brez smukca
stojalo za eppendorfove epruvete
odpiralnik eppendorfovih epruvt
pinceta
eppendorfove epruvete z varnostnim zapiralom in brez varnostnega zapirala (200 µL, 0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL)
pipeta (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)
nastavki s filtrom za pipeto (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)
natrijev acetat
PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler
škarje
parafilm
samolepilni trak
odlagalnik odpadnega materiala
nalepke za označevanje eppendorfovih epruvt

### 3.2.4 Računalniška obdelava nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja smo analizirali z računalniškim programom Vector NTI Suite 9 (uporabljena orodja: Contig Express in Align X).

## 3.3 METODE

### 3.3.1 PCR in ugnezdena PCR

Analizirali smo štiri genomska območja vsakega izolata s PCR in ugnezdeno PCR.

Izolirano DNA smo odtalili, zvrtnčili in centrifugirali. Pripravili smo desetkratne redčine DNA (45  $\mu$ L bidestilirane vode in 5  $\mu$ L izolirane DNA). Redčene vzorce smo zvrtnčili in centrifugirali.

PCR mešanico smo pripravili v komori za pripravo mešanic PCR. Za vsak izolat smo naredili štiri različne mešanice, saj smo za vsak izolat analizirali štiri različne gene (*aceF*, *secY*, *pnp*, *imp*). Mešanice so se razlikovale v oligonukleotidnih začetnikih, vsak gen ima specifičen smiselni in proti-smiselni oligonukleotidni začetnik (preglednica 4, prva dva začetnika za vsak gen), ostale kemikalije pa so bile iste za vse reakcije. Pred pripravo mešanice PCR smo vse kemikalije razen polimeraze odtajali, zvrtnčili in centrifugirali. Polimerazo smo odtajali in centrifugirali, tik pred dodajanjem v mešanico PCR. Imena kemikalij, njihove končne koncentracije in volumen, ki bi ga uporabili za pripravo ene reakcije, so zbrani v preglednici 11. Zaradi možnosti napake pri pipetiranju smo vedno pripravili deset procentov več reakcijske mešanice, kot smo jo dejansko potrebovali za določeno število reakcij. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo zvrtnčili ter centrifugirali, nato pa razdelili (po 48  $\mu$ L) v označene 200  $\mu$ L eppendorfove epruvete. Reakcijske mešanice smo do analize hranili na ledu.

Preglednica 11: Kemikalije, njihove koncentracije in končni volumen 1 reakcije

Kemikalija	končna koncentracija	volumen za 1 reakcijo [ $\mu$ L]
bidestilirana H <sub>2</sub> O		35.7
10 x High Fidelity pufer	1 x	5
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	2 mM	2
dNTP-ji (10mM)	200 $\mu$ M	1
smiselni začetnik	400 nM	2
protismiselni začetnik	400 nM	2
High Fidelity Taq polimeraza (5 U/ $\mu$ L)	0.03 U/ $\mu$ L	0.3

V komori za dodajanje DNA smo mešanici PCR dodali dva  $\mu$ L desetkrat redčenega vzorca DNA, ter jih zvrtnčili in centrifugirali.



Reakcije PCR smo izvajali v termociklerju PCR System 9700 GeneAmp® PCR Cycler po protokolu, kot je navedeno v preglednici 12.

Preglednica 12: Pogoji reakcije PCR

predhodna denaturacija	3 minute pri 94°C	1 cikel
denaturacija	30 sekund pri 94°C	
vezava začetnikov	30 sekund pri 50°C	30 ciklov
podaljševanje	1 minuta pri 68°C	
končno podaljševanje	7 minut pri 68°C	1 cikel
končna inkubacija	∞ 4°C	∞

Reakciji PCR je sledila priprava mešanice PCR za ugnezdene PCR. Mešanico smo pripravili na isti način kot mešanico za PCR, razlika je le v izbiri oligonukleotidnih začetnikov. Uporabljeni začetniki so zapisani v preglednici 4 kot tretji (smiselni) in četrti (protismiselni) začetnik vsakega gena.

V komori za dodajanje produktov PCR smo mešanici za ugnezdene PCR (48 µL) dodali 2 µL produkta PCR, zvrtnčili in centrifugirali.

Pogoji ugnezdene PCR so nekoliko razlikujejo od pogojev PCR in so opisani v preglednici 13.

Preglednica 13: Pogoji ugnezdene PCR reakcije

predhodna denaturacija	3 minute pri 94°C	1 cikel
denaturacija	30 sekund pri 94°C	
vezava začetnikov	30 sekund pri 50°C	35 ciklov
podaljševanje	1 minuta pri 68°C	
končno podaljševanje	7 minut pri 68°C	1 cikel
končna inkubacija	∞ 4°C	∞

V vsaki seriji reakcij PCR smo imeli pozitivno in negativno kontrolo reakcije. S pozitivno kontrolo reakcije PCR (vzorec DNA predhodno potrjen kot pozitiven z ugnezdene PCR) smo preverjali pravilnost izvedbe reakcije PCR (priprave mešanice in poteka reakcije). Z negativno kontrolo (namesto DNA vzorca dodali 2 µL avtoklavirane, bidestilirane vode) pa smo preverjali morebitno kontaminacijo mešanice in postopka med pripravo.

### 3.3.2 Agarozna gelska elektroforeza

Z 1 % agarozno gelsko elektroforezo smo analizirali uspešnost pomnožitve DNA v reakciji PCR. Količina kemikalij za agarozno elektroforezo je bila odvisna od velikosti nosilca za katerega smo pripravili gel (preglednica 14). Velikost nosilca pa smo izbrali glede na število produktov PCR, ki smo jih hoteli preveriti na gelu.

Preglednica 14: Mase in volumni sestavin za pripravo gela glede na nosilec

nosilec	agarozna [g]	1x TAE [mL]	Etidijev bromid [ $\mu$ L]
manjši za manjšo banjico	0.4	40	2
večji za srednjo banjico	1	100	4

Priprava gela je potekala v elektroforeznici. Glede na kasnejšo metodo čiščenja smo uporabili bodisi modificiran pufer TAE, bodisi navaden pufer TAE. Modificiran pufer TAE smo uporabili za produkte PCR katerih nadaljnje čiščenje je vključevalo, neposredni izrez produktov PCR iz gela. Navaden pufer TAE pa smo uporabili pri agarozni gelski elektroforezi vzorcev, kjer smo z elektroforezo le preverjali uspešnost reakcij PCR, čiščenje produktov PCR pa ni vključevalo izrezovanja produktov z gela. Agarozo in pufer TAE (1x TAE pripravljen iz založne raztopine 50x TAE) smo zmešali v erlenmajerici in ju raztopili v mikrovalovni pečici. Ohlajeni raztopini agaroze smo dodali etidijev bromid, jo razlili po nosilcu z glavničkom in počakali, da se strdi.

Ko se je agarozni gel strdil smo ga prenesli v banjico za elektroforezo, dolili pufer 1x TAE in z njim prekrili agarozni gel. Nato smo odstranili glavniček.

Pred začetkom nanašanja produktov PCR smo priklopili vir električne napetosti Biorad Powerpack 3000. Na parafilm smo nanесли kapljice nanašalnega pufru (6x loading dye in 50% glicerol). Eni kapljici smo dodali kapljico vode in 1  $\mu$ L dolžinskega označevalca (Gene Ruler<sup>®</sup> 100 bp DNA Ladder Plus), premešali ter prenesli v prvo luknjico na gelu. Ostalim kapljicam pa smo dodali po 2  $\mu$ L produkta PCR (20  $\mu$ L za vzorce, kjer smo uporabili modificiran 1 x TAE), s pipeto dobro premešali in prenesli v preostale luknjice na gelu. Ko smo nanесли vse pripravljene produkte PCR na gel, smo elektroforezno banjico prekrili s pokrovom, ki je povezan z virom električne napetosti. Aparat smo nastavili na napetost 100 V in ga pustili delovati 30 minut. Preostanek raztopin produktov PCR smo shranili v zamrzovalniku in jih kasneje očistili.

Po 30 minutah, ko je bila elektroforeza končana, smo v UV-transiluminatorju preverili prisotnost produktov PCR na gelu in s pomočjo programa UVI Photo MW posneli fotografijo gela.

Za vzorce, katerih 1 % agarozno gelsko elektroforezo smo pripravili z modificiranim 1 x TAE, je v elektroforeznici sledilo še izrezovanje produktov ugnezdene PCR iz gela. Iz gela smo z uporabo skalpela izrezali produkt ugnezdene PCR ter ga očistili s pomočjo kita DNA Gel Extraction kot je opisano v točki 3.3.3.

### 3.3.3 Čiščenje produktov PCR

Za prve vzorce smo za čiščenje, pred pošiljanjem v sekvenciranje, uporabili komplet »DNA Gel Extraction Kit«, ki pa se je izkazal kot neprimeren za naše vzorce, zato smo v nadaljevanju produkte PCR očistili s kompletom »MiniElute® PCR purification kit«. Čiščenje produktov PCR z »MiniElute® PCR purification kit-om« smo izvedli z nekoliko modificiranim postopkom kot ga priporoča proizvajalec in sicer smo očiščen produkt PCR eluirali dvakrat v 10 µL pufra EB, ki je prisoten v kitu.

Poleg čiščenja s kompletom »MiniElute® PCR purification kit«, smo na šestih vzorcih preizkusili še kompleta »Diffinity RapidTip®« in »Rapid PCR Cleanup Enzyme Set« v skladu z navodili proizvajalca.

### 3.3.4 Pošiljanje vzorcev na sekvenciranje in analiza dobljenih zaporedij

Očiščene produkte PCR smo poslali na sekvenciranje k ponudniku GATC Biotech (5 µL očiščenih produktov PCR + 5 µL 5 µM začetnega oligonukleotida). Ker so bili rezultati sekvenciranja nekvalitetni smo zamenjali ponudnika sekvenciranja.

Sekvenciranje produktov PCR je bilo uspešnejše pri ponudniku Macrogen Europe. Kadar je bilo sekvenciranje prvič neuspešno (nekvalitetna zaporedja), smo pri ponudniku prosili, da so postopek sekvenciranja ponovili pri čemer so uporabili drug protokol za pripravo na sekvenciranje. Če so bili rezultati sekvenciranja tudi drugič neuspešni, smo ponovili PCR in ugnezdeno PCR ter jih ponovno poslali na sekvenciranje. Na sekvenciranje smo ponovno poslali tudi vzorce, katerih zaporedja smo v celotni analizi dobili le enkrat in tako potrdili njihovo edinstvenost (Priloga E).

Dobljena nukleotidna zaporedja smo analizirali z Vector NTI. Za vsak vzorec smo dobili dve zaporedji, ki smo ju s pomočjo programa Contig Express zložili tako, da smo dobili nukleotidno zaporedje odseka, ki je bil prebran v smiselni in protismiselni smeri. Če je med smerema prišlo do neujemanja, smo neujemanje preverili s pomočjo kromatograma, in če je bilo mogoče, ustrezno popravili. Končno nukleotidno zaporedje posameznega vzorca je tako konsenz dveh zaporedij prebranih v različni smeri. Ko smo dobili nukleotidna zaporedja vseh vzorcev za en gen, smo jih poravnali s programom Align X. Enaka zaporedja, smo poimenovali kot en genotip. Zaporedje, ki se je od ostalih zaporedij razlikovalo v vsaj enem nukleotidu pa smo poimenovali kot nov genotip. Nato smo vse dobljene genotipe primerjali z že objavljenimi genotipi v NCBI s pomočjo orodja Blast. Na ta način smo ugotovili ali imamo genotipe, ki so jih že opisali drugi avtorji ali pa so naši genotipi še neobjavljeni. S pomočjo programa MEGA 6.06 smo izrisali filogenetska drevesa (zaporedja smo poravnali s pomočjo orodja Maft) za prikaz evolucijskih odnosov genotipov. Tako smo analizirali nukleotidna zaporedja vseh vzorcev za štiri različne gene.

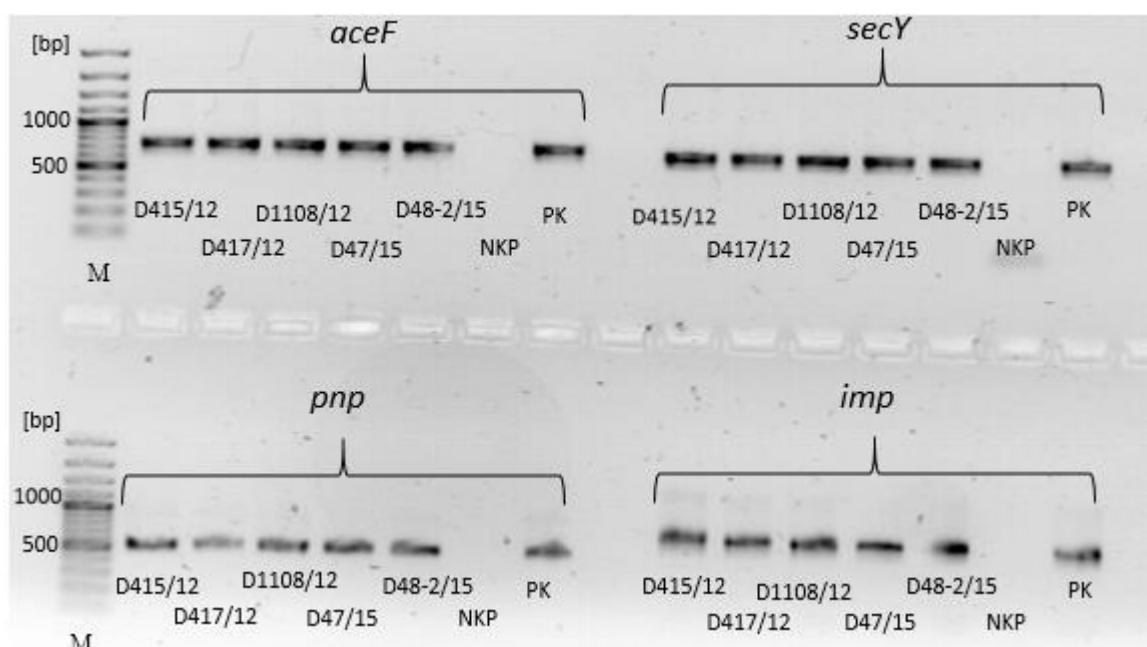
## 4 REZULTATI

Sledeči rezultati so predstavljeni v obliki slik, diagramov, grafikonov, preglednic in filogenetskih dreves, bolj podrobni rezultati in podatki pa so podani v poglavju Priloge. Najprej so podani primer rezultata agarozne gelske elektroforeze in rezultati različnih načinov čiščenja produktov PCR, nato pa sledijo rezultati o raznolikosti AP v Sloveniji.

### 4.1 PREVERJANJE USPEŠNOSTI REAKCIJ PCR Z AGAROZNO GELSKO ELEKTROFOREZO

Pred pošiljanjem vzorcev na sekvenciranje smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili uspešnost ugnezdene PCR. Viden produkt PCR na gelu je potrditev uspešne namnožitve produkta v reakciji PCR.

Velikost ugnezdenega produkta PCR za gen *aceF* je približno 800 bp, za *secY* 700 bp, za *pnp* 500 bp in za *imp* 700 bp (slika 2).



Slika 2: Primer 1 % agarozne gelske elektroforeze ugnezdenih produktov PCR. NKP - negativna kontrola ugnezdene PCR reakcije; PK - pozitivna kontrola; M – marker (Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas); D – oznake vzorcev.

### 4.2 PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ČIŠČENJA PRODUKTA PCR

Šest oz. štiri vzorce produktov PCR za gen *imp* smo očistili na tri načine in nato na podlagi dolžin zaporedij (konsenzus prebranih zaporedij v smiselni in protismiselni smeri) primerjali učinkovitost posameznega čiščenja. Ocenili smo tudi čas potreben za izvedbo postopka čiščenja (preglednica 15).

Po čiščenju z Rapid PCR Cleanup Enzyme Set sekvenciranje ni bilo uspešno v nobenem primeru. Sekvenciranje po čiščenju z metodama Diffinity Rapid Tip in MinElute Purification Kit pa je bilo uspešno v petih od šestih primerov. Pri prvi metodi sta bili dobljeni zaporedji dolgi od 510-627 bp, pri drugi od 523-567 bp. Za čiščenje štirih vzorcev

z Rapid PCR Cleanup Enzyme smo potrebovali 25 minut, z Diffinity Rapid Tip smo potrebovali 10 minut, s kompletom MinElute Purification Kit pa smo štiri vzorce očistili v 20 minutah. Navadno smo očistili po 12 vzorcev naenkrat, za kar smo z metodo MinElute Purification Kit porabili približno 35 minut, ocenimo pa, da bi za takšno število vzorcev z metodo Diffinity Rapid Tip potrebovali 40 minut, z metodo Rapid PCR Cleanup Enzyme Set pa 75 minut.

Preglednica 15: Primerjava treh različnih metod čiščenja PCR produkta s časovnim okvirom

<b>izolat (za gen <i>imp</i>)</b>	<b>MinElute PCR Purification Kit [bp]</b>	<b>Diffinity Rapid Tip [bp]</b>	<b>Rapid PCR Cleanup Enzyme Set [bp]</b>
D912/13	567	neuspešno sekvenciranje	neuspešno sekvenciranje
D913/13	548	535	neuspešno sekvenciranje
D914/13	560	594	neuspešno sekvenciranje
D940/13	523	627	neuspešno sekvenciranje
D140-2/13	567	552	<u>nismo testirali</u>
D140-3/13	neuspešno sekvenciranje	510	<u>nismo testirali</u>
<b>Čas čiščenja štirih vzorcev / predviden čas čiščenja za 12 vzorcev [min]</b>	20/35	10/40	25/75

### 4.3 RAZNOLIKOST ŠTIRIH RAZLIČNIH GENOV ZA AP

Z analizo genov *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp* smo proučili gensko pestrost izolatov APf v Sloveniji. Slovenske genotipe APf smo primerjali po krajevni in časovni razporeditvi in z genotipi iz genske banke NCBI ter tako proučili evlucijski odnos med njimi.

#### 4.3.1 Rezultati analize genov *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp*

Analizirali smo 37 različnih izolatov DNA, ki so bili vzorčeni v letih 2012-2015 v osmih različnih krajih v Sloveniji (Selo na Goričkem [14 vzorcev], Kasaze [13 vzorcev], Selo pri Prosenjakovcih [2 vzorca], Grahovo ob Bači [4 vzorci], in po en vzorec iz Zagorcev, Žvarulj, Drč, Fokovcev). 31 izolatov je bilo izoliranih iz vzorcev jablan (14 različnih sort, pri treh izolatih pa sorta ni poznana), šest pa iz vzorcev žuželk (*C. picta* in *C. melanoneura*). Z analizo genov *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp* smo določili genotipe za vse štiri gene pri 35 izolatih, pri dveh izolatih (D677/14 in D199/12) pa nismo mogli določiti genotipov za gen *imp* (preglednica 16). Za gen *aceF* smo za določitev genotipov primerjali zaporedje dolgo 593 bp, za gen *secY* 494 bp, za gen *pnp* 400 bp in za gen *imp* 510 bp. Na ta način smo za gen *aceF* določili 5 različnih genotipov, ki smo jih označili z A1-A5, za gen *secY* 6 različnih genotipov označenih S1-S6, za gen *pnp* 3 različne genotipe označene P1-P3 ter za gen *imp* 7 različnih genotipov, ki smo jih označili od I1-I7. Celotna dobljena zaporedja posameznih genotipov so zapisana v prilogah A, B, C in D.

Preglednica 16: Podatki o izolatih z genotipi za gene *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp* ter njihovi genotipi

izolat	kraj vzorčenja	leto vzorčenja	vzorec	sorta oz. vrsta žuželke	<i>aceF</i> genotip	<i>secY</i> genotip	<i>pnp</i> genotip	<i>imp</i> genotip
D142/14	Selo na Goričkem	2014	jablana	idared	A1	S2	P3	I3
D143/14	Selo na Goričkem	2014	jablana	idared	A1	S2	P3	I3
D178/13	Selo na Goričkem	2013	jablana	idared	A1	S1	P1	I4
D940-13	Selo na Goričkem	2013	jablana	zlata delišes	A4	S6	P1	I2
D140-2/13	Selo na Goričkem	2013	jablana	idared	A1	S1	P1	I5
D140-3/13	Selo na Goričkem	2013	jablana	idared	A1	S1	P1	I5
D145-2/13	Selo na Goričkem	2013	jablana	R.B.Se	A1	S1	P1	I5

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 16: Podatki o izolatih z genotipi za gene *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp* ter njihovi genotipi.

D157-5/13	Selo na Goričkem	2013	jablana	granny smith	A2	S4	P2	I5
D401/12	Selo na Goričkem	2012	jablana	jonagold-decosta	A3	S5	P1	I2
D406/12	Selo na Goričkem	2012	jablana	jonagold	A1	S1	P1	I5
D411/12	Selo na Goričkem	2012	jablana	jonagold	A1	S1	P1	I5
D415/12	Selo na Goričkem	2012	jablana	mutsu	A1	S1	P1	I4
D417/12	Selo na Goričkem	2012	jablana	granny smith	A1	S1	P1	I3
1108/12	Selo na Goričkem	2012	jablana	zlati delišes	A2	S1	P2	I5
D677/14	Kasaze	2014	jablana	elstar, jonagold	A1	S1	P1	/
D634/14	Kasaze	2014	jablana	braeburn	A1	S1	P1	I3
D678/14	Kasaze	2014	jablana	close	A2	S4	P2	I5
D679/14	Kasaze	2014	jablana	jonagold	A3	S1	P2	I2
D904/13	Kasaze	2013	jablana	melrose	A1	S1	P1	I4
D910/13	Kasaze	2013	jablana	boskop	A1	S1	P3	I3
D911/13	Kasaze	2013	jablana	boskop	A1	S1	P1	I4
D912/13	Kasaze	2013	jablana	braeburn	A1	S2	P3	I1

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 16: Podatki o izolatih z genotipi za gene *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp* ter njihovi genotipi

D913/13	Kasaze	2013	jablana	bobovec	A2	S1	P2	I5
D914/13	Kasaze	2013	jablana	bobovec	A2	S1	P2	I5
D199/12	Kasaze	2012	jablana	ni znan	A1	S4	P3	/
D200/12	Kasaze	2012	jablana	ni znan	A1	S4	P1	I5
D201/12	Kasaze	2012	jablana	ni znan	A5	S3	P3	I6
D45/15	Selo pri Prosenjak-ovcih	2015	žuželka	<i>Cacopsylla picta</i>	A1	S1	P1	I5
D47/15	Selo pri Prosenjak-ovcih	2015	žuželka	<i>Cacopsylla picta</i>	A2	S4	P2	I5
D48-2/15	Grahovo ob Bači	2015	žuželka	<i>Cacopsylla melanoneura</i>	A2	S4	P2	I7
D49-1/15	Grahovo ob Bači	2015	žuželka	<i>Cacopsylla picta</i>	A1	S1	P1	I3
D49-2/15	Grahovo ob Bači	2015	žuželka	<i>Cacopsylla picta</i>	A2	S1	P2	I5
D49-3/15	Grahovo ob Bači	2015	žuželka	<i>Cacopsylla picta</i>	A1	S1	P2	I5
D37/15	Fokovci	2015	jablana	ni znan	A1	S1	P1	I3
D680/14	Zagorci	2014	jablana	idared	A1	S1	P1	I5
D695/14	Žvarulje	2014	jablana	šampanjska reneta	A1	S1	P1	I3
D697/14	Drča	2014	jablana	spartan	A1	S3	P3	I1



### 4.3.2 Raznolikost gena *aceF* APf v Sloveniji

V Sloveniji je prisotnih pet različnih genotipov gena *aceF* APf (slika 3a). Genotip A1 je prisoten največkrat in sicer 25-krat, sledi A2, ki je prisoten osemkrat, A3 dvakrat, genotipa A4 in A5 pa po enkrat. Za vzorca, ki sta imela genotip A4 in A5, smo ponovili analizo in potrdili njuno edinstvenost (priloga E). Raznolikost znotraj genotipov je prikazana v preglednici 17. Najbolj podobni genotipi imajo 99,8 % enak genotip, najbolj raznoliki genotipi pa so si podobni v 99,3 %. Najbolj podobni so si genotipi A1 in A2, A1 in A4, A3 in A4, najbolj pa se med sabo razlikujeta genotipa A3 in A5.

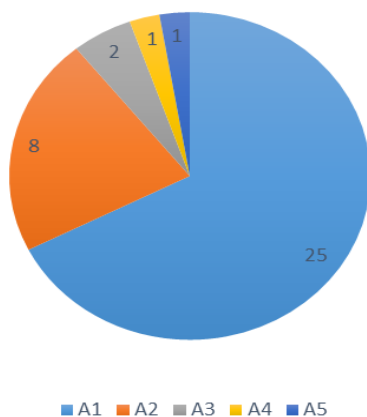
Preglednica 17: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi A1-A5 (primerjava je narejena za dolžino 593 bp, v oklepaju je podano število neujemanj)

	A1	A2	A3	A4	A5
A1	100 % (0)	99,8 % (1)	99,5 % (3)	99,8 % (1)	99,7 % (2)
A2	/	100 % (0)	99,5 % (3)	99,7 % (2)	99,5 % (3)
A3	/	/	100 % (0)	99,8 % (1)	99,3 % (4)
A4	/	/	/	100 % (0)	99,5 % (3)
A5	/	/	/	/	100 % (0)

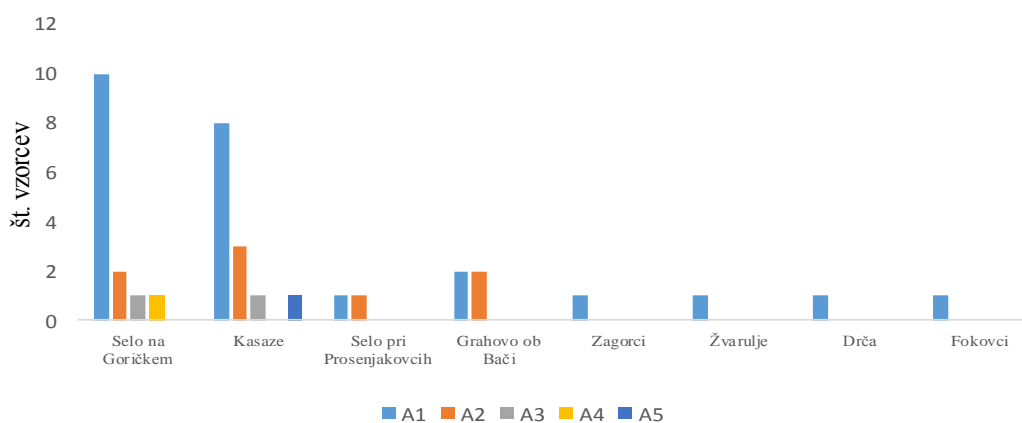
Raznolikost gena *aceF* za APf po posameznih krajih in po letih je prikazana na sliki 3b,c. V krajih Zagorci, Žvarulje, Drča in Fokovci je prisoten genotip A1. V kraju Grahovo ob Bači sta prisotna dva različna genotipa-A1 in A2 (vsak je prisoten dvakrat), prav tako sta v kraju Selo pri Prosenjakovcih prisotna dva različna genotipa-A1 in A2 (vsak je prisoten po enkrat). V kraju Selo na Goričkem so štirje različni genotipi (A1, A2, A3 in A4). Genotip A1 je prisoten desetkrat in je najpogostejši, A2 je prisoten dvakrat ter A3 in A4 sta prisotna po enkrat. Genotip A4 se pojavi le v Selu na Goričkem. V kraju Kasaze razlikujemo med štirimi različnimi genotipi (A1, A2, A3 in A5). Genotip A1 je najpogostejši in je prisoten osemkrat, A2 je prisoten trikrat, genotipa A3 in A5 pa sta prisotna po enkrat. Genotip A5 se pojavi le v Kasazah.

Iz leta 2012 smo analizirali 9 vzorcev, v katerih smo potrdili prisotnost štirih različnih genotipov gena *aceF* (A1, A2, A3 in A4), pri čemer je bil genotip A1 zastopan osemkrat, ostali genotipi pa so bili prisotni po enkrat. Iz leta 2013 smo potrdili prisotnost treh genotipov v 12 analiziranih vzorcih: A1 (osemkrat), A2 (trikrat) in A4 (enkrat). V letu 2014 so bili prav tako prisotni trije genotipi (analiziranih 9 vzorcev): A1 (sedemkrat), A2 in A3 pa po enkrat. V letu 2015 smo v 7 analiziranih vzorcih ugotovili prisotnost dveh genotipov: A1 (štirikrat) in A3 (trikrat). V štirih letih sta bila tako genotipa A4 in A5 prisotna le enkrat (v letih 2013 oz. 2012), ostali genotipi pa večkrat in v več letih-najpogosteje je bil prisoten genotip A1 (26-krat, prisoten je bil vsako leto). Največja pestrost genotipov je bila v letu 2012 (štirje različni genotipi od devetih analiziranih), najmanjša pa leta 2015 (dva različna genotipa od sedmih analiziranih).

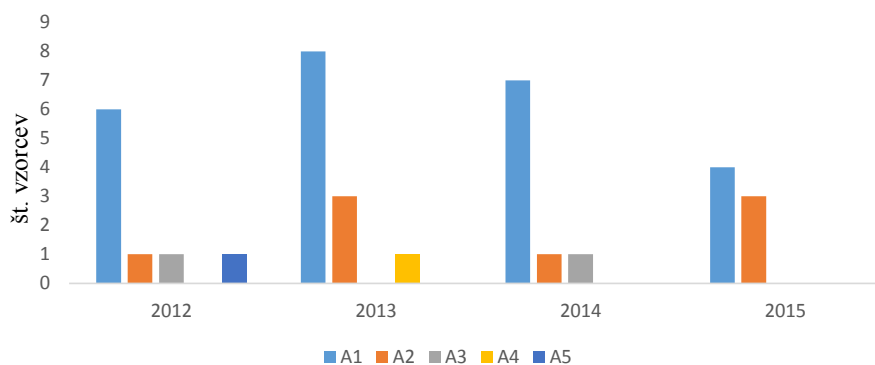
a)



b)



c)



Slika 3: Raznolikost genotipov gena *aceF* za APf v Sloveniji (a) ter pogostost in raznolikost genotipov gena *aceF* po posameznih krajih (b) in v letih 2012-2015 (c) v Sloveniji.

### 4.3.3 Raznolikost gena *secY* APf v Sloveniji

V Sloveniji je prisotnih šest različnih genotipov gena *secY* APf (slika 4a). Genotip S1 je prisoten največkrat in sicer 24-krat, sledi S4, ki je prisoten štirikrat, S2 trikrat, S3 dvakrat, genotipa S5 in S6 pa po enkrat. Za vzorca, ki sta imela genotip S5 in S6, smo ponovili analizo in potrdili njuno edinstvenost (priloga E). Raznolikost znotraj genotipov je prikazana v preglednici 18. Najbolj podobni genotipi so si podobni 99,4 % (S1 in S2, S2 in S3, S2 in S4, S5 in S6), najbolj raznoliki genotipi pa so si podobni 98,4 % (S3 in S4, S3 in S5).

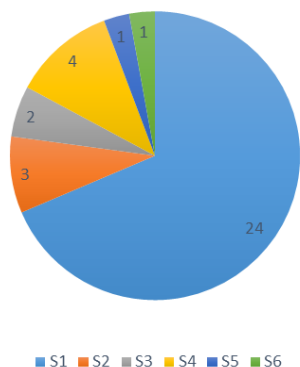
Preglednica 18: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi S1-S6 (primerjava je narejena za dolžino 494 bp, v oklepaju je podano število neujemanj)

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
S1	100 % (0)	99,4 % (3)	98,6 % (7)	99,0 % (5)	98,8 % (6)	99,2 % (4)
S2	/	100 % (0)	99,4 % (3)	99,4 % (3)	99,0 % (5)	98,6 % (7)
S3	/	/	100 % (0)	98,4 % (8)	98,4 % (8)	98,6 % (7)
S4	/	/	/	100 % (0)	99,2 % (4)	99,0 % (5)
S5	/	/	/	/	100 % (0)	99,4 % (3)
S6	/	/	/	/	/	100 % (0)

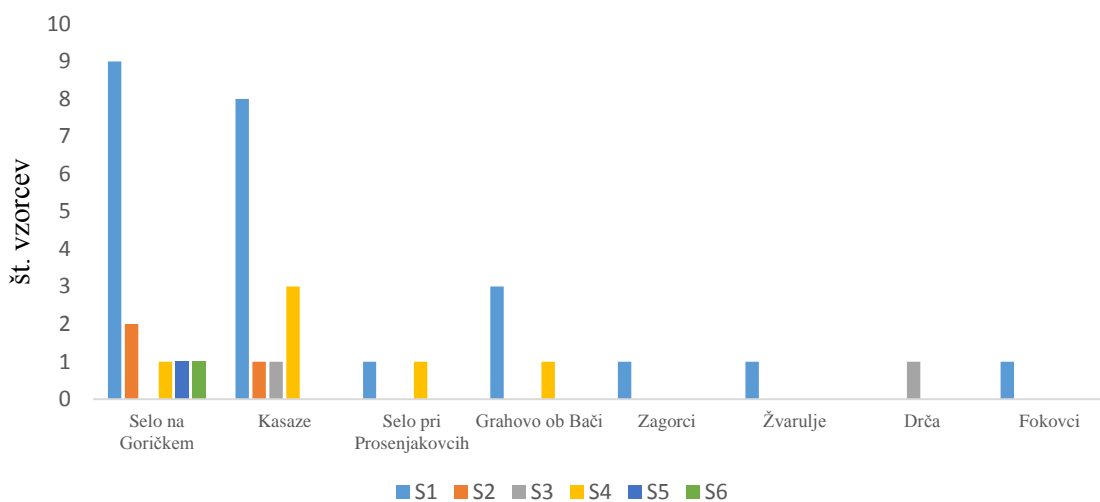
Raznolikost gena *secY* za APf po posameznih krajih in po letih je prikazana na sliki 4b,c. V Zagorcih, Žvaruljah, Fokovcih smo potrdili genotip S1, v Drčah genotip S3. V kraju Grahovo ob Bači sta prisotna dva različna genotipa-S1 in S4 (prvi je prisoten trikrat, drugi enkrat), prav tako sta v kraju Selo pri Prosenjakovcih prisotna dva različna genotipa-S1 in S4 (vsak je prisoten po enkrat). V kraju Selo na Goričkem je pet različnih genotipov (S1, S2, S4, S5 in S6). Genotip S1 je najpogostejši, prisoten je devetkrat, genotip S2 je prisoten dvakrat, genotipi S4, S5 in S6 pa so prisotni po enkrat. Genotipa S5 in S6 sta prisotna le v Selu na Goričkem. V kraju Kasaze razlikujemo med štirimi različnimi genotipi (S1, S2, S3 in S4). Najpogostejši genotip je S1, ki je prisoten osemkrat, genotip S4 je prisoten trikrat, genotipa S2 in S3 pa sta prisotna po enkrat.

V letu 2012 (analiziranih 9 vzorcev) so bili prisotni štirje različni genotipi gena *secY* (S1, S3, S4 in S5), pri čemer je bil genotip S1 zastopan najpogosteje-petkrat, ostali genotipi pa so bili prisotni po enkrat (S3 in S5) oz. dvakrat (S4). V letu 2013 (analiziranih 12 vzorcev) so bili prisotni štirje genotipi: S1 (devetkrat), S2, S4 in S6 pa po enkrat. V letu 2014 (analiziranih 9 vzorcev) so bili prav tako prisotni štirje genotipi: S1 (petkrat), S2 (dvakrat), S3 in S4 pa po enkrat. V letu 2015 smo v 7 analiziranih vzorcih potrdili prisotnost dveh genotipov: S1 (petkrat) in S4 (dvakrat). V štirih letih sta bila tako genotipa S5 in S6 prisotna le enkrat (v letih 2012 oz. 2013), ostali genotipi pa večkrat in v več letih-najpogosteje je bil prisoten genotip S1 (24-krat, prisoten je bil vsako leto). Največja pestrost genotipov je bila v letih 2012, 2013 in 2014 (po štirje različni genotipi), najmanjša pa leta 2015 (dva različna genotipa).

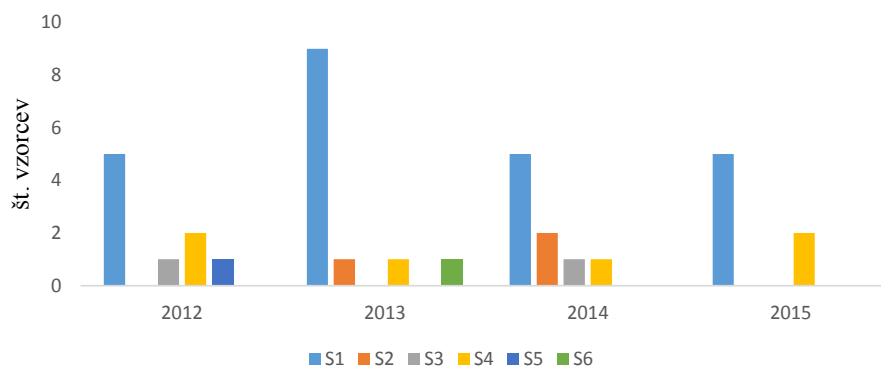
a)



b)



c)



Slika 4: Raznolikost genotipov gena *secY* za AP v Sloveniji (a) ter pogostost in raznolikost genotipov gena *secY* po posameznih krajih (b) in v letih 2012-2015 (c) v Sloveniji.

#### 4.3.4 Raznolikost gena *pnp* APf v Sloveniji

V Sloveniji so prisotni trije različni genotipi gena *pnp* APf (slika 5a). Genotip P1 je prisoten največkrat in sicer 20-krat, sledi P2, ki je prisoten desetkrat in na koncu še P3, ki je prisoten sedemkrat. Raznolikost znotraj genotipov je prikazana v preglednici 19. najbolj podobna sta si genotipa P1 in P3 (99,8 %), sledita P1 in P2 (99,5 %), najmanj pa sta si podobna genotipa P2 in P3 (99,3 %).

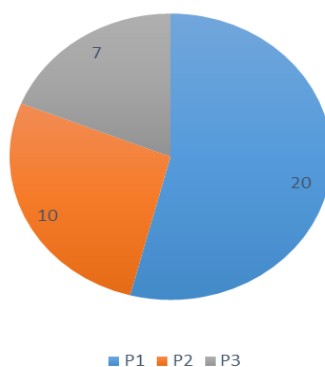
Preglednica 19: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi P1-P3 (primerjava je narejena za dolžino 400 bp, v oklepaju je podano število neujemanj)

	P1	P2	P3
P1	100 % (0)	99,5 % (2)	99,8 % (1)
P2	/	100 % (0)	99,3 % (3)
P3	/	/	100 % (0)

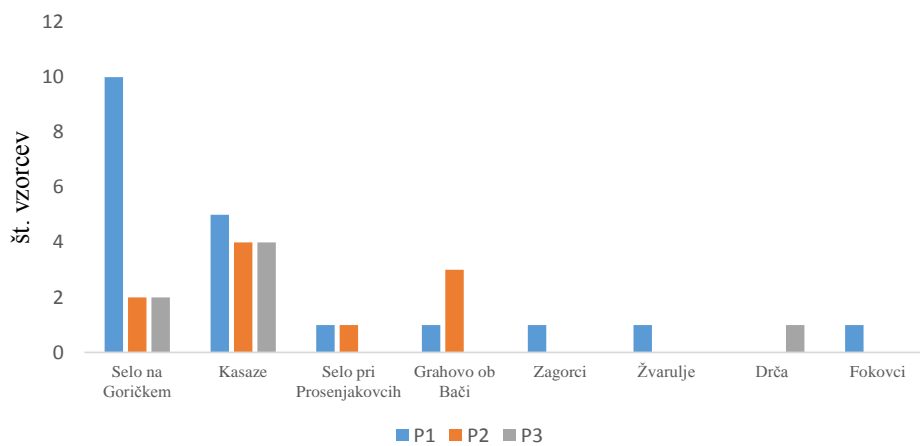
Raznolikost gena *pnp* za APf po posameznih krajih in po letih je prikazana na sliki 5b, c. V Zagorcih, Žvaruljah in Fokovcih je prisoten genotip P1, v Drčah pa P3. V kraju Grahovo ob Bači sta prisotna dva različna genotipa-P1 in P2 (prvi je prisoten enkrat, drugi trikrat), prav tako sta v kraju Selo pri Prosenjakovcih prisotna dva različna genotipa-P1 in P2 (vsak je prisoten po enkrat). V kraju Selo na Goričkem so trije različni genotipi (P1, P2 in P3) prisotni 14-krat. Najpogostejši je genotip P1, ki je prisoten desetkrat, genotipa P2 in P3 pa sta prisotna po dvakrat. V kraju Kasaze tudi razlikujemo med tremi različnimi genotipi (P1, P2 in P3), ki so prisotni 13-krat. Najpogostejši genotip je P1, ki je prisoten petkrat, genotipa P2 in P3 pa sta prisotna po štirikrat.

V letu 2012 (analiziranih 9 vzorcev) so bili prisotni trije različni genotipi gena *pnp* (P1, P2 in P3), pri čemer je bil genotip P1 zastopan najpogosteje-šestkrat, ostala genotipa pa sta bila prisotna po enkrat (P2) oz. dvakrat (P3). V letu 2013 (analiziranih 12 vzorcev) so bili prisotni trije genotipi: P1 (sedemkrat), P2 (trikrat) in P3 (dvakrat). V letu 2014 (analiziranih 9 vzorcev) so bili prav tako prisotni trije genotipi: P1 (štirikrat), P2 (dvakrat) in P3 (trikrat). V letu 2015 (analiziranih 7 vzorcev) sta bila prisotna dva genotipa: P1 (trikrat) in P2 (štirikrat). V štirih letih je bil genotip P1 prisoten največkrat (dvajsetkrat), pojavil se je vsako leto. Genotip P2 je bil prisoten desetkrat in se je prav tako pojavil vsako leto, genotip P3 pa je bil prisoten sedemkrat in se je pojavil v letih 2012-2014.

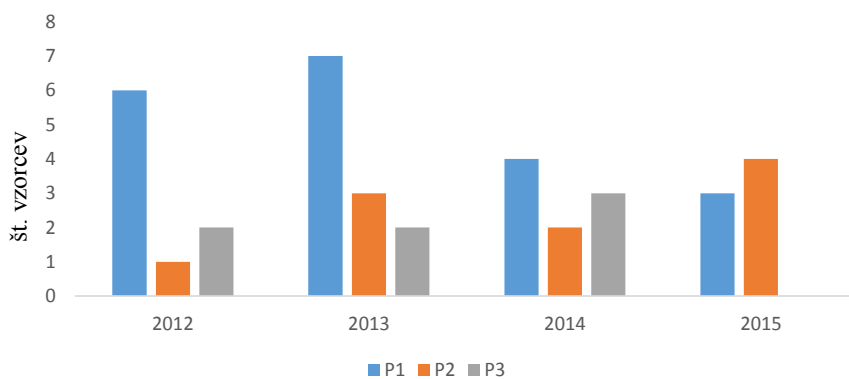
a)



b)



c)



Slika 5: Raznolikost genotipov gena *pnp* za APf v Sloveniji (a) ter pogostost in raznolikost genotipov gena *pnp* po posameznih krajih (b) in v letih 2012-2015 (c) v Sloveniji.

#### 4.3.5 Raznolikost gena *imp* APf v Sloveniji

V Sloveniji je prisotnih sedem različnih genotipov gena *imp* APf (slika 6a). Genotip I5 je prisoten največkrat in sicer 16-krat, sledi I3, ki je prisoten osemkrat, I4 štirikrat, I2 trikrat, I1 dvakrat, genotipa I6 in I7 pa po enkrat. Za vzorca, ki imata genotip I6 in I7, smo ponovili analizo in potrdili njuno edinstvenost (priloga E). Raznolikost znotraj genotipov je prikazana v preglednici 20. Najbolj podobni genotipi so si podobni v 99,8 % (I4 in I5, I5 in I6, I5 in I7), najmanj podobna pa sta si genotipa, ki se ujemata v 85,7 % (I2 in I4).

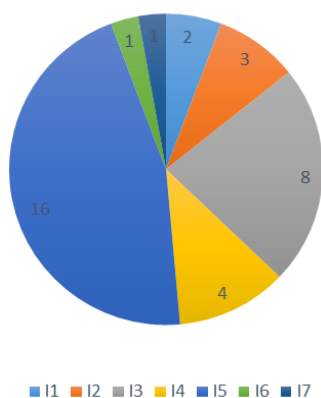
Preglednica 20: Primerjava stopnje podobnosti nukleotidnega zaporedja med genotipi I1-I7 (primerjava je narejena za dolžino 510 bp, v oklepaju je podano število neujemanj)

	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
I1	100 % (0)	91,2 % (45)	89,2 % (55)	89,2 % (55)	89,0 % (56)	89,0 % (56)	89,0 % (56)
I2	/	100 % (0)	85,9 % (72)	85,7 % (73)	85,9 % (72)	85,9 % (72)	85,9 % (72)
I3	/	/	100 % (0)	99,6 % (2)	99,6 % (2)	99,4 % (3)	99,4 % (3)
I4	/	/	/	100 % (0)	99,8 % (1)	99,6 % (2)	99,6 % (2)
I5	/	/	/	/	100 % (0)	99,8 % (1)	99,8 % (1)
I6	/	/	/	/	/	100 % (0)	99,6 % (2)
I7	/	/	/	/	/	/	100 % (0)

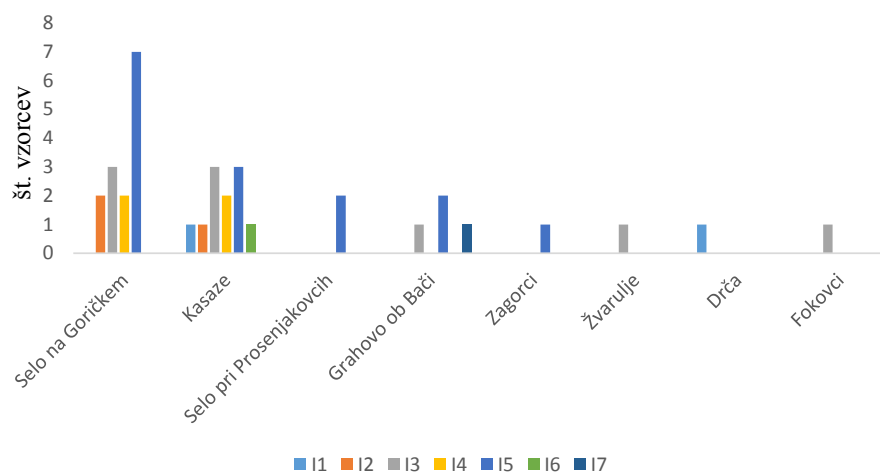
Raznolikost gena *imp* za APf po posameznih krajih in po letih je prikazana na Sliki 6b, c. V Zagorcih smo dokazali prisotnost genotipa I5, v Žvaruljah in Fokovcih I3, v Drči pa I1. V kraju Grahovo ob Bači so prisotni trije različni genotipi-I3, I5 in I7 (prvi in tretji sta prisotna enkrat, drugi dvakrat), pri čemer je I7 prisoten le v tem kraju. V kraju Selo pri Prosenjakovcih je prisoten en genotip I5 (dvakrat). V kraju Selo na Goričkem so štiri različni genotipov (I2, I3, I4 in I5) prisotni 14-krat. Najpogostejši je genotip I5, ki je prisoten sedemkrat, I3 je prisoten trikrat, I2 in I4 pa po dvakrat. V kraju Kasaze razlikujemo med šestimi različnimi genotipi (I1, I2, I3, I4, I5 in I6), ki so prisotni 11-krat. Najpogostejša genotipa sta I3 in I5, ki sta prisotna po trikrat. Genotip I4 je prisoten dvakrat, genotipi I1, I2 in I6 pa so prisotni po enkrat. Genotip I6 je prisoten le v Kasazah.

V letu 2012 (analiziranih 8 vzorcev) je bilo prisotnih pet različnih genotipov gena *imp* (I2, I3, I4, I5 in I6), pri čemer je bil genotip I5 zastopan najpogosteje-štirikrat, ostali genotipi pa so bili prisotni po enkrat (I2, I3, I4 in I6). V letu 2013 je bilo potrjenih pet genotipov v 12 analiziranih vzorcih: I5 (šestkrat), I4 (trikrat), I1, I2 in I3 pa po enkrat. V letu 2014 smo analizirali 8 vzorcev in potrdili prisotnost štirih genotipov: I3 (štirikrat), I5 (dvakrat), I1 in I2 pa po enkrat. V letu 2015 (analiziranih 7 vzorcev) so bili prisotni trije genotipi: I5 (štirikrat), I3 (dvakrat) in I7 (enkrat). V štirih letih sta bila tako genotipa I6 in I7 prisotna le enkrat (v letih 2012 oz. 2015), ostali genotipi pa večkrat in v več letih-najpogosteje je bil prisoten genotip I5 (16-krat, prisoten je bil vsako leto). Največja pestrost genotipov je bila v letih 2012 in 2013 (po pet različnih genotipov), sledi leto 2014 (štiri različni genotipi), najmanjša pestrost pa je bila leta 2015 (trije različni genotipi).

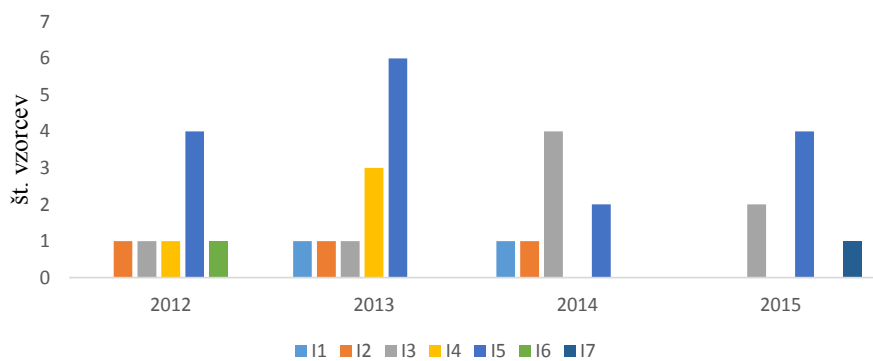
a)



b)



c)



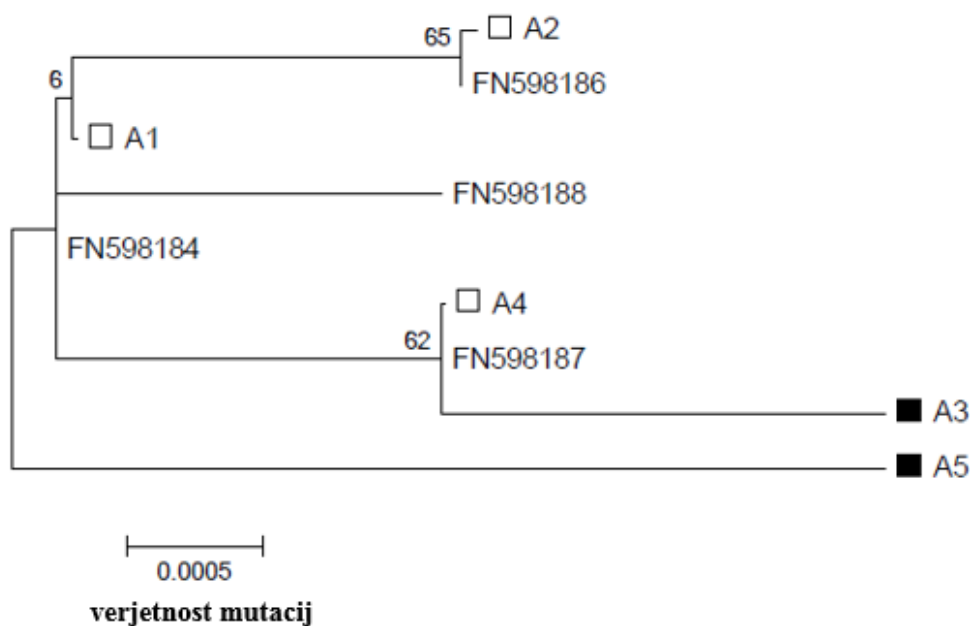
Slika 6: Raznolikost genotipov gena *imp* za APf v Sloveniji (a) ter pogostost in raznolikost genotipov gena *imp* po posameznih krajih (b) in v letih 2012-2015 (c) v Sloveniji.



#### 4.3.6 Primerjava slovenskih genotipov APf z genotipi genske banke NCBI

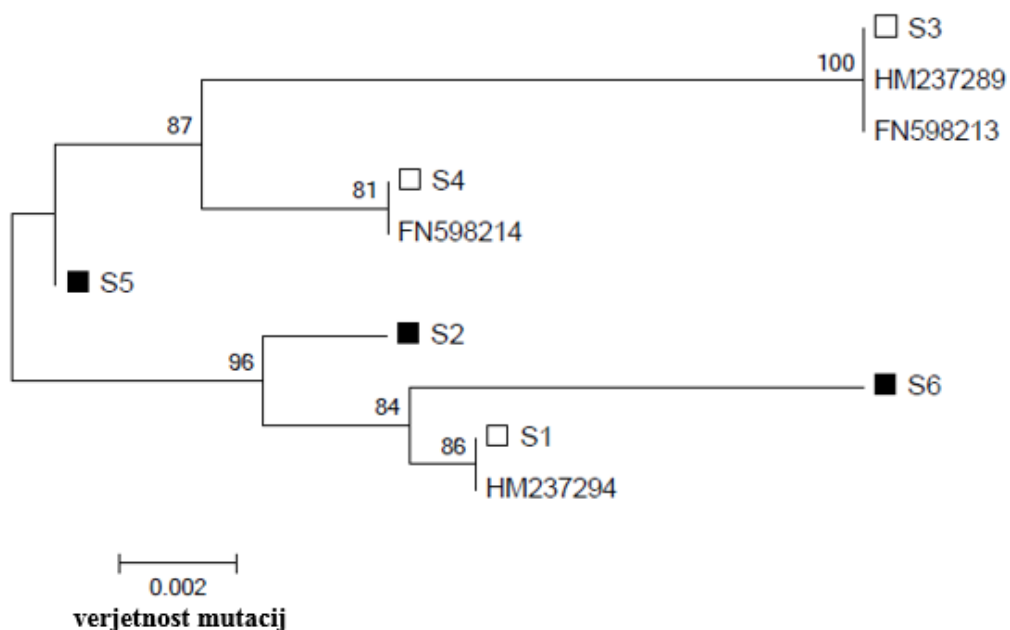
S filogenetskimi drevesi postavljamo hipoteze o evlucijskem razvoju oz. odnosih določene taksonomske skupine. Ob izrisu filogenetskega drevesa z metodo največjega verjetja (ang. Maximum Likelihood oz. ML) dobimo drevo, ki vključuje verjetnost sprememb oz. mutacij. Pri izrisu filogenetskih dreves smo v programu MEGA 6.06 pri izbrani metodi uporabili test samo-vzorčenja (200 ponovitev). Na ta način je program izmed 200 filogenetskih dreves izbral drevo, ki je najkrajše v smislu evlucijskih korakov. Evlucijski odnosi med slovenskimi genotipi APf in genotipi iz genske banke NCBI so prikazani na slikah 7-10.

Na sliki 7 so prikazani evlucijski odnosi med slovenskimi genotipi *aceF* APf in genotipi iz genske banke NCBI. Genotip A1 je identičen genotipu FN598184, genotip A2 je identičen genotipu FN598186, genotip A4 je identičen FN598187, genotipa A3 in A5 pa v drugih državah do sedaj še nista bila opisana. Poravnave zaporedij so priložene v prilogi A, kjer je tudi razvidno ali so si zaporedja identična oz. je razvidno na katerih mestih se zaporedja razlikujejo med seboj. Opis genotipov iz genske banke pa je podan v prilogi F.



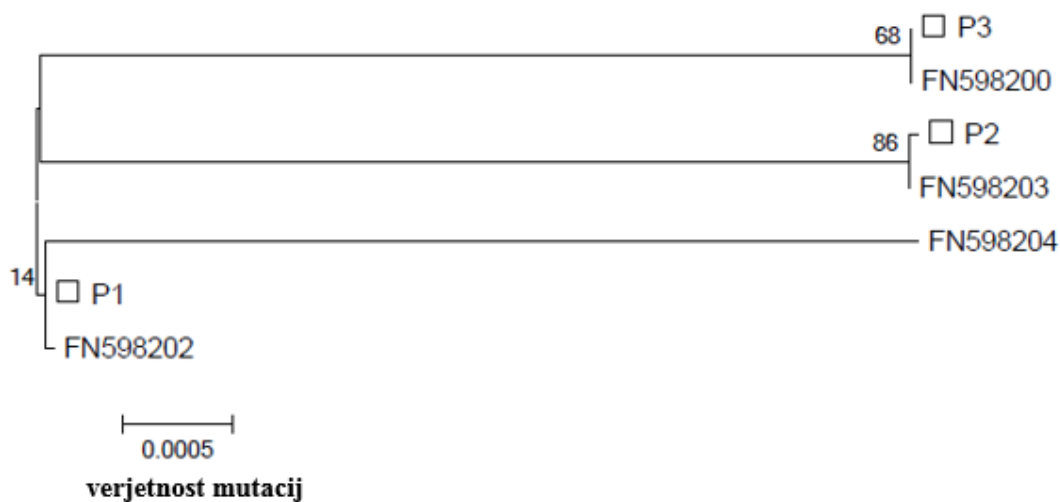
Slika 7: Evlucijski odnos slovenskih genotipov *aceF* APf in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati. S črnim kvadratom so označeni genotipi, ki so prisotni zgolj v Sloveniji.

Na sliki 8 so prikazani evolucijski odnosi med slovenskimi genotipi *secY* APf in genotipi iz genske banke NCBI. Genotip S1 je identičen genotipu HM237294, S3 je identičen HM237289 in FN598213, S4 je identičen FN598214, S2, S5 in S6 pa do sedaj še niso bili opisani v drugih državah. Poravnave zaporedij so priložene v prilogi B, kjer je tudi razvidno ali so si zaporedja identična oz. je razvidno na katerih mestih se zaporedja razlikujejo med seboj. Opis genotipov iz genske banke pa je podan v prilogi G.



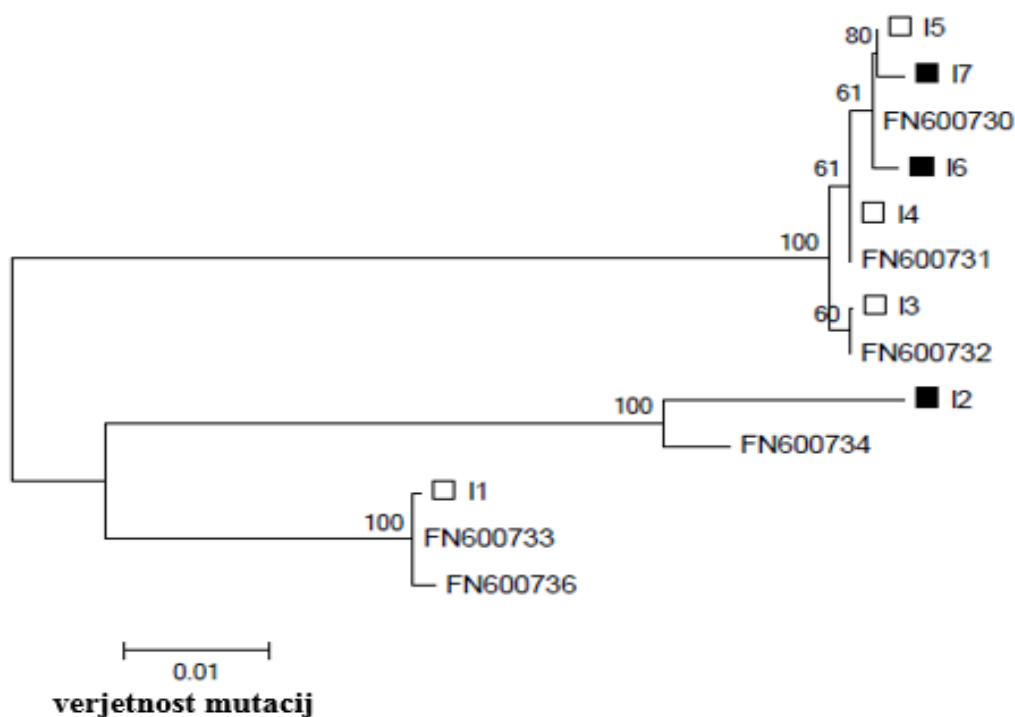
Slika 8: Evolucijski odnos slovenskih genotipov *secY* APf in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati. S črnim kvadratom so označeni genotipi, ki so prisotni zgolj v Sloveniji.

Na sliki 9 so prikazani evlucijski odnosi med slovenskimi genotipi *pnp* APf in genotipi genske banke NCBI. Genotip P1 je identičen FN598202 in se v eni mutaciji razlikuje od FN598204, genotip P2 je identičen FN598203 ter P3 je identičen FN598200. Poravnave zaporedij so priložene v prilogi C, kjer je tudi razvidno na katerih mestih se zaporedja razlikujejo med seboj. Opis genotipov genske banke pa je podan v prilogi H.



Slika 9: Evlucijski odnos slovenskih genotipov *pnp* APf in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati.

Na sliki 10 so prikazani evlucijski odnosi med slovenskimi genotipi *imp* APf in genotipi iz genske banke NCBI. Genotip I1 se v eni mutaciji razlikuje od FN600736 in je identičen FN600733, genotip I3 je identičen FN600732, I4 je identičen FN600731, genotip I5 je identičen FN600730, genotipi I2, I6 in I7 pa do sedaj še niso bili opisani v drugih državah. Poravnave zaporedij so priložene v prilogi D, kjer je tudi razvidno ali so si zaporedja identična oz. je razvidno na katerih mestih se zaporedja razlikujejo med seboj. Opis genotipov genske banke pa je podan v prilogi I.



Slika 10: Evlucijski odnos slovenskih genotipov *imp* APf in genotipov iz genske banke NCBI. Nad vejami so označeni odstotki, kolikokrat so se med 200 ponovitvami testa samo-vzorčenja genotipi združili v dane skupine ob uporabi metode največjega verjetja. Slovenski genotipi so označeni s kvadrati. S črnim kvadratom so označeni genotipi, ki so prisotni zgolj v Sloveniji.

#### 4.4 HAPLOTIPI APF PRISOTNI V SLOVENIJI

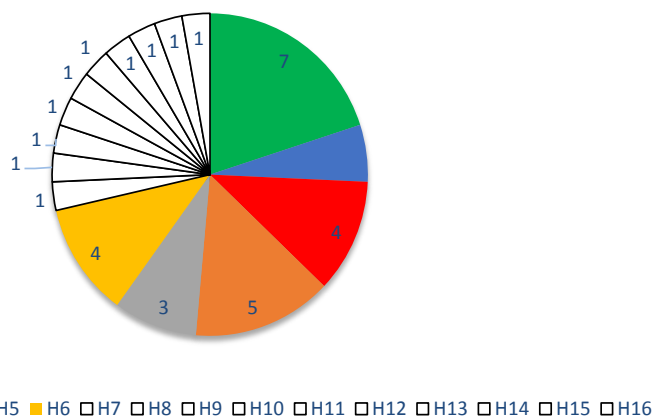
Za dodatno analizo genetske pestrosti APf v Sloveniji smo proučili haplotipe posameznih krajev. Na podlagi haplotipov smo želeli prikazati območje razširjanja ter izvor APf, s filogenetskim drevesom pa evolucijski odnos med posameznimi haplotipi.

##### 4.4.1 Raznolikost haplotipov v Sloveniji

V Sloveniji je prisotnih 16 različnih haplotipov, ki smo jih določili na podlagi različnih kombinacij genotipov (preglednica 21). Genotipi, ki določajo največ haplotipov so: A1 (devet), S1 (sedem), P1 (šest), P2, P3 in I5 (pet). Ostali genotipi pa določajo od enega do tri haplotipe. Haplotip H1 je prisoten največkrat-sedemkrat, H4 je prisoten petkrat, H3 in H6 po štirikrat, H5 trikrat, H2 dvakrat, ostali haplotipi pa po enkrat (slika 11). Podatki o vrstah haplotipov ter njihovi pogostosti po posameznih krajih v Sloveniji so zbrani v preglednici 21. V kraju Selo na Goričkem je prisotnih osem različnih haplotipov. H1 se pojavi petkrat, H2 in H3 se pojavita dvakrat, H4, H5, H6, H7 in H8 pa se pojavijo po enkrat. V Kasazah je prisotnih devet različnih haplotipov: H3 in H6 sta prisotna dvakrat, H4, H5, H9, H10, H11, H12, in H16 pa po enkrat. V Selu pri Prosenjakovcih sta po enkrat prisotna haplotipa H1 in H5, v kraju Grahovo ob Bači pa so prav tako po enkrat prisotni haplotipi H4, H6, H14 in H15. V Zagorcih je prisoten H1, v Žvaruljah H4, v Drčah H13 in v Fokovcih H4.

Preglednica 21: Določitev haplotipov in njihova raznolikost ter pogostost po posameznih krajih v Sloveniji

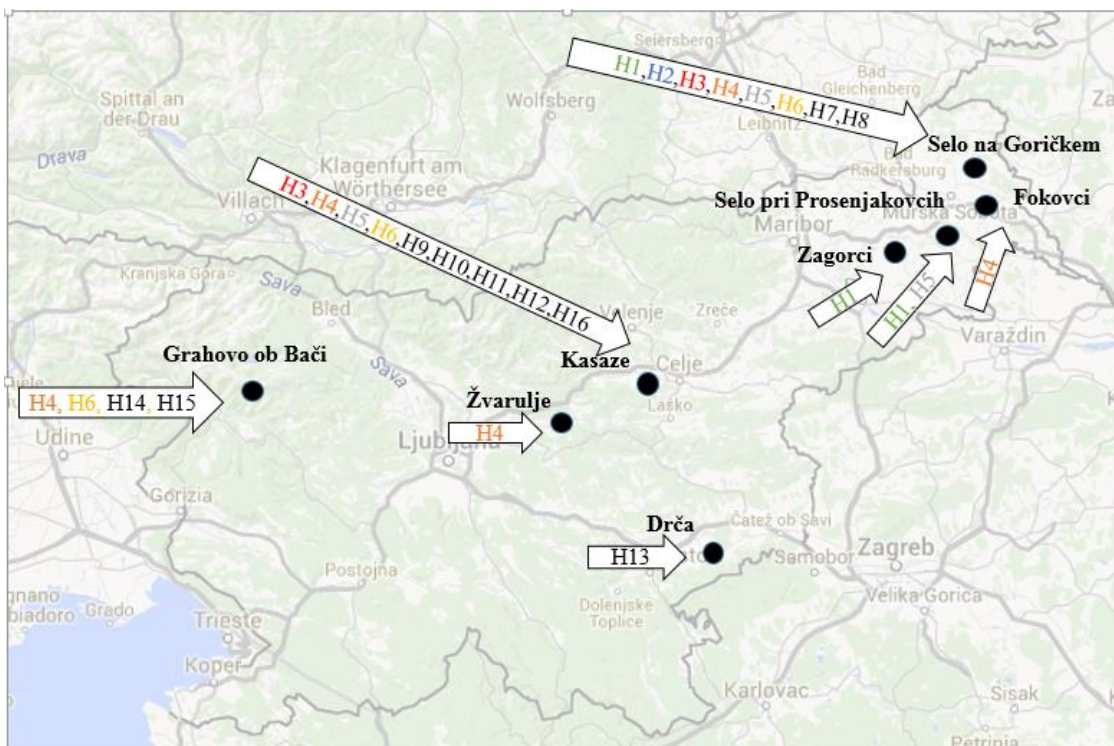
Haplotip	izolat	<i>aceF</i> [genotip]	<i>secY</i> [genotip]	<i>pnp</i> [genotip]	<i>imp</i> [genotip]	kraj vzorčenja
H1	D140-2/13	A1	S1	P1	I5	Selo na Goričkem
H1	D140-3/13	A1	S1	P1	I5	
H1	D145-2/13	A1	S1	P1	I5	
H1	D406/12	A1	S1	P1	I5	
H1	D411/12	A1	S1	P1	I5	
H2	D142/14	A1	S2	P3	I3	
H2	D143/14	A1	S2	P3	I3	
H3	D178/13	A1	S1	P1	I4	
H3	D415/12	A1	S1	P1	I4	
H4	D417/12	A1	S1	P1	I3	
H5	D157-5/13	A2	S4	P2	I5	
H6	D1108/12	A2	S1	P2	I5	
H7	D401/12	A3	S5	P1	I2	
H8	D940-13	A4	S6	P1	I2	
H4	D634/14	A1	S1	P1	I3	Kasaze
H9	D910/13	A1	S1	P3	I3	
H3	D904/13	A1	S1	P1	I4	
H3	D911/13	A1	S1	P1	I4	
H10	D912/13	A1	S2	P3	I1	
H11	D200/12	A1	S4	P1	I5	
H6	D913/13	A2	S1	P2	I5	
H6	D914/13	A2	S1	P2	I5	
H5	D678/14	A2	S4	P2	I5	
H12	D201/12	A5	S3	P3	I6	
H16	D679/14	A3	S1	P2	I2	
H1	D45/15	A1	S1	P1	I5	Selo pri Prosenjakovcih
H5	D47/15	A2	S4	P2	I5	
H4	D49-1/15	A1	S1	P1	I3	Grahovo ob Bači
H14	D49-3/15	A1	S1	P2	I5	
H15	D48-2/15	A2	S4	P2	I7	
H6	D49-2/15	A2	S1	P2	I5	
H4	D37/15	A1	S1	P1	I3	Fokovci
H1	D680/14	A1	S1	P1	I5	Zagorci
H4	D695/14	A1	S1	P1	I3	Žvarulje
H13	D697/14	A1	S3	P3	I1	Drča



Slika 11: Raznolikost haplotipov APf v Sloveniji

#### 4.4.2 Kartografski prikaz raznolikosti haplotipov v Sloveniji

Na sliki 12, ki predstavlja zemljevid Slovenije, vidimo, da je največja pestrost haplotipov v krajih Selo na Goričkem in Kasaze. Izolati H3, H4, H5 in H6 se pojavijo v obeh krajih. Haplotip H4 se poleg omenjenih krajev pojavi še v krajih Grahovo ob Bači, Žvarulje, in Fokovci. Haplotip H6 pa je poleg Sela na Goričkem in Kasaz prisoten tudi v kraju Grahovo ob Bači. H1 se pojavi le v vzhodnem delu Slovenije in sicer v Selu na Goričkem, Zagorcih in Selu pri Prosenjakovcih. H5 pa poleg Sela na Goričkem in Kasaz zasledimo še v Selu pri Prosenjakovcih. Ostali haplotipi so omejeni le na en kraj vzorčenja.

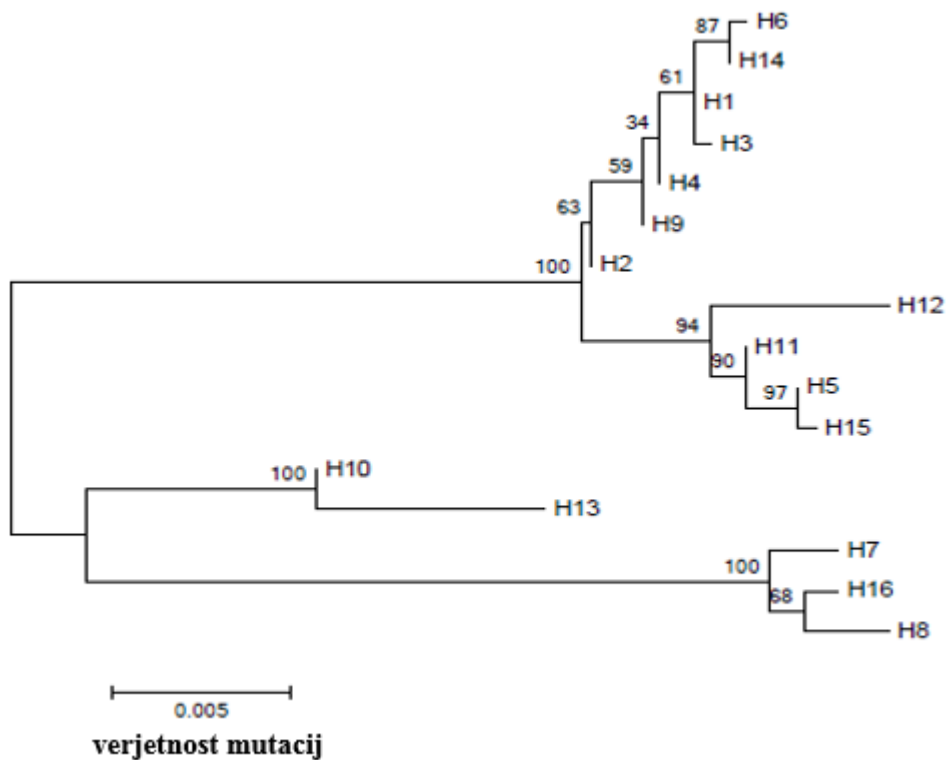


Slika 12: Razporejenost haplotipov po posameznih krajih v Sloveniji



#### 4.4.3 Filogenetski odnos haplotipov APf v Sloveniji

Na sliki 13 smo z metodo največjega verjetja, prikazali evlucijski odnos med haplotipi v Sloveniji. V prvo skupino najožjih evlucijskih odnosov sodijo haplotipi H6, H14, H1, H3, H4, H9 in H2. V drugo skupino haplotipi H12, H11, H5 in H15. V trejo skupino haplotipa H10 in H13, haplotipi H7, H16 in H8 pa v četrto skupino podobnosti.



Slika 13: Filogenetski odnosi haplotipov APf v Sloveniji. Oznake nad vejami prikazujejo odstotek v koliko primerih je med testom samo-vzorčenja (200 ponovitev) prišlo do takšnega združevanja haplotipov.

## 5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo proučevali molekulsko pestrost fitoplazme '*Candidatus phytoplasma mali*' v Sloveniji. To je druga analiza (Pavšič in sod., 2014) za skupino v Sloveniji in ena redkih na svetovni ravni (Danet in sod., 2011). Osredotočili smo se na gene *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp*. Genotipe smo primerjali z že objavljenimi genotipi APf. Za lažje nadaljnje proučevanje fitoplazem smo tekom eksperimentalnega dela proučili tudi, katera metoda čiščenja je najbolj primerna za čiščenje produktov PCR fitoplazem.

### 5.1 PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ČIŠČENJA PRODUKTA PCR

S primerjavo različnih metod čiščenja produktov PCR smo ugotovili, da metoda Rapid PCR Cleanup Enzyme Set ni primerna za čiščenje produktov PCR pred sekvenciranjem, metodi Diffinity Rapid Tip in MinElute PCR Purification Kit pa sta po učinkovitosti primerljivi, saj smo po sekvenciranju istih vzorcev za gen *imp* za obe metodi dobili zaporedja primerljivih dolžin za pet vzorcev od šestih. Za čiščenje štirih vzorcev z Diffinity Rapid Tip smo potrebovali manj časa (deset minut) kot za čiščenje z MinElute PCR Purification Kit (20 minut). Ocenili pa smo, da bi za čiščenje večjega števila vzorcev (na primer 12 vzorcev) manj časa potrebovali pri čiščenju z MinElute Purification Kit (35 minut, z Diffinity Rapid Tip pa 40 minut). Zaključimo lahko, da je najprimernejša metoda čiščenja PCR produktov s kompletom Diffinity Rapid Tip, njej zelo primerljiva pa je metoda čiščenja s kompletom MinElute Purification Kit, ki pa je z vidika izvedbe bolj primerna v primeru ko moramo očistiti večje število produktov PCR.

### 5.2 RAZNOLIKOST APF V SLOVENIJI

Z analizo 37 izolatov pozitivnih na APf smo določili genotipe za gene *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp*. Izolati so bili vzorčeni v letih 2012-2015 v osmih različnih krajih v Sloveniji. In sicer iz krajev v zahodni (Grahovo ob Bači), jugovzhodni (Drča), vzhodni (Žvarulje in Kasaze) ter iz krajev v severovzhodni Sloveniji (Selo na Goričkem, Selo pri Prosenjakovcih, Fokovci, Zagorci). Največ izolatov smo analizirali iz kraja Selo na Goričkem (14), sledijo Kasaze (13), Grahovo ob Bači (štiri), Selo pri Prosenjakovcih (dva). Iz krajev Fokovci, Zagorci, Žvarulje in drča smo analizirali po en izolat. V krajih, kjer smo analizirali največje število izolatov in je prisotnih največ različnih sort jablan je po pričakovanju pestrost genotipov in haplotipov '*Ca. P. mali*' najvišja. DNA fitoplazme APf je bila izolirana iz vzorcev jablan (*Malus x domestica*) in žuželk (*Cacopsylla picta* in *Cacopsylla melanoneura*). Povezave med kraji in genotipi s sortami jablan ne zaznamo. Isti genotipi v posameznih krajih so prisotni pri različnih sortah, prav tako so isti genotipi, ki so prisotni v različnih krajih prisotni na različnih sortah. Za dva izolata (D677/14 in D199/12) izolirana iz vzorcev jablan, kljub trikratni ponovitvi nismo mogli določiti genotipa za gen *imp*. Glede na rezultate predhodne analize vzorcev s PCR v realnem času (priloga J) ter vidnega produkta ugnezdene PCR (rezultatov ugnezdene PCR nismo priložili), sklepamo da razlog ni v količini fitoplazemske DNA v vzorcu, temveč najverjetneje v prisotnosti različnih izolatov fitoplazme AP v vzorcu. Da bi omenjeno trditev preverili, bi morali sekvencirati večje število klonov produktov PCR pridobljenih iz omenjenih vzorcev.

Po poravnavi zaporedij sekvenciranja smo dobili zaporedja za gene *aceF* v velikosti 593bp, za *secY* 494bp, za *pnp* 400bp in za *imp* 510bp. Dobljena zaporedja so krajša kot so jih dobili Danet in sod. (2011) (*aceF*-797 bp, *secY*-664 bp, *pnp*-549 bp in *imp*-670 bp), kar je najverjetneje posledica slabše kvalitete produktov PCR, na kar so opozorili že Schneider

in Seemüller (2009) ali pa slabše kvalitete sekvenciranja. Vendar so naša zaporedja še vedno dovolj dolga za relevantno primerjanje med seboj in z zaporedji iz genske banke NCBI.

### 5.2.1 Raznolikost gena *aceF* za APf v Sloveniji

V Sloveniji razlikujemo med petimi različnimi genotipi APf za gen *aceF*. Genotip A1 je najbolj pogost, sledita A2 in A4, A3 in A5 pa sta prisotna le po enkrat. Genotipi se med seboj razlikujejo v 1-4 nukleotidih, do razlik pa prihaja na šestih različnih mestih znotraj zaporedij (priloga A). Danet in sod. (2011) so z analizo 34 izolatov fitoplazme APf iz Francije, Italije, Romunije, Avstrije in Nemčije razlikovali med šestimi različnimi genotipi *aceF*, ki so se razlikovala v 1-3 nukleotidih. Najbolj pogost v omenjeni študiji je bil genotip A13 (FN598184), ki je identičen genotipu A1 iz Slovenije. Slovenskemu genotipu A2 je iz njihove študije identičen genotip A15 (FN598186), genotipu A4 je identičen genotip, ki so ga poimenovali A16 (FN598187). Genotipa, ki smo jih označili kot A3 in A5 pa v drugih državah še nista bila opisana. Genotip A3 se v enem nukleotidu razlikuje od genotipa FN598187 (oznaka genotipa po Danet in sod. (2011): A16), A5 pa v dveh nukleotidih od FN598184 (oznaka genotipa po Danet in sod. (2011): A13) (priloga A in F).

Z analizo raznolikosti gena *aceF* po posameznih krajih, smo ugotovili, da je največja raznolikost gena v krajih Selo na Goričkem in Kasaze, vendar velja dodati, da smo v omenjenih krajih analizirali največ izolatov (14 oz. 13). V obeh krajih so prisotni po štiri različni genotipi. Genotipi A1, A2 in A3 so prisotni v obeh krajih, A4 pa le v Selu na Goričkem in A5 le v Kasazah. Genotipa A4 in A5 sta se pojavila samo enkrat in samo v omenjenih krajih, genotip A1 pa se je v obeh krajih pojavil največkrat. Genotip A1 pa se je kot edini genotip pojavil v prav vseh proučevanih krajih. Po dva različna genotipa smo zasledili tudi v krajih Selo na Goričkem (A1 in A2) in Grahovo ob Bači (A1 in A2). V krajih Zagorci, Žvarulje, Drča in Fokovci pa je bil prisoten genotip A1.

Raznolikost gena *aceF* je v letih 2012-2015 upadla. V letu 2012, smo razlikovali med največjim številom različnih genotipov-med štirimi (A1, A2, A3 in A5). V letih 2013 in 2014 smo razlikovali med tremi genotipi, obakrat sta bila prisotna genotipa A1 in A2, genotip A4 je bil prisoten leta 2013, A3 pa leta 2014. Leta 2015 pa razlikujemo le med dvema genotipoma. Genotipa, ki sta bila prisotna le enkrat (A5 in A4) sta se pojavila v letih 2012 oz. 2013. Pestrost genotipov je najmanjša leta 2015, kar je gotovo povezano s tem, da smo v tem letu analizirali najmanjše število izolatov (7). Kljub največjemu številu analiziranih vzorcev v letu 2013 (12) pa takrat pestrost ni bila najvišja. Genotipa A1 in A2 sta se pojavila prav v vseh štirih letih in sta tako najbolj dominantna genotipa v Sloveniji.

### 5.2.2 Raznolikost gena *secY* za APf v Sloveniji

Z analizo 37 izolatov smo ugotovili, da imamo v Sloveniji šest različnih genotipov gena *secY*: S1, S2, S3, S4, S5 in S6. Največkrat je prisoten genotip S1, sledijo mu S4, S2 in S3, genotipa S5 in S6 pa sta prisotna po enkrat. Genotipi se razlikujejo med sabo v 3-7 nukleotidih, na do 16 različnih mestih znotraj zaporedij (priloga B). Danet in sod. (2011) pa so pri 16 izolatih iz Nemčije, Italije, Avstrije, Francije in Romunije razlikovali med štirimi različnimi genotipi *secY*. Pri njih je bil najbolj pogost genotip S12 (FN598216), ki ga v Sloveniji nismo zasledili. Slovenskemu genotipu S3 je iz njihove študije identičen genotip S9 (FN598213), slovenskemu genotipu S4 pa je iz njihove študije identičen

genotip S10 (FN598214). Prisotnost slovenskih genotipov S1 in S3 so prav tako potrdili v Italiji (Casati in sod., 2011), kjer je bil genotip S1 poimenovan AP15 (HM237294), S3 pa kot AT (HM237289). Slovenski genotipi S2, S5 in S6 v literaturi še niso opisani, kar prikazuje tudi filogenetska analiza. S2 se v treh nukleotidih razlikuje od HM237294 (oznaka genotipa po Casati in sod. (2011): AP15), S5 v treh nukleotidih od FN598214 (oznaka genotipa po Danet in sod. (2011): S10) in S6 v štirih nukleotidih od HM237294 (oznaka genotipa po Casati in sod. (2011): AP15) (Priloga B in G).

Raznolikost gena *secY* je prav tako kot za gen *aceF* najvišja v krajih Selo na Goričkem in Kasaze, kar sovпада s številom analiziranih vzorcev. V Selu na Goričkem razlikujemo med petimi in v Kasazah med štirimi genotipi. Genotip S1 se pojavi povsod razen v Drčah, sledi mu S4 ki se pojavi v vseh štirih krajih, kjer smo analizirali več kot en izolat. Genotipi, ki so unikatni za Slovenijo se pojavijo v Selu na Goričkem (S2, S5 in S6) ter Kasazah (S2).

V letih 2012-2014 je bila pestrost gena *secY* v Sloveniji podobna, v letu 2015 pa glede na malo število analiziranih vzorcev pričakovano manjša. Genotipa S1 in S2 ostajata v Sloveniji prisotna vsa leta. Genotipa, ki sta se pojavila le enkrat, sta bila prisotna v letih 2012 (S5) in 2013 (S6). Prav tako kot pri genu *aceF* tudi pri genu *secY* opazimo, da se genotipi, ki so prisotni le enkrat pojavijo v letih 2012 in 2013 (A5 in S5 leta 2012 ter A4 in S6 leta 2013).

### 5.2.3 Raznolikost gena *pnp* za APf v Sloveniji

Z analizo 37 izolatov smo potrdili prisotnost treh različnih genotipov za gen *pnp* za APf v Sloveniji. Najpogostejši je genotip P1, sledi mu P2, genotip P3 pa je prisoten najmanjkrat. Na štirih različnih mestih zaporedij se genotipi med sabo razlikujejo v 1-3 nukleotidih (priloga C). Danet in sod. (2011) pa so izmed 17 izolatov iz Nemčije, Francije, Italije, Švice, Romunije in Avstrije razlikovali med petimi različnimi genotipi. Genotip P11 (FN598202) je identičen slovenskemu P1, genotip P12 (FN598203) je identičen slovenskemu P2 in genotip P9 (FN598200) je identičen slovenskemu P3 (priloga C in H). Z genom *pnp* je razlikovanje med fitoplazmami AP nizko in za gen *pnp* ne moremo opisati edinstvenih genotipov za Slovenijo.

V krajih Selo na Goričkem in Kasaze, kjer smo analizirali največje število izolatov, so prisotni vsi trije genotipi-P1, P2 in P3. Najpogostejši genotip je P1, ki se pojavi v sedmih krajih, sledi mu genotip P2, ki se pojavi v štirih krajih. Podobno Danet in sod. (2011) poročajo, da je v Švici, Franciji, Italiji in Romuniji najpogostejši genotip P11, ki je enak slovenskemu P1.

Raznolikost genotipov *pnp* v letih 2012-2015 je konstantna, saj smo v letih 2012-2014 določili vse tri različne genotipe *pnp* (P1, P2 in P3), v letu 2015 pa je bil odsoten genotip P3, vendar smo za to leto analizirali najmanjše število izolatov. V vseh letih je največkrat zastopan genotip P1, razen v letu 2015, ko je največkrat zastopan genotip P2.

#### 5.2.4 Raznolikost gena *imp* za APf v Sloveniji

35 izolatov APf smo določili sedem različnih genotipov gena *imp* in jih poimenovali I1, I2, I3, I4, I5, I6 in I7. Najbolj pogost je genotip I5 (prisoten 16-krat), sledijo I3 (prisoten osemkrat), I4 (prisoten štirikrat), I2 (prisoten trikrat), I1 (prisoten dvakrat) ter I6 in I7 (oba po enkrat). Raznolikost zaporedij je visoka, zaporedja niso ohranjena tako visoko kot zaporedja prejšnjih treh genov in se tako med sabo ločijo na 85 različnih mestih (priloga D), razlikujejo pa se v 1-73 nukleotidih. Danet in sod. (2011) z analizo v Franciji, Avstriji, Italiji, Nemčiji in Romuniji prav tako razlikujejo med sedmimi različnimi genotipi APf za gen *imp* in sicer med 24 izolati. Štirje izmed sedmih genotipov so identični med slovenskimi in prej naštetimi državami, trije pa so unikatni bodisi za Italijo oz. Nemčijo ter trije za Slovenijo. Genotip I24 (FN600733) je identičen slovenskemu I1, I23 (FN600732) je identičen slovenskemu I3, I22 (FN600731) je identičen slovenskemu I4 in genotip I21 (FN600730) je identičen slovenskemu I5. Genotipi I2, I6 in I7 so unikatni za Slovenijo (priloga D in I). Tako kot za Slovenijo je za države Francija, Avstrija, Nemčija in Italija najbolj pogost genotip I5 (I5 ustreza I21 po Danet in sod., 2011). Med vsemi štirimi analiziranimi geni za analizo APf gen *imp* omogoča največje razlikovanje genotipov APf, kar soupada z ugotovitvami Danet in sod. (2011).

V krajih Selo na Goričkem in Kasaze je prisotnih štiri oz. šest različnih genotipov APf za gen *imp*. Najbolj pogosta genotipa sta I3 in I5, ki se pojavita v petih različnih krajih, genotipa I6 in I7 pa se pojavita le enkrat in sicer v Kasazah oz. Grahovem ob Bači. Genotipi, ki so unikatni za Slovenijo pa se pojavijo v krajih Selo na Goričkem (I2), Kasaze (I2 in I6) ter Grahovo ob Bači (I7).

Raznolikost gena *imp* v letih 2012-2015 upada. V letih 2012 in 2013 je bilo prisotnih po pet različnih genotipov, leta 2014 štirje in leta 2015 trije različni genotipi. Leta 2015 je pestrost najverjetneje najmanjša zaradi najmanjšega števila analiziranih izolatov, sicer pa je bilo največje število izolatov analiziranih leta 2013 (12). Genotip I5 je prav tako kot genotip I3 prisoten v vseh štirih letih, vendar je genotip I5 bolj pogost. Genotipa I6 in I7, ki sta se pojavila le enkrat sta se pojavila v letih 2012 oz. 2015.

### 5.3 RAZNOLIKOST SLOVENSКИH HAPLOTIPOV APF

V Sloveniji je prisotnih 16 različnih haplotipov APf, ki smo jih določili z analizo MLSA za gene *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp*. Najpogostejši je haplotip H1 (prisoten sedemkrat), sledijo H4 (petkrat), H3 in H6 (štirikrat), H5 (trikrat), H2 (dvakrat), ostali haplotipi pa so prisotni po enkrat.

Casati in sod. (2010) so z metodo PCR in RFLP ter analizo MLSA genov (16S/23S rDNA, PR-1, PR-2, PR-3 neribosomsko območje, geni za ribosomske proteine *rplV*- *rpsC*) in enega istega gena (*secY*) kot mi ugotovili, da v Italiji pri 60 analiziranih izolatih razlikujejo med 12 različnimi haplotipi. Iz tega lahko zaključimo, da je molekulska raznolikost fitoplazme APf v Sloveniji velika, kar je lahko posledica specifičnih ekoloških razmer, selekcije, različnih geografskih regij, raznolikih gostiteljskih rastlin in prenašalnih žuželk (Casati in sod., 2011).

#### 5.3.1 Raznolikost haplotipov APf po posameznih krajih v Sloveniji

V kraju Selo na Goričkem, kjer je bilo analiziranih 14 vzorcev, razlikujemo med osmimi različnimi haplotipi, v Kasazah smo odkrili devet različnih haplotipov (11 analiziranih vzorcev), v Selu pri Prosenjakovcih dva (dva analizirana vzorca), V Grahovem ob Bači pa štiri (štirje analizirani vzorci).

Haplotip H4 se pojavi v petih različnih krajih v različnih predelih Slovenije, H1 pa le v Prekmurju v treh različnih krajih. H5 je prisoten na Štajerskem in v Prekmurju (Kasaze, Selo na Goričkem in Selo pri Prosenjakovcih), H6 pa na Štajerskem, v Prekmurju in na Primorskem. Haplotip H3 je prisoten v dveh različnih krajih na Štajerskem in v Prekmurju, preostali haplotipi pa se pojavijo le po enkrat in le v enem kraju. Zaključimo lahko, da je haplotip H4 najbolj razširjen haplotip v Sloveniji, njegovega izvora ne moremo opredeliti, saj se v vsakem kraju pojavi po enkrat. Najbolj pogost haplotip-H1 je omejen le na Prekmurje. Očitne povezave med izvorom ostalih haplotipov APf in krajev ne zaznamo.

Haplotipi, ki so prisotni v različnih predelih Slovenije so lahko posledica širjenja z okuženim sadilnim materialom, ali pa zaradi širjenja z žuželčjimi prenašalci. Haplotipi, ki so prisotni po enkrat pa so najverjetneje posledica mutacij. Lahko pa tudi kombinacije različnih dejavnikov vplivajo na raznolikost haplotipov (Pavšič in sod., 2014).

#### 5.3.2 Filogenetski odnosi haplotipov APf v Sloveniji

Filogenetski odnosi haplotipov prikazujejo, da se slovenski haplotipi združujejo v štiri skupine. V največji skupini je prisotnih sedem haplotipov, sledi mu skupina s štirimi in tremi haplotipi, najmanjša pa je skupina z dvema haplotipoma. Skupini s po sedmimi oz. štirimi haplotipi sta si najbolj sorodni, število mutacij med njima je nižje kot med skupinama s po tremi oz. dvema haplotipoma. Znotraj skupin pa je raznolikost najvišja v skupini s po tremi in v skupini z dvema haplotipoma. Vidimo, da se med najbolj sorodnimi haplotipi vsi razen haplotipa H14 v Sloveniji pojavijo več kot enkrat, vsi haplotipi v preostalih skupinah razen haplotipa H5 pa se v Sloveniji pojavijo le enkrat. Haplotipi, ki se v Sloveniji pojavljajo večkrat in v različnih krajih so bolj ozko sorodni med sabo, kot haplotipi, ki si prisotni le enkrat. V posameznih krajih pa se pojavljajo tako manj sorodni kot ozko sorodni haplotipi.

## 6 SKLEPI

Iz rezultatov magistrske naloge lahko sklepamo:

- Metodi Diffinity Rapid Tip in MinElute PCR Purification Kit sta učinkoviti metodi za čiščenje PCR produktov.
- Pestrost genotipov oziroma haplotipov APf v Sloveniji je visoka. Za gen *aceF* razlikujemo med petimi, za gen *secY* med šestimi, za gen *pnp* med tremi in za gen *imp* med sedmimi genotipi. Le-ti oblikujejo 16 različnih haplotipov.
- V Sloveniji je prisotnih osem genotipov AP, ki do sedaj še niso bili opisani.
- Povezave med kraji in genotipi s sortami jablan ne zaznamo.
- Med leti 2012-2015 ostaja raznolikost AP v Sloveniji bolj ali manj konstantna, najbolj številčni genotipi pa se pojavijo vsako leto.
- Gena *imp* in *secY* sta v Sloveniji bolj informativna in bolj primerna za razlikovanje fitoplazem AP kot gena *aceF* in *pnp*.
- Genotipi A1, P1 in I5 so najpogostejši genotipi v Sloveniji in tudi v drugih evropskih državah. Najpogostejši genotip za gen *secY* je v Sloveniji S1 (slednji je bil opisan tudi v Italiji), najpogostejši haplotip pa H1.
- Filogenetski odnosi prikazujejo razvrščanje slovenskih haplotipov v štiri skupine.
- Ozko sorodni haplotipi se pojavijo večkrat in v različnih krajih.

## 7 POVZETEK

V magistrski nalogi smo proučili molekulsko raznolikost fitoplazme povzročiteljice metličavosti jablan '*Candidatus Phytoplasma mali*'. Raznolikost smo proučili na podlagi sekveniranja produktov ugnezdene PCR. Z analizo dobljenih zaporedij smo definirali prisotnost genotipov, z metodo MLSA smo raziskali še prisotnost haplotipov APf v Sloveniji.

Molekulsko raznolikost APf smo določili na podlagi analiz genov *aceF*, *secY*, *pnp* in *imp*. Ugotovili smo, da sta gena *imp* in *secY* manj ohranjena kot gena *aceF* in *pnp* in posledično omogočata lažje razlikovanje med fitoplazmami APf. Na podlagi gena *imp* smo definirali sedem različnih genotipov, gena *secY* šest genotipov, gena *aceF* pet genotipov in na podlagi gena *pnp* tri različne genotipe. V krajih Selo na Goričkem in Kasaze, od koder smo analizirali večje število vzorcev, smo opazili veliko molekulsko raznolikost APf. Analizirali pa smo tudi raznolikost APf po posameznih letih in ugotovili, da raznolikost z leti ostaja bolj ali manj konstantna.

Z metodo MLSA smo ugotovili, da je v Sloveniji prisotnih 16 različnih haplotipov APf. Največja raznolikost je na območju Štajerske in Prekmurja. Filogenetska analiza je pokazala, da so glede na sorodnost haplotipi razvrščeni v štiri različne skupine. Za večino haplotipov je značilno, da se nahajajo širom Slovenije ali pa se v Sloveniji pojavijo le enkrat, zato težko govorimo o njihovi geografski specifičnosti.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko potrdimo, da je raznolikost APf v Sloveniji visoka, ne moremo pa potrditi ugotovitev Daneta in sod. (2011), da je poleg gena *imp* gen *aceF* najbolj informativen gen, kar se tiče polimorfizma zaporedij APf, saj je v našem primeru gen *secY* nekoliko boljši pokazatelj raznolikosti zaporedij kot gen *aceF*. Kot smo pravilno predpostavili glede na predhodne raziskave (Danet in sod., 2011), pa za gen *pnp* velja majhna genska raznolikost tudi za slovenske izolate.



## 8 VIRI

- Berges R., Seemüller E. 2002. Impact of phytoplasma infection of common alder (*Alnus glutinosa*) depends on strain virulence. *Forest Pathology*, 32, 6: 357-363
- Bosco D., Minucci C., Boccardo G., Conti M. 1997. Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83, 2: 219-224
- Bertaccini A., Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 355-379
- Brzin J., Petrovič N., Boben J., Hren M., Kogovšek P., Mehle N., Žežlina I., Seljak G., Ravnikar M. 2005. Fitoplazme na sadnem drevju. V: Maček, J. (ur.). Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Zreče, 4.-6. marec 2003. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 254-257
- Brzin J., Seljak G., Ermacora P., Osler R., Ravnikar M., Petrovič N. 2003. Določanje fitoplazme leptonekroze koščičarjev (European Stone Fruit Yellows, ESFY) v Sloveniji. V: Maček, J. (ur.). Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Zreče, 4.-6. marec 2003. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 254-257
- Canik D., Ertunc F. 2007. Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey. *Bulletin of Insectology*, 60, 2: 335
- Carraro L., Loi N., Ermacora P., Osler R. 1998. High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 2: 141-145
- Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi N. 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology*, 51, 4: 513-517
- Carraro L., Osler R. 2003. European stone fruit yellows: a destructive disease in the mediterranean basin. *Options Méditerranéennes, Série B*, 45: 113-117
- Casati P., Quaglino F., Stern A., Tedeschi R., Alma A., Bianco P. 2011. Multiple gene analyses reveal extensive genetic diversity among '*Candidatus Phytoplasma mali*' populations. *Annals of Applied Biology*, 158, 3: 257-266
- Ciccotti A.M., Bianchedi P.L., Bragagna P., Deromedi M., Filippi M., Forno F., Mattedi L. 2007. Transmission of '*Candidatus Phytoplasma mali*' by root bridges under natural and experimental conditions. *Bulletin of Insectology*, 60, 2: 387-388
- Danet J.L., Balakishiyeva G., Cimerman A., Sauvion N., Marie-Jeanne V., Labonne G., Laviña A., Batlle A., Križanac I., Škorić D. 2011. Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. *Microbiology*, 157, 2: 438-450

- Davis M.J., Tsai J.H., Cox R.L., McDaniel L.L., Harrison N.A. 1988. Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 1: 295-302
- Davis R., Sinclair W. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88, 12: 1372-1376
- Direktiva sveta o varstvenih ukrepih proti vnosu organizmov, škodljivih za rastline ali rastlinske proizvode, v skupnost in proti njihovem širjenju v skupnosti. 2000. Uradne list evropske skupnosti, 3, 29: 258-369
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Annual Phytopathology Society of Japan*, 33: 259-266
- Eriksson A., Anfora G., Lucchi A., Lanzo F., Virant-Doberlet M., Mazzoni V. 2012. Exploitation of insect vibrational signals reveals a new method for pest management. *PLoS ONE* 7, 3: e32954, doi: 10.1371/journal.pone.0032954: 5 str.
- Firrao G., Andersen M., Bertaccini A., Boudon E., Bove J. M., Daire X., Davis R. E., Fletcher J., Garnier M., Gibb K. S. 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
- Firrao G., Gibb K., Streten C. 2005. Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus* Phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology*, 87:249-263
- Fránová J., Ludvíková H., Paprštein F., Bertaccini A. 2013. Genetic diversity of Czech '*Candidatus* Phytoplasma mali' strains based on multilocus gene analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 4: 675-688
- Frisinghelli C., Delaiti L., Grando M., Forti D., Vindimian M. 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology*, 148, 7-8: 425-431
- Gundersen D.E., Lee I.-M., Rehner S.A., Davis R.E., Kingsbury D.T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 176, 17: 5244-5254
- Harrison N., Richardson P., Tsai J., Ebbert M., Kramer J. 1996. PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Disease*, 80, 3: 263-269

- International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee Taxonomy of Mollicutes. 1997. Minutes of the interim meetings. 12 and 18 July 1996, Orlando, Florida, USA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 911–14
- Jarausch W., Lansac M., Saillard C., Broquaire J., Dosba F. 1998. PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 1: 17-27
- Jarausch B., Schwind N., Fuchs A., Jarausch W. 2011. Characteristics of the spread of apple proliferation by its vector *Cacopsylla picta*. *Phytopathology*, 101, 12: 1471-1480
- Kogovšek P., Hodgetts J., Hall J., Prezelj N., Nikolić P., Mehle N., Lenarčič R., Rotter A., Dickinson M., Boonham N. 2014. LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 64, 2: 286-296
- Kube M., Schneider B., Kuhl H., Dandekar T., Heitmann K., Migdoll A.M., Reinhardt R., Seemüller E. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *Bmc Genomics*, 9, 1: 306
- Kube M., Mitrovic J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E. 2012. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal*: 25 str.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322544/> (24. avgust 2015)
- Lee I., Davis R. 1986. Prospects for in vitro culture of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 1: 339-354
- Lee I.-M., Gundersen D., Davis R., Chiykowski L. 1992. Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasma-like organisms associated with Canadian peach (eastern) X disease, western X disease, and clover yellow edge. *Journal of Bacteriology*, 174, 20: 6694-6698
- Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes 1. *Annual Reviews in Microbiology*, 54, 1: 221-255
- Lepka P., Stitt M., Moll E., Seemüller E. 1999. Effect of phytoplasma infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 1: 59-68
- Lešnik M., Brzin J., Mehle N., Ravnikar M. 2008. Transmission of '*Candidatus phytoplasma mali*' by natural formation of root bridges in M9 apple rootstock. *Agricultura (Slovenia)*, 5, 2: 43-46

- Lešnik M., Pavlič E., Lešnik M. 2009. Rezultati spremljanja pojava fitoplazem AP ('*Candidatus* Phytoplasma mali') in PD ('*Candidatus* Phytoplasma pyri') v Sloveniji. Zbornik predavanj in referatov, 9: 255-260
- Mattedi L., Forno F., Cainelli C., Grando M.S., Jarausch W. 2007. Transmission of *Candidatus* Phytoplasma mali by psyllid vectors in Trentino. IOBC/WPRS Bulletin, 30, 4: 39
- Marcone C., Weintraub P., Jones P. 2009. Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. V: Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. Marcone C. (ed). Wallingford CABI publishing: 114-131
- Maust B., Espadas F., Talavera C., Aguilar M., Santamaría J., Oropeza C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. Phytopathology, 93, 8: 976-981
- Mayer C.J., Vilcinskis A., Gross J. 2008. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. Journal of Chemical Ecology, 34, 12: 1518-1522
- Mayer C.J., Jarausch B., Jarausch W., Jelkmann W., Vilcinskis A., Gross J. 2009. *Cacopsylla melanoneura* has no relevance as vector of apple proliferation in Germany. Phytopathology, 99, 6: 729-738
- Mazzoni V., Lucchi A., Čokl A., Prešern J., Virant-Doberlet M. 2009. Disruption of the reproductive behaviour of *Scaphoideus titanus* by playback of vibrational signals. Entomologia Experimentalis et Applicata, 133, 2: 174-185
- Mehle N., Ravnikar M., Seljak G., Knapic V., Dermastia M. 2011. The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. Phytopathogenic Mollicutes, 1, 2: 65-76
- Musetti R., Favali M.A. 2003. Cytochemical localization of calcium and X-ray microanalysis of *Catharanthus roseus* L. infected with phytoplasmas. Micron, 34, 8: 387-393
- Musetti R., di Toppi L.S., Ermacora P., Favali M. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. Phytopathology, 94, 2: 203-208
- Musetti R., di Toppi L.S., Martini M., Ferrini F., Loschi A., Favali M.A., Osler R. 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. European Journal of Plant Pathology, 112, 1: 53-61

- Musetti R., Farhan K., De Marco F., Polizzotto R., Paolacci A., Ciaffi M., Ermacora P., Grisan S., Santi S., Osler R. 2013. Differentially-regulated defence genes in *Malus domestica* during phytoplasma infection and recovery. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 1: 13-19
- NCBI. 2015. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=phytoplasma> (8. jun. 2015)
- Nikolić P., Mehle N., Gruden K., Ravnika M., 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, 5: 303-309
- Pavšič J., Mehle N., Nikolić P., Dermastia M. 2014. Molecular diversity of 'Candidatus Phytoplasma pyri' isolates in Slovenia. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 4: 801-809
- Purcell A.H. 1982. Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 1: 397-417
- Seemüller E., 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 Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 4: 1217-1226
- Seemüller E., Schneider B. 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of 'Candidatus Phytoplasma mali', the apple proliferation agent. *Phytopathology*, 97, 8: 964-970
- Seemüller E., Moll E., Schneider B. 2008. Apple proliferation resistance of *Malus sieboldii*-based rootstocks in comparison to rootstocks derived from other *Malus* species. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 2: 109-119
- Seemüller E., Moll E., Schneider B. 2009. Pear decline resistance in progenies of *Pyrus* taxa used as rootstocks. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 2: 217-223
- Schneider B., Seemüller E. 2009. Strain differentiation of 'Candidatus Phytoplasma mali' by SSCP- and sequence analyses of the HFLB gene. *Journal of Plant Pathology*, 91, 1: 103-112
- Sinclair W.A., Whitlow T.H., Griffiths H.M. 1997. Heritable tolerance of ash yellows phytoplasmas in green ash. *Canadian journal of forest research*, 27, 12: 1928-1935
- Šarić A., Cvjetković B. 1985. Nalaz mikoplazmama sličnih organizama u jabuci sa simptomima proliferacije i kruški sa simptomima propadanja. *Znanstvene Edicije Fakulteta Poljoprivrednih Znanosti Sveučilišta u Zagrebu*, 68: 61-67

- Tedeschi R., Bosco D., Alma A. 2002. Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology*, 95, 3: 544-551
- Tedeschi R., Alma A. 2006. *Fieberiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *Plant Disease*, 90, 3: 284-290
- Tedeschi R., Alma A. 2007. '*Candidatus Phytoplasma mali*': the current situation of insect vectors in northwestern Italy. *Bulletin of Insectology*, 60, 2: 187
- Tedeschi R., Lauterer P., Brusetti L., Tota F., Alma A. 2009. Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorn psyllid fauna of northwestern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 3: 301-310
- Weintraub P.G., Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review Entomology*, 51: 91-111
- Weintraub P.G., Jones P. 2010. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Preston, AMA Dataset: 331 str.
- Weisburg W., Tully J., Rose D., Petzel J., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T., Van Etten J. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 171, 12: 6455-6467

## ZAHVALA

Zahvaljujem se Nacionalnemu inštitutu za biologijo, ki mi je omogočil opravljanje praktičnega dela magistrske naloge. Raziskovalno delo je bilo izvedeno v okviru projekta CRP AP V4-1406 (Obvladovanje boleznih metličavosti jablan v nasadih sadilnega materiala) in programa ARRS P4-0165 (Biotehnologija in sistemska biologija rastlin).

Posebna zahvala gre mentorici prof. dr. Marini Dermastia za prevzem mentorstva in nasvete pri izvedbi magistrske naloge in somentorici dr. Nataši Mehle za uvajanje v delo v laboratoriju ter predloge in pomoč pri oblikovanju magistrske naloge.

Nadvse pa se iz srca zahvaljujem svojim najdražjim za potrpežljivost in podporo tekom celotnega študija.

## PRILOGE

Priloga A: Poravnava dobljenih zaporedij (A1, A2, A3, A4 in A5) in zaporedij iz baze podatkov NCBI (FN598186, FN598184, FN598187, FN598188) za gen *aceF*. Z rumeno je označen odsek, ki smo ga primerjali za določitev genotipov A1, A2, A3, A4 in A5.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	
A1	1	-----CGATATTTTACGATTTTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
A5	1	-----TTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGCGATATGGTAGCTATAATAGG																	
A2	1	-----TTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
FN598186	1	TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTACGATTTTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
FN598184	1	TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTACGATTTTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
A3	1	-----CGATATTTTACGATTTTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
A4	1	-----CGATATTTTACGATTTTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
FN598187	1	TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTACGATTTTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
FN598188	1	TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTACGATTTTACAGTAGAAAACAGATAAAAGTAAATGCAGATTTACCGCTCCATAAAATGGTGTATTACTAAATAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTATATGGTAGCTATAATAGG																	
	175	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	
A1	175	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
A5	122	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
A2	122	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
FN598186	175	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
FN598184	175	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
A3	133	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
A4	133	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
FN598187	175	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
FN598188	175	TGATGAAATTCATGAAACTGAAATTAAGAAAAGCAGATAAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCCTCTCAAATATAGAAAACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAATTCCTAACCACTCCTTTAGTACGTTT																	
	345	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	
A1	303	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
A5	292	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
A2	292	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
FN598186	345	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
FN598184	345	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
A3	303	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
A4	303	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
FN598187	345	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
FN598188	345	CTATGGCTAAGAAGTTAGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAAGAAGATGTCGAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCACCTTCAACAAATACAAAAACAAAATATAAAAAGAACAACAAATCAATTAATAATCTTGATTTTAC																	
	520	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690
A1	478	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGC-----																	
A5	467	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGC-----																	
A2	467	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGC-----																	
FN598186	520	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGCATTTTAGGAAAAAATTAATAATTTGAAAGCAGATTCTAAAAATTAATAAT																	
FN598184	520	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGCATTTTAGGAAAAAATTAATAATTTGAAAGCAGATTCTAAAAATTAATAAT																	
A3	478	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGC-----																	
A4	478	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGC-----																	
FN598187	520	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGCATTTTAGGAAAAAATTAATAATTTGAAAGCAGATTCTAAAAATTAATAAT																	
FN598188	520	TAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTTCAGAACAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCCTACTACTTTTAAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAGCATTTTAGGAAAAAATTAATAATTTGAAAGCAGATTCTAAAAATTAATAAT																	



Priloga B: Poravnava dobljenih zaporedij (S1, S2, S3, S4, S5 in S6) in zaporedij iz baze podatkov NCBI (HM237289, FN598213, HM237294, FN598214) za gen *secY*. Z rumeno je označen odsek, ki smo ga primerjali za določitev genotipov S1, S2, S3, S4, S5 in S6.

		220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390						
FN598213	28	AAAAGCAGT	AAAAAGAGA	AAAAATTT	ATAACAAAC	AAAAAAA	TAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
S3	1	-----	-----	-----	-----	-----	ATAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
HM237289	220	AAAAGCAGT	AAAAAGAGA	AAAAATTT	ATAACAAAC	AAAAAAA	TAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
FN598214	28	AAAAGCAGT	AAAAAGAGA	AAAAATTT	ATAACAAAC	AAAAAAA	TAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
S4	1	-----	-----	-----	-----	-----	ATAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
S5	1	-----	-----	-----	-----	-----	ATAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
S2	1	-----	-----	-----	-----	-----	ATAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
HM237294	213	AAAAGCAGT	AAAAAGAGA	AAAAATTT	ATAACAAAC	AAAAAAA	TAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
S1	1	-----	-----	-----	-----	-----	ATAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
S6	1	AAAAGCAGT	AAAAAGAGA	AAAAATTT	ATAACAAAC	AAAAAAA	TAATTCCT	AAATTTAGT	AGATATACT	AACTCTATA	ATTTTATCT	TTTACATT	TAATTC	AAAAAATGGT	ATATTATT	ATAACAAAC	ATAAAAAATGCT	TGCATT	TGGGATGTT	AAAAATAATTG					
		396	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	5					
FN598213	204	GCAATACACC	AGGAACATTA	ATTTTAAAGG	AAATATAAT	TTTCTACT	TGACTTTTT	TATTAGG	ATAAATAATG	AGGATTTT	AAAAGTAGC	TAATAA	ACTATA	ATAGT	AGATATTA	AAAAATAA	ATAAAAA	AAACAA	TAANGCA	AAAAATTTAAT	TGCTGTATTCCAAA				
S3	131	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
HM237289	396	GCAATACACC	AGGAACATTA	ATTTTAAAGG	AAATATAAT	TTTCTACT	TGACTTTTT	TATTAGG	ATAAATAATG	AGGATTTT	AAAAGTAGC	TAATAA	ACTATA	ATAGT	AGATATTA	AAAAATAA	ATAAAAA	AAACAA	TAANGCA	AAAAATTTAAT	TGCTGTATTCCAAA				
FN598214	204	GCAATACACC	AGGAACATTA	ATTTTAAAGG	AAATATAAT	TTTCTACT	TGACTTTTT	TATTAGG	ATAAATAATG	AGGATTTT	AAAAGTAGC	TAATAA	ACTATA	ATAGT	AGATATTA	AAAAATAA	ATAAAAA	AAACAA	TAANGCA	AAAAATTTAAT	TGCTGTATTCCAAA				
S4	131	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
S5	131	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
S2	131	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
HM237294	389	GCAATACACC	AGGAACATTA	ATTTTAAAGG	AAATATAAT	TTTCTACT	TGACTTTTT	TATTAGG	ATAAATAATG	AGGATTTT	AAAAGTAGC	TAATAA	ACTATA	ATAGT	AGATATTA	AAAAATAA	ATAAAAA	AAACAA	TAANGCA	AAAAATTTAAT	TGCTGTATTCCAAA				
S1	131	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
S6	177	GCAATACACC	AGGAACATTA	ATTTTAAAGG	AAATATAAT	TTTCTACT	TGACTTTTT	TATTAGG	ATAAATAATG	AGGATTTT	AAAAGTAGC	TAATAA	ACTATA	ATAGT	AGATATTA	AAAAATAA	ATAAAAA	AAACAA	TAANGCA	AAAAATTTAAT	TGCTGTATTCCAAA				
		572	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740						
FN598213	380	GCAAAATAT	TTTTGAAAAG	TAGTAATT	TACTCCACT	ACTCATTCC	AACCATAA	TAAAAAT	TGAAGT	TCCATTACCA	ATCCCT	TTGGCTG	TAAAT	TAAAT	CAGATAA	CCAAATAG	CAATAGC	TGTTCC	GGTAGCT	AAAAAAA	ACGATATATATA	AACTTTCT	CCAAAT	ATATCT	AC
S3	307	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HM237289	572	GCAAAATAT	TTTTGAAAAG	TAGTAATT	TACTCCACT	ACTCATTCC	AACCATAA	TAAAAAT	TGAAGT	TCCATTACCA	ATCCCT	TTGGCTG	TAAAT	TAAAT	CAGATAA	CCAAATAG	CAATAGC	TGTTCC	GGTAGCT	AAAAAAA	ACGATATATATA	AACTTTCT	CCAAAT	ATATCT	AC
FN598214	380	GCAAAATAT	TTTTGAAAAG	TAGTAATT	TACTCCACT	ACTCATTCC	AACCATAA	TAAAAAT	TGAAGT	TCCATTACCA	ATCCCT	TTGGCTG	TAAAT	TAAAT	CAGATAA	CCAAATAG	CAATAGC	TGTTCC	GGTAGCT	AAAAAAA	ACGATATATATA	AACTTTCT	CCAAAT	ATATCT	AC
S4	307	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S5	307	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S2	307	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HM237294	565	GCAAAATAT	TTTTGAAAAG	TAGTAATT	TACTCCACT	ACTCATTCC	AACCATAA	TAAAAAT	TGAAGT	TCCATTACCA	ATCCCT	TTGGCTG	TAAAT	TAAAT	CAGATAA	CCAAATAG	CAATAGC	TGTTCC	GGTAGCT	AAAAAAA	ACGATATATATA	AACTTTCT	CCAAAT	ATATCT	AC
S1	307	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S6	353	GCAAAATAT	TTTTGAAAAG	TAGTAATT	TACTCCACT	ACTCATTCC	AACCATAA	TAAAAAT	TGAAGT	TCCATTACCA	ATCCCT	TTGGCTG	TAAAT	TAAAT	CAGATAA	CCAAATAG	CAATAGC	TGTTCC	GGTAGCT	AAAAAAA	ACGATATATATA	AACTTTCT	CCAAAT	ATATCT	AC





Priloga E: Poravnave prvih dobljenih zaporedij genotipov z zaporedji po ponovnem sekveniranju novih produktov ugnezdene PCR. Primerjava je bila narejena le na vzorcih (D201/12/imp, D48-2/15/imp, D940/13/aceF, D201/12/aceF, D401/12/secY, D940/13/secY) kjer smo odkrili edinstveno zaporedje- zaporedje odkrito le pri enem vzorcu

	120	130	140	150	160	170													
D201_12_imp	1	ACAAAAAAATACCTTATAGGTGTGGTTTCAGTTGTTGGTGTCTTATGTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGGCTTTTTCATCAAAAAGTAAACACAAATTTTACCGATGAAATTTAGCAAAATAACATTTGACACTGAAAGTAGCAGAAA																	
16	1	ACAAAAAAATACCTTATAGGTGTGGTTTCAGTTGTTGGTGTCTTATGTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGGCTTTTTCATCAAAAAGTAAACACAAATTTTACCGATGAAATTTAGCAAAATAACATTTGACACTGAAAGTAGCAGAAA																	
D48_2_15_imp	12	ACAAAAAAATACCTTATAGGTGTGGTTTCAGTTGTTGGTGTCTTATGTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGGCTTTTTCATCAAAAAGTAAACACAAATTTTACCGATGAAATTTAGCAAAATAACATTTGACACTGAAAGTAGCAGAAA																	
17	12	ACAAAAAAATACCTTATAGGTGTGGTTTCAGTTGTTGGTGTCTTATGTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGGCTTTTTCATCAAAAAGTAAACACAAATTTTACCGATGAAATTTAGCAAAATAACATTTGACACTGAAAGTAGCAGAAA																	
	175	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	
D201_12_imp	164	ACAAATGCCATTTTAAATAAACACTACCAGCTGATAGAATCAAAATTTTAAAGAAGATTTTATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTTGGTCGAATGGGCTGATCAATTAATGAAACAAAAATTTACTGAAAGCCGATAAAAAGCATCTTTTGATTTAGCCTTTGAATCATTTGGGA																	
16	164	ACAAATGCCATTTTAAATAAACACTACCAGCTGATAGAATCAAAATTTTAAAGAAGATTTTATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTTGGTCGAATGGGCTGATCAATTAATGAAACAAAAATTTACTGAAAGCCGATAAAAAGCATCTTTTGATTTAGCCTTTGAATCATTTGGGA																	
D48_2_15_imp	175	ACAAATGCCATTTTAAATAAACACTACCAGCTGATAGAATCAAAATTTTAAAGAAGATTTTATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTTGGTCGAATGGGCTGATCAATTAATGAAACAAAAATTTACTGAAAGCCGATAAAAAGCATCTTTTGATTTAGCCTTTGAATCATTTGGGA																	
17	175	ACAAATGCCATTTTAAATAAACACTACCAGCTGATAGAATCAAAATTTTAAAGAAGATTTTATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTTGGTCGAATGGGCTGATCAATTAATGAAACAAAAATTTACTGAAAGCCGATAAAAAGCATCTTTTGATTTAGCCTTTGAATCATTTGGGA																	
	349	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	
D201_12_imp	338	AAAAATTAAGTCAACCAAGAATTTATTAGCAAAACATGACGAATCTTTTTGAAAGCAGACACTAATAAAGCCACAGTTCAGGTGAAATAAAAATTATCATTGACGAATACCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAAGTCTTTAAATTTGCAATAAATTTTAAATATT																	
16	338	AAAAATTAAGTCAACCAAGAATTTATTAGCAAAACATGACGAATCTTTTTGAAAGCAGACACTAATAAAGCCACAGTTCAGGTGAAATAAAAATTATCATTGACGAATACCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAAGTCTTTAAATTTGCAATAAATTTTAAATATT																	
D48_2_15_imp	349	AAAAATTAAGTCAACCAAGAATTTATTAGCAAAACATGACGAATCTTTTTGAAAGCAGACACTAATAAAGCCACAGTTCAGGTGAAATAAAAATTATCATTGACGAATACCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAAGTCTTTAAATTTGCAATAAATTTTAAATATT																	
17	349	AAAAATTAAGTCAACCAAGAATTTATTAGCAAAACATGACGAATCTTTTTGAAAGCAGACACTAATAAAGCCACAGTTCAGGTGAAATAAAAATTATCATTGACGAATACCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAAGTCTTTAAATTTGCAATAAATTTTAAATATT																	
	25	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	
A4	12	TTTACAGTAAACACAGATAAAGTAAATGACAGATTACGCTCCCAATAAATGGTGTATTACTAAATTAAGGAGTTAAAGAAAGGTGAAATGATCCATGTTGGC																	
D940_13_aceF_P	21	TTTACAGTAAACACAGATAAAGTAAATGACAGATTACGCTCCCAATAAATGGTGTATTACTAAATTAAGGAGTTAAAGAAAGGTGAAATGATCCATGTTGGC																	
A5	1	TTTACAGTAAACACAGATAAAGTAAATGACAGATTACGCTCCCAATAAATGGTGTATTACTAAATTAAGGAGTTAAAGAAAGGTGAAATGATCCATGTTGGC																	
D201_12_aceF_P	25	TTTACAGTAAACACAGATAAAGTAAATGACAGATTACGCTCCCAATAAATGGTGTATTACTAAATTAAGGAGTTAAAGAAAGGTGAAATGATCCATGTTGGC																	
	197	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
A4	184	AGGAGTAGTCGGAGATTAGAAAATCTCTCAAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTAAATGAAATTAATTTAAGT																	
D940_13_aceF_P	190	AGGAGTAGTCGGAGATTAGAAAATCTCTCAAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTAAATGAAATTAATTTAAGT																	
A5	173	AGGAGTAGTCGGAGATTAGAAAATCTCTCAAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTAAATGAAATTAATTTAAGT																	
D201_12_aceF_P	197	AGGAGTAGTCGGAGATTAGAAAATCTCTCAAAATATAGAAACATTTAATGATAACCATGTTTAAATGAAATTAATTTAAGT																	
	369	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	54
A4	350	AATGGCAAAATCTGAAAGAAAGATGTGCAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCAACTTCAACATACAAAAACAAATATAAAAGAACAAACATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATCTCGTTTAAAGAAAAGCTATTT																	
D940_13_aceF_P	365	AATGGCAAAATCTGAAAGAAAGATGTGCAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCAACTTCAACATACAAAAACAAATATAAAAGAACAAACATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATCTCGTTTAAAGAAAAGCTATTT																	
A5	345	AATGGCAAAATCTGAAAGAAAGATGTGCAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCAACTTCAACATACAAAAACAAATATAAAAGAACAAACATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATCTCGTTTAAAGAAAAGCTATTT																	
D201_12_aceF_P	369	AATGGCAAAATCTGAAAGAAAGATGTGCAAAAGATATCAAAATGAAAATTTAAAAAATTCAACTTCAACATACAAAAACAAATATAAAAGAACAAACATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTATTAATAATCTCGTTTAAAGAAAAGCTATTT																	
	457	460	550	560	570	580	590	600	610										
A4	441	CAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCACTACTTTTATTAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAG																	
D940_13_aceF_P	453	CAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCACTACTTTTATTAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAG																	
A5	433	CAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCACTACTTTTATTAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAG																	
D201_12_aceF_P	457	CAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCACTACTTTTATTAATGAAATTAATATTGATAATTTGATAG																	

	48	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210																			
<b>9401_12_secY_P</b>	48	ATAAATCCAAATTAAGTAGATATACTAAATAAACCTGATATAATTTAATCTTTACATTC																110	AAATTTA							117	AAAAAATGGTATATTATTAACAAAACATAAAAAATGCTTGCAATTGTGGATGTTAAAATAAATGGCCAATACACCGAGAACATTAATTTTAAAGGAATATAATTTT										127
<b>55</b>	1	ATAAATCCAAATTAAGTAGATATACTAAATAAACCTGATATAATTTAATCTTTACATTC																110	AAATTTA							117	AAAAAATGGTATATTATTAACAAAACATAAAAAATGCTTGCAATTGTGGATGTTAAAATAAATGGCCAATACACCGAGAACATTAATTTTAAAGGAATATAATTTT										127
<b>D940_13_secY_P</b>	48	ATAAATCCAAATTAAGTAGATATACTAAATAAACCTGATATAATTTAATCTTTACATTC																110	AAATTTA							117	AAAAAATGGTATATTATTAACAAAACATAAAAAATGCTTGCAATTGTGGATGTTAAAATAAATGGCCAATACACCGAGAACATTAATTTTAAAGGAATATAATTTT										127
<b>56</b>	47	ATAAATCCAAATTAAGTAGATATACTAAATAAACCTGATATAATTTAATCTTTACATTC																110	AAATTTA							117	AAAAAATGGTATATTATTAACAAAACATAAAAAATGCTTGCAATTGTGGATGTTAAAATAAATGGCCAATACACCGAGAACATTAATTTTAAAGGAATATAATTTT										127
	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390																			
<b>9401_12_secY_P</b>	220	CTACTTGACTTTTTTATTAAGGATAAATAAATAGGGATTTTTTAAAGTAGCTAAATAAATCTATAAATAGTAGATATAAATAAATAAATAAAAAAACAATAAAGCAAAAAATTAATTCGTCTGTATTC																330	AAAAATGCCAAATATTTTTGAAAAAGTAGTAATTAAGCTGACTACT										340								
<b>55</b>	173	CTACTTGACTTTTTTATTAAGGATAAATAAATAGGGATTTTTTAAAGTAGCTAAATAAATCTATAAATAGTAGATATAAATAAATAAATAAAAAAACAATAAAGCAAAAAATTAATTCGTCTGTATTC																330	AAAAATGCCAAATATTTTTGAAAAAGTAGTAATTAAGCTGACTACT										340								
<b>D940_13_secY_P</b>	220	CTACTTGACTTTTTTATTAAGGATAAATAAATAGGGATTTTTTAAAGTAGCTAAATAAATCTATAAATAGTAGATATAAATAAATAAATAAAAAAACAATAAAGCAAAAAATTAATTCGTCTGTATTC																330	AAAAATGCCAAATATTTTTGAAAAAGTAGTAATTAAGCTGACTACT										340								
<b>56</b>	219	CTACTTGACTTTTTTATTAAGGATAAATAAATAGGGATTTTTTAAAGTAGCTAAATAAATCTATAAATAGTAGATATAAATAAATAAATAAAAAAACAATAAAGCAAAAAATTAATTCGTCTGTATTC																330	AAAAATGCCAAATATTTTTGAAAAAGTAGTAATTAAGCTGACTACT										340								
	380	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520																							
<b>9401_12_secY_P</b>	380	CATTCCAACCAATAATAAAATGAAAGTCCATTACCAATCCCTGTGGCTGTAAATAAAATCAGATAACCAATAGCAATAGCTG												492	TCCGGTAGCTAAAAAAACGATATATATAACTTCCTAAATATATCT						508																
<b>55</b>	345	CATTCCAACCAATAATAAAATGAAAGTCCATTACCAATCCCTGTGGCTGTAAATAAAATCAGATAACCAATAGCAATAGCTG												492	TCCGGTAGCTAAAAAAACGATATATATAACTTCCTAAATATATCT						508																
<b>D940_13_secY_P</b>	380	CATTCCAACCAATAATAAAATGAAAGTCCATTACCAATCCCTGTGGCTGTAAATAAAATCAGATAACCAATAGCAATAGCTG												492	TCCGGTAGCTAAAAAAACGATATATATAACTTCCTAAATATATCT						508																
<b>56</b>	391	CATTCCAACCAATAATAAAATGAAAGTCCATTACCAATCCCTGTGGCTGTAAATAAAATCAGATAACCAATAGCAATAGCTG												492	TCCGGTAGCTAAAAAAACGATATATATAACTTCCTAAATATATCT						508																

Priloga F: Primerjava slovenskih genotipov *aceF* z genotipi iz genske banke NCBI.

slovenski genotip	Genotipi iz genske banke NCBI				ujemanje slovenskih genotipov <i>aceF</i> z objavljenimi genotipi
	acc.no.	izvor - država	izvor - gostitelj	ime genotipa po Danet in sod. (2011)	
A1	FN598184	np	<i>Catharanthus roseus</i>	A13	100%
	FN598188	Italija	<i>Catharanthus roseus</i>	A22	99%
A2	FN598186	np	np	A15	100%
	FN598184	np	<i>Catharanthus roseus</i>	A13	99%
A3	FN598187	np	np	A16	99%
	FN598184	np	<i>Catharanthus roseus</i>	A13	99%
A4	FN598187	np	np	A16	100%
	FN598184	np	<i>Catharanthus roseus</i>	A13	99 %
A5	FN598184	np	<i>Catharanthus roseus</i>	A13	99%

np – ni podatka

Priloga G: Primerjava slovenskih genotipov *secY* z genotipi iz genske banke NCBI

slovenski genotipi	Genotipi iz genske banke NCBI					ujemanje slovenskih genotipov <i>secY</i> z objavljenimi genotipi
	acc.no.	izvor-država	izvor-gostitelj	ime genotipa po Danet in sod. (2011)	ime genotipa po Casati in sod. (2011)	
S1	HM237294	Italija	<i>Catharant -hus roseus</i>	/	AP15	100%
	FN598216	np	np	S12	/	100%
	FN598214	np	np	S10	/	99%
S2	HM237294	Italija	np	/	AP15	99%
S3	HM237289	Nemčija	<i>Catharant -hus roseus</i>	/	AT	100%
	FN598213	Nemčija	<i>Catharant -hus roseus</i>	S9	/	100%
	FN598214	np	np	S10	/	98%
S4	FN598214	np	np	S10	/	100%
	HM237289	np	<i>Catharant -hus roseus</i>	/	AT	98%
S5	FN598214	np	np	S10	/	99%
S6	HM237294	Italija	<i>Catharant -hus roseus</i>	/	AP15	98%)

np- ni podatka

Priloga H: Primerjava slovenskih genotipov *pnp* z genotipi iz genske banke NCBI

slovenski genotip	Genotipi iz genske banke NCBI				ujemanje slovenskih genotipov <i>pnp</i> z objavljenimi genotipi
	acc.no.	izvor-država	izvor-gostitelj	ime genotipa po Danet in sod. (2011)	
<b>P1</b>	FN598202	np	np	P11	100%
	FN598204	Italija	np	P13	99%
<b>P2</b>	FN598203	np	np	P12	100%
	FN598202	np	np	P11	99%
<b>P3</b>	FN598200	np	<i>Catharanthus roseus</i>	P9	100%
	FN598202	np	np	P11	100%

np- ni podatkov



Priloga I: Primerjava slovenskih genotipov *imp* z genotipi iz genske banke NCBI

slovenski genotip	Genotipi iz genske banke NCBI				ujemanje slovenskih genotipov <i>imp</i> z objavljenimi genotipi
	acc.no.	izvor-država	izvor-gostitelj	ime genotipa po Danet in sod. (2011)	
<b>I1</b>	FN600733	np	<i>Catharanthus roseus</i>	I24	100 %
	FN600736	np	np	I30	99 %
<b>I2</b>	FN600734	np	np	I25	97 %
<b>I3</b>	FN600732	np	np	I23	100 %
	FN600731	np	np	I22	99 %
<b>I4</b>	FN600731	np	np	I22	100 %
	FN600730	np	np	I21	99 %
<b>I5</b>	N600730	np	np	I21	100 %
	FN600731	np	np	I22	99 %
<b>I6</b>	FN600730	np	np	I21	99%
<b>I7</b>	FN600730	np	np	I21	99%

np – ni podatka

Priloga J: Vrednosti Ct izolatov določene z metodo PCR v realnem času (vir podatkov: NIB arhiv)

<b>izolat</b>	<b>Ct</b>
D199/12	26,9
D200/12	25,3
D201/12	27,7
D401/12	24,5
D406/12	21,9
D411/12	23
D415/12	22,7
D417/12	23,6
D1108/12	24,9
D140-2/13	23,7
D140-3/13	27,4
D145-2/13	23,8
D157-5/13	22,9
D178/13	24,4
D904/13	29,3
D910/13	26,4
D911/13	25,5
D912/13	24,6
D913/13	29,6
D914/13	30,4
D940-13	23,1
D142/14	24
D143/14	24,3
D634/14	22,9
D677/14	23,6
D678/14	22,1
D679/14	23,7
D680/14	26,6
D695/14	24,7
D697/14	26,8
D37/15	22,5
D45/15	25,57
D47/15	27
D48-2 /15	26,5
D49-1/15	25
D49-2/15	26,09
D49-3/15	26,8