

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matevž RUPAR

**MOLEKULSKA RAZNOVRSTNOST SLOVENSKIH IZOLATOV FITOPLAZME,  
POVZROČITELJICE ZLATE TRSNE RUMENICE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MOLECULAR DIVERSITY OF SLOVENIAN PHYTOPLASMA ISOLATES,  
WHICH CAUSE FLAVESCENCE DORÉE**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija dodiplomskega študija oddelka za biotehnologijo je dne 16.06.2010 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Marino Dermastio, za recenzenta pa doc. dr. Jerneja Jakšeta.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:      prof. dr. Branka JAVORNIK  
                        Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član:                doc. dr. Jernej JAKŠE  
                        Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:      25.08.2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matevž RUPAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	634.8:632.3(043.2)=163.6
KG	Fitoplazme/zlata trsna rumenica/vinska trta ( <i>Vitis sp.</i> )/srobot ( <i>Clematis vitalba</i> )/japonski škržatek <i>Orientus ishidae</i> /PCR/PCR v realnem času/PCR RFLP/kloniranje/sekvenciranje/
AV	RUPAR, Matevž
SA	DERMASTIA, Marina
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	MOLEKULSKA RAZNOVRSTNOST SLOVENSKIH IZOLATOV FITOPLAZME, POVZROČITELJICE ZLATE TRSNE RUMENICE
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 66 str., 33 preg., 33 sl., 4 pril., 59 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Fitoplazme so patogene bakterije brez celične stene, ki za razmnoževanje potrebujejo tako rastline kot žuželke. Fitoplazma <i>Flavescence dorée</i> (FD) je povzročiteljica bolezni zlate trsne rumenice pri vinski trti, razširja pa jo ameriški škržatek <i>Scaphoideus titanus</i> . Zlata trsna rumenica se izredno hitro širi, v večini primerov okužbe trta propade. Gospodarska škoda zaradi okužb je lahko velika. Bolezen je prisotna v Sloveniji, kjer je v zadnjih letih nastalo več žarišč v vseh vinorodnih pokrajinah. Ker je o bolezni znanega relativno malo, smo v tej nalogi preverili če FD okužuje tudi druge rastline v bližini vinogradov in preverili vrsto škržatka <i>Orientus ishidae</i> , ki do sedaj ni bil povezan s FD. Z metodo polimorfizmov dolžin restriktivskih fragmentov (PCR RFLP) in analizo nukleotidnih zaporedij smo analizirali vse do sedaj nabbrane vzorce vinske trte in navadnega srobova od leta 2005 do 2009. Preko profilov PCR RFLP fragmenta FD9, rezanega s <i>TaqαI</i> endonukleazo, in fragmenta rp(V), rezanega s <i>HpaII</i> smo pokazali, da je v Sloveniji okoli 60% vzorcev vinske trte okužene s FD iz skupin FD1 ali FD2. Ostalih 40% je bilo okuženih s FD tipa FD3. Spričo tega dejstva sklepamo da srobot ni edini vir okužbe, saj so bili vsi sroboti okuženi s FD tipa FD3. Ugotovili smo, da s FD ni bila okužena nobena vzorčena rastlina poleg trte in srobova. S kloniranjem smo dokazali, da je <i>O. ishidae</i> lahko okužen s FD tipa FD1 in FD2, kar je prvo tovrstno poročilo. Prvič pa smo tudi pokazali mešano okužbo vinske trte s FD tipom FD2 in FD3. Nadaljnje raziskave bodo potrebne da določimo vlogo <i>O. ishidae</i> pri širjenju FD in morebitne nove rastlinske gostitelje fitoplazme FD, med katerimi je najbolj zanimiva črna jelša.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	634.8:632.3(043.2)=163.6
CX	Phytolasma/ <i>Flaveescence dorée/Vitis sp./Clematis vitalba/Orientus ishidae</i> /PCR/qPCR/RFLP/cloning/sequencing
AU	RUPAR, Matevž
AA	DERMASTIA, Marina
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY	2010
TI	MOLECULAR DIVERSITY OF SLOVENIAN PHYTOPLASMA ISOLATES, WHICH CAUSE FLAVESCENCE DORÉE
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XII, 66 p., 33 tab., 33 fig., 4 ann., 59 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Phytoplasmas are pathogenic bacteria without cell walls that need plants and insects for successful reproduction and spreading. Phytoplasma <i>Flavescence dorée</i> (FD) causes golden grapevine yellows disease in grapevine and is transmitted by the American leafhopper <i>Scaphoideus titanus</i>. Golden grapevine yellows spread very quickly and in most cases of infection vines decline. Economic damage due to infection may be significant. The disease is present in Slovenia, where it has in recent years made a number of hotspots in all winegrowing regions. Since the disease is relatively less known, we checked if FD also infects other plant species in the vicinity of vineyards and checked another leafhopper species <i>Orientus ishidae</i>, which until now has not been associated with FD. With the method of restriction fragment length polymorphism (RFLP) and the analysis of nucleotide sequences we analyzed all the samples of vines and clematis collected from 2005 to 2009. Through RFLP profiles of FD9 fragment, cut with <i>TaqI</i> endonuclease and rp (V) fragment, cut with <i>HpaII</i>, we showed that about 60% of vine samples in Slovenia were infected with FD type FD1 or FD2. The remaining 40% were infected with type FD3. Based on these facts we suggest that the clematis is not the only source of infection, because all clematis samples were infected with type FD3. We found that FD does not infect other plant species that we sampled, besides grapevines and clematis. With cloning, we demonstrated that the <i>O. ishidae</i> may be contaminated with FD type FD1 and FD2, which is the first report of its kind. We were also the first to show a mixed infection with FD type FD2 and FD3 in a grapevine. Further studies are needed to determine the role of <i>O. ishidae</i> in the spreading of FD and potential new plant hosts of FD phytoplasma, amongst them the most interesting black alders</p>

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI)</b>	<b>III</b>
<b>Key Words Documentation (KWD)</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic</b>	<b>VI</b>
<b>Kazalo slik</b>	<b>VIII</b>
<b>Kazalo prilog</b>	<b>X</b>
<b>Okrajšave in simboli</b>	<b>XI</b>
<b>Slovarček</b>	<b>XII</b>

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 Fitoplazme	2
2.2 Trsne rumenice	6
2.3 Zlata trsna rumenica	7
2.4 Namen diplomskega dela in hipoteze	14
<b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>15</b>
3.1 Rastlinski material	15
3.2 Japonski škržatek ( <i>Orientus ishidae Matsumura, 1902</i> )	15
3.3 Pregled metod, uporabljenih v nalogi	16
3.4 Metode priprave rastlinskih vzorcev in izolacije DNA	18
3.5 PCR v realnem času za detekcijo fitoplazem FD	21
3.6 PCR za detekcijo fitoplazem Fd	24
3.7 Agarozna gelska elektroforeza	30
3.8 Analiza polimorfizmov dolžin restriktivnih fragmentov (RFLP)	31
3.9 Kloniranje produktov PCR	35
3.10 Obdelava nukleotidnih zaporedij	40
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>42</b>
4.1 Primerjava metod homogenizacije in ekstrakcije DNA iz rastlinskega materiala	42
4.2 Bolezenska znamenja na vinski trti okuženi s fitoplazmo FD	44
4.3 Bolezenska znamenja na srobotih okuženih s fitoplazmo FD	46
4.4 Vzorci, v katerih je bila potrjena prisotnost fitoplazme FD z metodo PCR v realnem času	47
4.5 Analiza vzorcev z vgnezdenim PCR	47
4.6 Analiza polimorfizmov dolžin restriktivnih fragmentov- RFLP	49
4.7 Sekvenciranje in obdelave nukleotidnih zaporedij	54
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>60</b>
5.1 Razprava	60
5.2 Sklepi	64
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>65</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>67</b>
<b>ZAHVALA.....</b>	<b>73</b>
<b>PRILOGE .....</b>	<b>74</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Seznam znanih trsnih rumenic s povezanimi fitoplazmami, žuželčjimi prenašalci, rastlinskimi gostitelji in razširjenostjo v svetu. Vir: (Boudon-Padieu, 2003).....	6
Preglednica 2: Sevi fitoplazem , ki predstavljajo 16Sr V filogenetsko skupino, z njimi povezane bolezni, gostitelji, prenašalci in PCR RFLP klasifikacija v podskupine (Lée in sod., 2004) .....	8
Preglednica 3: Seznam uporabljenih začetnih nukleotidov in sond, za določanje prisotnosti fitoplazem z metodo PCR v realnem času. ....	22
Preglednica 4: Sestava reakcijskih mešanic za PCR v realnem času za različne amplikone... <td style="text-align: right;">23</td>	23
Preglednica 5: Pražne meje povprečnih vrednosti Ct za določitev pozitivnih vzorcev (Hren in sod., 2007) .....	24
Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili v reakcijah PCR .....	25
Preglednica 7: Sestava reakcijske PCR mešanice, ki smo jo uporabljali v PCR reakcijah z začetnimi oligonukleotidi FD9F1/R1 in rp(V)F1/R1.....	27
Preglednica 8: Nastavitev programa na aparaturi PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler, za PCR reakcije z začetnimi oligonukleotidi FD9F1/R1 in rp(V)F1/R1.....	27
Preglednica 9: Sestava reakcijskePCR mešanice, ki smo jo uporabljali v vgnezdenih PCR reakcijah z začetnimi oligonukleotidi FD9F3b/R2 in rp(V)F1A/R1A. ....	27
Preglednica 10: Nastavitev programa na aparaturi PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler, za vgnezdene PCR reakcije z začetnimi oligonukleotidi FD9F3b/R2 in rp(V)F1A/R1A. ....	27
Preglednica 11: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili pri PCR reakcijah za nadaljno sekvenciranje. ....	28
Preglednica 12: Pari začetnih oligonukleotidov uporabljeni v reakcijah PCR za pomnoževanje fragmentov in pari, ki so bili uporabljeni pri sekvenciranju teh fragmentov.....	29
Preglednica 13: Nastavitev naprave PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler za vgnezdene PCR reakcijo s parom začetnikov FD9F1/FD9R2 in FD9F2/FD9R1 .....	29
Preglednica 14: Nastavitev naprave PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler za reakcijo vgnezdenega PCR s parom začetnikov FD9F3/FD9R2 .....	29
Preglednica 15: sestavine za pripravo 1000 ml pufra 50x TAE.....	30
Preglednica 16: Sestavine za pripravo agaroznih gelov.....	30
Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za <i>Hpa II</i> endonukleazo. ....	33
Preglednica 18: Sestava reakcijske mešanice za <i>TaqαI</i> endonukleazo. ....	33
Preglednica 19: Sestava reakcijske mešanice za <i>AluI</i> endonukleazo. ....	33
Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za <i>Tru9I</i> endonukleazo.....	33
Preglednica 21: Sestava in potek priprave 10% poliakrilamidnega gela .....	34
Preglednica 22: Sestava LB gojišča .....	36
Preglednica 23: Sestava reakcij ligacije .....	38
Preglednica 24: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni za sekveniranje posameznega plazmida .....	40
Preglednica 25: Vrednosti Ct za posamezen tip preizkušane ekstrakcije po PCR v realnem času. Z različnimi barvami so označeni različni tipi ekstrakcije, ki so primerjani s klasično ekstrakcijo. ....	43
Preglednica 26: Rezultati testov PCR vrealnem času izvedenih v okviru te naloge. Oznake: Poz, potrjena prisotnost.....	47
Preglednica 27: Razporeditev vzorcev glede na različne profile PCR RFLP pri razrezu fragmenta FD9 s <i>TaqαI</i> endonukleazo.....	49
Preglednica 28: Razporeditev vzorcev glede na različne PCR RFLP profile pri razrezu fragmenta rp(V) s <i>HpaII</i> endonukleazo. Test PCR RFLP ni bil izveden v primeru prenizke	

koncentracije produktov PCR posamezne vgnezdenе reakcije. *, profila nismo mogli določiti (glej poglavje 4.6.2) .....	49
Preglednica 29: Primerjava nukleotidnih zaporedij klonov fitoplazme FD iz vinske trte z obstoječimi v bazi GenBank (BLAST rezultati). Izpisani so le najboljši zadetki, najbolj podoben je vedno na vrhu. ....	57
Preglednica 30: Primerjava nukleotidnih zaporedij klonov fitoplazme FD iz japonskega škržatka ( <i>O. ishidae</i> ) z obstoječimi v bazi GenBank (BLAST rezultati). Izpisani so le najboljši zadetki, najbolj podoben je vedno na vrhu.....	58
Preglednica 31: Tabelaričen prikaz števila razlik med nukleotidnimi zaporedji fragmenta FD9 (zaporedje med začetnikoma FD9f3b/r2). Pod rdečo črto je napisano število nukleotidnih razlik, ki smo jih dobili pri poravnavi zaporedij nad rdečo črto pa število vstavljenih presledkov med zaporedji Vzorci v vrsticah/ stolpcih 1-8 so najbolj podobni cevo FD-C (FD3 skupina), vzorec v vrstici/stolpcu 9 je najbolj podoben sevu FD-D (FD2 skupina) Za celotno poravnavo glej prilogo B.....	59
Preglednica 32: Tabelaričen prikaz števila razlik med nukleotidnimi zaporedji fragmenta FD9 (zaporedje med začetnikoma FD9f3b/r2).Pod rdečo črto je napisano število nukleotidnih razlik, ki smo jih dobili pri poravnavi zaporedij nad rdečo črto pa število vstavljenih presledkov med zaporedji. V vrsticah/stolpcih 1-5 so referenčni sevi, ki so najbolj podobni različnim klonom(najboljši BLAST zadetki). Oznaka pred prevzemno št. pomeni oznako seva, ki ga predstavlja, oznaka rev, pa pomeni, da je bila v poravnavi uporabljen reverzni prepis zaporedja iz baze. V stolpcih/vrsticah 6-11 so kloni pridobljeni v tej nalogi. Za celotno poravnavo glej prilogo C.....	59
Preglednica 33: Primerjava dveh metod homogenizacije .....	60

## KAZALO SLIK

str.	
Slika 1: Fitoplazme tipa brestove rumenice EY-1, v celicah floema v listni žili madagaskarskega zimzelena ( <i>Catharanthus roseus</i> ). Slika je bila posneta s presevnim elektronskim mikroskopom. Foto: Magda Tušek Žnidarič, Nacionalni inštitut za biologijo. ....	4
Slika 2: Prehajanje fitoplazme tipa EY-1 skozi plazmodezmo med dvema celicama floemskega tkiva madagaskarskega zimzelena ( <i>Catharanthus roseus</i> ). Slika je bila posneta s presevnim elektronskim mikroskopom. Foto: Magda Tušek Žnidarič, Nacionalni inštitut za biologijo. ....	4
Slika 3: Pojavljanje različnih skupin FD v Evropi. FD1 modro, FD2 rdeče, FD3 zeleno. Povzeto po (Boudon-Padieu, 2010a).....	10
Slika 4: Ameriški škržatek ( <i>Scaphoideus titanus</i> Ball.), levo larva, desno odrasli osebek. (Boudon-Padieu, 2010b) .....	10
Slika 5: Razširjenost ameriškega škržatka v Evropi (temno rdeče) in smer širitve (siva puščica). S svetlo rdečo so označena področja kjer raste vinska trta. (Boudon-Padieu, 2010b) .....	11
Slika 6: Napredovanje zlate trsne rumenice po Sloveniji od leta 2005 do 2009. Vir:(Ministrstvo Za Kmetijstvo..., 2009) .....	13
Slika 7: Metodološki potek primerjave različnih metod ekstrakcije DNA iz rastlinskega tkiva .....	16
Slika 8: Metodološki potek molekulske analize vzorcev .....	17
Slika 9: Shematska predstavitev vseh fragmentov DNA, ki smo jih pomnožili za nadaljnje sekvenciranje. Vidimo lahko tudi prileganje oligonukleotidnih začetnikov, s katerimi smo pomnoževali in sekvencirali naše fragmente, na fragment FD9 fitoplazemske DNA. Slika je simbolična, dolžine oligonukleotidnih začetnikov in razdalje med njimi niso v pravem merilu. ....	28
Slika 10: Shematični prikaz naleganja nukleotidnih začetnikov uporabljenih pri sekvenciranju plazmida pGEM. ....	40
Slika 11: Bolezenski znaki pri rdečih sortah (na sliki: modra frankinja). (Foto: Matevž Rupar (M.R.)).....	44
Slika 12: Bolezenski znaki pri belih sortah (na sliki renski rizling). (Foto: M.R.) .....	44
Slika 13: Dva primera sušenja in propadanja grozdih jagod, kot posledica okužbe z zlatou rumenico. Na obeh slikah lahko vidimo tudi, da sta poganjka slabo olesenela. (Foto: M.R.).	45
Slika 14: A, bolezenska znamenja pri samorodnici, veliki nagubani in krhki listi, zvijanje listnih robov navzdol, rumenenje listov; B, primerjava med listom brez bolezenskih znamenj (v ozadju) in listom z bolezenskimi znamenji. (Foto: M.R.) .....	45
Slika 15: Bolezenska znamenja na srobotu, okuženem s fitoplazmo FD. (Foto: M.R.) .....	46
Slika 16: A, vzorec brez značilnih bolezenskih znamenj, a z molekulsko potrjeno prisotnostjo fitoplazme FD; B, zdrava rastlina. (Foto: M.R.) .....	46
Slika 17: Produkti vgnezdenе PCR reakcije z začetnikoma FD9f3b/r2; 1% agarozni gel; velikost fragmenta je približno 1,2 kbp; M, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder.....	48
Slika 18: Produkti vgnezdenе PCR reakcije z začetnikoma rp(V) F1A/R1A; 1% agarozni gel; velikost fragmenta je približno 1,2 kbp; M, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder.....	48
Slika 19: Restrikcijski profili fragmentov FD9 rezanih z endonukleazo <i>TaqI</i> ; 2% agarozni gel. Velike tiskane črke v spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za posamezen vzorec. Vzorca 410/09 in 458/09 sta izolirana iz japonskega škržatka ( <i>O. ishidae</i> ), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. FD70 in FD92 sta referenčna izolata.....	50
Slika 20: Restrikcijski profili fragmentov rp(V) rezanih z endonukleazo <i>HpaII</i> ; 2% agarozni gel. Velike tiskane črke v spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za	

posamezen vzorec. Vzorca 410/09 in 458/09 sta izolirana iz japonskega škržatka ( <i>O. ishidae</i> ), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. FD70 in FD92 sta referenčna izolata.....	50
Slika 21: Restrikcijski profili fragmentov FD9 rezanih z endonukleazo <i>Tru9I</i> , 10% poliakrilamidni gel. Velike tiskane črke v spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za posamezen vzorec (A+, profil A z dodatno liso na vrhu) . Vzorca 410/09 in 458/09 sta izolirana iz japonskega škržatka ( <i>O. ishidae</i> ), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. ....	51
Slika 22: Restrikcijski profili fragmentov FD9 rezani z endonukleazo <i>TaqαI</i> . 10 % poliakrilamidni gel, obarvan z etidijevim bromidom. Vsi vzorci so sroboti in imajo enak restrikcijski profil (črka pod vsakim vzorcem) - profil B. ....	51
Slika 23: Restrikcijski profili fragmentov rp(V) rezani z endonukleazo <i>HpaII</i> . 10 % poliakrilamidni gel, obarvan z etidijevim bromidom. Vsi vzorci so sroboti in imajo enak restrikcijski profil (črka pod vsakim vzorcem) - profil B. ....	52
Slika 24: Restrikcijski profili fragmentov FD9 rezanih z endonukleazo <i>AluI</i> . Velike tiskane črke v spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za posamezen vzorec Vzorca 410/09 in 458/09 sta izolirana iz Japonskega škržatka ( <i>O. ishidae</i> ), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. Števila ob M3 predstavljajo dolžino fragmentov v bp. ....	53
Slika 25: Profila PCR RFLP vzorcev 676/06 (2) in 421/06 (3) v primerjavi z vzorcem s profilom B (1) in vzorcem s profilom A (4). ....	53
Slika 26: Restrikcijski profili fragmenta FD9 vzorcev sroboti. A, profili dobljeni z <i>TaqαI</i> ; B, z <i>Tru9I</i> . Vzorec 1618/09 (A, kolona 5; B, kolona 2) ima drugačen profil od vseh ostalih srobotov.....	54
Slika 27: Kakovosten kromatogram nukleotidnega zaporedja .....	54
Slika 28: Nekakovosten kromatogram nukleotidnega zaporedja.....	55
Slika 29: Plošča s kolonijami <i>E. coli</i> , ki so bile transformirane s pozitivno kontrolo ligacije (pGEM s kontrolnim insertom). Bele kolonije imajo vstavljen plazmid pGEM s kontrolnim insertom, modre kolonije pa plazmid pGEM brez inserta. ....	55
Slika 30: Kontrola transformacije. Plošča s transformiranimi kolonijami <i>E. coli</i> , kjer smo za transformacijo uporabili kontrolni plazmid pUC. ....	55
Slika 31:Plošča s kolonijami <i>E. coli</i> , ki so bile transformirane s kontrolo ozadja ligacije (samo plazmid pGEM).....	56
Slika 32: Plošča s kolonijami <i>E. coli</i> , ki so bile transformirane s plazmidom pGEM z vstavljenim produktom PCR. Bele kolonije imajo vstavljen plazmid pGEM z želenim produktom PCR, modre kolonije pa imajo vstavljen plazmid pGEM brez inserta.....	56
Slika 33:Razširjenost različnih FD podskupin in pojavljanje navadnih srobotov, okuženih s fitoplazmo FD v Sloveniji. Prirejeno po viru: Ministrstvo Za Kmetijstvo Gozdarstvo In Prehrano RS 2009 .....	61

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vseh analiziranih vzorcev skupaj z letom vzorčenja lokacijo vzorčenja in rezultati.

Priloga B: Poravna nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorca 1780/09. Rdeče senčena so mesta, kjer so razlike med zaporedji.

Priloga C: Poravnava nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta med začetnikoma FD9f3b/r2 pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorcev vinske trte in žuželke *Orientus ishidae*. Sivo so označena mesta neujemanja med zaporedji, simbolno je delež ujemanja predstavljen tudi s stolpci pod zaporedji.

Priloga D: Članek, ki je nastal iz tega diplomskega dela in je trenutno v procesu objavljanja v New Disease Reports . Naslov: The first detection of a phytoplasma from the 16SrV (Elm yellows) group in the mosaic leafhopper *Orientus ishidae*.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16s rRNA	16S ribosomalna RNA, komponenta 30S podenote ribosomov prokariontov
ALY	jelšina rumenica
AP	filogenetska skupina fitoplazem imenovana metličavost jablan (ang. apple proliferation)
bdH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
BLAST	algoritem za primerjavo nukleotidnih zaporedij (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
BN	fitoplazma povzročiteljica bolezni počnlosti lesa pri vinski trti
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumine)
<i>Ca.</i> P	rod <i>Candidatus Phytoplasma</i>
CLY	češnjeve rumenice
Ct	število ciklov pri metodi PCR v realnem času kjer vrednost fluorescentnega signala preseže vrednost ozadja (ang. cycle threshold)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi nukleozid tri fosfat
EDTA	etilen diamin tetraacetna kislina (ang. ethylene diamine tetraacetic acid)
EY-1	en izmed izolatov v skupini brestovih rumenic
EYs	brestove rumenice- ime za celotno filogenetsko skupino
FASTA	format zapisa nukleotidnega zaporedja
FD	fitoplazma povzročiteljica zlate trsne rumenice
FD9	genomski fragment fitoplazem kjer se nahaja gen <i>secY</i> in del gena <i>rplO</i>
FURS	Fitosanitarna uprava Republike Slovenije
kbp	kilo bazni par (1000 baznih parov)
LB	hranljiv medij za gojenje bakterij (ang. lysogeny broth)
MGB	minor groove binding- vrsta sonde pri PCR v realnem času
NKI	negativna kontrola izolacije
NKP	negativna kontrola PCR testa
NTC	kontrola kontaminiranosti kemikalij pri PCR v realnem času (ang. non template control)
PA gel	poliakrilamidni gel
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PGY	trsna rumenica iz območja Palatine v Nemčiji (ang. Palatine grapevine yellows)
PKP	pozitivna kontrola PCR testa
RFLP	metoda polimorfizmov restrikcijskih fragmentov
rp(V)	genomski fragment fitoplazem kjer se nahajata gena <i>rpl22</i> in <i>rps3</i>
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
RuS	pritlikavost robidovk
SNP	(ang. single nucleotide polymorphism) sprememba enega nukleotida v zaporedju DNA
TAE	tris-acetat-EDTA pufer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etan-1,2-diamin
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- beta-D-galaktopiranozid

## SLOVARČEK

- Fitoplazme** so vrsta bakterij brez celične stene. So znotrajcelični obligatni paraziti/ simbionti rastlin in žuželk. V rastlinah naseljujejo celice floemskega tkiva, širijo pa se s pomočjo žuželčjih prenosalcev, ki se prehranjujejo z rastlinskim sokom. Fitoplazme povzročajo številne bolezni tako pri divjih kot tudi kulturnih rastlinah.
- PCR** je kratica za verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction). Je metoda, ki omogoča pomnoževanje odsekov DNA s pomočjo encima DNAPolimeraze. Kopiranje odsekov DNA poteka tako, da uporabimo dve kratki molekuli DNA (začetna oligonukleotida), ki sta komplementarni začetnemu in končnemu delu segmenta, ki ga želimo pomnožiti, dodamo encim, raztopino soli in deoksiribonukleotide (gradnike DNA). Reakcija poteka verižno; to pomeni, da jo večkrat ponovimo. Pri vsaki ponovitvi se število kopij pomnoževanega odseka podvoji; tako lahko po 20 ponovitvah reakcije dobimo iz 1 kopije DNA teoretično več kot 1 milijon kopij.
- Amplikon** je drugo ime za produkt PCR reakcije, ali odsek DNA, ki smo ga želeli pomnožiti
- PCR v realnem času** je metoda, ki je v principu enaka klasični verižni reakciji s polimerazo s to razliko, da lahko pri PCR v realnem času tekom reakcije spremljamo količino nastalega produkta. Količino spremljamo s pomočjo (1) posebnih fluorescenčnih barvil, ki bolj fluorescirajo, če so vezana na dvoverižno DNA ali (2) preko DNA sond specifičnih za želeni amplikon, ki so označene s fluorescenčnim reporterskim barvilm. Barvilo v tem primeru fluorescira šele, ko je sonda vezana na amplikon, in procesirana s polimerazo. Tekom reakcije spremljamo jakost fluorescence. Tako lahko določimo število tarčne DNA pred začetkom reakcije, saj vemo, da se število kopij amplikona v vsakem ciklu PCR reakcije podvoji.
- PCR RFLP** je tehnik s katero lahko razlikujemo več različnih homolognih odsekov DNA. Sestoji iz reakcije restrikcije, kjer z eno ali več endonukleazo razrežemo vzorčno DNA na manjše fragmente. Kolikokrat posamezna endonukleaza reže določeno DNA molekulo je odvisno od zaporedja DNA/ koliko prepoznavnih mest je v DNA prisotnih. Dobljene fragmente nato ločimo s pomočjo elektroforeze, kjer vidimo število in dolžino fragmentov. Tako dobimo za vsak vzorec svoj RFLP profil. S profili lahko vidimo spremembe v zaporedjih kot so SNP, insercije, delekcije.
- Endonukleaza** (restriktivski encim) je encim, ki reže DNA znotraj ali ob specifičnem zaporedju oligonukleotidov. Vsak endonukleaza ima svoje prepoznavno zaporedje nukleotidov na katerega nalega, nato pa prereže verigo DNA na cepitvenem mestu, ki je lahko znotraj prepoznavnega zaporedja ali pa višje/nižje od prepoznavnega zaporedja. Vse endonukleaze so izredno specifične in režejo le, če je v DNA molekuli prisotno popolno prepoznavno zaporedje.

## 1 UVOD

V tej nalogi se bomo posvetili fitoplazmi, ki pri vinski trti povzroča bolezen zlato trsno rumenico.

Fitoplazme so izredno specializirani rastlinski patogeni, ki so hkrati lahko tudi simbionti ali patogeni žuželk, ki se z rastlinami hranijo. Ker fitoplazme poznamo šele nekaj več kot 50 let, o njih ne vemo veliko. So bakterije brez celične stene, ki živijo znotraj gostiteljskih celic in jih za enkrat še ne znamo gojiti v razmerah *in vitro*. Standardna mikrobiološka karakterizacija fitoplazem, ki temelji na Kochovih postulatih, torej ni mogoča. Posledično lahko fitoplazme preučujemo le z molekulskimi metodami. Fitoplazme so najmanjše bakterije, manjše od 1 mikrometra in jih lahko opazujemo le z elektronskim mikroskopom. Med vsemi bakterijami imajo najmanjši genom in veliko genov, ki nimajo znanih homologov z drugimi organizmi. Kljub majhnosti so njihove interakcije z gostitelji izredno zapletene, specifične in jih slabo poznamo. Fitoplazme uspešno uporabljajo in nadzorujejo svoj življenski prostor, ki je citoplazma bodisi rastlinskih bodisi živalskih celic. Lahko prehajajo skozi plazmodezme med celicami rastlin in skozi bazalne lamine v živalskih tkivih. Pri rastlinah povzročajo bolezenska znamenja, ki kažejo na temeljito reprogramiranje rastlinskega transkriptoma. To je za organizem s tako majhnim genomom presenetljivo. Okužujejo zelo veliko rastlinskih vrst in velikokrat povzročajo huda bolezenska znamenja in propadanje rastlin, kar pri gojenih rastlinah pomeni veliko gospodarsko in posledično socialno škodo.

Zlata trsna rumenica je bolezen vinske trte, ki v večini primerov vodi do propada okuženih trsov. V Evropi jo povzročajo različni sevi vrste fitoplazme, povzročiteljice zlate trsne rumenice. V zadnjih letih je bilo več poročil o prisotnosti te fitoplazme tudi na negojenih rastlinah, predvsem na navadnem srobotu (*Clematis vitalba* L.). V Sloveniji je ta fitoplazma prisotna zadnjih pet let in se je že razširila v vse vinorodne dežele. Ker znamenja bolezni po navadi opazimo, ko je že prepozno, lahko bolezen vodi do hitrega propada velikih površin vinogradov in s tem povzroči ogromno gospodarsko škodo. S tako epidemijo so se srečali v Franciji ob koncu prejšnjega stoletja. V primeru Slovenije, kjer imamo veliko majhnih vinogradov, bi epidemija zlate trsne rumenice lahko v nekaj letih uničila njihov velik delež. Zaradi preprečevanja epidemij je pomembno pravočasno odkrivanje okuženih trsov. To pa je možno le z učinkovitimi diagnostičnimi metodami, s katerimi lahko izsledimo vire okužb. Predpogoj za dobro diagnostiko je poznavanje preučevanega materiala. Ker v Sloveniji ne vemo, kateri sevi fitoplazemske povzročiteljice zlate trsne rumenice so prisotni, posledično ne poznamo izvora bolezni.

V diplomski nalogi bomo z molekulskimi metodami okarakterizirali vse do sedaj zbrane vzorce vinskih trt in navadnih srobotov okuženih s fitoplazemske povzročiteljico zlate trsne rumenice, pod drobnogled pa bomo vzeli tudi druge rastline, ki rastejo v okolici okuženih vinogradov in predstavljajo potencialne naravne rezervoarje te fitoplazme. Tako bomo poskušali dopolniti sliko stanja zlate trsne rumenice v Sloveniji, določili nove relacije med gostitelji ter poskušali določiti glavne vire in načine prenašanja zlate trsne rumenice v Sloveniji.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 FITOPLAZME

#### 2.1.1 Osnovne značilnosti

Fitoplazme so patogene bakterije ki povzročajo številne bolezni na divjih in gojenih rastlinah (Bertaccini, 2007). Prvi jih je odkril Doi s sodelavci leta 1967, ko je z elektronskim mikroskopom opazoval floem rastlin, ki so rumenele in propadale. Opisal jih je kot mikoplazmam podobna telesa. Pred tem odkritjem je prevladovalo mnenje, da bolezni, kot je na primer rumenica in pritlikavost riža, povzročajo virusi, saj ste patogeneze virusov in fitoplazem na prvi pogled podobni. Ne moremo jih gojiti v razmerah *in vitro*, prenašajo jih žuželke in imajo pogosto podobna bolezenska znamenja (Hogenhout in sod., 2008).

Celice fitoplazem obdaja plazmalema in nimajo celične stene. Pod elektronskim mikroskopom izgledajo okrogla, redkeje nitasta telesa s premerom 200-800 nm (Kuske in Kirkpatrick, 1992, Lée in sod., 2000). Razmnožujejo se z cepitvijo. Imajo majhen genom, s 530 kbp do 1350 kbp in le od 23 do 28 molekulske odstotkov C-G nukleotidnih parov (Marcone in sod., 1999). Ker v genomu ni večine genov, ki kodirajo encime v osnovnih metabolnih poteh, je njihovo preživetje povsem odvisno od gostiteljev (Tran-Nguyen in sod., 2008; Bai in sod., 2006; Oshima in sod., 2004)

V večini primerov fitoplazme potrebujejo za preživetje in širjenje v naravi tako rastlinskega kot žuželčjega gostitelja. V rastlinah živijo izključno v floemskih celicah sitastih cevi, zelo redko se pojavljajo tudi v floemskih parenhimskih celicah. Znotraj rastline lahko med celicami prehajajo skozi plazmodezme in tako potujejo v vse dele rastline. Najvišje koncentracije fitoplazem najdemo v zrelih prevajalnih tkivih. Žuželčji gostitelji in hkrati glavni prenosalci fitoplazem, se prehranjujejo s sesanjem rastlinskega floemskega soka. Fitoplazme so v žuželkah predvsem v prebavnem traktu, hemolimfi in žlezah slinavkah. Gostiteljske žuželke pripadajo družinam Cicadellidae, Fulgoromorpha in Psyllidae v redu Hemiptera (Weintraub in Beanland 2006). Fitoplazme so občutljive na antibiotike iz skupine tetraciklinov, ne pa tudi na penicilin (Ishii in sod., 1967).

#### 2.1.2 Življenjski cikel in interakcije z gostitelji

Fitoplazme se z rastline na rastlino lahko prenašajo vegetativno s cepljenjem okuženih cepičev na zdravo podlago ali s cepljenjem zdravih cepičev na okuženo podlago. Redko in v nizkih koncentracijah se lahko prenesejo tudi na zarodke rastlin, kar je bilo dokazano v primeru fitoplazme, ki povzroča letalno rumenenje kokosovih palm (Nipah in sod., 2007) in v primeru fitoplazme, ki pri lucerni (*Medicago sativa L.*) povzroča simptome čarovniške metle (Bertaccini, 2007)

Fitoplazme so skupaj z dvema vrstama spiroplazem posebne med rastlinskimi patogeni, saj se lahko razmnožujejo znotraj dveh gostiteljev iz različnih kraljestev. So obligatni

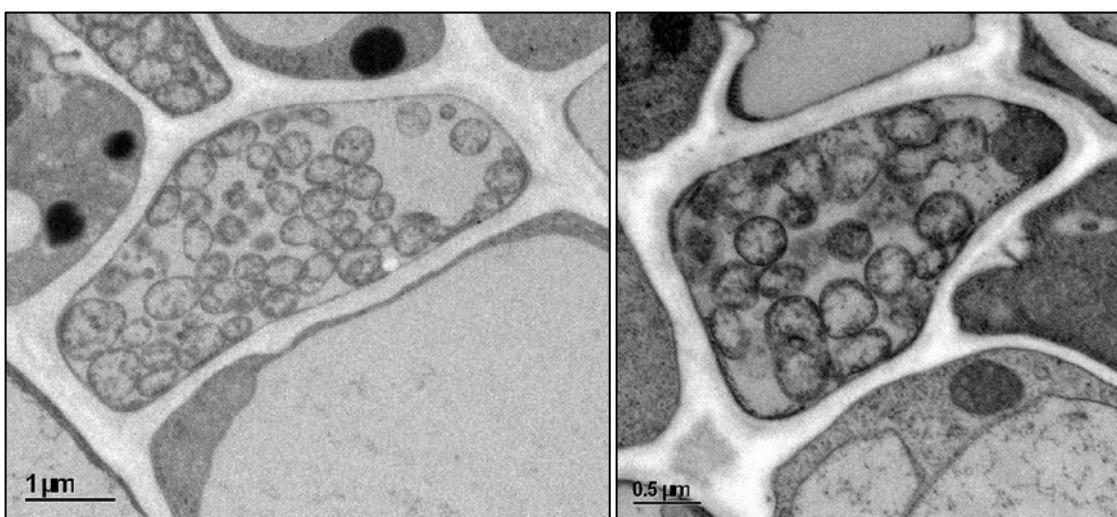
paraziti/simbionti tako rastlin kot žuželk. V splošnem velja, da fitoplazme prezimujejo v rastlinah, poleti pa jih razširjajo žuželke.

Fitoplazme imajo širok spekter rastlinskih gostiteljev, ki je odvisen predvsem od tega, na katerih vrstah se hrani njihov žuželčji prenašalec. Fitoplazma *Candidatus Phytoplasma asteris* ima vsaj 30, večinoma polifagnih, žuželčjih prenašalcev in lahko okuži več kot 80 različnih vrst rastlin (Hogenhout in sod., 2008). Fitoplazme iz iste filogenetske skupine in/ali podskupine lahko okužijo rastline iz različnih filogenetskih skupin, medtem ko jih prenaša ista ali zelo sorodna vrsta žuželk (Boudon-Padieu, 2003).

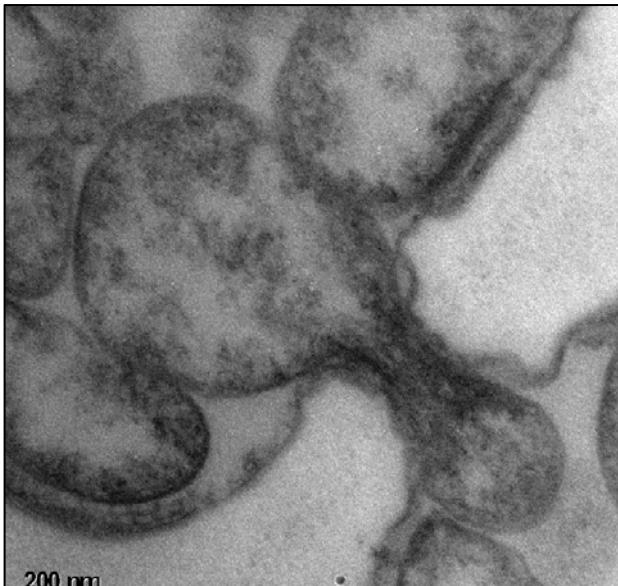
Ko se žuželka prehranjuje na rastlini, okuženi s fitoplazmami, skupaj s floemskim sokom posrka tudi fitoplazme. Fitoplazme se nato namnožijo v srednjem prebavilu žuželke. Če je žuželka gostiteljska za fitoplazmo, se fitoplazme pritrdijo na membrane epitelnih celic v srednjem prebavilu. Od tam nato prehajajo skozi steno v hemolimfo. Za spiroplazme in mikoplazme je znano, da imajo posebne koničaste strukture za pritrjevanje na membrane, medtem ko je mehanizem pri fitoplazmah za enkrat še neznan. Je pa znan vsaj en protein (AMP- antigenic membrane protein), ki je pomemben za vdor *Ca. P. asteris* OY v gostitelja (Suzuki in sod., 2006). Ko fitoplazme preidejo bazalno membrano epitela srednjega prebavila, se lahko namnožijo v celotnem telesu gostitelja. Preko hemolimfe nato potujejo do žleze slinavke, kjer nato preidejo v slino gostitelja. Nekaj fitoplazem lahko tudi ostane v sekretornih celicah slinavke, kjer se močno namnožijo. Ko se žuželka hrani, preko slino okužijo nove rastline.

Čas od trenutka, ko žuželka sprejme fitoplazmo od rastline in z njo okuži novo rastlino, je odvisen tako od vrste fitoplazme kot tudi od žuželke in traja od 8 do 80 dni. V rastlini se bolezenska znamenja razvijejo po sedmih dneh do 24 mesecih od inokulacije, odvisno od vrste rastline in fitoplazme (Hogenhout in sod., 2008).

V rastlinah se fitoplazme kopijo v floemskejem tkivu (slika 1), predvsem v mladih koreninah in mladih poganjkih, kjer potem povzročajo značilna bolezenska znamenja. Med celicami sitastih cevi prehajajo skozi plazmodezme (slika 2). Fitoplazme lahko v nekaterih rastlinah sprožijo hudo nekrozo floema. (Hogenhout in sod., 2008).



**Slika 1: Fitoplazme tipa brestove rumenice EY-1, v celicah floema v listni žili madagaskarskega zimzelena (*Catharanthus roseus*). Slika je bila posneta s presevnim elektronskim mikroskopom.**  
**Foto: Magda Tušek Žnidarič, Nacionalni inštitut za biologijo.**



**Slika 2: Prehajanje fitoplazme tipa EY-1 skozi plazmodezmo med dvema celicama floemskega tkiva madagaskarskega zimzelena (*Catharanthus roseus*). Slika je bila posneta s presevnim elektronskim mikroskopom.**  
**Foto: Magda Tušek Žnidarič, Nacionalni inštitut za biologijo.**

Fitoplazemske okužbe imajo na rastline v splošnem negativne učinke. Pri gostiteljskih žuželkah okužba ali ne vpliva na žuželko, ali pa žuželka pogine še preden bi lahko fitoplazme prenesla na nove rastline. Obstajajo pa tudi primeri, ko fitoplazme ugodno vplivajo na žuželke. Primer take interakcije sta škržatek *Macrosteles quadrilineatus* Forbes in fitoplazma *Ca. P. asteris*. Osebki, ki se hranijo na okuženih rastlinah živijo tudi do 50 % dlje, samice pa izležejo kar dvakrat več jajčec, če se hranijo z okuženimi rastlinami v primerjavi s tistimi, ki so se hranile na zdravih rastlinah (Beanland in sod., 2000). Tovrstna povezava nakazuje zelo dolg soobstoj dveh organizmov, v katerem sta se prilagodila eden na drugega.

Evolucijske povezave med fitoplazmami in žuželkami so pomembne tudi s stališča epidemiologije rastlinskih bolezni. Fitoplazme, ki so vezane na polifagne žuželke, navado povzročajo manjšo škodo specifični vrsti rastline, saj se na njej žuželke le občasno hranijo. Vendar imajo take fitoplazme številne rezervoarje v drugih vrstah rastlin, na katerih se njihov žuželčji gostitelj prehranjuje. Ti rezervoarji so pogosto latentni, kar pomeni, da okužene rastline ne kažejo znamenj okužbe in jih je zato težje odkriti. Primer take povezave je fitoplazma, ki pri vinski trti povzroča bolezen počrnelost lesa. Nasprotno pa fitoplazme, povezane z oligo-/monofagnimi žuželkami, rastlinam povzročajo veliko škodo. Taka fitoplazma se v monokulturnih nasadih rastlin zelo hitro razširi. Ob hranjenju žuželka rastline inokulira na več mestih hkrati, kar pomeni večji vnos fitoplazem v rastlino. V takih primerih so tudi bolezenska znamenja pri rastlinah mnogo hujša. Primer take bolezni je zlata trsna rumenica.

Fitoplazme lahko tudi modelirajo odnose med rastlinami in žuželkami. Rastline, na katerih se določena vrsta žuželk po navadi ne hrani, lahko po okužbi s fitoplazmami postanejo nov, lahko pa tudi prevladujoči gostitelj za to vrsto žuželk (Purcell, 1988).

Pred kratkim so s pomočjo mikromrež in tehnike PCR v realnem času pokazali, da fitoplazma iz skupine 16srXII, ki povzroča bolezen počrnelost lesa pri vinski trti, značilno spremeni transkriptom rastlinskega gostitelja. Pokazali so povečano izražanje genov primarnega metabolizma sladkorjev, predvsem genov za degradacijo saharoze, in genov za sintezo flavonoidov ter znižano raven izražanja genov iz sintezne poti izoprenov in terpenoidov v okuženih trtah v primerjavi z zdravimi (Hren in sod., 2009). Spremenjeni metabolizem s fitoplazmami okuženih rastlin, je verjetno glavni razlog, da neka rastlina postane bolj privlačna/sprejemljiva za žuželke, vendar pa so za potrditev podobnih interakcij potrebne nadaljnje raziskave.

### 2.1.3 Sistematika fitoplazem

Dvajset let po odkritju je identifikacija fitoplazem temeljila predvsem na fluorescenčni in elektronski mikroskopiji (Bertaccini, 2007). Podrobnejše proučevanje in boljšo sistematiko fitoplazem je od začetka osemdesetih let prejšnjega stoletja dalje omogočila šele uporaba molekulskeih orodij, kot so verižna reakcija s polimerazo (PCR) in vgnezdeni PCR, analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov PCR produktov in določanje nukleotidnih zaporedij. Z analizo zaporedja gena za 16S rRNA so fitoplazme nato nedvoumno razvrstili v svojo monofiletsko vejo znotraj razreda Mollicutes. Leta 1994 je skupina za taksonomijo fitoplazem na desetem kongresu mednarodne organizacije za mikoplazmologijo sprejela ime fitoplazme namesto mikoplazmam podobni organizmi, leta 2004 pa so določili pravila, po katerih se nova bakterijska vrsta lahko uvrsti v samostojen takson *Candidatus Phytoplasma* (IrPCM, 2004).

Nova vrsta se določi na osnovi zaporedja gena za 16S rRNA, ki naj bo daljše od 1200 bp. Zaporedje je referenčno in mora biti javno dostopno. Sevi, ki se v zaporedju gena za 16S rRNA, razlikujejo od referenčnega zaporedja za v več kot 2,5% (manj kot 97,5% podobnosti) so nove vrste fitoplazem. Sev dobi oznako nove vrste tudi, če se ima z referenčnim sevom več kot 97,5% podobnosti, vendar pa predstavlja jasno ločeno ekološko populacijo. Jasno ločena populacija pomeni, da jih prenaša različen žuželčji prenašalec, imata fitoplazmi različne rastlinske gostitelje in obstaja dokaz o značilni molekulske različnosti (diverziteti), ki je bil pridobljen s pomočjo hibridizacije na klonirane DNA sonde, seroloških tehnik (ELISA) ali PCR analize (IrPCM, 2004).

Glede na gen za 16S rRNA je bilo znotraj rodu *C. P.* opisanih 26 novih vrst, ki pripadajo 15 skupinam (Lee in sod., 2007). Zaradi visoke ohranjenosti zaporedja gena za 16S rRNA, se za natančnejše sistematske in filogenetske študije uporabljajo tudi drugi deli genoma. Najpogosteje uporabljeni so gen za ribosomalni protein *rp(V)* (Lée in sod., 1998), del genoma med 16s in 23s rRNA, gena *secY* (Martini in sod., 2002) in *sec A* (Hodgetts in sod., 2008), *map*, *uvrB* (Arnaud in sod., 2007) ter drugi genomske fragmenti. Na osnovi teh analiz je bila že postavljena nova sistematika, po kateri so fitoplazme razvrščene v 28 skupin (Wei in sod., 2007), a se v seznam dodajajo vedno nove.

### 2.1.4 Posledice okužbe s fitoplazmami

Pri rastlinah fitoplazme povzročajo razvoj različnih bolezenskih znamenj, kot so metličavost (skupki prekomerno rastočih mladih poganjkov) pri mladih, razvijajočih se poganjkih, preobrazba cvetov v listom podobna tkiva, zelenjenje nezelenih tkiv in slabo olesenevanje stebel, podaljšana rast stebel, tvorba šopastih, vlknastih sekundarnih korenin, rdečenje listov in stebel ter vse splošno rumenenje rastline, nekroze floemskega tkiva in propad rastline (Hogenhout in sod., 2008).

Zelo redko so nekatere fitoplazme lahko patogene tudi za žuželčje gostitelje. Nekatere fitoplazme imajo pozitivne učinke na žuželke s vplivanjem na njihovo razmnoževanje, selitve in izbor rastlinskih gostiteljev.(Beanland in sod., 2000; Hogenhout in sod., 2008)

## 2.2 TRSNE RUMENICE

Različne fitoplazme, ki jih prenašajo različni žuželčji prenašalci, povzročajo na vinski trti bolezni, ki jih s skupnim imenom imenujemo trsne rumenice (Preglednica 1).

**Preglednica 1: Seznam znanih trsnih rumenic s povezanimi fitoplazmami, žuželčjimi prenašalci, rastlinskimi gostitelji in razširjenostjo v svetu. Vir: (Boudon-Padieu, 2003)**

Ime bolezni	Ime fitoplazme	Filogenetska skupina	Znani žuželčji prenašalec na vinsko trto	Preferenčni gostitelj prenašalca	Regije kjer se bolezen pojavlja
Flavescence dorée, zlata trsna rumenica	Sevi FD,	EY ali 16srV	<i>Scaphoideus titanus</i> Ball	<i>Vitis</i> sp.	Francija, Italija, Španija, Balkanski polotok
Palatine Grapevine Yellows	PGY	EY ali 16srV	<i>Oncopsis alni</i> Schrank	<i>Alnus glutinosa</i> L.	Nemčija
Bois noir, Počrnelost lesa	stolbur	stolbur ali 16sr XII-A	<i>Hyalesthes obsoletus</i> Sign	<i>Convolvulus arvensis</i> L., <i>Urtica dioica</i> , <i>Ranunculus</i> , <i>Solanum</i> in <i>Lavandula</i>	Evropa, Izrael, Libanon
Avstralska trsna rumenica	<i>Candidatus Phytoplasma australiense</i>	stolbur ali 16sr XII-B	Neznan	Neznan	Avstralija
Avstralska trsna rumenica	Tomato big bud	FSP ali 16srII	Neznan	Neznan	Avstralija
Buckland valley trsne rumenice	BVGY	AY ali sorodna 16srI	Neznan	Neznan	Avstralija
Trsna rumenica	Aster yellows	AY ali 16srI-A	Neznan	Neznan	Italija
S-Ameriške trsne rumenice	Western X	W-X ali 16srIII-I	Neznan	Neznan	ZDA – New York, Virginia

Trsne rumenice so znane približno 50 let. Po prvem izbruhu zlate trsne rumenice v jugozahodni Franciji v petdesetih letih prejšnjega stoletja so kasneje opazili podobne bolezni vinske trte tudi v drugih regijah in državah od Evrope, S. Amerike, Bližnjega Vzhoda, južne Afrike do Avstralije. Bolezenska znamenja trsnih rumenic so podobna za večino rumenic, razlikujejo se le v jakosti. Tipična znamenja so rumenenje listov pri belih in rdečenje pri rdečih sortah vinske trte, zvijanje listov navzdol, neolesenevanje poganjkov, propadanje cvetov in grozdov ter končno propadanje celotne rastline in smrt. V Evropi in tudi pri nas sta najpogosteji in ekonomsko najpomembnejši bolezni počrnelost lesa in zlata trsna rumenica, ki imata popolnoma neločljiva bolezenska znamenja in zelo različno epidemiologijo. Prva je splošno razširjena ter povzroča zmanjšanje pridelka ter nižjo slatkorna stopnjo grozdja, medtem ko je druga karantenska bolezen, ki izjemno hitro širi med vinogradi in povzroča propad trsov (Boudon-Padieu, 2003).

## 2.3 ZLATA TRSNA RUMENICA

### 2.3.1 Splošno o bolezni

Zlata trsna rumenica ali *Flavescence dorée* (v nadaljevanju FD) je bolezen vinske trte, katere povzročitelj so sevi fitoplazme FD. Edini znani prenašalec v Evropi je ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball.) (Angelini in sod., 2001). Bolezenska znamenja zlate trsne rumenice (slike 12-17 v poglavju Rezultati) se začnejo pojavljati konec junija in se stopnjujejo proti koncu rastne sezone. Najprej se pojavi bledikavost listov, pri belih sortah listje nato porumeni, pri rdečih pa pordeči. Listni robovi se vihajo navznoter, listi postanejo togi, hitro dozorevajo in predčasno odpadejo. Tkivo slabo oleseneva, zato so rozge povešene, enoletne pa pozimi pogosto pozebejo in odmrejo. Močni znaki se kažejo tudi na grozdju, saj se okužene trte po cvetenju močno osipajo, preostale oplojene jagode pa venejo, se sušijo in odpadajo. Poškodovana je tudi pecljevin, ki je šibka, tako da odpadajo tudi celi grozdi. Okuženi trsi spomladis pozneje in néenakomerno odganjajo. Okužene trte ne kažejo vsako leto enako močnih znakov okužbe, z leti pa shirajo in se posušijo (Mehle in sod., 2009). Okrevanje po okužbi s FD je zelo redko, in se zgodi le v primeru, ko je rastlina izpostavljena okuženim ameriškim škržatkom le eno rastno sezono. Mehанизem okrevanja je za enkrat še neznan.

Po prvotni hipotezi dr. Caudwella, naj bi fitoplazma FD prišla iz Severne Amerike skupaj s prenašalcem ameriškim škržatkom. Novejše raziskave pa kažejo, da je ta fitoplazma evropskega izvora in je bila na vinsko trto prenesena naključno, z do sedaj še nepotrjenega divjega gostitelja. Zlata trsna rumenica postala resna in epidemična bolezen šele s prihodom prenašalca, ki je monofagen na vinski trti in sočasno tudi gostitelj za fitoplazmo FD. (Boudon-Padieu, 2010a).

### 2.3.2 Raznolikost sevov fitoplazme FD, povzročiteljice zlate trsne rumenice

Na osnovi analize PCR RFLP gena za 16S rRNA fitoplazemske seve FD uvrščamo v skupino 16SrV, imenovano tudi brestove rumenice (EYs) (Lée in sod., 1998). EYs je tretja največja skupina fitoplazem in ena izmed najbolj raznolikih. Sestavlja jo izolati, ki

povzročajo bolezni pri brestu- EY, vinski trti- FD, jelši- ALY, robidah- RuS, češnji- CLY, in drugih. Podobnost izolatov v zaporedju gena za 16S rRNA je med 98,6 in 99,9%, vendar sevi zasedajo različne ekološke niše. Za natančnejšo klasifikacijo, so raziskovalci uporabili analizo PCR RFLP in primerjavo zaporedij fragmenta rp(V) z genoma *rpl 22 in rps3* za ribosomska proteina (Lee in sod., 2004a), fragmenta FD9 z genom *secY*, ki kodira proteinsko translokazo in delom gena *rplO*, ki kodira protein L15 v 50S v ribosomalni podenoti (Daire in sod., 1997); Angelini in sod., 2001), gena *map* in *infA*, ki kodirata metionin aminopeptidazo in iniciacijski dejavnik translacije A ter genov *uvrB* in *degV* (Arnaud in sod., 2007). Filogenetske odnose med izolati so poskušali določiti tudi z metodo mobilnosti heterodupleksov DNA, kjer so uporabili produkte PCR fragmenta FD9 (Angelini in sod., 2003) V preglednici 2 so zbrani do sedaj znani sevi iz skupine 16SrV ter njihova najosnovnejša klasifikacija glede na profile RFLP. Fitoplazma FD še ni bila uradno taksonomsko razvrščena v takson *Candidatus Phytoplasma*.

**Preglednica 2: Sevi fitoplazem , ki predstavljajo 16Sr V filogenetsko skupino, z njimi povezane bolezni, gostitelji, prenašalci in PCR RFLP klasifikacija v podskupine (Lée in sod., 2004)**

Oznaka seva	Slovensko ime za bolezen	Angleško ime za bolezen , latinsko ime gostitelja	Latinsko ime žuželčjega prenašalca	Izvor	RFLP podskupina glede na:		
					16SrV	rpV	secY
RuSR19	Pritlikavost robide	Rubus stunt, <i>Rubus caesius</i>	Neznan	Nemčija	E	I	/
RuS400	Pritlikavost robide	Rubus stunt, <i>Rubus fruticosus</i>	Neznan	Italija	E	I	/
RuS971	Pritlikavost robide	Rubus stunt, <i>Rubus idaeus</i>	Neznan	Švica	E	I	/
RUS	Pritlikavost robide	Rubus stunt, <i>Catharanthus</i>	Neznan	Italija	E	I	I
ALY	Jelšine rumenice	Alder yellows, <i>Catharanthus</i>	Neznan	Italija	C	H	H
ALY882	Jelšine rumenice	Alder yellows, <i>Alnus glutinosa</i>	<i>Oncopsis alni</i>	Nemčija	C	K	K
ALY1068	Jelšine rumenice	Alder yellows, <i>Alnus glutinosa</i>	Neznan	Italija	C	H	/
HD1		<i>Apocynum cannabinum</i>	Neznan	New York, ZDA	C	J	J
FD70	Zlata trsna rumenica	Flavescence dorée, <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Francija	C	F	F
FD-D	Zlata trsna rumenica	Flavescence dorée, <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Italija	D	E	E
FD-C	Zlata trsna rumenica	Flavescence dorée, <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Italija	C	D	D
FD (Lomb/Piem)	Zlata trsna rumenica	Flavescence dorée, <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Italija	C	G	/
VC		<i>Parthenocissus quinquefolia</i>	Neznan	Florida, ZDA	C	/	/
SpaWB229	Metličavost žuke	Spartium witches'-broom, <i>Spartium junceum</i>	Neznan	Italija	C	L	L

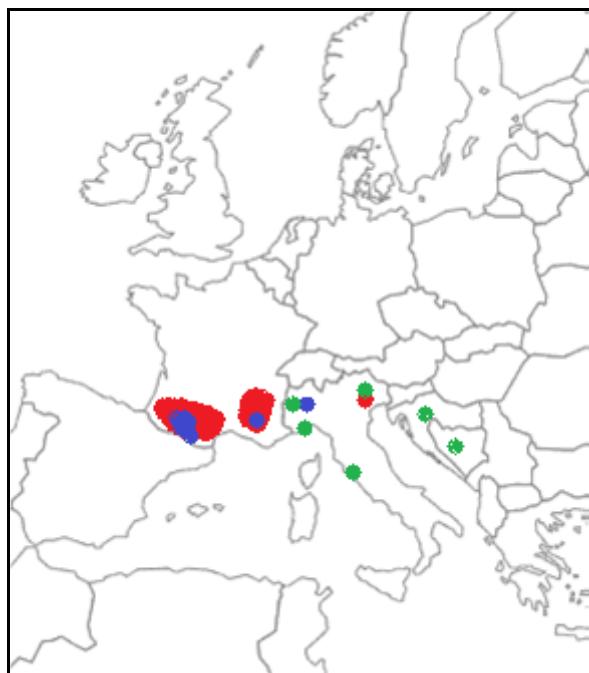
Se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 2: Sevi fitoplazem , ki predstavljajo 16Sr V filogenetsko skupino, z njimi povezane bolezni, gostitelji, prenašalci in PCR RFLP klasifikacija v podskupine (Lée in sod., 2004)**

Oznaka seva	Slovensko ime za bolezen	Angleško ime za bolezen , latinsko ime gostitelja	Latinsko ime žuželčjega prenašalca	Izvor	RFLP podskupina glede na:		
					16SrV	rpV	secY
SpaWB251	Metličavost žuke	Spartium witches'-broom, <i>Spartium junceum</i>	Neznan	Italija	C	L	/
EY1	Brestove rumenice	Elm yellows, <i>Ulmus americana</i>	<i>Scaphoideus luteolus</i>	New York, ZDA	A	A	A
EY125	Brestove rumenice	Elm yellows, <i>Ulmus minor</i>	Neznan	Italija	A	A	/
EY626	Brestove rumenice	Elm yellows, <i>Ulmus minor</i>	Neznan	Italija	A	A	M
EY627	Brestove rumenice	Elm yellows, <i>Ulmus minor</i>	Neznan	Italija	A	A	/
JWB		<i>Ziziphus jujuba</i>	<i>Hishimonoides chinesis</i>	Kitajska	B	C	C
PY-In	Breskove rumenice	Peach yellows, <i>Prunus persica</i>	Neznan	Indija	B	M	N
CLY5	Češnjeve rumenice	Cherry lethal yellows, <i>Prunus avium</i>	Neznan	Kitajska	B	B	B

Na osnovi rezultatov dosedanjih raziskav lahko ugotovimo, da obstaja več različnih sevov FD, ki jih razvrščamo v tri skupine (preglednica 2, slika 3). V skupini FD1 je izolat FD-70, ki je povzročil epidemijo v Franciji leta 1970 (Boudon-Padieu 2010a). Med posameznimi sevi znotraj skupine FD1 je majhna variabilnost. Izolat je odgovoren za okoli 17 % primerov okužbe v Franciji (Arnaud in sod., 2007) z žarišči predvsem na jugozahodu. Sev je prisoten še v italijanski pokrajini Lombardia-Piemonte (Martini in sod., 2002, Boudon-Padieu, 2010a). Skupina FD2 je zelo homogena, saj variabilnosti med sevi praktično ni. Sestavlja jo sevi FD88, FD92 iz Francije ter sev FD-D iz Italije, ki so med seboj identični v sekvenkah *map*, *secY* in *uvrB-degV*. To kaže na klonsko razširjanje z okuženim rastlinskim materialom in prenosom okuženih škržatkov med regijami s trgovino z okuženimi trsi. Izolati iz skupine FD2 se pojavljajo po celotni Franciji, kjer predstavljajo 83% vseh primerov okužbe s FD, severni Italiji in drugje. Skupina FD3 je najbolj variabilna izmed vseh treh (Arnaud in sod., 2007). Sestavlja jo izolati iz okuženih vinskih trt severne Italije (FD-C), Slovenije, Hrvaške in Srbije, potrjene pa so tudi najdbe na navadnem srobotu (*Clematis vitalba*) (Filippin in sod., 2009).



Slika 3: Pojavljanje različnih skupin FD v Evropi. FD1 modro, FD2 rdeče, FD3 zeleno. Povzeto po (Boudon-Padieu, 2010a).

Jelšina rumenica (ALY), ki jo povzroča fitoplazma sorodna FD, je prisotna v jelšah od Francije, Italije, Švice, Nemčije do vzhodne baltske regije, ni pa poznana v Severni Ameriki. Zanimivo je, da nekateri izolati ALY na podlagi podobnosti zaporedij genov *map* in *secY* pripadajo ali FD1 ali FD2 skupini (Maher in sod. 2007, Arnaud in sod. 2007), drugi so bolj podobni izolatom, ki v Nemčiji povzročajo bolezen Palatine grapevine yellows (PGY) (Maixner in sod., 2000) ali pa izolatom brestovih rumenic.

Raznolikost FD izolatov in njihova sorodnost z različnimi izolati ALY podpira hipotezo, da so bili nekateri sevi, sorodni današnjim FD sevom, preneseni iz naravnih rezervoarjev kot je jelša, na vinsko trto s polifagnimi žuželkami, ki so se na trti hrani občasno. Od tu naprej je *S. titanus* razširil fitoplazme med trsi in vinogradi in s tem povzročil epidemijo. Zgoraj opisano sosledje naj bi se zgodilo v treh ločenih primerih, kar naj bi vodilo v evolucijo treh tipov fitoplazme FD (Arnaud in sod., 2007).

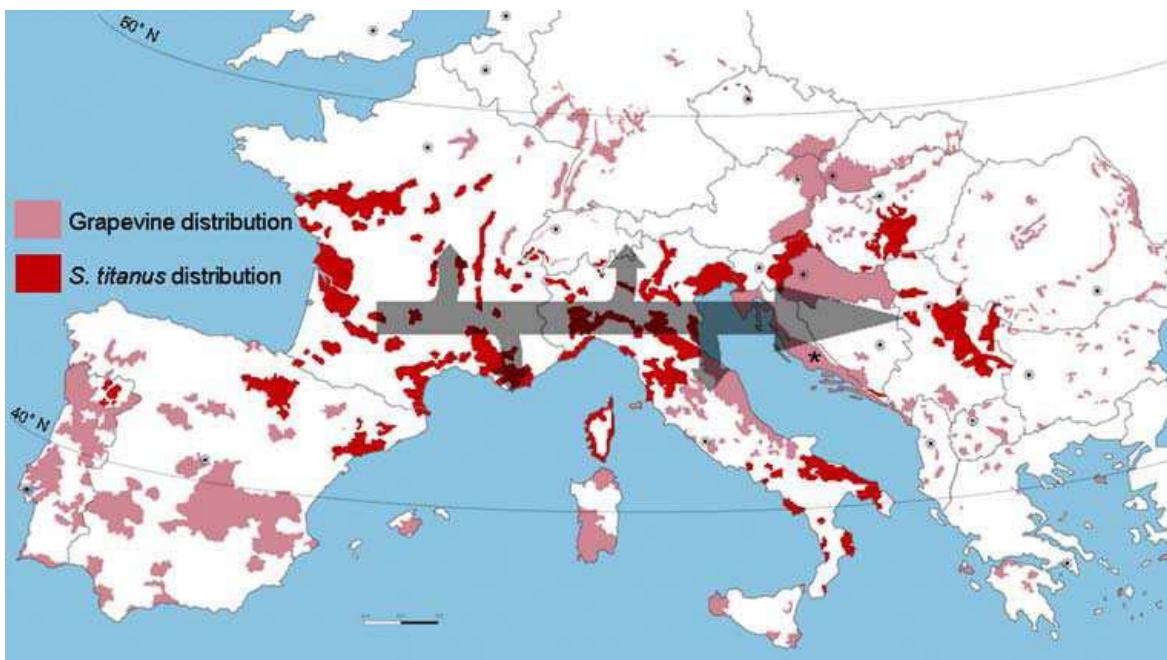
### 2.3.3 Ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball, 1932) – prenašalec fitoplazme FD

Ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball, 1932) (slika 4) je doma v Severni Ameriki.



Slika 4: Ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball.), levo larva, desno odrasli osebek. (Boudon-Padieu, 2010b)

V Evropi je bil prvič najden leta 1958 v jugozahodni Franciji, nato pa se je postopoma razširil skoraj po celi Evropi (slika 5).



Slika 5: Razširjenost ameriškega škržatka v Evropi (temno rdeče) in smer širitve (siva puščica). Svetlo rdečo so označena področja kjer raste vinska trta. (Boudon-Padieu, 2010b)

Ameriški škržatek je uvrščen v družino malih škržatkov (Cicadellidae) (Wikipedia, 2010). Celoten življenjski cikel zaključi na vinski trti, na kateri se tudi prehranjuje. Žuželka prezimi v lubju v obliki jajčec, katera se izležejo v sredini maja. Izleganje sovpada z ozelenitvijo trte, tako da se lahko larve hranijo na mladih hranljivih listih in se tako hitreje razvijajo. Da se jajčeca izležejo pravi čas, potrebujejo nizke zimske temperature, ki prekinejo dormanco. V primeru mile zime se jajčeca izležejo kasneje in larve se razvijajo počasneje, ker se prehranjujejo na starejših listih (Chuche in Thiéry, 2009). Za dokončanje življenjskega cikla *S. titanus* potrebuje topla in dovolj dolga poletja, da se preko petih stopenj larve proti koncu vegetativne dobe od konca avgusta do začetka oktobra razvijejo odrasli osebki. Ti ponovno v lubje odležejo jajčeca. Zaradi podnebnih sprememb se habitat *S. titanusa* širi višje proti severu; tako ga sedaj najdemo tudi v južni Avstriji in Nemčiji ter Burgundiji (Buodon-Padieu, 2010b).

Ameriški škržatek v Evropi nima naravnih sovražnikov, ki bi omejevali velikost njegovih populacij. Da bi raziskali možnosti biološkega nadzora populacij je Nusillard in sod., (2003) raziskoval njegove naravne sovražnike v Severni Ameriki. Odkrili so kar nekaj vrst žuželk, ki so paraziti na škržatkih. Najbolj zanimiva je vrsta *Lonchodryinus flavus* Olmi, ki je močno prilagojena na rod *Scaphoideus* in divjo trto v Ameriki in predstavlja potencialno možnost biološkega nadzora v Evropi.

S prehranjevanjem na trsih, okuženih s sevi fitoplazme FD, se lahko okužijo že larvalne stopnje škržatka in osebki ostanejo kužni do konca življenja. Za pridobitev fitoplazme je dovolj že enkratno hranjenje žuželke na okuženi rastlini. V približno štirih do petih tednih se fitoplazme v škržatku namnožijo, in migrirajo v žleze slinavke, od koder lahko pri hranjenju ponovno preidejo v rastlino.

Nekatere raziskave ugotavljajo, da imajo primerki ameriških škržatkov, ki so okuženi s sevi fitoplazme FD, nižjo plodnost ter krajšo življenjsko dobo, v primerjavi z zdravimi, kar nakazuje na kratko koevolucijo med to fitoplazmo in škržatkom (Maixner, 2006).

### 2.3.4 Možni drugi prenašalce fitoplazme FD

Novejše raziskave odkrivajo nove možne naravne rezervoarje fitoplazme FD in z njimi tudi nove možne posredne prenašalce te fitoplazme na vinsko trto. Nemška skupina raziskovalcev je leta 2000 na območjih Palatine in Mosel odkrila, da lahko škržatek *Oncopsis alni* prenaša fitoplazmo PGY, ki je sorodna fitoplazmi FD, med jelšami (Maixner in Reinert, 1999) kot tudi z okužene jelše na vinsko trto (Maixner in sod., 2000). Ugotovili so, da fitoplazma PGY povzroča podobna bolezenske znamenja kot fitoplazma FD. Ker pa se *Oncopsis alni* le redko prehranjuje na vinski trti in ker na tem območju ni ameriškega škržatka, do epidemije ni prišlo. Podobno so ugotovili, da v laboratorijskih razmerah škržatek *Dictyophara europaea* lahko prenese fitoplazmo FD tipa C iz okuženega navadnega srobona na vinsko trto (Filippin in sod., 2007). Primerke *D. europaea*, okužene s fitoplazmo FD-C so do sedaj našli v severni Italiji in v Srbiji (Filippin in sod., 2007). Predpostavlja možnost, da ima ta škržatek vlogo pri širjenju tega tipa fitoplazme med naravnim rezervoarjem in vinsko trto.

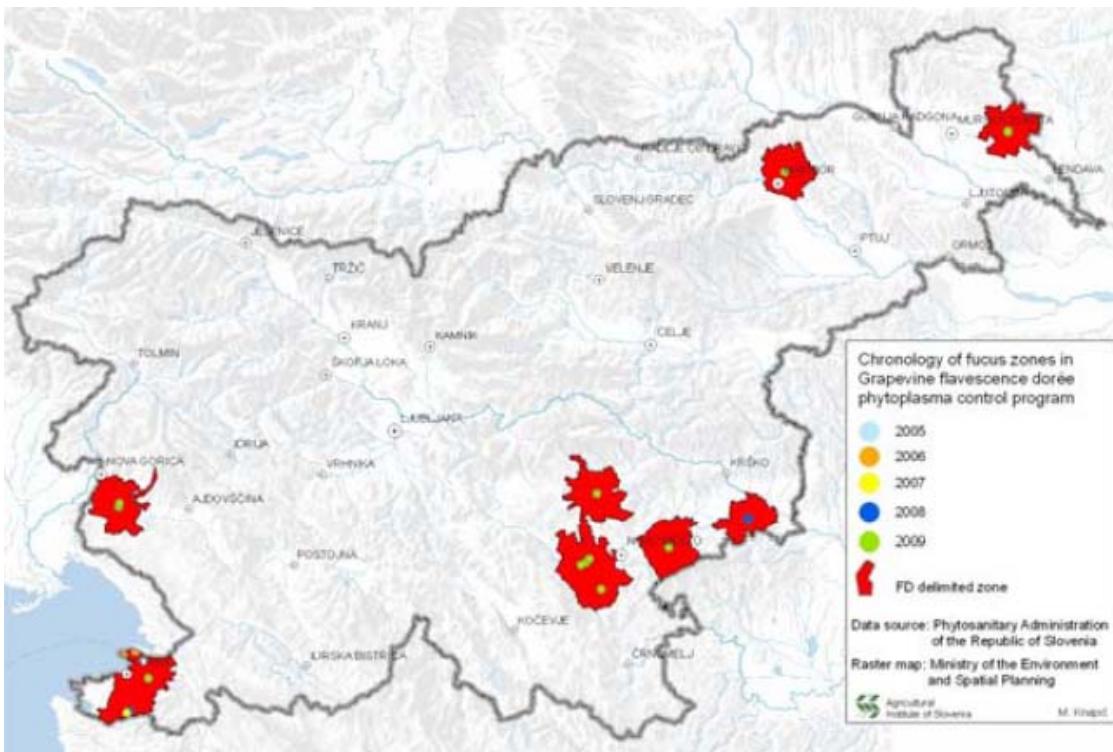
Spričo dejstva, da je o fitoplazmah še vedno veliko neznanega, ne moremo izključiti možnosti obstoja tudi drugih polifagnih prenašalcev, ki se občasno hranijo na vinski trti kot tudi na drugih rastlinah in s tem širijo FD ter vzpostavljajo diskretne naravne rezervoarje zlate trsne rumenice.

### 2.3.5 Epidemiologija zlate trsne rumenice in ukrepi za zatiranje

Razširjanje fitoplazme FD poteka predvsem na dva načina. Na kratke razdalje se širi z ameriškim škržatkom, na dolge razdalje med regijami in državami pa s transportom okuženega rastlinskega materiala. Za nastanek epidemije je pomemben predvsem prvi način, saj se bolezen v primeru odsotnosti populacije ameriškega škržatka ne razširi med trsi (Maixner, 2006; Boudon-Padieu, 2003). Fitoplazma FD je že razširjena po večjem območju zahodne in srednje Evrope, od Portugalske na zahodu (Sousa in sod., 2009) do Srbije na vzhodu (Duduk in sod., 2007), na severu pa do Severne Burgundije v Franciji.

V Evropski uniji je FD karantenska bolezen, za katero obstajajo obvezni ukrepi sanacije in omejevanja žarišč te bolezni. Take ukrepe je sprejela Francija že leta 1987, Italija pa leta 2000, ob izbruhu FD v francoski obmejni regiji Saviole. Posebni nadzor trsnih rumenic v Sloveniji izvaja Fitosanitarna uprava Republike Slovenije (FURS) od leta 2002. V okviru posebnega nadzora diagnostični del poteka na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Fitoplazmo FD so prvič potrdili leta 2005 v okolici Kopra (Hren, 2007). V letih 2006 in 2007 je bila FD ponovno ugotovljena na isti lokaciji in poleg tega še na treh novih lokacijah v slovenski Istri. V letu 2008 je bila FD prvič ugotovljena izven Primorske in sicer na Dolenjskem na lokaciji Piroški vrh v bližini Brežic, v letu 2009 pa na več novih lokacijah v vseh slovenskih vinorodnih deželah, največ (6) novih žarišč je bilo ugotovljenih na Dolenjskem. Zaradi ugotovitve FD na novih lokacijah so bila z odločbami

FURSa določena razmejena območja in uvedeni fitosanitarni ukrepi. V vseh primerih je šlo za zgodnje odkritje žarišč, v katerih do izbruha FD ni prišlo (Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano RS, 2009)



Slika 6: Napredovanje zlate trsne rumenice po Sloveniji od leta 2005 do 2009. Vir:(Ministrstvo Za Kmetijstvo..., 2009)

Za omejevanje širjenja in zatiranje zlate trsne rumenice, moramo omejevati populacije ameriškega škržatka. Zelo pomembno je, da vsako rastlino z bolezenskimi znamenji čim prej testiramo in jo uničimo, če se izkaže, da je okužena s fitoplazmo FD.

### 2.3.6 Diagnostične metode za določanje fitoplazemske povzročiteljice zlate trsne rumenice

Fitoplazme po inokulaciji in okužbi rastline najprej detektiramo v koreninskih vršičkih in prevodnem sistemu korenin, nato v mladih poganjkih in nazadnje v starih poganjkih. Bolezenska znamenja se pri rastlini razvijejo šele eno leto po okužbi, kar predstavlja veliko težavo pri odkrivanju in sanaciji bolezni. V primeru, da poleti opazimo v vinogradu 5 % rastlin z bolezenskimi znamenji, obstaja verjetnost da jih je okuženih od 5 do 20-krat več, kar pomeni, da bo v naslednjem letu rastlin z bolezenskimi znamenji med 35 in 100 % (Boudon-Padieu, 2010a). Tako lahko celoten vinograd propade v samo nekaj letih, če ne sprejmemmo pravih ukrepov dovolj hitro.

Diagnostične metode za detekcijo povzročiteljic trsnih rumenic morajo biti take, da z njimi kar najhitreje zaznamo prisotnost fitoplazme. Težava diagnostike povzročiteljic trsnih rumenic je, podobno kot pri vseh fitoplazmah, da so v rastlini prisotne v nizkih koncentracijah ter zelo nenejakomerno. Znotraj iste rastline so lahko v nekaterih poganjkih fitoplazme prisotne, v drugih pa ne. Lesnate rastline, kot je vinska trta, pa pogosto vsebujejo tudi spojine, ki motijo ali onemogočajo diagnostične teste. Sodobni diagnostični

testi za fitoplazme vključujejo PCR v povezavi z vgnezdenim PCR, kjer za detekcijo specifičnih fitoplazem pomnožujemo neribosomske fragmente DNA, kot je fragment FD9 v primeru detekcije zlate trsne rumenice (Daire in sod., 1997). Razvit je tudi test za hitre presejalne teste velikega števila vzorcev, ki temelji na obratni transkripciji in PCR reakciji v enem koraku, kot vzorčni material pa lahko uporabimo neposredno listni ekstrakt (Margaria in sod., 2007). Za natančno tipizacijo skupin fitoplazem se uporablja analiza PCR RFLP (Angelini in sod., 2001; Martini in sod. 2002; Lée in sod. 2004 in drugi). Vse več je diagnostičnih testov, ki temeljijo na različnih tehnikah PCR v realnem času. Razviti so protokoli za hitro detekcijo FD fitoplazem s TaqMan® (Angelini in sod., 2007; Bianco in sod., 2004) in TaqMan® MGB tehnologijo (Hren in sod., 2007), za ločevanje FD, BN ter različnih virusov na vinski trti iz surovega ekstrakta z metodo obratne transkripcije in PCR v realnem času s TaqMan® kemijo (Margaria in sod, 2009). Za detekcijo fitoplazem se uporablajo tudi mikromreže DNA (Nicolaisen in Bertaccini, 2007). Čeprav je njihova občutljivost manjša v primerjavi z metodo PCR v realnem času, pa lahko v eni sami reakciji, oz. hibridizaciji, preverimo prisotnost velikega števila različnih povzročiteljev bolezni, v konkretnem primeru specifično detekcijo devetih različnih skupin fitoplazem (16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI, 16SrVII, 16SrIX, 16SrX in 16SrXII) in univerzalno detekcijo fitoplazem.

#### 2.4 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA IN HIPOTEZE

Glavni namen diplomske naloge je bil molekulski pregled vseh dosedanjih najdb fitoplazme FD v Sloveniji, da bi ugotovili, kateri skupini FD pripadajo. Pridobljeno znanje bo pomagalo pri načrtovanju ukrepov za zatiranju zlate trsne rumenice. V nadaljevanju naloge smo pregledali tudi divje rastline, ki bi bile lahko potencialno okužene s fitoplazmo FD in bi predstavljal možen nov naravni izvor fitoplazme. Testirali smo tudi vrsto škržatka, za katerega ni poročil o možni okuženosti z raziskovano fitoplazmo.

Poleg molekulske analize, smo v tej nalogi žeeli preveriti tudi primernost homogenizacije rastlinskega materiala v napravo FastPrep® za nadaljnjo ekstrakcijo DNA.

Na osnovi objavljenih tujih poročil smo predvidevali, da je v Sloveniji prisoten izolat iz skupine FD3, ki se je iz Primorske širil v druge vinorodne dežele. Možen vir novih žarišč naj bi bil okužen navaden srobot.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

##### 3.1.1 Vzorci iz posebnega nadzora trsnih rumenic

Večina vzorcev, uporabljenih v nalogi, je bila nabранa v okviru Programa posebnega nadzora trsnih rumenic, ki se v Sloveniji izvaja že od leta 2002 dalje in ga vodi FURS. Vzorci so natančneje predstavljeni v Prilogi A.

##### 3.1.2 Vzorčenje na terenu

Vzorce z laboratorijsko oznako od 966/09 do 986/09 smo vzorčili v vinogradih in njihovi okolici na treh lokacijah v bližini Novega mesta. Na dveh izmed treh lokacij so bile v letu 2009 potrjene najdbe z zlato trsno rumenico okužene vinske trte. Tu smo vzorčili tako okuženo vinsko trto, kot tudi rastline v neposredni okolici (srobot, dren, ribez, bukev). Na lokaciji, kjer vinske trte, okužene s fitoplazmo FD, do sedaj še nišemo našli, smo vzorčili le srobot v neposredni okolici vinograda.

Vzorčili smo nekaj listov z izraženimi bolezenskimi znanimji, iz treh različnih poganjkov na isti rastlini. Vsak vzorec smo dali v svojo vrečko in jo opremili s podatki o lokaciji vzorčenja. Za čas terenskega dela smo vzorce shranili v prenosni hladilni skrinji, nato pa smo jih do nadaljnje obdelave hranili v hladni sobi pri temperaturi +4°C.

Z namenom ugotavljanja prisotnosti fitoplazme FD v srobotu, smo dodatno vzorčili liste srobota (*Clematis vitalba*) tudi v nevinorodnih predelih Slovenije (laboratorijske oznake vzorcev od 1015/09 do 1017/09, 1045/09 ter od 1123/09 do 1127/09; glej prilogo A).

##### 3.1.3 Referenčni sevi fitoplazme FD

DNA referenčnih sevov fitoplazme FD, ki smo jih uporabili v tej nalogi nam je priskrbela Élisabeth Boudon-Padieu, Biologie et écologie des Phytoplasmes, UMR PME INRA - CNRS - Université de Bourgogne 21065 Dijon cedex, France. Uporabili smo referenčna seva FD70 in FD92.

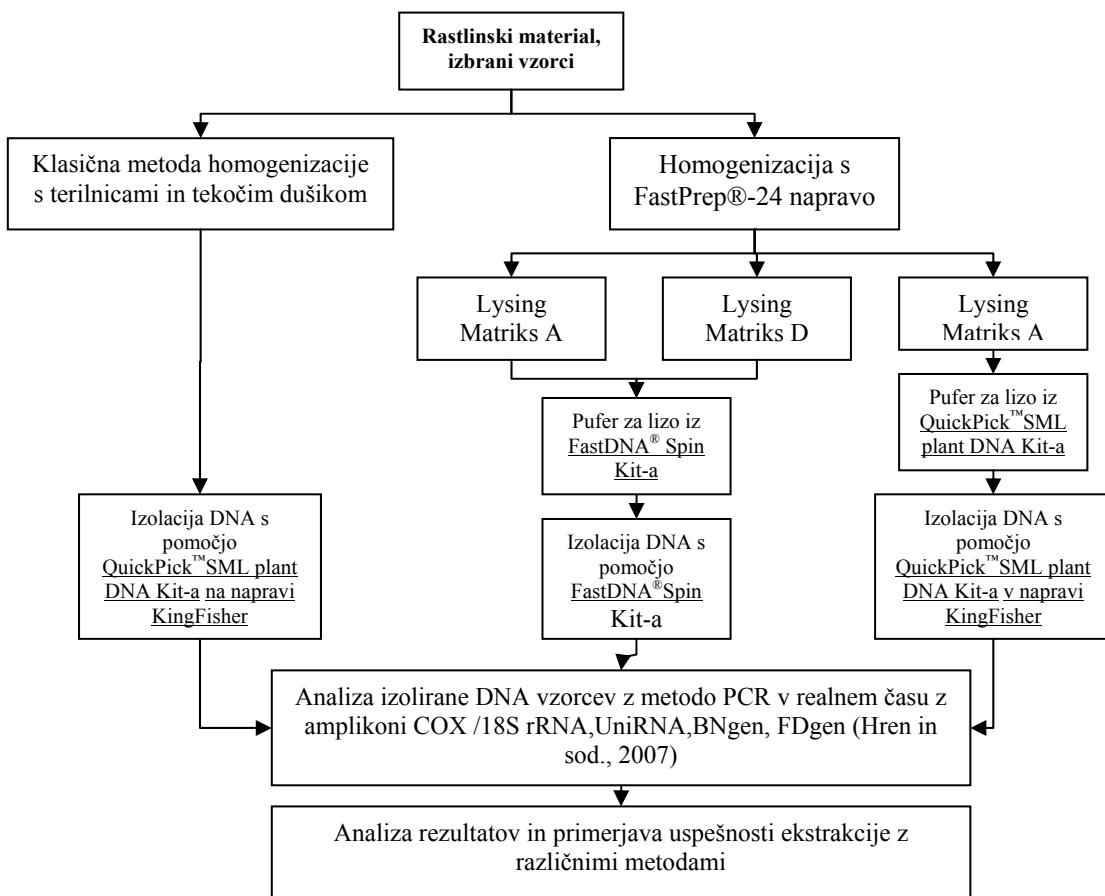
#### 3.2 JAPONSKI ŠKRŽATEK (*ORIENTUS ISHIDAE MATSUMURA, 1902*)

Med rutinskim vzorčenjem na Primorskem je leta 2009 mag. Gabrijel Seljak nabral primerke polifagnega japonskega škržatka (*Orientus ishidae* Matsumura, 1902) (<http://www1.pms-lj.si/animalia/galerija.php?load=1015>), ki so se hranili na rastlinah iz družine rožnic, za potrebe testiranja na prisotnost fitoplazem iz skupine metličavosti jablan (AP). Najdišče ni bilo v bližini vinogradov. Pri rutinski diagnostiki smo ugotovili, da škržatki niso okuženi s fitoplazmami iz skupine AP, a imajo prisotne fitoplazme FD. Škržatke smo vključili v diplomsko nalogu za nadaljnjo analizo. Laboratorijski oznaki 410/09 in 458/09 (priloga A).

### 3.3 PREGLED METOD, UPORABLJENIH V NALOGI

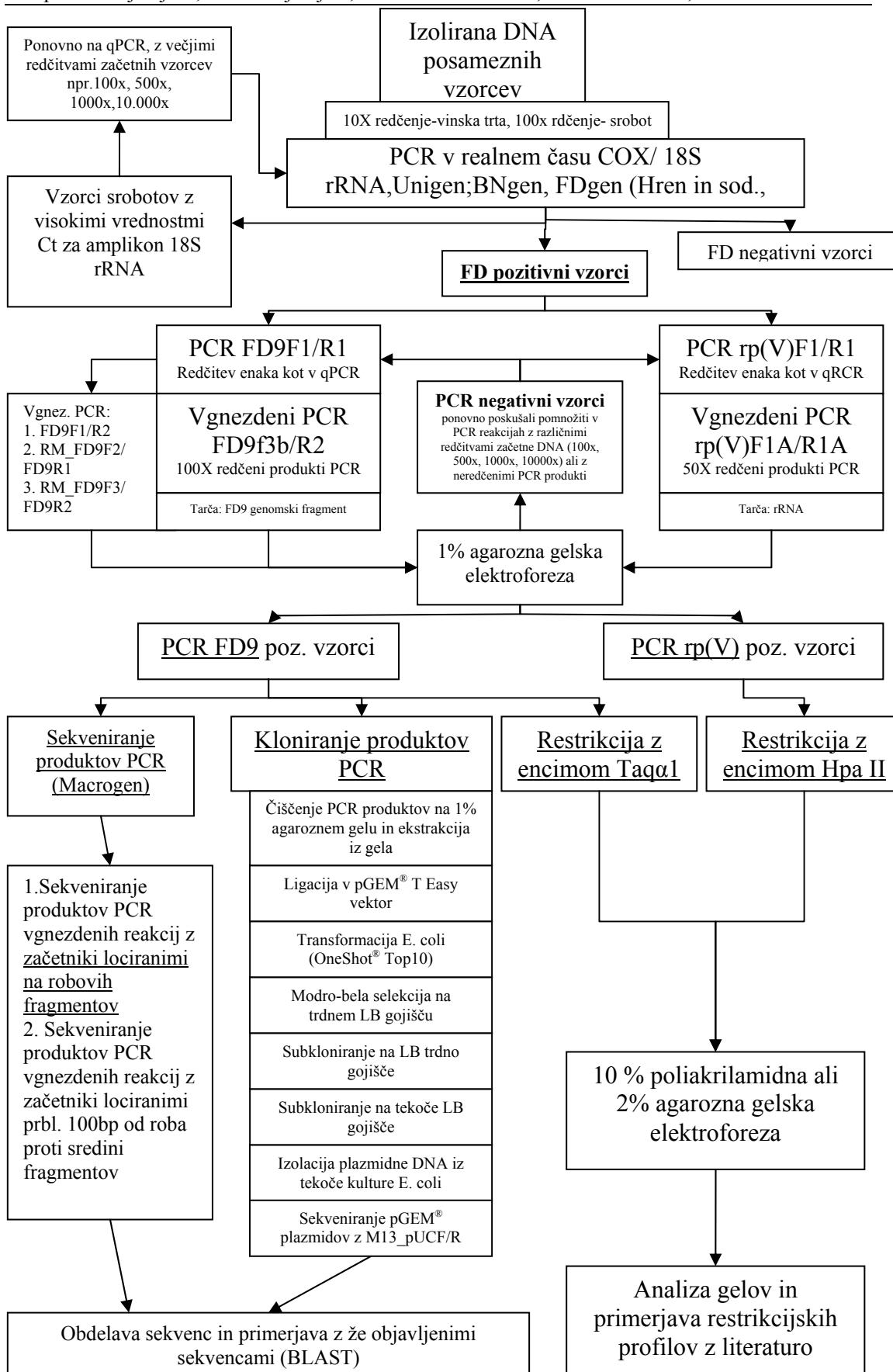
Da med pripravo vzorcev in izolacijo DNA ne bi prišlo do kontaminacije, smo delovne površine redno čistili s 70 % etanolom in pred začetkom dela nanje položili čist list papirja. Redno smo menjavali rokavice, skalpele za izrezovanje listnih žil, uporabljali sterilno laboratorijsko orodje (terilnice, pestiči, spatule ipd.). PCR mešanice smo vedno pripravljali v posebnem prostoru za pripravo mešanic.

V prvem delu diplomske naloge smo primerjali učinkovitost treh različnih metod homogenizacije rastlinskega materiala in ekstrakcije DNA. Klasično homogenizacijo in ekstrakcijo smo primerjali s homogenizacijo z napravo FastPrep® v kombinaciji s klasično ekstrakcijo ter v kombinaciji z ekstrakcijo s kompletom FastDNA®. V ta namen smo izbrali nekaj vzorcev vinske trte ter iz njih izolirali DNA na več različnih načinov. Vsi načini homogenizacije in nadaljnje ekstrakcije DNA so natančno opisani v točkah od 3.4.1 do 3.4.4 in shematično predstavljeni na sliki 7. Uspešnost homogenizacije in ekstrakcije smo preverili na 10-krat rečenih ekstraktih DNA z metodo PCR v realnem času, katero so razvil Hren in sod. leta 2007. Metoda je natančneje opisana v poglavju 3.5.



Slika 7: Metodološki potek primerjave različnih metod ekstrakcije DNA iz rastlinskega tkiva

V drugem delu naloge smo z molekulskimi metodami določevali prisotnost, vrsto in tip fitoplazem v vzorecih (slika 8).



Slika 8: Metodološki potek molekulske analize vzorcev

### 3.4 METODE PRIPRAVE RASTLINSKIH VZORCEV IN IZOLACIJE DNA

#### 3.4.1 Groba priprava vzorcev

Groba priprava vzorcev je začetni del vsake od različic priprave vzorca in izolacije DNA.

##### 3.4.1.1 Material

- močnejši papir za rezanje
- skalpeli za enkratno uporabo
- 70% etanol
- 15 mililitrske centrifugirke odporne proti zamrzovanju
- termo posoda s tekočim dušikom
- polistirenska posoda z ledom
- papirnate brisače
- rokavice

##### 3.4.1.2 Metoda

1. Centrifugirko smo označili s številko vzorca in jo za čas rezanja postavili na led.
2. S svežim skalpelom smo izrezali glavno in dve do tri stranske žile iz listov ter jih narezali na koščke dolžine 3-5 milimetrov. Na drobno narezane koščke listnih žil smo prenašali v centrifugirko na ledu, dokler ni bila polna vsaj do oznake 10 ml. Če je bilo v vzorcu premalo listov, smo centrifugirko napolnili tudi s koščki listnih pecljev.
3. Polno in označeno centrifugirko smo prenesli v posodo s tekočim dušikom.
4. Po končanem delu smo centrifugirke z vzorci shranili v hladilni skrinji pri temperaturi -80 °C.

#### 3.4.2 Trenje vzorcev v terilnicah s tekočim dušikom in izolacija DNA s kompletom QuickPick plant DNA in aparaturom KingFisher®

S to metodo so bili pridobljeni vsi ekstrakti DNA, uporabljeni v tej nalogi.

##### 3.4.2.1 Trenje v terilnici

###### 3.4.2.1.1 Material

- 15 mililitrske centrifugirke z narezanimi vzorci
- tekoči dušik
- termo posoda
- stojalo za eppendorfove epruvete iz polistirena
- terilnica in bat
- zaščitna očala
- rokavice
- dvomililitrske eppendorfove epruvete z varnostnim zapiralom
- 70 % etanol
- papirnate brisače
- igla
- spatule

### 3.4.2.1.2 Metoda

1. Centrifugirke shranjene pri temperaturi -80 °C smo prestavili v termo posodo s tekočim dušikom. Pazili smo, da se nam vzorci niso odtajali.
2. Vzorce smo strli, v predhodno ohlajenih terilnicah s tekočim dušikom, v čim drobnejši prah.
3. Približno 200 mg strtega vzorca smo prenesli v ohlajeno, označeno in na pokrovu preluknjano dvomililitrsko eppendorfovo epruveto ter jo do izolacije DNA shranili na tekočem dušiku oziroma pri -80 °C.

### 3.4.2.2 Izolacija DNA s QuickPick PlantDNA kitom in aparaturom King Fisher

#### 3.4.2.2.1 Material

- 14 označenih eppendorfovih epruvet z 200 mg strtega vzorca
- stojalo za eppendorfove epruvete
- 1,5 mililitrske eppendorfove epruvete
- QuickPick™ SML PlantDNA kit, Bio Nobile, Cat. št.:53022
- aparatura KingFisher® s nastavki in trakovi
- bidestilirana voda (bdH<sub>2</sub>O)
- pipete in nastavki za pipete
- vrtinčnik, Vibromix 10, Tehnica®
- namizna centrifuga za eppendorfove epruvete , Eppendorf 5417R
- termo blok ali vodna kopel
- nalepke in leplilni trak
- rokavice

#### 3.4.2.2.2 Metoda

1. 200 mg strtega vzorca smo dodali 600 µl pufra za lizo celic (QuickPick™ XL Plant DNA lysis buffer) in 25µl proteinaze K (QuickPick™ XL Plant DNA proteinase K solution). Zadnjo smo pripravili negativno kontrolo izolacije: v prazno eppendorfovo epruveto smo dali 600µl pufra za lizo celic (QuickPick™ XL Plant DNA lysis buffer) in 25µl proteinaze K (QuickPick™ XL Plant DNA proteinase K solution). Kontrolo smo v nadaljevanju obravnavali enako kot vzorce.
2. Vzorce smo vrtinčili, pri tem pa pazili, da smo pokrovček prekrili s čistim koščkom papirnate brisače, ki smo ga zamenjali za vsak vzorec, saj so imele eppendorfove epruvete na pokrovčkih luknjico, preko katere bi lahko vzorce navzkrižno kontaminirali.
3. Vzorce smo inkubirali 30 min v termoblokru pri T=65°C.
4. Med inkubacijo smo pripravili in označili trakove za aparaturom KingFisher®. Nanos kemikalij v luknjice trakov je bil sledeč:
  - a. Prva luknjica (najblžje repu traka): 500 µl pufra za vezavo (QuickPick™ XL Plant DNA binding buffer) in 20µl suspenzije magnetnih delcev (QuickPick™ XL Plant DNA MegaZorb® magnetic particles)
  - b. Druga in tretja luknjica: 800 µl pufra za spiranje (QuickPick™ XL Plant DNA wash buffer).
  - c. Četrta luknjica: 200 µl pufra za elucijo (QuickPick™ XL Plant DNA elution buffer).
  - d. Peta luknjica: 100 µl bidestilirane vode.

5. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 60-90 s pri 6000 rcf. Iz vsake eppendorfove epruvete smo odpipetirali po 220 µl supernatanta v prvo luknjico na pripravljenem traku.
6. V aparatu KingFisher® smo namestili nastavke in vstavili stojalo z napolnjenimi trakovi.
7. Program Quick pick plant DNA je bil sestavljen iz naslednjih korakov:
  - a. 2- 10 min mešanja v luknjici 1 (vezava na magnetne delce).
  - b. Prenos magnetnih delcev iz luknjice 1 v luknjico 2.
  - c. 10-15 s mešanja magnetnih delcev v luknjici 2 (izpiranje).
  - d. Prenos magnetnih delcev iz luknjice 2 v luknjico 3.
  - e. 10-15 s mešanja v luknjici 3 (dodatno izpiranje).
  - f. Prenos magnetnih delcev iz luknjice 3 v luknjico 4.
  - g. 2- 10 min mešanja magnetnih delcev v luknjici 4 (elucija iz magnetnih delcev).
  - h. Prenos magnetnih delcev iz luknjice 4 v luknjico 5.
8. Po končanem programu aparature KingFisher® smo iz četrte luknjice vsakega traku odpipetirali po 200 µl DNA v označeno eppendorfovo epruveto.
9. Epruvete smo do analize shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

### **3.4.3 Metoda homogenizacije s homogenizerjem FastPrep® in izolacije DNA s kompletom FastDNA® Spin**

#### **3.4.3.1 Material**

- 15 mililitrske centrifugirke z zamrznjenimi rastlinskimi vzorci (pripravljeni v točki 3.4.1)
- FastDNA® Spin Kit, MP Biomedicals, Cat. št. #11-6540-600
- 15 mililitrske centrifugirke s polnilom 1 (1,4 mm keramične kroglice; MP Biomedicals, LLC)- Lysing Matrix D tube, FastDNA® Spin kit
- 15 mililitrske centrifugirke s polnilom 2 (granatni matriks (garnet matrix; MP Biomedicals, LLC, kataloška št. 6540-427) + keramične kroglice (1/4 inch ceramic sphere; MP Biomedicals, LLC, kataloška št. 6540-412))- Lysing Matrix A tube, FastDNA® Spin kit
- MP FastPrep® 24 homogenizer, MP Biomedicals, model: 6004-500, rotor TN:12x15
- pipete z nastavki
- namizna centrifuga za eppendorfove epruvete, Eppendorf 5417R
- tehnica, Sartorius BP 310 S
- termo blok, Kroketer, TBTEb
- centrifuga, Beckman *Avanti J-25*; rotor JA25.15

#### **3.4.3.2 Metoda**

Prilagojena za 1g vzorca in 15 mililitrske centrifugirke, po protokolu proizvajalca (FastDNA® Spin Kit 2009)

1. 1 g zamrznjenega vzorca smo prenesli v 15 ml centrifugirke s polnilom 2, dodali 4,0 ml raztopine CLS-VF in 1,0 ml raztopine PPS iz kompleta FastDNA® Spin Kit.
2. Centrifugirke smo homogenizirali s MP FastPrep® homogenizerjem 40 s pri hitrosti 6 m/s.

### 3.4.4 Prilagojena metoda homogenizacije s homogenizerjem FastPrep®24 in izolacije DNA s kompletom QuickPick plant DNA kit

#### 3.4.4.1 Material

- 15 mililitrske centrifugirke z zmrznenimi rastlinskimi vzorci (pripravljene v točki 3.3.1)
- QuickPick™ SML PlantDNA kit, Bio Nobile, Cat. št.:53022
- 15 mililitrske centrifugirke s polnilom 2 (granatni matriks (garnet matrix; MP Biomedicals, LLC, kataloška št. 6540-427) + keramične kroglice (1/4 inch ceramic sphere; MP Biomedicals, LLC, kataloška št. 6540-412))- Lysing Matrix A tube, FastDNA® Spin kit
- MP FastPrep® 24 homogenizator, MP Biomedicals, model: 6004-500, rotor12x15
- aparatura KingFisher® z nastavki in stripi
- bdestilirana voda
- 2 mililitrske eppendorfove epruvete
- 1,5 mililitrske eppendorfove epruvete
- nalepke in lepilni trak
- rokavice
- stojalo za eppendorfove epruvete
- piete in nastavki
- Beckman Avanti J-25; rotor JA25.15
- termo blok

#### 3.4.4.2 Metoda

1. Najprej smo 15 mililitrske centrifugirke s polnilom 2 inkubirali čez noč pri temperaturi -20 °C. S tem smo žeeli preveriti, če temperaturni stres oslabi centrifugirke in jih naredi neprimerne za uporabo z napravo FastPrep®24.
2. 1,0 g zamrznjenega vzorca s polnilom 2 smo dodali 2,0 ml pufra za lizo celic (QuickPick™ XL Plant DNA lysis buffer) in homogenizirali z MP FastPrep® homogenizerjem, hitrost 5,0 m/s, čas 40s).
3. Po končani homogenizaciji smo vzorce centrifugirali 10 min pri 14000 rcf in sobni temperaturi v centrifugi Beckman.
4. V čiste in označene 2,0 mililitrske eppendorfove epruvete smo odpipetirali 800 µl supernatanta in dodali 25 µl proteinaze K (QuickPick™ XL Plant DNA proteinase K solution).
5. V dodatno eppendorfovou epruveto smo pripravili še negativno kontrolo izolacije (NKI): 600 µl pufra za lizo celic in 25 µl proteinaze K.
6. Postopek smo dokončali kot v metodi 3.4.2.2 od točke 3 do točke 11.

## 3.5 PCR V REALNEM ČASU ZA DETEKCIJO FITOPLAZEM FD

Vsi vzorci, pridobljeni s strani Fitosanitarne uprave Republike Slovenije so bili že predhodno testirani z metodo PCR v realnem času po protokolu, ki so ga za detekcijo fitoplazem FD razvili Hren in sod. 2007. Vzorce, ki smo jih nabrali v sklopu te diplomske naloge(priloga A, vzorci označeni z modro barvo) smo testirali po istem protokolu.

### 3.5.1 Material

- Aparatura ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)
- 2 × TaqMan reakcijska mešanica, PCR, TaqMan Universal PCR Master Mix, (vsebuje že pufer za PCR, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, dUTP, Taq polimerazo, Amperazo UNG in referenčno barvilo ROX), Applied Biosystems (AB).
- Raztopine začetnih nukleotidov in sond za PCR v realnem času (preglednica 3)
- Komora za pripravo reakcijskih mešanic: BIOSAN DNA/RNA cleaner UVT-S-AR
- Komora za delo z DNA: BIOSAN DNA/RNA cleaner UVC/T-M-AR
- Pipete in nastavki s filtri
- ploščica za PCR v realnem času s 396 luknjicami, Applied Biosystems, in lepilna folija za ploščico, MicroAmp® Optical adhezive DNA film, Applied Biosystems
- Centrifuga za qPCR plošče SIGMA 3K18, rotor Sigma Nr. 11223, držalo za plošče Nr. 13223
- Avtomatska večstopenjska pipeta (Biohit) z nastavki s filtri in brez njih
- Eppendorfove epruvete
- Bidestilirana voda (bdH<sub>2</sub>O)
- Eppendorfove epruvete z DNA ekstrakti posameznih vzorcev

Preglednica 3: Seznam uporabljenih začetnih nukleotidov in sond, za določanje prisotnosti fitoplazem z metodo PCR v realnem času.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	T <sub>m</sub> (°C)	Delovna konc. (µM)	Končna konc. v mešanici. (nM)	Specifičnost	Vir
18S rRNA (AB)	Eukaryotic 18S rRNA TaqMan assay (Applied Biosystems)	/	/	/	Evkariantska 18S rRNA	Applied Biosystem s-kit
BNGen_F	5' AAG CAG GTT TAG CGA TGG TTG T 3'	59f,0	10	900	BN fitoplazme (Stolbur group, 16SrXII); Stol11 genomski fragment	(Hren in sod., 2007)
BNGen_R	5' TGG TAC CGT TGC TTC ATC ATT T 3'	58,0	10	900		
BNGen_M	5' TTA ATA CCT CCT TCA GGA AA 3' GB sonda	67,8	2,5	250		
FDgen_F	5' TTA TGC CTT ATG TTA CTG CTT CTA TTG TTA 3'	58,0	10	900	FD fitoplazme (Elm yellows group, 16SrV); FD9 genomski fragment	(Hren in sod., 2007)
FDgen_R	5' TCT CCT TGT TCT TGC CAT TCT TT 3'	58,0	10	900		
FDgen_MG	5' ACC TTT TGA CTC AAT TGA 3' B sonda	68,6	2,5	250		
UniRNA_F	5' AAA TAT AGT GGA GGT TAT CAG GGA TAC AG 3'	58,0	10	900	Fitoplazme; 16S rRNA	(Hren in sod., 2007)
UniRNA_R	5' AAC CTA ACA TCT CAC GAC ACG AAC T 3'	59,0	10	900		
UniRNA_M	5' ACG ACA ACC ATG CAC MGB sonda CA 3'	68,5	2,5	250		

### 3.5.2 Metoda

Vzorce v katerih smo določali prisotnost fitoplazem FD, smo analizirali s štirimi pari začetnih oligonukleotidov in njim primernimi sondami: UniRNA, FDgen, BNGen in 18S rRNA. Začetni oligonukleotidi in sonde za posamezen amplikon - del DNA, ki se pomnožuje s PCR - so navedene v preglednici 3.

Analize s parom začetnih oligonukleotidov UniRNA in sondno določajo prisotnost fitoplazem v vzorcu na splošno (z njim zaznamo vse znane fitoplazme). Kljub temu, da z UniRNA lahko določamo različne tipe fitoplazem, je UniRNA bolj občutljiv za detekcijo fitoplazem FD kot fitoplazem povzročiteljic počrnlosti lesa (v nadaljevanju BN). Para začetnih oligonukleotidov BNgen in FDgen predstavlja specifičen tip analiz za prisotnost fitoplazem BN, oziroma FD. Analize z 18S rRNA predstavljajo kontrolo ekstrakcije DNA iz rastlinskega materiala, saj z njo določamo prisotnost rastlinske DNA, ki se izolira skupaj z DNA fitoplazem.

### 3.5.2.1 Postopek

1. PCR mešanice smo pripravili, kot je navedeno v preglednici 4. Vse sestavine smo vedno dodajali v enakem vrstnem redu kot so navedene v preglednici 4 od zgoraj navzdol.

**Preglednica 4: Sestava reakcijskih mešanic za PCR v realnem času za različne amplikone.**

<b>mastermix za 18S rRNA, Applied Biosystems (specifičnost: evkariontska 18S rRNA)</b>	<b>končne konc.</b>	<b>V za 1 reakc. (µl)</b>
bd voda		2,5
2× TaqMan Universal master mix	1 x	5,0
Primer/probe mix (20x)	1x	0,5
SKUPAJ		8,0 µl
<b>mastermix za UniRNA (specifičnost: fitoplazme na splošno)</b>	<b>končne konc.</b>	<b>V za 1 reakc. (µl)</b>
bd voda		0,2
2× TaqMan Universal master mix	1 x	5,0
UniRNA_F (10 µM)	900 nM	0,9
UniRNA_R (10 µM)	900 nM	0,9
UniRNA_S (2,5 µM)	250 nM	1,0
SKUPAJ		8,0 µl
<b>mastermix za STOgen (specifičnost: BN tip fitoplazem, Stolbur group, 16SrXII)</b>	<b>končne konc.</b>	<b>V za 1 reakc. (µl)</b>
bd voda		0,2
2× TaqMan Universal master mix	1 x	5,0
STOgen_F (10 µM)	900 nM	0,9
STOgen_R (10 µM)	900 nM	0,9
STOgen_S (2,5 µM)	250 nM	1,0
SKUPAJ		8,0 µl
<b>mastermix za FDgen (specifičnost: FD tip fitoplazem, Elm yellows group,</b>	<b>končne konc.</b>	<b>V za 1 reakc. (µl)</b>
bd voda		0,2
2× TaqMan Universal master mix	1 x	5,0
FDgen_F (10 µM)	900 nM	0,9
FDgen_R (10 µM)	900 nM	0,9
FDgen_S (2,5 µM)	250 nM	1,0
SKUPAJ		8,0 µl

2. PCR mešanice smo razdelili na ploščo, po 8 µl v vsako luknjico,

3. V komori za dodajanje DNA smo dodali 2 µl ekstrakta DNA posameznega vzorca, 10-krat redčenega v bd H<sub>2</sub>O.
4. Po nanosu vzorcev smo ploščo prekrili z lepilno folijo in centrifugirali 60 sekund pri 1000 rcf.
5. Vsak vzorec smo z vsakim amplikonom preverili v treh ponovitvah.
6. Z vsemi amplikoni smo testirali tudi kontrole:
  - a. Z NTC (non template control) preverimo, če so sestavine reakcijske mešanice kontaminirane z DNA: 8 µl reakcijske mešanice in 2µl bdH<sub>2</sub>O.
  - b. Negativno kontrolo izolacije (NKI), ki smo jo pripravili ob vsaki izolaciji DNA: 8µl reakcijske mešanice in 2µl pripravljene kontrole.
  - c. Pozitivna kontrola PCR reakcije (PKP): v 8µl reakcijske mešanice dodamo 2µl vzorca, ki je bil predhodno določen kot pozitiven.
7. Centrifugirano ploščico smo vstavili v aparaturo ABI 7900HT Sequence Detection System in nastavili program:
  - 50 °C 2 min
  - 95 °C 10 min
  - 95 °C 15 s } 45
  - 60 °C 1 min } ciklov
8. Po končanem programu smo rezultate pregledali v programu SDS 2.3 (Applied Biosystems), nastavitev: pražnja vrednost (threshold) 0,065 , bazna linija privzeta (automatic)
9. Dobljene podatke smo izvozili v Microsoft Excel in jih uredili.
10. Če se je izkazalo, da je za nek vzorec povprečje vrednosti Ct treh ponovitev za amplikon 18S RNA presegalo vrednost navedeno v preglednici 5, potem smo analizo ponovili. V ponovljenih reakcijah smo uporabili večje redčitve DNA ekstrakta (100x, 500X, 1000x, 10000x).

**Preglednica 5: Pražne meje povprečnih vrednosti Ct za določitev pozitivnih vzorcev (Hren in sod., 2007)**

Amplikon	pražna vrednost Ct
18S	25,0
UniRNA	36,0
FDgen	37,5
BNGen	36,0

11. V vzorcu smo potrdili prisotnost fitoplazem FD, kadar so bile povprečne Ct vrednosti 18S, UniRNA in FDgen amplikonov pod pražno vrednostjo za posamezen amplikon (pražne vrednosti za posamezen amplikon so navedene v preglednici 5), razlika med vrednostmi Ct za UniRNA in FDgen pa je bila med -2 in -3.

### 3.6 PCR ZA DETEKCIJO FITOPLAZEM FD

#### 3.6.1 PCR reakcije za potrditev analize PCR v realnem času in nadaljnjo analizo z restriktijskimi encimi

Vse vzorce, pri katerih je bila z analizo PCR v realnem času potrjena prisotnost fitoplazem FD, smo testirali še z naslednjimi reakcijami PCR:

- specifična detekcija FD (FD9 genomski fragment) z uporabo para oligonukleotidnih začetnikov FD9f1/r1 (Daire in sod., 1997), ki ji je sledila reakcija

- vgnezdenega PCR s parom oligonukleotidnih začetnikov FD9f3b/r2 (Clair in sod., 2003),
- specifična detekcija FD (rRNA) z uporabo para oligonukleotidnih začetnikov rp(V)F1/R1 (Lee in sod., 1998a), ki ji je sledila reakcija vgnezdenega PCR s parom oligonukleotidnih začetnikov rp(V)F1A/R1A (Lee in sod., 2004b)

Vsi vzorci, ki smo jih z metodo PCR analizirali v tej nalogi, so predstavljeni v prilogi A. Produkte vgnezdenih PCR reakcij smo nadalje analizirali z analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (PCR RFLP).

### 3.6.1.1 Material

- Aparatura PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler (Perkin Elmer)
- Vrtinčnik, Vibromix 10, Tehtnica®
- Namizna centrifuga za centrifugiranje eppendorfovih epruvet, Eppendorf MiniSpin® plus
- Bidestilirana voda
- PCR kemikalije proizvajalca Applied Biosystems
  - AmpliTaq® DNA Polymerase 5U/µl, Applied Biosystems/Roche, Cat. Št. 58002040-1
  - MgCl<sub>2</sub>, 25 mM, Applied Biosystems/Roche, Cat. Št. 58002032-1
  - 10x PCR Buffer II, Applied Biosystems/Roche, Cat. Št. 58002026-1
  - dNTP MIX, 10mM, Applied Biosystems/ Roche
- 2 mililitrske eppendorfove epruvete z bidestilirano vodo
- Komora za pripravo reakcijskih mešanic: BIOSAN DNA/RNA cleaner UVT-S-AR
- Komora za delo z DNA: BIOSAN DNA/RNA cleaner UVC/T-M-AR
- Komora za delo s PCR produkti: EHRET, Biosafe 2
- Oligonukleotidni začetniki, navedeni v preglednici 6
- Pipete in nastavki s filtri
- Avtomatska pipeta
- 0,2 mililitrske eppendorfove epruvete za PCR reakcije
- Polistirenska posoda z ledom
- Rokavice

#### Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili v reakcijah PCR

Oznaka oligonukleotidnega začetnika	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Tarča	Vir
FD9f1	GAATTAGAACTGTTGAAGACG	FD9 genomski fragment	Daire in sod., 1997
FD9r1	TTTGCTTCATATCTTGTATCG	FD9 genomski fragment	Daire in sod., 1997
FD9f3b	TAATAAGGTAGTTTATATGACAAG	FD9 genomski fragment	Clair in sod., 2003
FD9r2	GACTAGTCCGCCAAAG	FD9 genomski fragment	Clair in sod., 2003

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili v reakcijah PCR

rp(V)F1	GGACATAAGTTAGGTGAATT	rRNA	Lée in sod., 1998
rp(V)R1	ACGATATTAGTTCTTTGG	rRNA	Lée in sod., 1998
rp(V)F1A	AGGCGATAAAAAAGTTCAAAA	rRNA	Lée in sod., 2004
rp(V)R1A	GGCATTAAACATAATATATTATG	rRNA	Lée in sod., 2004

### 3.6.1.2 Metoda

Vse reakcije PCR smo izvedli v 40 $\mu$ l reakcijskih mešanicah v katerih je bilo 2 $\mu$ l ekstrakta DNA.

Potek analize PCR:

1. Ekstrakte vzorcev DNA smo najprej odmrznili, kratko vrtinčili in centrifugirali.
2. Ekstrakte DNA srobotov smo redčili z bdH<sub>2</sub>O enako, kot v uspešnih reakcijah PCR v realnem času, ekstraktov DNA vinske trte nismo redčili.
3. Za vgnezdeno PCR reakcije smo uporabili naslednje redčitve:
  - a. V primeru FD9f3b/r2 PCR smo uporabili 100-krat redčene produkte reakcije FD9f1/r1 v bdH<sub>2</sub>O.
  - b. V primeru rp(V)F1A/R1A PCR smo uporabili 50-krat redčene produkte PCR reakcije rp(V)F1/R1v bdH<sub>2</sub>O.
4. V komori za pripravo mešanic PCR smo odmrznili vse potrebne kemikalije ter jih kratko vrtinčili in centrifugirali. Na zadnje smo v mešanico PCR dodali polimerazo, ki smo jo do takrat hranili v zamrzovalniku.
5. Mešanice PCR smo pripravili kot je navedeno v preglednici 7 in 9.
6. Pripravljeno mešanico PCR smo temeljito vrtinčili in centrifugirali nato pa razdelili po 38  $\mu$ l v vsako 200  $\mu$ l eppendorfovo epruveto za reakcije PCR.
7. Ekstrakte DNA smo v eppendorfove epruvete za reakcije PCR dodajali v komori za delo z DNA, redčine produktov PCR smo dodajali v komori za delo s produkti PCR. V vsako epruveto smo dodali 2  $\mu$ l dna ekstrakta ali produktov PCR. Eppendorfove epruvete z reakcijskimi mešanicami so bile ves čas dodajanja vzorcev na ledu.
8. Ob vsakem nizu reakcij PCR smo pripravili tudi negativno kontrolo reakcije PCR (NKP), kjer smo namesto vzorca dodali 2  $\mu$ l iste bidestilirane vode, kot smo jo uporabili za samo pripravo reakcijske mešanice. Tako smo se prepričali, da so sestavine reakcijskih mešanic brez kontaminacij.
9. Eppendorfove epruvete za reakcije PCR z vzorci in reakcijskimi mešanicami smo, temeljito prevrtinčili in centrifufirali.
10. Na napravi PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler smo zagnali ustrezni program, kot je navedeno v preglednici 8 in 10. Počakali smo, da je temperatura v napravi dosegla 90-92 °C, nato smo program začasno zaustavili in vstavili vzorce ter nadaljevali z nastavljenim programom.
11. Uspešnost izvedbe PCR pomnoževanja smo preverili na agarozni gelski elektroforezi (glej poglavje 3.7).

Preglednica 7: Sestava reakcijske PCR mešanice, ki smo jo uporabljali v PCR reakcijah z začetnimi oligonukleotidi FD9F1/R1 in rp(V)F1/R1.

PCR reakcijska mešanica	končna koncentracija	µl za 1 reakcijo
Sterilna ddH <sub>2</sub> O		18,8
10X pufer PCR	1 x	4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.0 mM	1,6
dNTP mix (10 mM)	300 µM	1,2
Začetnik Reverse (2,5 µM)	0.375 µM	6
Začetnik Forward (2,5 µM)	0.375 µM	6
<i>AmpliTaq</i> polimeraza (5U/ µl)	5 U / 100 µl	0,4
skupaj		38

Preglednica 8: Nastavitev programa na aparaturi PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler, za PCR reakcije z začetnimi oligonukleotidi FD9F1/R1 in rp(V)F1/R1.

Predhodna denaturacija	92°C / 1 min 30 s
Denaturacija	92°C / 30 s
Vezava začetnikov	54°C / 30 s
Podaljševanje	72°C / 1 min 15 s
Število ciklov	40
Končno podaljševanje	72°C / 10 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

Preglednica 9: Sestava reakcijske PCR mešanice, ki smo jo uporabljali v vgnezdenih PCR reakcijah z začetnimi oligonukleotidi FD9F3b/R2 in rp(V)F1A/R1A.

PCR reakcijska mešanica	končna koncentracija	µl za 1 reakcijo
Sterilna ddH <sub>2</sub> O		15,2
10X pufer PCR	1 x	4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 mM	4
dNTP mix (10 mM)	150 µM	2,4
Začetnik Rewerse (2,5 µM)	0.375 µM	6
Začetnik Forward (2,5 µM)	0.375 µM	6
<i>AmpliTaq</i> polimeraza (5U/ µl)	5 U / 100 µl	0,4
skupaj		38

Preglednica 10: Nastavitev programa na aparaturi PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler, za vgnezdenje PCR reakcije z začetnimi oligonukleotidi FD9F3b/R2 in rp(V)F1A/R1A.

Predhodna denaturacija	92°C / 1 min 30 s
Denaturacija	92°C / 40 s
Vezava začetnikov	55°C / 40 s
Podaljševanje	72°C / 1 min 10 s
Število ciklov	30
Končno podaljševanje	72°C / 10 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

### 3.6.2 PCR reakcije in čiščenje PCR produktov za nadaljnjo sekvenciranje

Reakcije PCR, katerih produkte smo kasneje sekvencirali, smo zaradi večje preglednosti metod opisali ločeno.

### 3.6.2.1 PCR reakcije

#### 3.6.2.1.1 Materiali

Razen oligonukleotidnih začetnikov, ki so navedeni v preglednici 11, so vsi materiali enaki kot v poglavju 3.6.1.1.

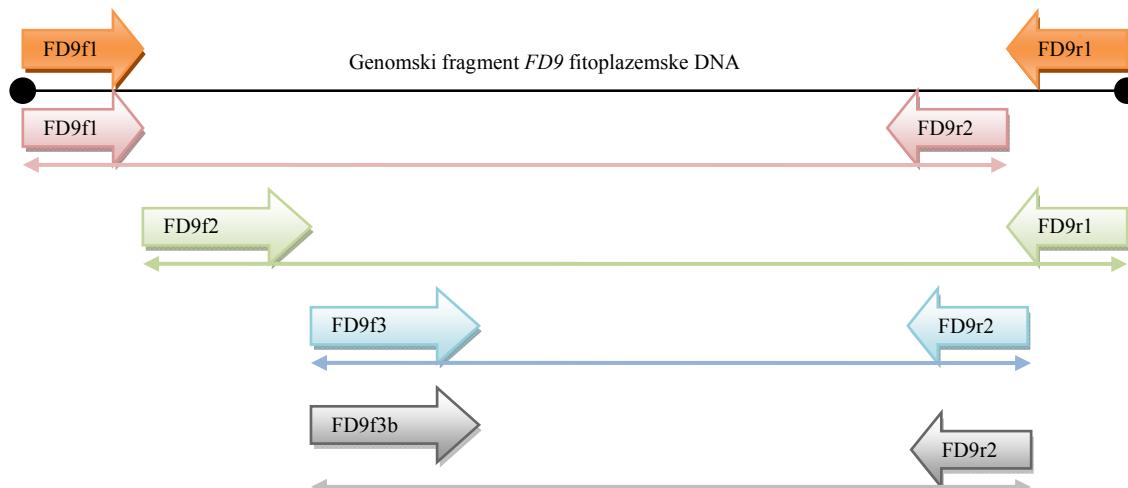
**Preglednica 11: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili pri PCR reakcijah za nadaljnjo sekvenciranje.**

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Tarča	Vir
oligonukleotidnega začetnika			
FD9f2	GCTAAAGGTGATTAAAC	FD9 genomski fragment	(Angelini, Bertaccini in Boudon-Padieu 2001)
FD9f3	GGTAGTTTATATGACAAG	FD9 genomski fragment	(Angelini, Bertaccini in Boudon-Padieu 2001)
FD9f1		Glej preglednico 3.4 (str. 25)	
FD9r1		Glej preglednico 3.4 (str. 25)	
FD9f3b		Glej preglednico 3.4 (str. 25)	
FD9r2		Glej preglednico 3.4 (str. 25)	

#### 3.6.2.1.2 Metoda

Izvedba PCR reakcij je bila enaka kot v poglavju 3.6.1. Sestave reakcijskih PCR mešanic so bile enake kot v točki 3.6.1.2, preglednica 9.

V vseh reakcijah vgnezdenega PCR, smo uporabili produkte reakcij PCR z začetniki FD9F1/R1, pripravljenimi v poglavju 3.6.1, ki smo jih 100-krat redčili v  $\text{bdH}_2\text{O}$ . Pari oligonukleotidnih začetnikov, uporabljeni v reakcijah vgnezdenega PCR, so shematično predstavljeni na sliki 9 in izpisani v preglednici 12, kjer so navedeni tudi začetniki, s katerimi je bil določen fragment sekvenciran. V preglednicah 13 in 14 so predstavljene različne nastavitev naprave PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler, ki smo jih uporabili z različnimi pari začetnih oligonukleotidov



**Slika 9:** Shematska predstavitev vseh fragmentov DNA, ki smo jih pomnožili za nadaljnje sekvenciranje. Vidimo lahko tudi prileganje oligonukleotidnih začetnikov, s katerimi smo pomnoževali in sekvencirali naše fragmente, na fragment FD9 fitoplazemske DNA. Slika je simbolična, dolžine oligonukleotidnih začetnikov in razdalje med njimi niso v pravem merilu.

**Preglednica 12: Pari začetnih oligonukleotidov uporabljeni v reakcijah PCR za pomnoževanje fragmentov in pari, ki so bili uporabljeni pri sekvenciranju teh fragmentov**

Začetniki za vgnezdeni PCR		Začetniki uporabljeni za sekvenciranje fragmentov	
Začetnik Forward	Začetnik Reverse	Začetnik Forward	Začetnik Reverse
FD9f1	FD9r2	FD9f1 FD9f2	FD9r2 FD9r2
FD9f2	FD9r1	FD9f2 FD9f3	FD9r1 FD9r2
FD9f3	FD9r2	FD9f3	FD9r2
FD9f3b	FD9r2	FD9f3b	FD9r2

**Preglednica 13: Nastavitev naprave PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler za vgnezdenje PCR reakcijo s parom začetnikov FD9F1/FD9R2 in FD9F2/FD9R1**

Predhodna denaturacija	92°C / 1 min 30 s
Denaturacija	92°C / 30 s
Vezava začetnikov	47°C / 30 s
Podaljševanje	72°C / 1 min 15 s
Število ciklov	40
Končno podaljševanje	72°C / 10 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

**Preglednica 14: Nastavitev naprave PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler za reakcijo vgnezdenega PCR s parom začetnikov FD9F3/FD9R2**

Predhodna denaturacija	92°C / 1 min 30 s
Denaturacija	92°C / 30 s
Vezava začetnikov	48°C / 30 s
Podaljševanje	72°C / 1 min 15 s
Število ciklov	40
Končno podaljševanje	72°C / 10 min
Končna inkubacija	4°C / ∞

Uspešnost izvedbe PCR pomnoževanja smo preverili na agarozni gelski elektroforezi, podrobno opisani v poglavju 3.7.

### 3.6.2.2 Čiščenje PCR produktov z MinElute® PCR purification Kit-om

#### 3.6.2.2.1 Material

- 96-100% etanol
- namizna centrifuga Eppendorf 5417R
- MinElute® PCR purification Kit, Qiagen, Cat. Št. 28004
- 1,5 mililitrske eppendorfove epruvete z varnostnim zapiralom
- Pipete in nastavki
- Nalepke, pisalo in lepilni trak

#### 3.6.2.2.2 Metoda

Po navodilu proizvajalca; vir: Min Elute PCR Purification Kit 2008

Izjeme:

- V 9. koraku proizvajalčevega protokola smo na sredino kolon smo nanesli 10 µl pufra EB (Buffer EB) ter inkubirali **3 min** pri sobni temperaturi nato pa centrifugirali 1 min pri 17.900 rcf.

- Še enkrat smo ponovili smo korak pod točko 9, tako da smo dobili prbl. 20 µl očiščenega PCR produkta.

### 3.7 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Uspešnost izvedbe pomnoževanja PCR smo preverili na agarozni gelski elektroforezi.

#### 3.7.1 Materiali

- Vir električne napetosti, Biorad Powerpack 3000
- Nosilci za gele, glavniki in banjice za elektroforezo, Biorad
- Mikrovalovna pečica
- Erlermajerica
- Nitrilne rokavice
- Parafilm
- Pipete z nastavki
- Agaroza, Sigma, A-9539
- Raztopina etidijevega bromida 10mg/ml, Sigma, E-1510
- EDTA, Sigma, E-5140
- Tris-HCl, Sigma, T-5594
- Nanašalni pufer, 6x Loading Dye, Fermentas
- Dolžinski standard GeneRuler® 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Cat. št. SM0321
- Bidestilirana voda (bdH<sub>2</sub>O)
- Tehtnica, Sartorius, BP 310 S
- Sistem za fotografiranje gelov v ultravijoličnem spektru, Biosystematica, UVI prosystem

#### 3.7.2 Metoda

1. Najprej smo pripravili pufer 50x TAE, kot je navedeno v preglednici 15, nato pa smo ga razredčili do pufra 1x TAE.

Preglednica 15: sestavine za pripravo 1000 ml pufra 50x TAE

50 × TAE pufer (za 1000 ml)	
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

2. Gele smo pripravljali, kot je navedeno v preglednici 16. Celoten postopek opravljamo z nitrilnimi rokavicami, saj je etidijev bromid zelo strupen in rakotvoren (The National Institute..., 2009)

Preglednica 16: Sestavine za pripravo agaroznih gelov

Nosilec gela	Volumen	Sestavine	1% agarozni gel	2% agarozni gel
mali	40 ml	1x TAE / agaroza	40 ml / 0,4g	40 ml / 0,8g
Srednji	80 ml	1x TAE / agaroza	80 ml / 0,8g	80 ml / 1,6g
Veliki	120 ml	1x TAE / agaroza	120 ml / 1,2g	120 ml / 2,4g

3. Ustrezno količino agaroze smo segrevali v mikrovalovni pečici do vretja, da se je agaroza popolnoma raztopila.

4. V ohlajeno raztopino agaroze, približno 60 °C, smo dodali etidijev bromid s koncentracijo 10 mg/ml, in sicer 1 µl na 20 ml raztopine agaroze. Raztopino smo dobro premešali in jo nalili v pripravljeni nosilec z glavničkom, preverili da v okolini glavnička ni bilo nobenih mehurčkov in pustili, da se je gel ohladil.
5. Gel smo z nosilcem vred namestili v banjico za elektroforezo in ga prelimi s pufrom 1x TAE tako, da je gladina segala približno 5 mm nad gel. Nato smo odstranili glavniček.
6. Na gel smo nanesli približno 1 µl reakcijske mešanice PCR pomešane z 1 µl nanašalnega pufra
7. Nanesli smo tudi 1 µl dolžinskega standarda, ki smo ga predhodno redčili z bdH2O in nanašalnim pufrom (dolžinski standard : bdH2O : nanašalni pufer = 2 : 1 : 3)
8. Elektroforeza je potekala pri 100V, 400mA, 250W, 25 minut.
9. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali s pomočjo sistema za fotografiranje gelov v ultravijoličnem spektru.

### 3.8 ANALIZA POLIMORFIZEMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV (PCR RFLP)

Vse fragmente, ki smo jih pridobili v vgnezdenih PCR reakcijah v točki 3.6.1, smo v nadaljevanju izpostavili delovanju dveh restrikcijskih endonukleaz. FD9 fragmente smo rezali s *TaqαI* endonukleazo, rp(V) fragmente pa s *Hpa II* endonukleazo (Filippin in sod., 2009). Nekatere vzorce smo izpostavili tudi delovanju *Tru9I* in *AluI* endonukleaze. (Angelini in sod., 2001) Rezane fragmente smo nato ločili ali na 10% poliakrilamidni gelski elektroforezi ali pa na 2% agarozni gelski elektroforezi. Profile smo primerjali z literaturo. Profili vseh analiziranih vzorcev so navedeni v prilogi A.

#### 3.8.1 Materiali

##### 3.8.1.1 Materiali za restrikcijske reakcije

- TaqαI endonukleaza, 20.000 U/ml, R0149S, New England BioLabs
- Reakcijski pufer; 10 X NEB Buffer 4, New England BioLabs
- Goveji serumski albumin, 100x BSA, New England BioLabs
- Hpa II endonukleaza 10.000 U/ml, R0171S, New England BioLabs
- Reakcijski pufer 10x NEB Buffer 1
- Polistirenska posoda z ledom in s stojalom za 0,2 mililitrske eppendorfove epruvete
- Pipete z nastavki s filtrom
- 0,2 mililitrske eppendorfove epruvete
- 1,5 mililitrske eppendorfove epruvete Komora za pripravo PCR mešanic, BIOSAN DNA/RNA cleaner, UVT-S-AR
- Komora za delo s PRC produkti; EHRET, BIOSAFE 2
- aparatura PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler
- vrtinčnik s centrifugo, MultiSpin, MSC-3000, BIOSAN
- rokavice

##### 3.8.1.2 Material za 10 % poliakrilamidno gelsko elektroforezo

- Naprava za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (nosilec za vlivanje gela s tesnili, stekla, distančniki, glavniček, nosilec za gel v elektroforezni banjici, banjica za elektroforezo) BIORAD, Protean® II XI cell

- 15 in 50 mililitrske centrifugirke (Conring)
- Stojalo za centrifugirke
- Plastične Pasteurjeve pipete, Plastibrand® Pasteur pipetes, Cat. št. 74 77 55
- 2x 0,5 litrski stekleni časi
- Vir električne napetosti, BIORAD powerpack 3000
- Hamiltonova brizga, Sigma Hamilton syringe, Model 705 SNR
- Hladna soba
- Digestorij
- Tehnica, Sartorius, BP 310 S
- Plastična banjica
- Nitrilne in navadne rokavice
- Sistem za fotografiranje gelov v ultravijoličnem spektru, Biosystematica, UVI prosystem
- Raztopina akrilamida, 30% acrylamide/bis solution, 29:1(3,3%) BIORAD, Cat. št. 161-0156
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine), Sigma, T7024- 50ml
- 50x TAE pufer (Preglednica 3.15)
- Amonijev presulfat (APS) 98+%, Sigma, Cat. št. A9164
- Bidestilirana voda (bdH<sub>2</sub>O)
- Raztopina etidijevega bromida 10mg/ml, Sigma, E-1510
- Dolžinski standardi redčeni z bdH<sub>2</sub>O in nanašalnim puferom v razmerju 2:1:3(standard : bdH<sub>2</sub>O : nanašalni pufer)
  - GeneRuler® 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Cat. št. SM0321
  - Low Molecular Weight DNA Ladder, NewEngland BioLabs, Cat. št. N3233L
  - pBR322/ BsuRI (Hae III) Marker, 5, Fermentas, Cat. št. SM0271

### 3.8.1.3 Materiali za gelsko elektroforezo na 2 % agarovi

Enako kot v točki 3.7.1

### 3.8.2 Metoda

1. Reakcijske mešanice PCR smo odmrznili, prevrtinčili in centrifugirali.
2. V komori za pripravo mešanic PCR smo odmrznili, prevrtinčili in centrifugirali oba reakcijska pufera in BSA, endonuleazi smo imeli na ledu do uporabe.
3. V 1,5 mililitrsko eppendorfovno epruveto smo pripravili reakcijsko mešanico, kot je navedeno v preglednicah 17 do 20.
4. Če so bili produkti vgnezdzene PCR reakcije smo zmanjšali količino dodanega PCR produkta in povečali količino vode tako da so koncentracije ostalih reagentov ostale nespremenjene

Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za *Hpa II* endonukleazo.

	Založna konc.	Končna konc.	Končni volumen na reakcijo (μl)
bdH <sub>2</sub> O	0	0	10
10x NEBuffer 1	10	1	2
BSA ug/mL	10000	0	0
Encim <i>Hpa II</i> (U/uL)	10	0,5	1
Skupaj master miksa. (uL)			13
volumen reakcije (uL)			20

Preglednica 18: Sestava reakcijske mešanice za *Taqα I* endonukleazo.

	Založna konc.	Končna konc.	Končni volumen na reakcijo (μl)
bdH <sub>2</sub> O	0	0	10,3
10x NEBuffer 4	10	1	2
BSA ug/mL	10000	100	0,2
Encim <i>Taqα I</i> (U/uL)	20	0,5	0,5
Skupaj master miksa. (uL)			13
volumen reakcije (uL)			20

Preglednica 19: Sestava reakcijske mešanice za *AluI* endonukleazo.

	Založna konc.	Končna konc.	Končni volumen na reakcijo
H <sub>2</sub> O	0	0	10,6
10x NEBuffer 4	10	1	2
BSA	10000	0	0
Encim <i>AluI</i> (U/uL)	10	0,2	0,4
Skupaj master miksa. (uL)			13
volumen reakcije (uL)			20

Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za *Tru9I* endonukleazo.

	V za en vzorec (μl)
ddH <sub>2</sub> O	7,53
10x pufer	1,7
100xBSA	0,17
Encim <i>Tru9I</i> 5 U/uL	0,6
Skupaj master mixa. (uL)	10
volumen reakcije (uL)	17

5. Gotovo reakcijsko mešanico smo temeljito prevrtinčili in centrifugirali, razdelili v 0,2 mililitrske eppendorfove epruvete, po 10 ali 13 μl v vsako in epruvete postavili na led.
6. V komori za delo s produkti PCR smo v označene 0,2 mililitrske eppendorfove epruvete z reakcijskimi mešanicami dodali 7 μl PCR produktov, jih prevrtinčili in

centrifugirali. Vsakič smo naredili tudi negativno kontrolo reakcije (NKR), kjer smo namesto PCR produktov dodali 7 µl bdH<sub>2</sub>O.

7. Reakcije smo inkubirali v napravi PCR System 9700 GeneAmp PCR Cycler:
  - a. Mešanice s *Taqα I* in *Tru91*endonukleazo 60 min pri temperaturi 65 °C.
  - b. Mešanice s *Hpa II* endonukleazo 120 min pri temperaturi 37 °C
  - c. Mešanice s *AluI* endonukleazo 60 min pri 37 °C
8. Med inkubacijo smo:
  - a. sestavili nosilec za vlivanje gela, nato pa pripravili 10 % poliakrilamidni gel (PA gel) kot je navedeno v preglednici 21.
  - b. pripravili 2 % agarozni gel kot je navedeno pod točko 3.7.2

**Preglednica 21: Sestava in potek priprave 10% poliakrilamidnega gela**

Vrstni red dodajanja	Sestavina	Količina za pripravo enega velikega gela (16 x 20 cm)
1	bdH <sub>2</sub> O	10,65 ml
2	Raztopina akrilamida	14,2 ml
3	5x TAE	6,0 ml
4	APS (100mg/ml)	300 µl
5	TEMED	30 µl

9. PA gel smo vedno pripravljali v digestoriju in uporabljali zaščitne rokavice. APS je bil vedno sveže pripravljen (100 mg APS + 1,0 ml bdH<sub>2</sub>O). Pred začetkom dela smo si pripravili tudi 5x TAE pufer.
10. Po dodatku zadnje kemikalije (TEMED) smo centrifugirko zaprli, vsebino dobro premešali tresenjem in čim hitreje nalili v pripravljeni nosilec s plastično Pasteurjevo pipeto.
11. PA gel smo nalili do vrha stekel nato pa vstavili glavniček. Pri tem smo pazili, da nismo naredili zračnih mehurčkov.
12. Po približno 30 min se je gel strdil, in smo ga lahko vstavili v napravo za elektroforezo. Če smo vlili samo en gel, potem smo na drugo stran nosilca vstavili prazni stekelci, da smo preprečili odtekanje elektroforetskega pufra TAE med elektroforezo
13. V banjico smo natočili 1x TAE pufer tako, da je segal približno 2/3 do vrha banjice, nekaj pa smo ga natočili tudi na vrh nosilca, med vpeta gela. Pazili smo, da sta bil negativna elektroda in glavniček pod gladino TAE pufra.
14. Previdno in počasi smo odstranili glavniček, da nismo poškodovali žepkov. V žepke na gelu smo s hamiltonovo brizgo (PA gel) oziroma s pipeto (agarozni gel) nanesli vzorce, katerim smo dodali 6 µl nanašalnega pufra. V prvega in zadnja dva žepka na gelu smo nanesli po 5 µl redčenih dolžinskih standardov.
15. Poliakrilamidna elektroforeza je potekala pri 4 °C 18 ur pri napetosti 80V, 2% agarozna elektroforeza pa pri sobni temperaturi 60 min, napetost 100V,
16. Po končani poliakrilamidni elektroforezi smo razdrli stekla, med katerimi je bil gel in ga pobarvali z etidijevim bromidom (inkubacija v 1x TAE pufru z etidijevim bromidom: 20 minut v temi)
17. Gele smo fotografirali s sistemom za fotografiranje gelov v ultravijoličnem spektru, Biosystematica, UVI prosystem.

### 3.9 KLONIRANJE PRODUKTOV PCR

#### 3.9.1 Priprava gojišč

##### 3.9.1.1 Materiali

- Tehnica, Sartorius BP 310 S
- Tehnica, Sartorius, R 200 D
- Mikrovalovna pečica, DeLonghi MW862F
- Brezprašna komora za razlivanje gojišč, EHRET AURA-H
- 5 mililitrske brizge prilagojene za uporabo filtrov
- Filtri s porami 0,20 µm
- 15 mililitrske centrifugirke
- 1,5 mililitrske eppendorfove epruvete
- Manjša čista časa
- Plastičen vrč
- Merilni valj
- Magnetno mešalo in mešalni magnet
- Avtoklav
- SHOTT steklenice, 11
- Rokavice in zaščitna maska za delo z antibiotiki
- Petrijevke s premerom 9 cm
- Aluminijasta folija
- Pipete z nastavki s filtrom
- Bidestilirana voda
- Bacto™ Trypton, BD, # 211707
- Bacto™ Yeast Extract, BD, #212750
- Bacto™ Agar, BD, # 214010
- Natrijev klorid, Merck, K39301104
- X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside), Fermentas, #R0402
- N,N dimetilformamid, D-4551, Sigma
- Ampicilin, A-9393, Sigma

##### 3.9.1.2 Metoda

1. Najprej smo pripravili raztopino ampicilina s koncentracijo 50 mg/ml
  - a. Zatehtali smo 500,0 mg ampicilina v prahu. Med tehtanjem smo si preko nosu in ust nadeli zaščitno masko.
  - b. Ampicilin smo stresli v čašo in dodali 10 ml bidestilirane vode ter ga raztopili z rahlim krožnim mešanjem.
  - c. Raztopino smo nato v brezprašni komori sterilno filtrirali v čisto 15 mililitrsko centrifugirko s pomočjo sterilne brizge in filtra ter jo razdelili v 1,5 mililitrske eppendorfove epruvete po 1mililiter.
2. Nato smo pripravili 2 % raztopino X-Gal (20mg/ml) v N,N dimetilformamidu. Korak a), smo izvedli v digestoriju.
  - a. Zatehtali smo 0,070 g X-Gal v prahu, stresli v manjšo čisto čašo in dodali 3,5 ml N,N dimetilformamida

- b. Raztopino smo nato v brezprašni komori sterilno filtrirali v čisto 15 mililitrsko centrifugirko s pomočjo sterilne brizge in filtra s porami 0,20 µm
3. Pripravili smo gojišči:
- tekoče LB gojišč s 100 µg/ml ampicilina
  - trdno LB gojišča s 50 µg/ml X-Gal in 100 µg/ml ampicilina
- Osnovne sestavine LB gojišča so navedene preglednici 22.

**Preglednica 22: Sestava LB gojišča**

Sestavina LB gojišča	Količina za 1 liter gojišča
bdH <sub>2</sub> O	1 l
Bacto <sup>TM</sup> Trypton, BD, # 211707	10 g
Bacto <sup>TM</sup> Yeast Extract, BD, #212750	5 g
Natrijev klorid, Merck, K39301104	5 g
Bacto <sup>TM</sup> Agar, BD, (samo za trdno gojišče)	15 g

4. Potek priprave trdnih gojišč:
- Z merilnim valjem smo odmerili 2 l bdH<sub>2</sub>O.
  - V plastičen vrč smo dali mešalni magnet, ga postavili na magnetno mešalo in dolili vodo. Pričeli smo z mešanjem.
  - V vrč smo počasi dodajali vse natehtane sestavine in počakali, da so se med mešanjem popolnoma raztopile.
  - Raztopino smo pretočili v litrske steklenice, v vsako pol litra.
  - Na steklenice smo rahlo privili plastične zamaške, jih tesno zavili v aluminijasto folijo in opremili z avtoklavirnim lepilnim trakom ter označili.
  - Steklenice smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,3 bar
  - Po avtoklaviranju smo počakali, da so se gojišča ohladila na približno 50-60 °C, nato pa smo v brezprašni komori dodali:
    - 1 mililiter ampicilina (50mg/ml) na 0,5 l gojišča in premešali
    - 1.25 mililitra 2% X-Gal (20mg/ml) na 0,5 l gojišča in premešali
  - V brezprašni komori smo še toplo trdno gojišče sterilno razlili v petrijevke, približno 20 petrijevk iz 0,5 l litra gojišča
  - Petrijevke smo pustili delno odprte, dokler se gojišče ni popolnoma shladilo in strdilo, nato pa smo jih pokrili in čez noč inkubirali v temi na sobni temperaturi. Tako smo se prepričali, da so gojišča v petrijevkah res sterilna.
  - Tekoče gojišče smo v komori za sterilno delo razporedili v sterilne 15 mililitrske centrifugirke, v vsako približno 8 mililitrov. Centrifugirke smo zaprli in jih shranili pri 4 °C.

### 3.9.2 Čiščenje in koncentriranje produktov PCR pred ligacijo v vektor

Klonirati smo želeli fragmente pomnožene v reakciji vgnezdenega PCR, kjer smo uporabili oligonukleotidne začetnike FD9f3b/r2.

Pred ligacijo izbranih PCR produktov v vektor smo jih očistili s kompletem DNA gel extraction kit (Milipore). S tem smo odstranili neporabljenе oligonukleotidne začetnike in vse kratke fragmente DNA. Tako smo zagotovili, da se je kasneje v vektor vstavljal le želeni fragment.

#### 3.9.2.1 Materiali

- DNA gel extraction kit, MILIPORE, Cat. št. LSKG EL 050
- Namizna centrifuga, Eppendorf 5417R

- Agaroza, Sigma, Cat. no A9164
- Bidestilirana voda (bdH<sub>2</sub>O)
- Nosilec za gel, glavnički in banjice, BIORAD
- Skalpeli za enkratno uporabo
- Naprava za pregledovanje gelov, Safe Imager™, Invitrogen in priložena očala za opazovanje gelov
- Vse potrebno za pripravo 1% agaroznega gela (glej 3.7.1)

### 3.9.2.2 Metoda

Po navodilih proizvajalca: Milipore, Dna gel extraction kit, Catalogue Number LSKG EL050

### 3.9.3 Določanje koncentracije nukleinskih kislin v očiščenih produktih PCR in njihovo koncentriranje.

Pred ligacijo v vektor je bilo potrebno optimizirati koncentracijo DNA fragmentov.

#### 3.9.3.1 Materiali

- NanoDrop®, ND-1000, Spectrophotometer
- voda brez RN-aze
- krpice za čiščenje tipala
- evaporator, GeneVac EZ 2 plus
- Pipete z nastavki
- bdH<sub>2</sub>O

#### 3.9.3.2 Metoda

1. Koncentracijo raztopine očiščenih produktov PCR (1,5 µl) smo merili s pomočjo aparature NanoDrop®.
2. S pomočjo pipete smo določili še volumen posamezne raztopine očiščenih produktov PCR.
3. Odprte mikrocentrifugirke smo vstavili v evaporator in odparili vso vodo pri podtlaku in temperaturi 40 °C.
4. Po evaporaciji smo očiščenim PCR produktom dodali bd vodo do koncentracije približno 20 ng/µl.
5. Koncentracijo smo ponovno preverili s pomočjo NanoDrop® naprave.

### 3.9.4 Ligacija produktov PCR v plazmid pGEM®

#### 3.9.4.1 Material

- pGEM® T Easy Vector System I Kit, Promega, Cat. št. A1360
- Namizna centrifuga Eppendorf MiniSpin plus®
- 0,5 mililitrske eppendorfove epruvete
- Vrtinčnik, Vibromix 10, Tehnica®
- Komora za delo s PCR produkti, EHRET Biosafe 2

### 3.9.4.2 Metoda (pGEM®-T Easy 2009)

Ligacijo PCR produktov v plazmide smo naredili s pGEM® T Easy Vector System I kompletom. Sestava reakcijskih mešanic in izračuni so predstavljeni v preglednic 23 in nadaljnjem tekstu.

#### Preglednica 23: Sestava reakcij ligacije

Sestavine reakcije	Količina sestavine za 1 vzorec	Količina sestavine za pozitivno kontrolo reakcije	Količina sestavine za kontrolo ozadja reakcije
2X Rapid Ligation Buffer	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM-T Easy Vector (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR produkt	3 µl (glej točko 4 v tem poglavju)	/	/
Kontrolni DNA insert	/	2 µl	/
T4 DNA Ligase (3 Weiss-ove enote/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Voda brez nukleaz do končnega volumna 10 µl	/	1 µl	3 µl

#### 1. Optimizacija količine PCR produktov v reakciji:

- Pri optimizaciji količine PCR produktov v reakcijah ligacije smo upoštevali enačbo 1, naš konkreten izračun je predstavljen v enačbi 2.
- V reakcijsko mešanico smo zato dodali 3µl raztopine PCR produktov (20ng/µl), ki smo jo pripravili v točki 3.9.3.

$$\frac{\text{masa vektorja v ng} \times \text{dolžina PCR fragmenta v kb}}{\text{dolžina vektorja v kb}} \times \left(\frac{3}{1}\right)^* = \text{optimalna masa PCR fragmenta v reakciji}$$

Enačba 1: Izračun optimalne količine produktov/ vključka PCR v reakciji ligacije; \* faktor predstavlja molarno razmerje med insertom (3) in vektorjem(1), ki smo ga izbrali sami

$$\frac{50\text{ng} \times 1,2\text{ kb}}{3,0\text{ kb}} \times 3 = 60\text{ng}$$

Enačba 2: Izračun optimalne količine produktov PCR v reakciji ligacije z našimi konkretnimi številkami.

### 3.9.5 Transformacija vektorja pGEM® v kompetentne celice *E. coli*

#### 3.9.5.1 Materiali

- One Shot® Top 10 Cemically competent *E. coli* Kit, Invitrogen, Cat. št. C4040-03
- Eppendorfove epruvete z ligacijskimi reakcijami iz točke 3.7.4
- Termoblok, Kroketer, TBTEb
- Komora za sterilno delo, EHRET BIOSAFE 2
- Inkubator, Kambič I-150-CH
- Stresalnik, Kambič, S 360x360
- Stojalo za epruvete
- Plastične eze za enkratno uporabo
- Pipete in nastavki

- Sterilne plastične paličice za razmazovanje celic po trdnem gojišču
- Polistirenska posoda za led in led
- Rokavice
- Lepilni trak

### 3.9.5.2 Metoda(One Shot TOP10 2004)

Transformacijo plazmidov smo izvedli z ONE Shot top 10( Invitrogen) kompletom po navodilih proizvajalca. Nekateri koraki so natančneje opisani v nadaljevanju.

1. Pripravili smo tri kontrole:
  - a. Pozitivna kontrola ligacije: v mikrocentrifugirko s celicami smo dodali 5 µl pozitivne kontrole ligacijske reakcije, pripravljene v točki 3.9.4
  - b. Kontrola ozadja ligacije: v mikrocentrifugirko s celicami smo dodali 5 µl kontrole ozadja ligacijske reakcije, pripravljene v točki 3.9.4
  - c. Pozitivna kontrola transformacije: Namesto ligacijske reakcije smo celicam dodali 1 µl priložene raztopine kontrolnega plazmida pUC19.
2. V komori za sterilno delo smo prenesli suspenzijo celic iz posamezne reakcijske mikrocentrifugirke v dve petrijevki s trdnim LB gojiščem(50 µg/ml X-Gal, 100 µg/ml ampicilina) pripravljenim v točki 3.9.1. Na eno izmed obeh plošč smo nanesli 100 µl, na drugo pa 200 µl suspenzije celic. Suspenzijo celic smo razmazali s pomočjo sterilne plastične paličice.
3. Na trdno gojišče smo nanesli tudi kontrole, po 150 µl suspenzije celic.
4. Označene petrijevke smo po dvajsetih minutah obrnili s pokrovom navzdol in jih čez noč inkubirali pri temperaturi 37 °C.
5. Naslednji dan smo najprej preverili plošče s kontrolami in jih ovrednotili kot ustrezne. Iz vsake izmed ostalih petrijevk smo v komori za sterilno delo s sterilno ezo prenesli od 4 do 6 posameznih kolonij v petrijevke s svežim gojiščem. Označene petrijevke smo inkubirali čez noč pri temperaturi 37 °C.
6. Naslednji dan smo v komori za sterilno delo prenesli po eno posamezno kolonijo iz vsake petrijevke v eno 15 mililitrsko centrifugirko s tekočim LB gojiščem (100 µg/ml ampicilin), segretim na sobno temperaturo.
7. Centrifugirke smo čez noč inkubirali pri temperaturi 37 °C.

### 3.9.6 Izolacija plazmidne DNA iz suspenzije celic *E. coli*

#### 3.9.6.1 Material

- Wizard® Plus SV Minipreps Kit, Promega, Cat. št. #A1460
- Stojala za 15 mililitrske centrifugirke
- Papirnate brisače
- Plastične Pasteurjeve pipete, Plastibrand® Pasteur pipetes, Cat. št. 74 77 55
- Centrifuga Beckman Avanti J-25; rotor JA25.15
- Centrifuga, Eppendorf 5417R
- 2 mililitrske eppendorfove epruvete
- Pipete z nastavki

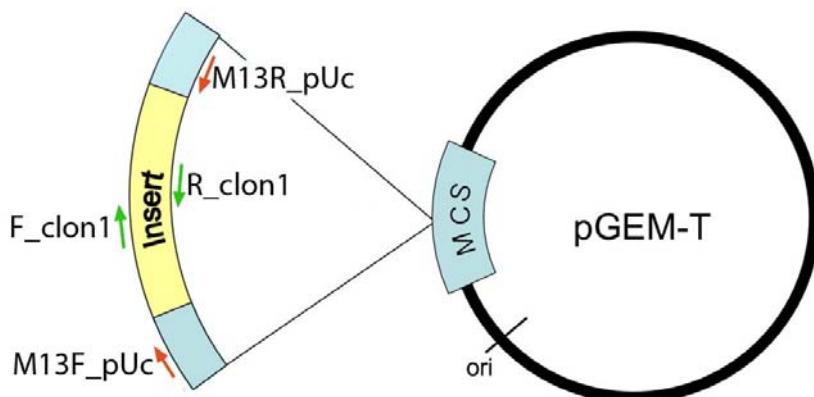
#### 3.9.6.2 Metoda

Plazmidno DNA smo iz suspenzije celic *E. coli* izolirali z Wizard Plus SV Minipreps, (Promega) kompletom. Delo smo izvajali po navodilih proizvajalca.

Po končanem postopku izolacije smo ependorfove epruvete z raztopino plazmidov označili, zaščitili s parafilmom in poslali sekvencirati v podjetje Macrogen, Korea. Sekvenciranje plazmidov je bilo izvedeno z začetnimi nukleotidi navedenimi v preglednici 3.21. Naleganje začetnikov je shematsko predstavljeno na sliki 10. Vsi začetniki so bili sintetizirani v podjetju Macrogen, Korea.

**Preglednica 24: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni za sekvenciranje posameznega plazmida**

Oznaka oligonukleotidnega začetnika	Dolžina	Sekvenca začetnika 5'-3'	Vir:
M13F-pUC	17 bp	GTTTCCCAGTCACGAC	(pGEM®-T Easy 2009)
M13R-pUC	17 bp	CAGGAAACAGCTATGAC	(pGEM®-T Easy 2009)
F_clon1	18 bp	AGCTATAAGGGATGGTAGA	načrtovali sami
R_clon1	20 bp	GCTGAAGATAAGATAATTGT	načrtovali sami



**Slika 10: Shematični prikaz naleganja nukleotidnih začetnikov uporabljenih pri sekvenciranju plazmida pGEM. Slika je pritejena po viru: <http://www.biomedcentral.com/content/figures/1471-2164-8-416-2-l.jpg>**

### 3.10 OBDELAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Vsa sekvenciranja so bila izvedena po Sangerjevi metodi. Podatke o nukleotidnih zaporedjih smo prenesli neposredno s spletnne strani podjetje Macrogen, Korea, in jih nato uvozili v program CLC MainWorkbench (CLCBio). Najprej smo ročno pregledali kakovost posameznih zaporedij, tako da smo si ogledali njihove kromatograme. Iz nadaljnje obdelave smo izločili zaporedja, ki niso bila dovolj kakovostna/verodostojna. Iz nadaljnje obdelave smo izločili tudi nizkokakovostne začetne in končne dele ostalih zaporedij. Pri zaporedjih pridobljenih s sekvenciranjem plazmidov, smo izločili tudi del zaporedja, ki je pripadal plazmidu, v katerega smo vstavili produkte PCR. Tako obdelana nukleotidna zaporedja posameznega vzorca smo vzporedili v soseke (ang. contig). Vsa morebitna neujemanja med zaporedji smo preverili in jih primerjali s kromatogrami posameznih zaporedij. Tako smo za vsako neujemanje določili kateri nukleotid je najbolj verjetno ustrezен. Za vsak vzorec smo nato izvozili soseke v format FASTA. Zaporedja vseh sosek smo primerjali z že objavljenimi zaporedji v podatkovni bazi NCBI Nucleotide,

s pomočjo orodja BLAST integriranega v program CLC MainWorkbench. Naša zaporedja smo nato poravnali z algoritmom ClustalW (CLC MainWorkbench) skupaj z najbolj verjetnimi zadetki orodja Blast. Tako smo videli dejanske nukleotidne razlike med zaporedji.

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRIMERJAVA METOD HOMOGENIZACIJE IN EKSTRAKCIJE DNA IZ RASTLINSKEGA MATERIALA

Kakovost ekstrakcije fitoplazemske DNA iz rastlinskega materiala smo ovrednotili s primerjavo vrednosti Ct z metodo PCR v realnem času za štiri različne amplikone: 18S, UniRNA, BNgen in FDgen (Preglednica 25). V analizah PCR v realnem času, pozitivno reakcijo detektiramo s kopičenjem fluorescenčnega signala. Vrednost Ct (okrajšava za angl. cycle threshold) je definirana kot število ciklov, ki so potrebni, da fluorescenčni signal preide prazenjo vrednost in tako preseže raven ozadja. Vrednost Ct je obratno sorazmerna s količino tarčne nukleinske kisline v vzorcu. To pomeni, da nižja kot je vrednost Ct, več nukleinske kisline je v vzorcu. Pri 40 ciklih pomnoževanja, vrednosti Ct, ki so manjše od 29, pomenijo močno pozitivno reakcijo z veliko prisotne tarčne nukleinske kisline; vrednosti med 30 in 37 pomenijo pozitivno reakcijo, z zmerno količino tarčne nukleinske kisline; medtem ko vrednosti med 38 in 40 pomenijo šibko reakcijo, ki lahko nakazuje zelo nizko količino tarčne nukleinske kisline ali celo kontaminiran vzorec.

Notranjo kontrolo v naših poskusih je predstavljal amplikon 18S, ki je bil pokazatelj ekstrakcije rastlinske DNA. Vrednosti Ct za ta amplikon so bile pri vzorcih, ki smo jih homogenizirali z napravo FastPrep®, v povprečju nižje kot pri vzorcih homogeniziranih klasično v terilnicah. To pomeni, da smo s FastPrep® pridobili večjo ali enako količino rastlinske DNA. Glede na vrednosti Ct med 15,40 in 20,04 smo z obema metoda ekstrahirali veliko rastlinske DNA.

Primerjave vrednosti Ct pri fitoplazemski DNA so pokazale zelo podobne vrednosti ob uporabi FastPrep® in klasične homogenizacije.

Zelo visoke vrednosti Ct ob uporabi amplikona UniRNA za splošno detekcijo fitoplazemske DNA (UniRNA) v primerjavi s specifičnima amplikonomoma BNgen in FDgen kažejo na njegovo nespecifičnost.

**Preglednica 25: Vrednosti Ct za posamezen tip preizkušene ekstrakcije po PCR v realnem času. Z različnimi barvami so označeni različni tipi ekstrakcije, ki so primerjeni s klasično ekstrakcijo. Oznake: Ct 1, Ct vrednosti dobljene pri klasični metodi ekstrakcije; Ct 2, Ct vrednosti dobljene pri preizkušeni ekstrakciji; P Ct 1, povprečje Ct vrednosti pri klasični ekstrakciji; P Ct 2, povprečje Ct vrednosti pri preizkušeni ekstrakciji; undet., signala nismo nismo zaznali; X, vzorec je bil med homogenizacijo poškodovan in nadaljnji testi niso bili izvedeni.**

Oznaka vzorca	Vrsta preizkušane ekstrakcije- metoda																	
		18S				Uni				BN				FD				
		Ct 1	Ct 2	P Ct 1	P Ct 2	Ct 1	Ct 2	P Ct 1	P Ct 2	Ct 1	Ct 2	P Ct 1	P Ct 2	Ct 1	Ct 2	P Ct 1	P Ct 2	
D1999/09	1 (Fast prep, lysing matrix D, Fast DNA Spin KIT)	18,29	19,37	18,38	19,41	40,00	undet	38,61	/	29,16	29,49	29,22	29,51	undet	undet	/	/	
		18,42	19,51			37,30	undet			29,29	29,38			undet	undet	/	/	
		18,42	19,35			38,54	undet			29,22	29,65							
D1881/09		18,60	19,01	18,59	19,21	38,31	43,24	40,49	43,24	31,50	29,90	31,43	30,01	undet	undet	/	/	
		18,63	19,36			41,39	undet			31,28	29,95			undet	undet	/	/	
		18,55	19,27			41,76	undet			31,51	30,17							
D1907/09	2 (Fast prep, lysing matrix A, Fast DNA Spin KIT)	19,32	18,49	19,14	18,04	38,51	43,81	38,50	41,28	29,16	25,26	29,16	25,33	undet	undet	/	/	
		19,14	17,96			37,94	40,34			29,11	25,34			undet	undet	/	/	
		18,96	17,68			39,04	39,69			29,22	25,39							
D1782/09		16,67	15,46	17,23	15,40	40,62	42,96	41,59	41,65	31,15	28,24	30,97	28,31	undet	undet	/	/	
		17,62	15,46			undet	undet			30,89	28,26			undet	undet	/	/	
		17,39	15,29			42,55	40,33			30,88	28,44							
D1944/09	3 (Fast prep, lysing matrix A, KingFisher)	19,08	16,34	19,29	16,59	undet	undet	/	/	34,34	33,28	33,88	33,49	undet	undet	/	/	
		19,25	16,69			undet	undet			34,06	33,54			undet	undet	/	/	
		19,53	16,75			undet	undet			33,24	33,64							
D1910/09		19,30	x	19,21	X	undet	x	41,81	X	31,32	x	31,41	X	undet	x	/	X	
		19,14	x			41,81	x			31,40	x			undet	undet	/	/	
		19,19	x			undet	x			31,50	x							
D1742/09		20,15	17,54	20,04	17,61	42,36	42,60	40,68	41,62	31,08	30,78	31,06	30,75	undet	undet	/	/	
		19,92	17,65			undet	undet			31,07	30,99			undet	undet	/	/	
		20,05	17,64			38,99	40,64			31,04	30,47							
D1949/09		17,91	16,41	17,96	16,48	22,44	22,61	22,41	22,70	undet	undet	29,93	28,29	undet	undet	/	/	
		17,96	16,49			22,38	22,73			undet	undet			undet	undet	/	/	
		18,02	16,55			22,41	22,77			undet	undet							
D1999/09	3 (Fast prep, lysing matrix A, KingFisher) pruhodno ohlajene centrifu=girke na 20°C	18,59	15,58	18,71	15,85	39,99	37,24	39,98	37,92	26,75	26,20	26,76	26,11	undet	undet	/	/	
		18,80	15,88			41,16	37,91			26,72	26,09			undet	undet	/	/	
		18,73	16,09			38,78	38,60			26,82	26,04							
D1881/09		18,82	15,50	18,89	16,05	41,41	37,35	40,06	38,92	27,97	27,45	27,88	27,30	undet	undet	/	/	
		18,87	16,69			39,10	38,84			27,75	27,11			undet	undet	/	/	
		18,98	15,95			39,68	40,57			27,93	27,34							
D1907/09		19,51	16,27	19,46	16,49	44,05	40,60	41,17	40,43	30,00	28,18	29,93	28,29	undet	undet	/	/	
		19,42	16,44			38,83	39,77			29,92	28,38			undet	undet	/	/	
		19,44	16,77			40,64	40,92			29,88	28,31							
D1782/09		19,40	16,44	19,50	16,38	32,53	39,93	32,32	38,39	28,44	28,65	28,45	28,66	undet	undet	/	/	
		19,59	16,44			32,23	37,46			28,39	28,72			undet	undet	/	/	
		19,52	16,27			32,21	37,79			28,52	28,60							
D1944/09		19,72	16,63	19,71	16,43	43,89	Undet.	43,89	/	31,47	30,87	31,21	30,84	undet	undet	/	/	
		19,85	16,63			undet	Undet.			30,91	30,70			undet	undet	/	/	
		19,56	16,04			undet	Undet.			31,25	30,95							
D1910/09		18,91	16,01	18,87	16,06	40,92	38,33	40,98	39,04	29,16	28,36	29,33	28,60	undet	undet	/	/	
		18,81	16,10			39,71	38,69			29,56	28,59			undet	undet	/	/	
		18,88	16,08			42,31	40,11			29,26	28,84							
D1742/09		19,62	15,41	19,46	15,52	39,13	39,71	40,77	39,02	28,62	29,76	28,79	29,76	undet	undet	/	/	
		19,28	15,63			42,51	38,63			28,76	29,70			undet	undet	/	/	
		19,49	15,53			40,68	38,72			28,98	29,83							
D1949/09		17,49	15,64	17,61	15,73	38,59	40,76	38,38	41,56	27,90	28,29	27,86	28,39	undet	undet	/	/	
		17,35	15,81			39,35	41,50			2								

#### 4.2 BOLEZENSKA ZNAMENJA NA VINSKI TRTI OKUŽENI S FITOPLAZMO FD

Konec rastne sezone 2009 se je na Dolenjskem pojavilo novo žarišče okužb vinske trte s fitoplazmo FD. Slike prikazujejo obolele trse s tega območja, z značilnimi bolezenskimi znamenji zlate trsne rumenice na poganjkih in listih rdeče sorte (slika 11), bele sorte (slika 12) ter na grozdih (slika 13).



Slika 11: Bolesni znaki pri rdečih sortah (na sliki: modra frankinja): A, rdečenje ter zvijanje listnih robov navzdol, v ozadju zdrava rastlina; B, mozaični tip rdečenja, nagubani in krhki listi; C,D, sektorski tip rdečenja (Foto: Matevž Rupar (M.R.))



Slika 12: Bolesni znaki pri belih sortah (na sliki: renski rizling): A,B, rumenenje listov, zvijanje listnih robov navzdol, nagubani in krhki listi; C, neoleseneli poganjki. (Foto: M.R.)



Slika 13: Dva primera sušenja in propadanja grozdih jagod, kot posledica okužbe z zlato trsno rumenico. Na obeh slikah lahko vidimo tudi, da sta poganjka slabo olesenela. (Foto: M.R.)

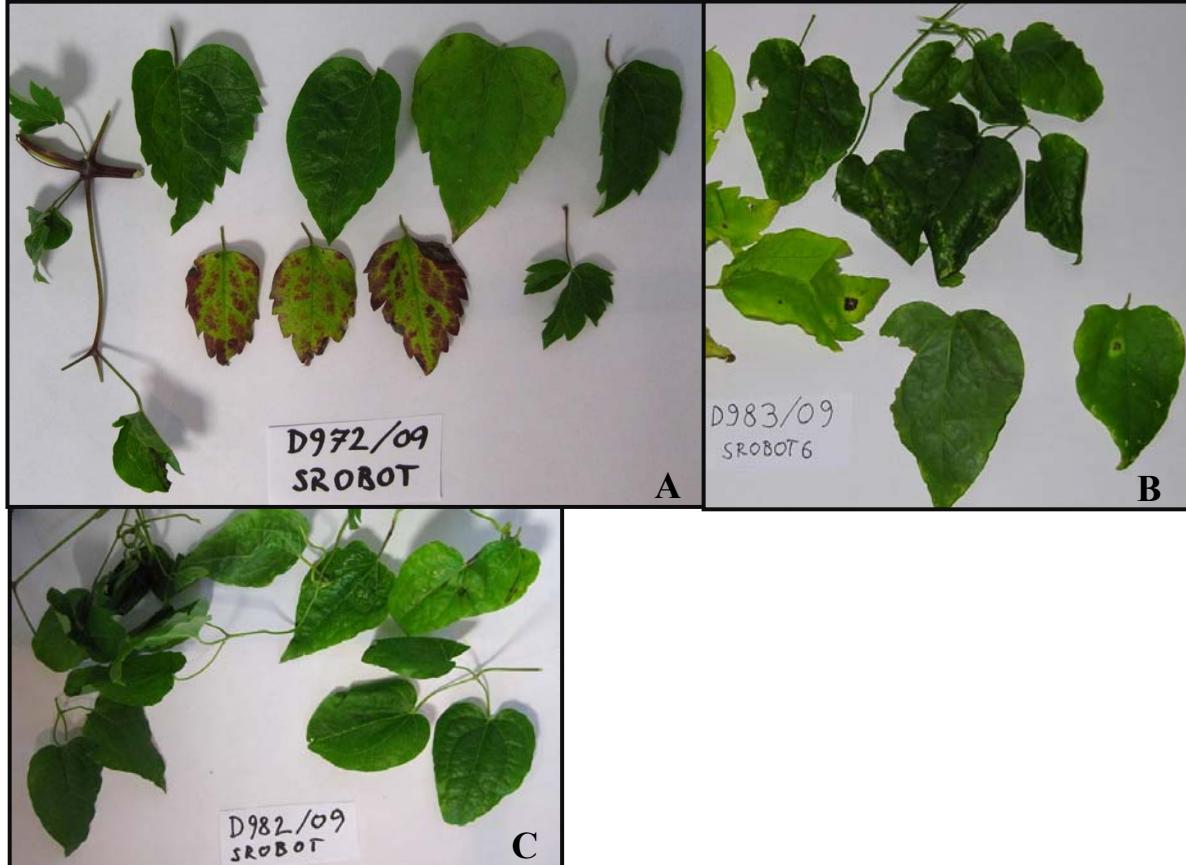
Okužba s fitoplazmo FD močno prizadene tudi samorodne trte (Slika 14).



Slika 14: A, bolezenska znamenja pri samorodnici, veliki nagubani in krhki listi, zvijanje listnih robov navzdol, rumenenje listov; B, primerjava med listom brez bolezenskih znamenj (v ozadju) in listom z bolezenskimi znamenji. (Foto: M.R.)

#### 4.3 BOLEZENSKA ZNAMENJA NA SROBOTIH OKUŽENIH S FITOPLAZMO FD

V vzorcih srobota z znamenji kot so rumenenje in rdečenje listov te vihanje listov navzdol (slika 15, A-C) smo z nadaljnjo analizo potrdili prisotnost fitoplazme FD. Prav tako smo to fitoplazmo potrdili tudi v nekaterih vzorcih srobota, nabranih na rastlinah brez izraženih bolezenskih znamenj (Slika 16, A). Iz tega lahko sklepamo, da na osnovi vidnih znamenj, brez molekulske analize, prisotnosti fitoplazem ne moremo izključiti.



Slika 15: Bolezenska znamenja na srobotu, okuženem s fitoplazmo FD. A, rumenenje in rdečenje listov; B in C, nagubani, krhki in navzdol zavihani listi. (Foto: M.R.)



Slika 16: A, vzorec brez značilnih bolezenskih znamenj, a z molekulsko potrjeno prisotnostjo fitoplazme FD; B, zdrava rastlina. (Foto: M.R.)

#### 4.4 VZORCI, V KATERIH JE BILA POTRJENA PRISOTNOST FITOPLAZME FD Z METODO PCR V REALNEM ČASU

V prilogi A so predstavljeni rezultati prisotnosti fitoplazme FD. S temno modro so označeni tisti vzorci, ki so bili testirani v okviru te naloge, ostali so bili testirani v sklopu Programa za posebni nadzor trsnih rumenic.

Testirali smo vzorce japonskega škržatka (*Orientus ishidae*), vinske trte, srobotu, drena, ribeza, trdoleske, kivija in drugih, ki so predstavljeni v preglednici 26.

**Preglednica 26: Rezultati testov PCR v realnem času izvedenih v okviru te naloge. Oznake: Poz, potrjena prisotnost; Neg, potrjena odsotnost; BN, fitoplazma počrnelosti lesa; FD, fitoplazma zlate trsne rumenice; fitopl., neznana fitoplazma**

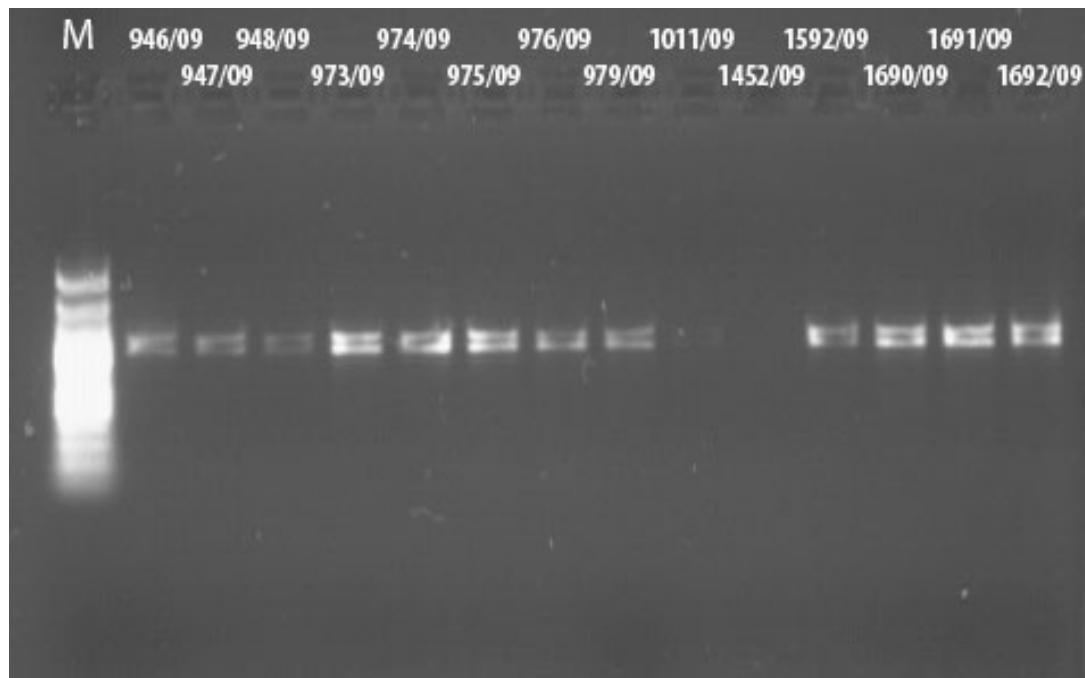
Vrsta	Število vzorcev z določenim rezultatom				Skupaj	
	Neg: BN, FD	Neg: BN, Poz: FD	Neg: FD; Poz: BN	Poz: fitopl.		
bukev	1				1	
dren	1				1	2
jesen	1					1
kivi	1					1
koruza	1					1
malina	1					1
muhvič	1					1
ribez	1					1
srobot	6	8				14
trdoleska	2					2
vinska trta		6	1			7
japonski škržatek ( <i>O. ishidae</i> )		2				2
Skupaj	16	16	1	1		34

Med testiranimi vzorci smo fitoplazmo FD določili v 6/7 vzorcih vinske trte in 8/14 vzorcih srobotu. V enem izmed vzorcev drena smo zaznali prisotnost neznane fitoplazme, ki jo še nismo natančneje določili.

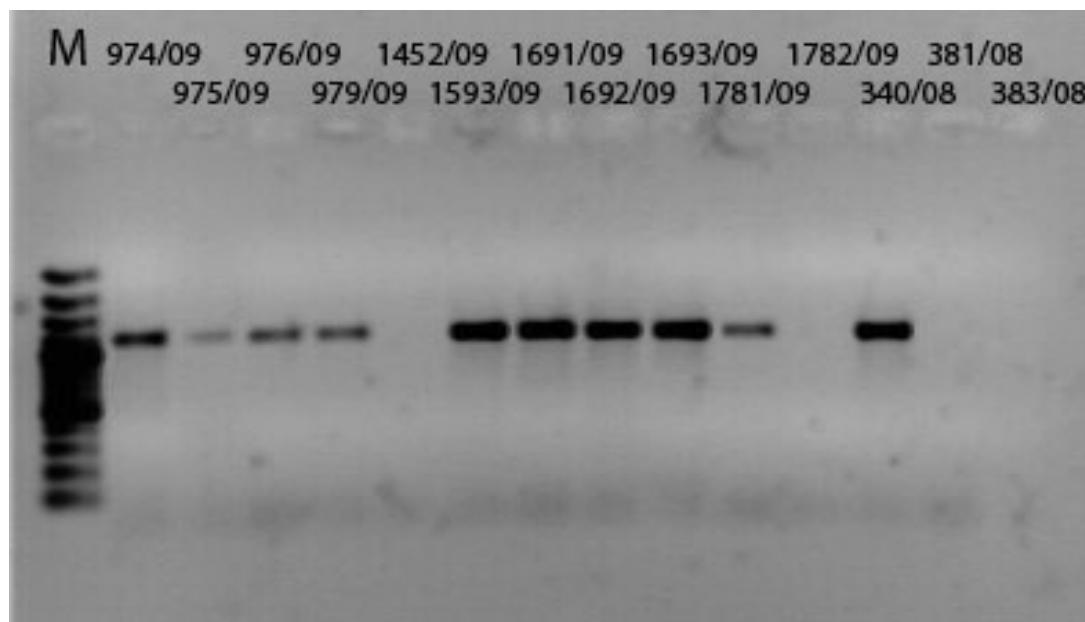
#### 4.5 ANALIZA VZORCEV Z VGNEZDENIM PCR

Vse vzorce od 2005 do 2009, v katerih je bila fitoplazma FD potrjena s PCR v realnem času, smo v nadaljevanju analizirali z vgnezdenim PCR z začetniki navedenimi v preglednici 6. Uspešnost analize je bila odvisna od starosti vzorca, tako da fitoplazme FD nismo uspeli potrditi v vzorcih z leta 2005, le delno smo bili uspešni pri vzorcih z leta 2006 in večinoma uspešni v primeru vzorcev z let 2007 do 2009. Z vgnezdenim PCR smo uspešno pomnožili fragmenta DNA FD9 in rp(V), specifična za FD, v vseh vzorcih srobotov in tako potrdili prisotnost fitoplazme FD določene z metodo PCR v realnem času. PCR analiza bila uspešna tudi pri vseh vzorcih vinske trte z let 2007 do 2009 (Priloga A). Skupno smo z vgnezdenim PCR uspeli pomnožiti 78/98 vzorcev v primeru rp(V) fragmenta- začetniki rp(V)F1A/R1A; ter 88/98 vzorcev v primeru fragmenta FD9- začetniki FD9f3b/r2. Za nadaljnjo uporabo v PCR RFLP analizi smo lahko uporabili 76/78 pomnoženih rp(V) fragmentov in 87/88 pomnoženih FD9 fragmentov. V ostalih primerih je bila koncentracija PCR produktov prenizka za uspešno PCR RFLP analizo.

Na slikah 17 in 18 sta predstavljena dva primera agaroznih gelov, na katerih smo zaznavali produkte reakcij vgnezdenih PCR.



Slika 17: Produkti vgnezdenje PCR reakcije z začetnikoma FD9f3b/r2; 1% agarozni gel; velikost fragmenta je približno 1,2 kbp; M, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder.



Slika 18: Produkti vgnezdenje PCR reakcije z začetnikoma rp(V) F1A/R1A; 1% agarozni gel; velikost fragmenta je približno 1,2 kbp; M, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder.

## 4.6 ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV-PCR RFLP

### 4.6.1 Profila A in B

V primeru razreza fragmentov FD9 z endonukleazo *TaqI* ali fragmentov rp(V) z endonukleazo *HpaII*, smo dobili dva različna profila RFLP, A in B. Profil A odgovarja referenčnim sevom FD70 in FD92 (FD-D), profil B pa odgovarja referenčnemu sevu FD-C

Vzorci vinske trte so imeli izražena oba profila, A in B (slike 19 do 21) medtem ko so vsi vzorci srobotov odgovarjali profilu B (slike 22 in 23). Porazdelitev števila vzorcev posameznega organizma po različnih profilih je predstavljena v preglednici 27 (restrikcija FD9 s *TaqI*) in v preglednici 28 (restrikcija rp(V) s *HpaII*). V primeru vzorcev pri katerih smo FD9 fragment rezali tudi s *Tru9I* endonukleazo (slika 21) so profili sovpadali s profili dobljenimi z razrezom s *TaqI* (glej prilogo A). Celo vzorec srobotova z oznako 1618/09 je imel v obeh primerih drugačen profil (dodatno liso) kot ostali sroboti (slika 26). V profili obeh vzorcev japonskega škržatka (*O. ishidae*) so odgovarjali profilu A (preglednici 27 in 28, slike 19 in 20)

**Preglednica 27: Razporeditev vzorcev glede na različne profile PCR RFLP pri razrezu fragmenta FD9 s *TaqI* endonukleazo.** Test PCR RFLP ni bil izveden v primeru prenizke koncentracije produktov PCR posamezne vgnezdenje reakcije. \*, glej poglavje 4.6.2 in sliko 26

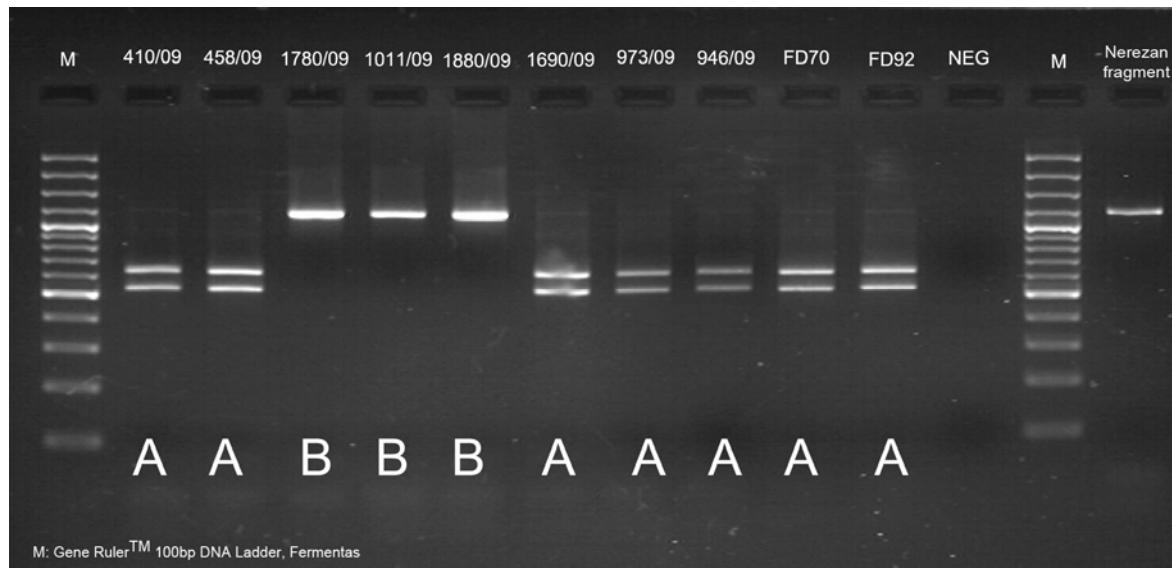
<i>TaqI</i>				
Rezultat (oznaka profila)	<i>Japonski škržatek</i> ( <i>O. ishidae</i> )	Srobot	Vinska trta	Skupaj
Test ni bil izveden		6	18	24
A	2		36	38
B		37	14	51
B (z dodatno progo*)		1		1
<b>Skupaj</b>	<b>2</b>	<b>44</b>	<b>68</b>	<b>114</b>

**Preglednica 28: Razporeditev vzorcev glede na različne PCR RFLP profile pri razrezu fragmenta rp(V) s *HpaII* endonukleazo.** Test PCR RFLP ni bil izveden v primeru prenizke koncentracije produktov PCR posamezne vgnezdenje reakcije. \*, profilu nismo mogli določiti (glej poglavje 4.6.2)

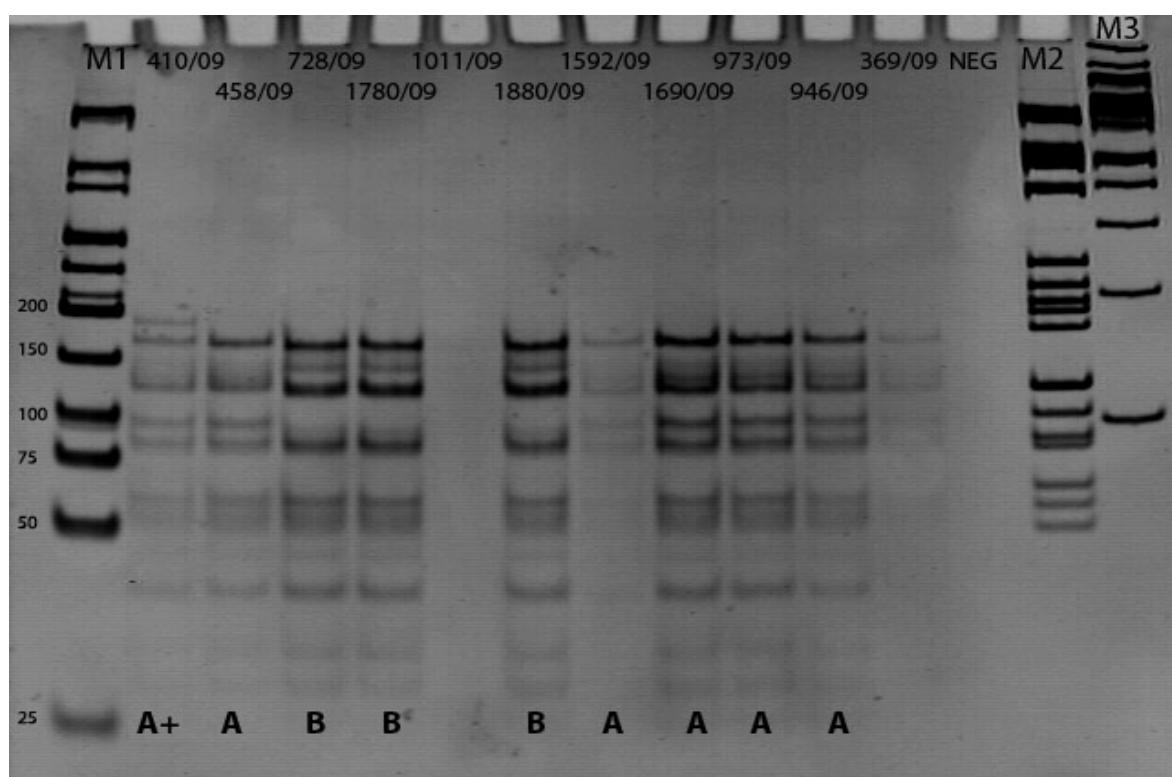
<i>HpaII</i>				
Rezultat (oznaka profila)	<i>Japonski škržatek</i> ( <i>O. ishidae</i> )	Srobot	Vinska trta	Skupaj
Test ni bil izveden		12	21	33
A	2		29	31
B		32	16	48
A/B*			2	2
<b>Skupaj</b>	<b>2</b>	<b>44</b>	<b>68</b>	<b>114</b>



Slika 19: Restriktijski profili fragmentov FD9 rezanih z endonukleazo *TaqI*; 2% agarozni gel. Velike tiskane črke v spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za posamezen vzorec. Vzorca 410/09 in 458/09 sta izolirana iz japonskega škržatka (*O. ishidae*), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. FD70 in FD92 sta referenčna izolata; M, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, velikost fragmentov od zgoraj navzdol: 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp.

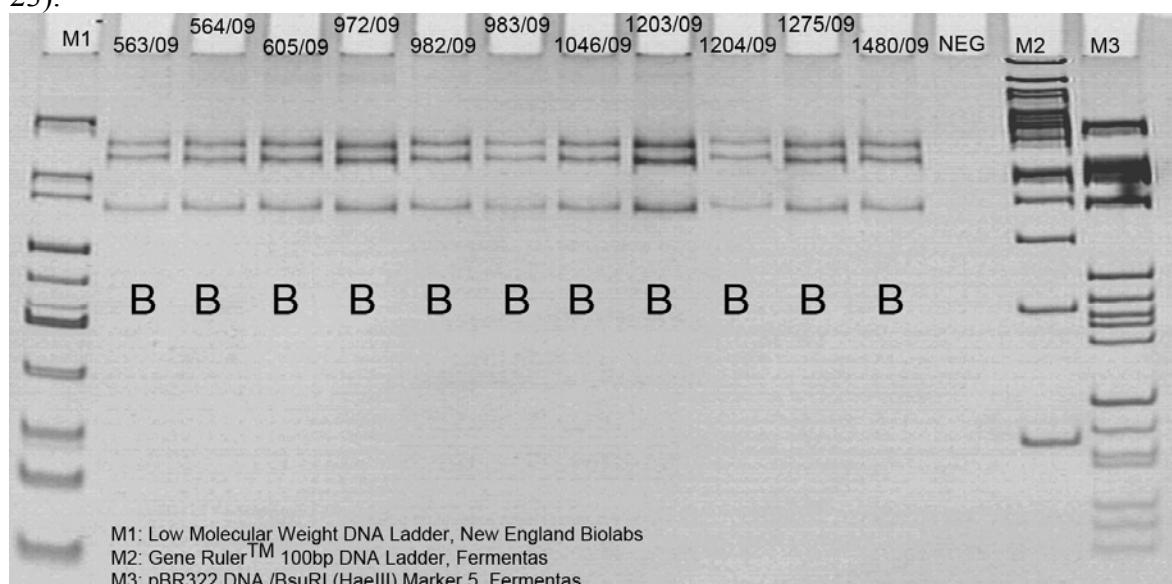


Slika 20: Restriktijski profili fragmentov rp(V) rezanih z endonukleazo *HpaII*; 2% agarozni gel. Velike tiskane črke v spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za posamezen vzorec. Vzorca 410/09 in 458/09 sta izolirana iz japonskega škržatka (*O. ishidae*), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. FD70 in FD92 sta referenčna izolata; M, Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, velikost fragmentov od zgoraj navzdol: 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp.



Slika 21: Restriktionski profili fragmentov FD9 rezanih z endonukleazo *Tru9I*, 10% poliakrilamidni gel. Velike tiskane črke v spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za posamezen vzorec (A+, profil A z dodatno liso na vrhu). Vzorce 410/09 in 458/09 sta izolirana iz japonskega škržatka (*O. ishidae*), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. M1, Low Molecular Weight DNA Ladder, NewEngland BioLabs, števila ob njem predstavljajo dolžino fragmentov v bp; M2, pBR322/ BsuRI (Hae III) Marker, 5, Fermentas; M3, GeneRuler® 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas.

Vzorci srobotov so imeli izražen profil B, pri razrezu z *TaqαI* (slika 22) in *HpaII* (slika 23).



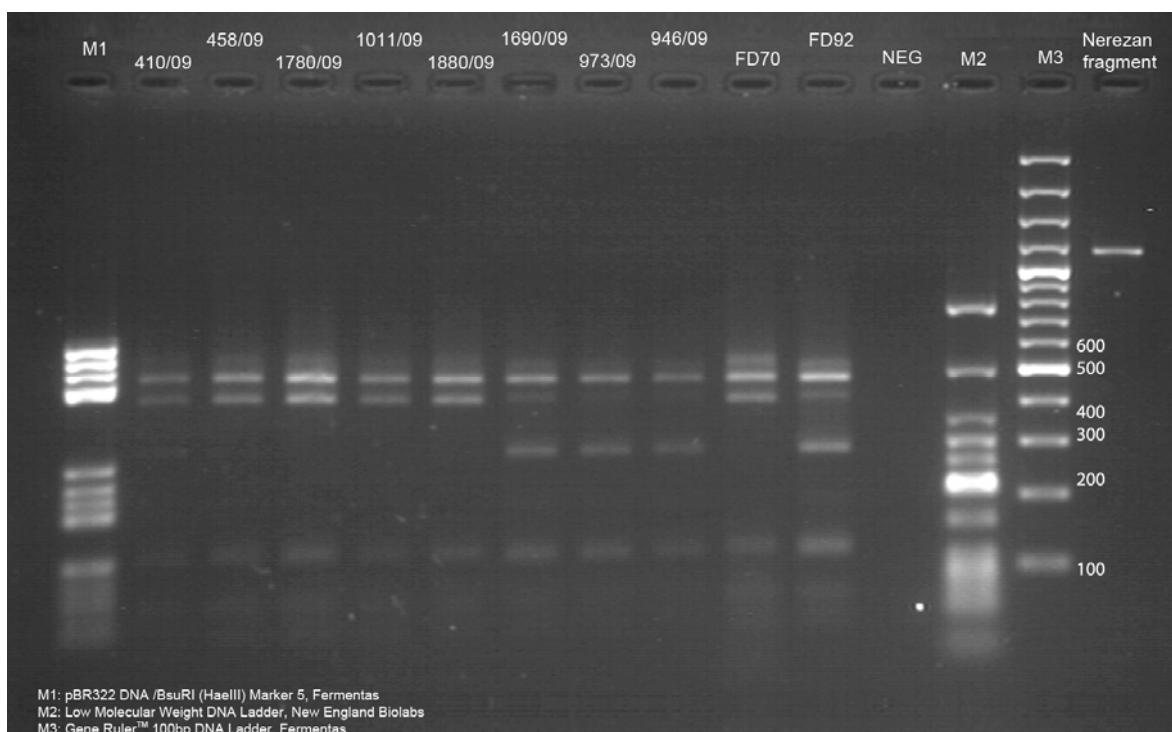
Slika 22: Restriktionski profili fragmentov FD9 rezani z endonukleazo *TaqαI*. 10 % poliakrilamidni gel, obarvan z etidijevim bromidom. Vsi vzorci so sroboti in imajo enak restriktionski profil (črka pod vsakim vzorcem) - profil B.



Slika 23: Restrikcijski profili fragmentov rp(V) rezani z endonukleazo *HpaII*. 10 % poliakrilamidni gel, obarvan z etidijevim bromidom. Vsí vzorci so sroboti in imajo enak restrikcijski profil (črka pod vsakim vzorcem) - profil B.

Pri večini vzorcev sta profila PCR RFLP pri istih vzorcih sovpadala, tako da smo vse vzorce lahko nedvoumno razvrstili v skupini A ali B (glej prilogo A). Vzorci v skupini A odgovarjajo referenčnim sevom FD70 in FD92 (FD-D), vzorci v skupini B pa referenčnemu sevu FD-C.

S profili PCR RFLP, fragmenta FD9 rezanega z endonukleazo *TaqI* in fragmenta rp(V) rezanega z endonukleazo *HpaII*, smo lahko jasno določili fitoplazmo FD iz skupine FD3, nismo pa mogli ločiti med sevoma skupinama FD1 (FD70) in FD2 (FD92). Zato smo fragment FD9 rezali še z endonukleazo *AluI*. Ta test PCR RFLP smo naredili le v primeru vzorcev navedenih na sliki 24. Na sliki vidimo, da je lahko razločimo profil FD70 in FD92. Pri tem smo opazili, da je profil vzorca japonskega škržatka (*O. ishidae*) z laboratorijsko oznako 410/09 podoben tako referenčnemu profilu FD70 kot tudi FD92, glede na sliko 24 pa bi lahko predstavljal tudi mešano okužbo s sevoma. Vzorec smo zato v nadaljevanju klonirali in klone sekvencirali.



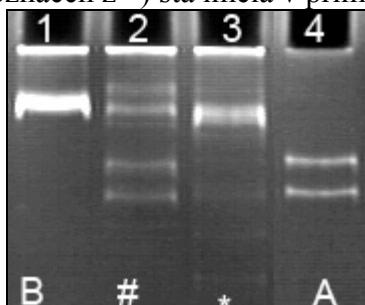
Slika 24: Restriktijski profili fragmentov FD9 rezanih z endonukleazo *AluI*. Velike tiskane črke spodnjem delu slike označujejo tip profila, ki smo ga določili za posamezen vzorec. Vzorca 410/09 in 458/09 sta izolirana iz Japonskega škržatka (*O. ishidae*), vsi ostali pa so izolirani iz vinske trte. Števila ob M3 predstavljajo dolžino fragmentov v bp.

#### 4.6.2 Odstopanja od splošnih profilov A in B

Profili PCR RFLP nekaterih vzorcev so se od ostalih razlikovali.

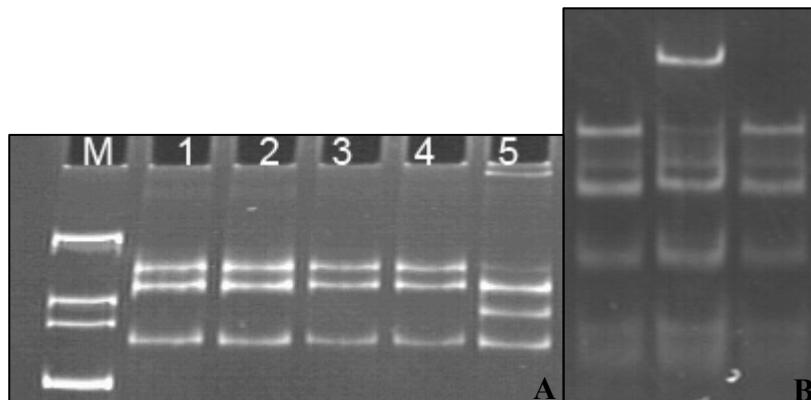
Vzorca 1592/09 in 1593/09 sta imela v primeru restrikcije fragmenta FD9 profil A, v primeru restrikcije fragmenta rp(V) pa sta kazala profil B. Rezultati testa so bili ob dveh ponovitvah enaki. Teh dveh vzorcev še nismo dokončno označili.

Vzorca vinske trte z oznako 676/06 (slika 25, profil označen z #) in 421/06 (slika 25, profil označen z \*) sta imela v primeru restrikcije fragmenta rp(V) dodatne proge.



Slika 25: Profila PCR RFLP vzorcev 676/06 (2) in 421/06 (3) v primerjavi z vzorcem s profilom B (1) in vzorcem s profilom A (4).

Vzorec srobota z oznako 1618/09 je imel pri restrikciji fragmenta FD9 dodatne proge (slika 26; A, št. 5, B, št. 2)



Slika 26: Restriktijski profili fragmenta FD9 vzorcev srobotova. A, profili dobljeni z *TaqI*; B, z *Tru9I*. Vzorec 1618/09 (A, kolona 5; B, kolona 2) ima drugačen profil od vseh ostalih srobotov.

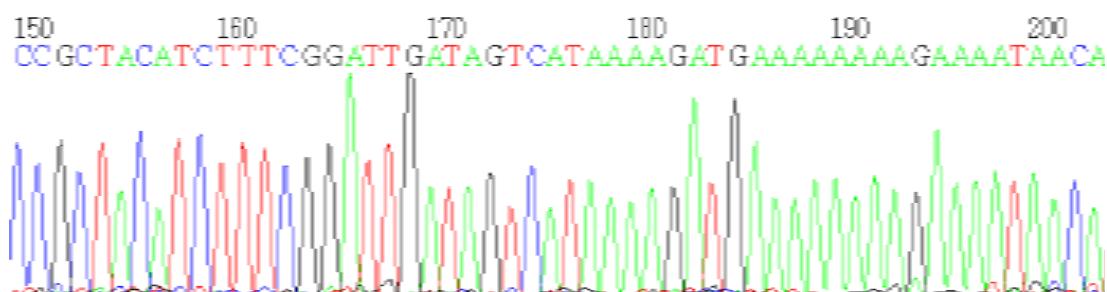
Rezultati restriktijske analize po posameznih vzorcih so navedeni v prilogi A.

#### 4.7 SEKVENCIRANJE IN OBDELAVE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

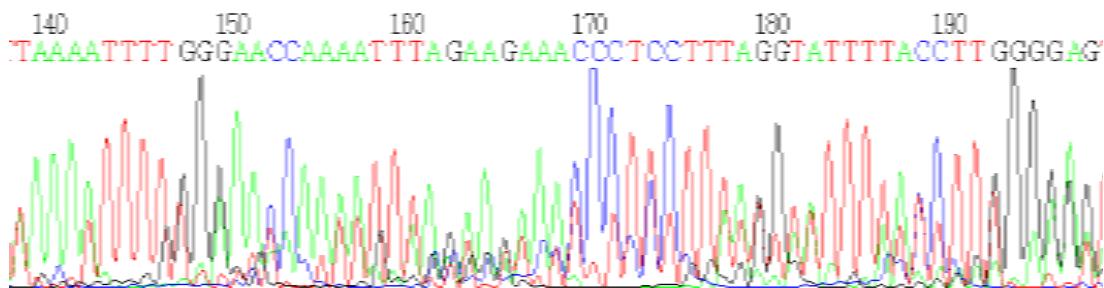
Z že opisanimi postopki fitoplazemske identitete nekaterih vzorcev nismo uspeli natančno določiti. Pri takih vzorcih smo se odločili za sekvenciranje določenih značilnih nukleotidnih zaporedij in njihovo sledično analizo.

##### 4.7.1 Neposredno določanje nukleotidnih zaporedij produktov reakcij vgnezdenega PCR

Nukleotidna zaporedja smo najprej določali neposredno na produktih reakcije vgnezdenega PCR, v kateri smo uporabili oligonukleotidne začetnike FD9f3b/r2. Ta postopek se ni izkazal za najboljšega, saj je bilo nukleotidno zaporedje uspešno prebrano le z začetnikom FD9r2 (slika 27), z začetnikom FD9F3b pa nikoli (slika 28). Nato smo poskusili sekvencirati različne produkte vgnezdenih PCR reakcij z različnimi kombinacijami začetnikov (preglednica 12). Tudi v tem primeru smo dobili vedno kakovosten kromatogram pri branju z »reverse« začetnikom, pri branju s »forward« pa nikoli. Skupno smo poskusili sekvencirati 33 produktov vgnezdenih PCR reakcij (66 branj), od tega je bilo 29/33 vzorcev sekvenciranih z začetniki na robu fragmentov, 4/33 pa z začetniki, ki so bili pomaknjeni bolj proti sredini fragmentov. Posledično so bila vsa zaporedja produktov PCR prebrana le enkrat in zato neprimerna za obdelavo.



Slika 27: Kakovostni kromatogram nukleotidnega zaporedja



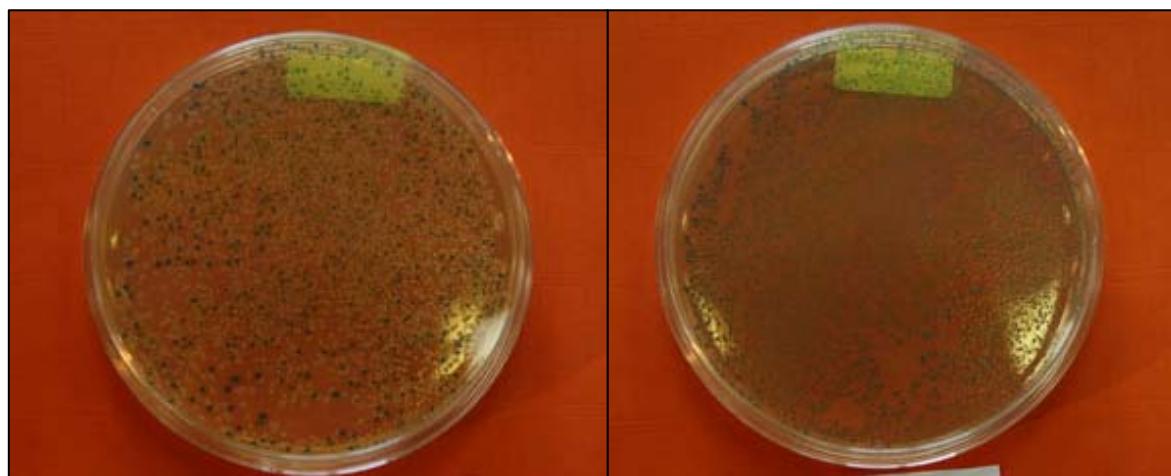
Slika 28: Nekakovosten kromatogram nukleotidnega zaporedja

#### 4.7.2 Sekvenciranje predhodno kloniranih nukleotidnih zaporedij

Zaradi težav pri analizi nukleotidnih zaporedij produktov vgnezdenega PCR, smo se odločili nekatere izbrane produkte vstaviti v plazmid in jih klonirati v *E. coli*. Pomnožene plazmide z vstavljenim produkтом PCR smo izolirali in jih sekvencirali. Na ta način smo pridobili kakovostna nukleotidna zaporedja produktov PCR, katera smo lahko primerjali z že objavljenimi.

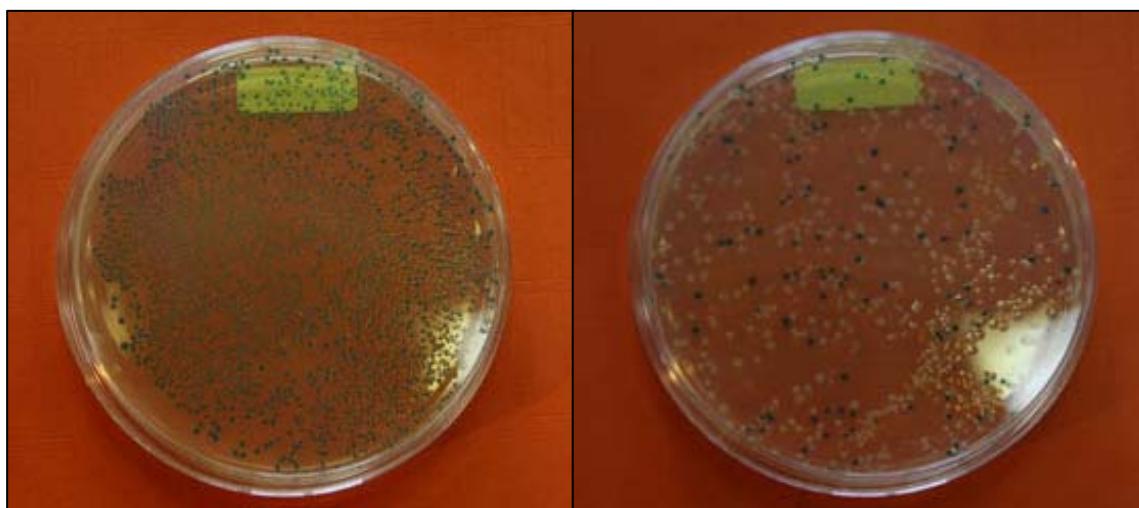
##### 4.7.2.1 Kontrola kloniranja

Uspešnost kloniranja smo preverili s pomočjo pozitivne kontrole ligacije (slika 29), kontrole transformacije (slika 30) in kontrole ozadje ligacije (slika 31).



Slika 29: Plošča s kolonijami *E. coli*, ki so bile transformirane s pozitivno kontrolo ligacije (pGEM s kontrolnim insertom). Bele kolonije imajo vstavljen plazmid pGEM s kontrolnim insertom, modre kolonije pa plazmid pGEM brez inserta.

Slika 30: Kontrola transformacije. Plošča s transformiranimi kolonijami *E. coli*, kjer smo za transformacijo uporabili kontrolni plazmid pUC.



Slika 31:Plošča s kolonijami *E. coli*, ki so bile transformirane s kontrolo ozadja ligacije (samo plazmid pGEM)

Slika 32: Plošča s kolonijami *E. coli*, ki so bile transformirane s plazmidom pGEM z vstavljenim produkтом PCR. Bele kolonije imajo vstavljen plazmid pGEM z želenim produkтом PCR, modre kolonije pa imajo vstavljen plazmid pGEM brez inserta.

Transformacijo smo izvedli pri dveh vzorcih vinske trte (oznaki vzorcev: 1780/09, 1690/09) in dveh vzorcih japonskega škržatka (*O. ishidae*) (oznaki vzorcev: 410/09, 458/09). Transformacija je bila uspešna pri vseh vzorcih (slika 32).

#### 4.7.2.2 Nukleotidna zaporedja kloniranih produktov PCR reakcij

Klonirali smo dva vzorca vinske trte z Dolenjske regije: vzorec trte z oznako 1690/09 iz Straže pri Novem mestu in vzorec 1780/09 z Ljubnja pri Uršnih selih ter oba vzorca japonskega škržatka (*O. ishidae*) (410/09, 458/09). Sekvencirali smo 5 klonov vzorca 1690/09, 11 klonov vzorca 1780/09, 11 klonov vzorca 468/09 in 48 klonov vzorca 410/09. Dobljena nukleotidna zaporedja niso bila vedno dovolj kvalitetna. Za nadaljnjo obdelavo smo vzeli le tista zaporedje, katerih vsak nukleotid je bil kvalitetno bran z vsaj dvema začetnikoma z obema koncem fragmenta DNA. Tako smo izmed petih klonov vzorca 1690/09 pridobili le 2 kvalitetni nukleotidni zaporedji. Nukleotidna zaporedja posameznih klonov (dolžina približno 1100bp) smo z orodjem BLAST primerjali z obstoječimi nukleotidnimi zaporedji v bazi GeneBank.

Obe nukleotidni zaporedji klonov vzorca 1690/09 sta bili identični in najbolj podobni zaporedju FD-D s prevzemno številko v bazi GeneBank AY197685.1 (pregledinca 29). Nukleotidna zaporedja devetih klonov vzorca 1780/09 so se med seboj razlikovala (preglednica 29). Večina zaporedij klonov vzorca 1780/09 je bila najbolj podobna zaporedju izolata FD-C, klon 1780\_09\_C9 pa je bil popolnoma drugačen. Najbolj podoben je bil zaporedju izolata FD-D s prevzemno številko AY197685, enako kot klon vzorca 1690/09. Primerjava klonov vzorca 1780/09 med seboj je prikazana v preglednici 31, poravnavna zaporedij pa v prilogi B.

Približno četrtina klonov vzorca japonskega škržatka (*O. ishidae*) z laboratorijsko številko 410/09 je bila najbolj podobna zaporedju FD-D s prevzemno številko v bazi GeneBank AY197685.1 (preglednica 30), ostale tri četrtine pa so bile najbolj podobne zaporedju FD70 s prevzemno številko AM238512.1. Vsi kloni vzorca 458/09 so bili najbolj podobni zaporedju FD70 s prevzemno številko AM238512.1 (preglednica 30).

**Preglednica 29: Primerjava nukleotidnih zaporedij klonov fitoplazme FD iz vinske trte z obstoječimi v bazi GenBank (BLAST rezultati). Izpisani so le najboljši zadetki, najbolj podoben je vedno na vrhu.**

Število klonov po posameznem vzorcu	Najbolj podoben sev	Natančnejši opis zadetkov			
		Prevzemna številka	Pokritost iskanega zaporedja z zadetkom iz baze	Odstotek identičnih nukleotidov	Opis sekvence v bazi Gene Bank
2/2 klonov vzorca 1690/09 (1690_09_C3, 1690_09_C4)	FD-D	<u>AY197685</u>	100%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD-D ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
		<u>AY197684</u>	100%	99%	Alder yellows phytoplasma strain ALY ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
		<u>AM238512</u>	100%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis rplO gene (partial), secY gene, map gene and infA gene, strain FD70
8/9 kolonov vzorca 1780/09 (1780_09_C1, 1780_09_C2, 1780_09_C3, 1780_09_C5, 1780_09_C6, 1780_09_C7, 1780_09_C8, 1780_09_C11)	FD-C	<u>FJ648493</u>	100%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis isolate CL-NG98 ribosomal protein L15 (rplO) and preprotein translocase (secY) genes, partial
		<u>FJ648491</u>	100%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis isolate CL-SB28 ribosomal protein L15 (rpl15) and preprotein translocase (secY) genes,
		<u>FJ648492</u>	100%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis isolate CL-KV97 ribosomal protein L15 (rplO) and preprotein translocase (secY) genes, partial
		<u>AY197688</u>	100%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD-C ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
1/9 kolonov vzorca 1780/09 (1780_09_C9)	FD-D	<u>AY197685</u>	100%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD-D ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes, partial
		<u>AY197684</u>	100%	99%	Alder yellows phytoplasma strain ALY ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes, partial cds
		<u>AM238512</u>	100%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis rplO gene (partial), secY gene, map gene and infA gene, strain FD70

**Preglednica 30: Primerjava nukleotidnih zaporedij klonov fitoplazme FD iz japonskega škržatka (*O. ishidae*) z obstoječimi v bazi GenBank (BLAST rezultati). Izpisani so le najboljši zadetki, najbolj podoben je vedno na vrhu.**

Število klonov po posameznem vzorcu	Najboj podoben sev	Najboljši zadetki natančneje			
		Prevzemna št. Zadetka	Pokritost iskanega zaporedja z zadetkom	Odstotek identičnih nukleotidov	Opis zadetka
1/37 klonov vzorca 410/09 (410_09_C33)	ALY	AY197684.1	100,00%	99%	Alder yellows phytoplasma strain ALY ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
		AM238512.1	100,00%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis rplO gene (partial), secY gene, map gene and infA gene, strain FD70
		AY197686.1	100,00%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD70 ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
		AY197685.1	100,00%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD-D ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
1/37 klonov vzorca 410/09 (410_09_C2)	Sevu FD70 sorodni sev	FJ648480.1	100,00%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis isolate CL-AL31 ribosomal protein L15 (rplO) and preprotein translocase (secY) genes,
		AM238512.1	100,00%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis rplO gene (partial), secY gene, map gene and infA gene, strain FD70
		AY197686.1	100,00%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD70 ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
27/37 klonov vzorca 410/09	FD70	AM238512.1	100,00%	99%	Candidatus Phytoplasma vitis rplO gene (partial), secY gene, map gene and infA gene, strain FD70
		AY197686.1	100,00%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD70 ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
6/6 klonov vzorca 458/09		AY197684.1	100,00%	99%	Alder yellows phytoplasma strain ALY ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
		AY197685.1	100,00%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD-D ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
8/37 klonov vzorca 410/09	FD-D	AY197685.1	100,00%	99%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD-D ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
		AY197684.1	100,00%	99%	Alder yellows phytoplasma strain ALY ribosomal protein L15 (rpl15) and translocation protein secY (secY) genes,
0/6 klonov vzorca 458/09		AM238512.1	100,00%	98%	Candidatus Phytoplasma vitis rplO gene (partial), secY gene, map gene and infA gene, strain FD70
		AY197686.1	100,00%	98%	<i>Flavescence dorée</i> phytoplasma strain FD70 ribosomal protein L15 (rpl15) and

Preglednica 31 predstavlja heterogenost klonov na odseku FD9, znotraj iste rastline. Vidimo lahko, da je celo med kloni, ki so vsi najbolj podobni sevu FD-C (vrstice/ stolpci 1-8) precej razlik, tudi do 7. Razvidno je tudi, da je klon 1780\_09\_C9 drugačen od vseh ostalih, saj je najbolj podoben sevu FD-D.

**Preglednica 31:** Tabelaričen prikaz števila razlik med nukleotidnimi zaporedji fragmenta FD9 (zaporedje med začetnikoma FD9f3b/r2). Pod rdečo črto je napisano število nukleotidnih razlik, ki smo jih dobili pri poravnavi zaporedij nad rdečo črto pa število vstavljenih presledkov med zaporedji. Vzorci v vrsticah/ stolpcih 1-8 so najbolj podobni sevom FD-C (FD3 skupina), vzorec v vrstici/stolpcu 9 je najbolj podoben sevu FD-D (FD2 skupina) Za celotno poravnavo glej prilogo B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1780_09_C1	1		2	1	4	2	2	0	2
1780_09_C2	2	3		1	2	2	2	0	1
1780_09_C4	3	5	4		3	1	1	1	0
1780_09_C5	4	6	3	7		4	4	2	3
1780_09_C6	5	4	3	5	6		2	2	1
1780_09_C7	6	5	4	6	7	5		2	1
1780_09_C8	7	1	2	4	5	3	4		1
1780_09_C11	8	4	1	5	4	3	5	3	
1780_09_C9	9	27	26	26	29	27	28	26	27

V preglednici 32 so prikazane nukleotidne razlike med zaporedij klonov in posameznimi referenčnimi izolati. Vidimo lahko, da so si izolati FD70, ALY in FD-D zelo podobni, saj jih loči le 7-9 nukleotidnih razlik, medtem ko se sev FD-C precej razlikuje od vseh ostalih, 22-25 nukleotidnih razlik. Iz preglednice lahko tudi razberemo, koliko je razlik med referenčnimi sevi in našimi kloni dobljenimi iz trte in japonskega škržatka (*O. ishidae*.)

**Preglednica 32:** Tabelaričen prikaz števila razlik med nukleotidnimi zaporedji fragmenta FD9 (zaporedje med začetnikoma FD9f3b/r2). Pod rdečo črto je napisano število nukleotidnih razlik, ki smo jih dobili pri poravnavi zaporedij nad rdečo črto pa število vstavljenih presledkov med zaporedji. V vrsticah/stolpcih 1-5 so referenčni sevi, ki so najbolj podobni različnim klonom(najboljši BLAST zadetki). Oznaka pred prevzemno št. pomeni oznako seva, ki ga predstavlja, oznaka rev, pa pomeni, da je bila v poravnavi uporabljen reverzni prepis zaporedja iz baze. V stolpcih/vrsticah 6-11 so kloni pridobljeni v tej nalogi. Za celotno poravnavo glej prilogo C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FD70_AY197686 rev	1		0	0	0	0	1	0	3	0	1
FD70_AM238512 rev	2	1		0	0	0	1	0	3	0	1
ALY_AY197684 rev	3	7	6		0	0	1	0	3	0	1
FD-D_AY197685 rev	4	9	8	6		0	1	0	3	0	1
FD-C_FJ648493 rev	5	22	21	21	25		1	0	3	0	1
Trta FD-C (klon: 1780_09_C11)	6	25	24	24	28	3		1	2	1	0
Trta FD-D (klon: 1780_09_C9)	7	10	9	5	3	24	27		3	0	1
Trta FD-D (klon: 1690_09_C3)	8	12	11	7	5	26	27	4		3	2
O. ishidae FD70 (klon: 410_09_C3)	9	4	3	5	9	20	23	8	10		1
O. ishidae FD-D (klon: 410_09_C14)	10	11	10	6	4	25	26	3	3	9	
O. ishidae ALY (klon: 410_09_C33)	11	9	8	6	8	23	24	7	7	7	6

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Naprava FastPrep® zagotavlja dobro homogenizacijo rastlinskega materiala

V diplomski nalogi smo pokazali uspešno homogenizacijo listov in listnih žil z napravo FastPrep® (preglednica 25). V vzorednih raziskavah v našem laboratoriju so pokazali uspešno uporabo naprave tudi pri homogenizaciji korenin (neobjavljeni rezultati – osebni razgovor). Homogenizacija listov in listnih žil z napravo FastPrep® je bila enako učinkovita ali celo učinkovitejša od klasične homogenizacije v terilnici (preglednica 25) in ni vplivala na učinkovitost nadaljnje ekstrakcije DNA. Novi način homogenizacije je hitrejši, prijaznejši do okolja in predstavlja manjše tveganje za navzkrižne kontaminacije vzorcev (preglednica 33). Na osnovi rezultatov predlagamo, da se klasična homogenizacija v terilnicah s tekočim dušikom zamenja z napravo FastPrep®, kljub ne bistveno izboljšani končno ekstrahirani DNA. Kot najučinkovitejši postopek homogenizacije in ekstrakcije DNA predlagamo uporabo kombiniranih metod FastPrep®, kompleta QuickPick plant DNA kit in naprave KingFisher®, ki je podrobno opisana v točki 3.4.4. Kombinirana metoda je robustna, učinkovita, predvsem pa hitra.

Preglednica 33: Primerjava dveh metod homogenizacije.

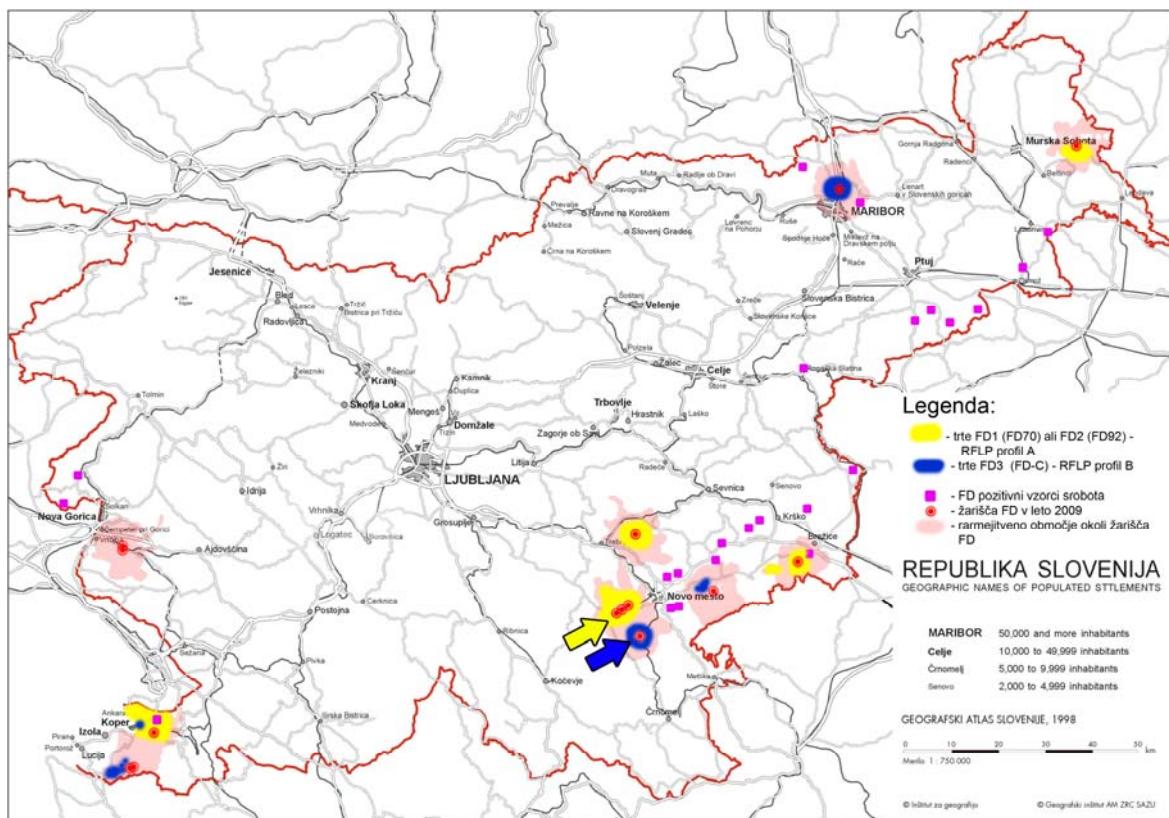
Vidiki primerjave:	Homogenizacija z napravo FastPrep®	Klasična homogenizacija v terilnici s tekočim dušikom.
Število homogeniziranih vzorcev v eni uri	nad 100	do 15
Vpliv na okolje	ni pomivanja, poraba plastičnih centrifugirk je enaka, kot pri klasični homogenizaciji, saj lahko izrezane listne žile shranimo v centrifugirkah za homogenizacijo	poraba tekočega dušika, poraba vode, detergentov, dezinfikacijskih sredstev in energije za pomivanje terilnic, velika poraba etanola in papirantih brisačk za čiščenje delovnih površin med homogenizacijo
Kritični dejavniki za nastanek navzkrižnih kontaminacij	brez, (človeški dejavnik)	nastajanje drobnega prahu, ki se širi po zraku in lahko kontaminira prostor ter druge vzorce

#### 5.1.2 V Sloveniji je vinska trta gotovo okužena s sevi fitoplazme FD iz skupin FD2 in FD3

Profili fragmentov PCR RFLP FD9 in rp(V), ki smo jih označili s črko A (slike 19 do 21), ustrezajo profilom istih fragmentov referenčnega seva FD70 v skupini FD1 ali FD92 v skupini FD2 (Angelini in sod., 2001; Arnaud in sod., 2007; Filippin in sod., 2009). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da okoli dve tretjini analiziranih vzorcev vinske trte, ki so v Sloveniji okužene s fitoplazmo FD, lahko razvrstimo v skupini FD1 ali FD2 (preglednici 27 in 28, slika 33). V Franciji, kjer se okužba s fitoplazmo FD pojavlja že 50 let, so z molekulsko tipizacijo sevov znotraj obeh skupin pokazali, da so izolati iz skupine FD1 lokalno omejeni in da je najbolj razširjen fitoplazemski sev FD2. Tega bolj kot žuželčji prenašalci, prenašamo ljudje z okuženim rastlinskim materialom (Arnaud in sod., 2007). V podporo prevladi izolatov seva FD2 v Sloveniji je tudi primerjava profilov PCR RFLP, dobljenih z restrikcijskima encimoma *TaqI* in *HpaII* (sliki 19 in 20) s preliminarnimi profili RFLP nekaterih vzorcev iz vinske trte, ki smo jih dobili po restrikciji z endonuleazo *AluI* (slika 24). Ta kaže, da v analiziranih vzorcih izolati iz skupine FD1 niso prisotni. Tudi

s sekvenciranjem vzorca 1690/09 smo določili le izolat, ki ustreza skupini FD2 (preglednica 29). Kljub temu bi za dokončno potrditev domneve o odsotnosti okužb vinske trte z izolati seva FD1 v Sloveniji, bi bilo potrebno razširjeno analizo vzorcev z endonokleazo *AluI*.

Profili, ki smo jih označili kot B (slike 19 do 21) so enaki kot pri izolatu FD-C (Angelini in sod., 2001; Filippin in sod., 2009), ki je del večje skupine FD3. Pomeni, da je le okoli tretjina analiziranih vzorcev vinske trte v Sloveniji okužena s fitoplazmo iz skupine FD3 (preglednici 27 in 28, slika 33). Čeprav je do sedaj okuženih rastlin premalo za boljšo statistično podporo rezultatom, pa se naše ugotovitve o stanju razširjenosti posameznih skupin fitoplazme FD ujemajo z raziskavami v Franciji in Italiji (Arnaud in sod., 2007). Odkritje izolatov iz skupine FD3 v Sloveniji je zanimivo, saj ta skupina ni poznana v Franciji, poročila o okuženih vinskih trtah s to fitoplazmo pa prihajajo iz Italije (Arnaud in sod., 2007; Filippin in sod., 2009). O izolatu, ki je podoben sevu FD-C poročajo tudi iz Srbije (Filippin in sod., 2009).



Slika 33: Razširjenost različnih FD podskupin in pojavljanje navadnih srobotov, okuženih s fitoplazmo FD v Sloveniji. Prijejeno po viru: Ministrstvo Za Kmetijstvo Gozdarstvo In Prehrano RS 2009

### 5.1.3 Navadni srobot je v Sloveniji okužen s sevom fitoplazme iz skupine FD3

V skladu s poročili o okuženih navadnih srobotih (*Clematis vitalba* L.) z izolati FD-C iz skupine FD3 v Italiji, Srbiji, Makedoniji in Sloveniji (Filippini so sod., 2009) smo v okviru naše naloge poskušali ugotoviti, kako pogosta je okuženost te rastlinske vrste v Sloveniji in

ali je le-ta povezana z žarišči okužb vinske trte s fitoplazmo FD. Analiza profilov PCR RFLP (sliki 22 in 23) je pokazala, da vse fitoplazme v vzorcih navadnega srobeta spadajo v skupino FD3. To je potrdilo najdbo, objavljeno v Filippini in sod., 2007, 2009. Iz slike razširjenosti okuženih srobotov (slika 33) je razvidno, da se okužene rastline pojavitajo na območju vseh vinorodnih dežel, vključno z žarišči fitoplazme iz skupine FD2. V nadaljevanju smo ob naključnem vzorčenju navadnega srobeta izven območij z vinogradi, prav tako detektirali veliko okuženih rastlin. Za dokončne skelepe o razširjenosti okužbe srobotov s fitoplazmo FD je še prezgodaj, saj za boljšo statistično analizo potrebujemo boljšo pokritost vzorčenja.

#### **5.1.4 Primerki japonskega škržatka so okuženi s fitoplazmami iz skupine FD1 in FD2**

Japonski škržatek (*Orientus ishidae*, Matsumura, 1902) (Hemiptera: Cicadellidae) je v Sloveniji tujerodna vrsta škržatka, ki izvira iz Azije in je bila nedavno vnešena v Evropo. Prvič je bil najden v Švici leta 2002. Prva najdba v Sloveniji je iz leta 2004 (Seljak, 2004). Na Goriškem postaja ena najpogostejših julijskih vrst škržatkov na različnih lesnatih rastlinah, zlasti vrbah (*Salix spp.*) in sadnem drevju, predvsem češnjah in kakiju (*Diospyros kaki*) pa tudi na zeleh (EPPO, 2006).

V letu 2009 so bili na rastlinah iz družine rožnic, na območjih, ki niso bila v bližini vinogradov, nabrani primerki japonskih škržatkov, s sumom na okužbo s fitoplazmami iz skupine 16srX filogenetske skupine ali AP skupine, ki pogosto povzroča bolezni na sadnem drevju. Med rutinsko diagnostiko na prisotnost fitoplazem, skupina AP ni bila potrjena, dokazana pa je bila prisotnost fitoplazem FD.

Analiza profilov PCR RFLP po restrikciji z endonuleazama *HpaII* in *TaqA I* je pokazala, da so v primerkih japonskih škržatkov prisotni izolati, ki ustrezajo profilu, označenim s črko A (slike 19- 21). Profili fragmenta FD9, razrezanim z encimom *AluI* (slika 24) so pokazali možnost prisotnosti izolatov, ki ustrezajo obema referenčnima sevoma v profilu A, FD70 (ustreza skupini FD1) in FD92 (ustreza skupini FD2). Produkte vgnezdenega PCR fragmenta FD9 smo klonirali in dobljene klone sekvencirali. Nukleotidna zaporedja, dolga od 1112 do 1113 baznih parov enega od klonov (prevzemna številka HM367596) so bila 99,7-odstotno identična z zaporedjem seva FD70 (prevzemna številka AM238512.1). Zaporedja enega klena (prevzemna številka HM367597) pa so bila 99,7-odstotno identična s sevom FD92 (prevzemna številka AY197685.1). Poravnava nukleotidnih zaporedij japonskega škržatka z referenčnimi sevi je predstavljena v prilogi C, .

Prisotnost fitoplazem na splošno in fitoplazme FD specifično v japonskem škržatku je bila v tej nalogi prvič pokazana, glej prilogo D. Za dejanski pomen tega odkritja bodo potrebne nadaljnje raziskave. Ker je japonski škržatek polifagna vrsta, je fitoplazme lahko pridobil naključno, s hranjenjem na okuženih rastlinah. Katere so te rastline za enkrat ni znano. Možno je, da to niso bili trsi vinske trte, temveč novi, še neznani naravni rezervoarji fitoplazme FD. Za enkrat tudi ni znano ali lahko okuženi japonski škržatki fitoplazmo prenesejo na druge rastline, ali celo iz enega trsa vinske trte na drugega.

### **5.1.5 Mešana okužba vzorca vinske trte z izolati fitoplazme FD iz različnih skupin**

S pomočjo kloniranja fragmenta FD9 vzorca vinske trte z oznako 1780/09 smo ugotovili, da so v vzorcu prisotne fitoplazme iz skupin FD2 in FD3 (preglednica 29). Do sedaj o mešanih okužbah z različnimi sevi fitoplazme FD pri vinski trti še ni poročil. So pa mešane pogoste pri črnih jelšah, kjer se praviloma skupaj pojavljajo izolati zelo različnih sevov fitoplazem iz skupine 16SrV (Malembic-Maher in sod., 2009).

Vzorec 1780/09 je bil nabran v bližini vasi Uršna sela (slika 33, modra puščica), kjer se je v letu 2009 pojavilo novo žarišče fitoplazme FD iz skupine FD3. Mesto vzorčenja vzorca 1780/09 pa je le 7,5 km zračne črte od Straže pri Novem mestu, kjer je žarišče FD iz skupine FD2. Prisotnost izolatov iz skupine FD2 potrjuje vzorec 1690/09 (slika 33, rumena puščica), ki je bil nabran na področju Straže. Možno bi bilo, da je ameriški škržatek, okužen s fitoplazmo FD iz skupine FD2, prenesel fitoplazme iz skupine FD2 iz enega žarišča v drugega in tako okužil rastlino z vzorcem 1780/09, ki je bila že okužena s fitoplazmo iz skupine FD3. Dejstvo, da smo fitoplazmo FD iz skupine FD2 našli le v enem izmed devetih klonov, podpira to teorijo, saj je znano, da je gibanje ameriškega škržatka lokalno omejeno (Lessio in Alma, 2004). Možnost daljših preletov okuženega prenašalca je zato majhna, kar pomeni, da bodo tudi koncentracije prenesenih fitoplazem manjše od koncentracij fitoplazem prisotnih v žarišču.

V vzorcu 1780/09 smo našli tudi različne izolate FD3, ki se med seboj ločijo po nekaterih jasnih posamičnih nukleotidnih spremembah (angleško single nucleotide polymorphism – SNP) (preglednica 31). Nekatere razlike med posameznimi nukleotidnimi zaporedji so posledica napak pri pomnoževanju s polimerazo Taq, kar lahko natančneje vidimo iz poravnave klonov vzorca 1780/09 v prilogi B. To so predvsem različno dolgi odseki zaporednih adeninskih in timinskih nukleotidov.

### **5.1.6 Navadni srobot ni edini vir okužb s fitoplazmo FD v Sloveniji**

Hipoteza naše naloge je bila, da je v Sloveniji prisoten izolat iz skupine FD3, ki se je iz prvega odkritega žarišča fitoplazme FD na Primorskem, širil v druge vinorodne dežele. Možen vir novih žarišč naj bi bil okužen navadni srobot. Hipotezo smo postavili na osnovi edinega objavljenega poročila o sevih fitoplazme FD v Sloveniji, ki omenja navadni srobot, okužen z izolatom FD-C (Filippin in sod., 2007, 2009). Hipotezo smo v nalogi testirali in jo le delno potrdili. V nasprotju s pričakovanji je bila večina določenih izolatov iz skupin FD1/FD2 in je le manjši del pripadal skupini FD3. Z analizo srobotov smo sicer pokazali njihovo povezavo z najdbami izolatov iz skupine FD3 v vinski trti, a so te najdbe pokrivale tudi z izolati iz skupine FD2 (slika 33). Da je navadni srobot potencialni naravni rezervoar fitoplazme iz skupine FD3, kažejo primerki okuženih rastlin na področjih, kjer ni vinogradov oz. žarišča v vinski trti še niso bila detektirana. V skladu s tujimi poročili (Arnaud in sod., 2007) in analizo slovenskih vzorcev, lahko sklepamo, da se fitoplazma FD tudi v Sloveniji večinsko prenaša s prenosom okuženih trsov.

### **5.1.7 Prisotnost fitoplazme FD iz skupine FD1 v Sloveniji**

S sevom FD1, katerega referenčni izolat predstavlja FD70, je po znanih poročilih okuženih okrog 17 % vinogradov v jugozahodni Franciji, redke okužbe pa se pojavljajo tudi na

območju Lombardije in Piemonta v severni Italiji (Martini in sod., 2002; Arnaud in sod., 2007). V Sloveniji smo z našo analizo odkrili izolate, ki bi temu sevu ustrezali, le v okuženih japonskih škržatkih. Kako bi se žuželke s to fitoplazmo okužile, za enkrat ni dokazano, a ena od možnih poti bi bila preko okuženih črnih jelš (*Alnus glutinosa*). Molekulske analize črne jelše so že pokazale, da je več kot 85 % vseh rastlin v treh različnih ekosistemih v jugovzhodni Franciji (vinogradi okuženi s fitoplazmo FD, neokuženi vinogradi, območja brez vinogradov) okuženih s fitoplazmo jelšine rumenice (ALY) iz skupine 16SrV (Malembic-Maher in sod. 2009). Nukleotidno zaporedje fragmenta FD9 fitoplazme ALY je zelo podobno zaporedju seva FD70; v primeru odseka *uvrB-degV* pa so zaporedja nekaterih izolatov fitoplazme ALY in FD1 celo identične (Arnaud in sod., 2007). Nukleotidna zaporedja izolatov fitoplazme ALY so tudi zelo podobna zaporedjem izolatov seva PGY (Malembic-Maher in sod., 2009), za katerega je bilo v Nemčiji že pokazano, da so jelše njihov naravni rezervoar (Maixner in sod., 2000). Možno bi bilo, da tak rezervoar fitoplazme FD predstavlajo tudi jelše v Sloveniji. Iz njega bi se v ugodnih razmerah lahko razširile na vinsko trto s še neznanim polifagnim prenašalcem, kot je na primer japonski škržatek. Za dokaz slednje hipoteze bodo potrebne nadaljnje raziskave žuželčjih prenašalcev in divjih rastlin, kot potencialnih rezervoarjev fitoplazemskih okužb. Za začetek take raziskave bi bile najprimernejša izbira kar črne jelše, saj so nekateri izolati jelšinih rumenih molekulsko zelo sorodni fitoplazmi FD (Arnaud in sod., 2007).

## 5.2 SKLEPI

- Pokazali smo, da je Naprava FastPrep® zagotavlja dobro homogenizacijo rastlinskega materiala
- Z analizo PCR RFLP profilov in nukleotidnih zaporedij smo dokazali, da je vinska trta v Sloveniji zagotovo okužena s sevi fitoplazme FD iz skupin FD2 in FD3. Za potrditev prisotnosti ali odsotnosti fitoplazme FD iz skupine FD1, bo potrebno preveriti še več vzorcev.
- V tej nalogi prvič poročamo o mešani okužbi vinske trte z dvema različnima sevoma fitoplazme FD
- Potrdili smo, da je navadni srobot v Sloveniji okužen le s fitoplazmo FD iz skupine FD3, zato verjetno ni edini naravni vir okužbe v novih žariščih, kot smo predvidevali.
- Prvič smo v tej nalogi pokazali, da je japonski škržatek lahko okužen fitoplazmo FD iz skupin FD1 in FD2 in tako tudi možen prenašalec. Za potrditev vloge japonskega škržatka v razširjanju fitoplazme FD bodo potrebne nadaljnje raziskave.

## 6 POVZETEK

Fitoplazme so izredno specializirani rastlinski patogeni, ki so hkrati lahko simbionti ali patogeni žuželk, ki se z rastlinami hrani. So bakterije brez celične stene, ki živijo znotraj gostiteljskih celic. Ker jih za enkrat še ne znamo gojiti v razmerah *in vitro*, jih lahko preučujemo le z molekulskimi metodami. Med vsemi bakterijami imajo najmanjši genom in veliko genov, ki nimajo znanih homologov z drugimi organizmi. Fitoplazme uspešno uporabljajo in nadzorujejo svoj živiljenjski prostor, ki je citoplazma bodisi rastlinskih bodisi živalskih celic. Lahko prehajajo skozi plazmodezme med celicami rastlin in skozi bazalne lamine v živalskih tkivih. V naravi se razširjajo se s pomočjo žuželk, človek pa jih prenaša s trgovanjem z okuženim rastlinskim materialom. Pri rastlinah povzročajo bolezenska znamenja, ki kažejo na temeljito reprogramiranje rastlinskega transkriptoma. Okužujejo zelo veliko rastlinskih vrst in velikokrat povzročajo huda bolezenska znamenja in propadanje rastlin, kar pri gojenih rastlinah pomeni veliko gospodarsko in posledično socialno škodo.

Zlata trsna rumenica (*Flavescence dorée*) je bolezen vinske trte, ki v večini primerov vodi do propada okuženih trsov. Gospodarska škoda je zato lahko velika. V Evropi jo povzročajo različni sevi vrste fitoplazme, povzročiteljice zlate trsne rumenice (fitoplazma FD). Na podlagi molekulskih metod razvrščamo izolate fitoplazme FD v tri skupine. V skupini FD1 je izolat FD-70, ki je povzročil epidemijo v Franciji leta 1970 in je odgovoren za okoli 17 % primerov okužbe v Franciji, prisoten pa je tudi v italijanski pokrajini Lombardia-Piemonte. Skupino FD2 sestavlja jo sevi FD88, FD92 iz Francije ter sev FD-D iz Italije, ki so med seboj skoraj identični. To kaže na klonsko razširjanje z okuženim rastlinskim materialom in prenosom okuženih škržatkov med regijami s trgovino z okuženimi trsi. V Franciji izolati iz skupine FD2 predstavljajo 83% okužb. Skupina FD3 je najbolj variabilna izmed vseh treh. Sestavlja jo izolati iz okuženih vinskih trt severne Italije (FD-C), Slovenije, Hrvaške in Srbije, potrjene pa so tudi najdbe na navadnem srobotu (*Clematis vitalba*). Prenašalec vseh izolatov je ameriški škržatek *Scaphoideus titanus*. V Sloveniji je ta fitoplazma prisotna zadnjih pet let in se je že razširila v vse vinorodne dežele. Zlata trsna rumenica se zelo hitro širi, okužbo pa navadno opazimo zelo pozno, zato je verjetnost epidemij velika. Za preprečevanje epidemij je pomembno pravočasno odkrivanje okuženih trsov. To pa je možno le z učinkovitimi diagnostičnimi metodami, s katerimi lahko izsledimo vire okužb. Ker v Sloveniji ne vemo, kateri sevi fitoplazemske povzročiteljice zlate trsne rumenice so prisotni, posledično ne poznamo izvora bolezni.

Glavni namen diplomske naloge je bil molekulski pregled vseh dosedanjih najdb fitoplazme FD v Sloveniji, da bi ugotovili, kateri skupini FD pripadajo. Pridobljeno znanje bo pomagalo pri načrtovanju ukrepov za zatiranju zlate trsne rumenice. V nadaljevanju naloge smo pregledali divje rastline, ki bi bile lahko potencialno okužene s fitoplazmo FD in bi predstavljale možen nov naravni izvor fitoplazme. Testirali smo tudi vrsto škržatka (japonski škržatek, *Orientus ishidae*), za katerega ni poročil o možni okuženosti fitoplazmo FD. Poleg tega smo preizkusili novo, hitro metodo homogenizacije rastlinskega materiala, za nadaljnjo ekstrakcijo DNA, z napravo Fast Prep®. Na osnovi objavljenih tujih poročil smo predvidevali, da je v Sloveniji prisoten izolat iz skupine FD3, ki se je iz Primorske širil v druge vinorodne dežele. Možen vir novih žarišč naj bi bil okužen navaden srobot.

Z metodo PCR v realnem času smo izvedli presejalne teste na vseh vzorcih vinske trte in srobotu in let 2005 do 2009. Testirali smo tudi divje rastline kot so dren trdoleska, bukev, ipd. ter dva vzorca japonskega škržatka (*Orientus ishidae*). Vsak vzorec, v katerem smo s PCR v realnem času zaznali prisotnost fitoplazme FD, smo testirali tudi klasičnim PCR testom specifičnim za fitoplazmo FD. Pomnožili smo za fitoplazmo FD specifična fragmenta FD9 in rp(V). Pomnožene fragmente smo analizirali metodo polimorfizmov restrikcijskih fragmentov ( PCR RFLP). Vse fragmente FD9 smo rezali s *TaqI* endonukleazo, nekatere pa tudi *AluI* in *Tru9I*. Fragmente rp(V) smo rezali s *HpaII* endonukleazo. Dobljene profile smo primerjali z literaturo in profili referenčnih sevov. Ugotovili smo, da je v Sloveniji okoli 60% vzorcev vinske trte okužene s fitoplazmo FD iz skupine FD1 ali FD2. Ostali vzorci so okuženi s fitoplazmo FD iz skupine FD3. Sprič tega dejstva sklepamo da srobot ni edini vir okužbe, saj so bili vsi sroboti okuženi s fitoplazmo FD tipa FD3. Ugotovili smo, da poleg trte in srobotu, s FD ni bila okužena nobena druga vzorčena rastlina. S kloniranjem produktov PCR smo dokazali, da je japonski škržatek lahko kontaminiran s fitoplazmo FD iz skupine FD1 in FD2, kar je prvo tovrstno poročilo. Dejansko vlogo japonskega škržatka, v razširjanju fitoplazme FD nameravamo določiti z nadaljnji raziskavami na tem področju. Prvič smo tudi pokazali mešano okužbo vinske trte s fitoplazmo FD iz skupine FD2 in FD3.

V Sloveniji srobot torej ne more biti edini vir okužbe, zato bodo potrebne nove raziskave rastlinskih gostiteljev in potencialnih naravnih rezervoarjih fitoplazme FD. Na podlagi teh naloge in dosedanjega znanja na področju fitoplazem je med divjimi rastlinami najbolj zanimiva črna jelša. Prisotna je namreč po celi Evropi, v njej pa so našli izolate fitoplazem, ki so molekulsko zelo podobni fitoplazmi FD.

## 7 VIRI

Angelini E., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. 2001. Flavescence doree in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, vol. 40, št. 2, str. 79-86.

Angelini E., Luca Bianchi G., Filippin L., Morassutti C., Borgo M. 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of microbiological methods*, vol. 68, št. 3, str. 613-22. Dostopno na medmrežju: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222474>

Angelini E., Negrisolo E., Clair D., Borgo M., Boudon-Padieu E. 2003. Phylogenetic relationships among Flavescence doree strains and related phytoplasmas determined by heteroduplex mobility assay and sequence of ribosomal and Nonribosomal DNA. *Plant Pathology*, vol. 52, št. 5, str. 663-672. Dostopno na medmrežju: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-3059.2003.00917.x>

Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-Padieu E., Foissac X., Se V. 2007. Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Doree Phytoplasma Strain Clusters and Group 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, št. 12, str. 4001-4010.

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

Beanland L., Hoy C., Miller S., Nault L. 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 93, št. 2, str. 271-276. Dostopno na medmrežju: [http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[0271:IOAYPO\]2.0.CO;2](http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1603/0013-8746(2000)093[0271:IOAYPO]2.0.CO;2)

Bertaccini A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, vol. 12, št. 1, p. 673-689. Dostopno na medmrežju: <http://www.bioscience.org/u37153137/gaDTRQo7632rgysaGWQYT64356/2007/v12/af/2092/2092.pdf>

Bianco P.A., Casati P., Marziliano N. 2004. Detection of phytoplasmas associated with grapevina *Flavescence dorée* disease using Real-time PCR. *Journal of Plant Pathology*, vol. 86, št. 3, str. 257-261.

Boudon-Padieu E. 2010a. Grapevine Flavescence doree phytoplasma biology, experiences in survey and testing- lecture I. V: *Posvet o implementaciji fitosanitarnih ukrepov proti fitoplazmi Flavescence doree*, Ljubljana 2010.

Boudon-Padieu E. 2010b. *Scaphoideus titanus* ecology and approach to its control Experiences with containment program in France- lecture II. V: *Posvet o implementaciji fitosanitarnih ukrepov proti fitoplazmi Flavescence doree*, Ljubljana 2010.

Boudon-Padieu, E 2003, "The situation of grapevine yellows and current research directions : Distribution, diversity, vectors, diffusion and control. V: *14th ICVG Conference*, Locorotondo 2003, str. 47-51. Dostopno na medmrežju: <http://www.agr.uniba.it/ICVG2003/Extended abstracts/3 Session 3.pdf>

Clair D., Larrue J., Aubert G., Gillet J., Cloquemin G., Boudon-Padieu E. 2003. A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis*, vol. 42, št. 3, str. 151-157. Dostopno na medmrežju: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheNincpsidt=15161529>

Chuche J., Thiéry D. 2009. Cold winter temperatures condition the egg-hatching dynamics of a grape disease vector. *Die Naturwissenschaften*, vol. 96, št. 7, str. 827-34. Dostopno na medmrežju: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401803>

Daire X., Clair D., Reinert W., Boudon-Padieu E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 103, št. 1993, str. 507-514.

Duduk, B, Ivanovic, M, Dukic, N, Botti, S in Bertaccini, A 2007, "First Report of an Elm Yellows Subgroup 16SrV-C Phytoplasma Infecting Grapevine in Serbia." *Plant Disease*, vol. 87, št. 5, p. 599. Dostopno na medmrežju: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.5.599C>

EPPO. 2006. EPPo Reporting Service, NO.8, PARIS, 2006-08-01, Pests in Diseases 4, str. 3-4

FastDNA® Spin Kit. 2009. Instruction manual, Protocol Revision # 6540-600-07DEC, 6/09. MP Biomedicals.

Filippin L., Jović J., Cvrković T., Forte V., Clair D., Toševski I., Boudon-Padieu E., Borgo M., Angelini E. 2009. Molecular characteristics of phytoplasmas associated with *Flavescence dorée* in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology*, vol. 58, št. 5, str. 826-837. Dostopno na medmrežju: <http://blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.2009.02092.x>

Filippin L., Jović J., Orte V.F., Cvrković T., 2007, "Occurrence and diversity of phytoplasmas detected in clematis and their relationships with grapevine "flavescence dorée" phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, vol. 60, št. 2, str. 327-328.

Hodgetts J., Boonham N., Mumford R., Harrison N., Dickinson M. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58, str. 1826- 1837. Dostopno na medmrežju: <http://ijsb.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/58/8/1826>

Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E., Kakizawa S., Kingdom H.N., Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, vol. 9, št. 4, str. 403-423.

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

Hren M., Nikolić P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden, K. 2009. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC genomics*, vol. 10, p. 460. Dostopno na medmrežju: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799775>

Hren M. 2007. Interakcije med fitoplazmami in vinsko trto (*Vitis vinifera L.*) na ravni izražanja genov. *Doktorsko delo*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

IrPCM. 2004. Candidatus Phytoplasma, a taxon for the wall-less, nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 54, str. 1243-1255. Dostopno na medmrežju: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280299>

Ishii T., Doi Y., Yora K., Asuyama H. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, vol. 33, str. 267-275.

Kuske C.R., Kirkpatrick B.C. 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasmalike organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 42, str. 226-233.

Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based an RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 48, str. 1153-1169.

Lee I.-M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F. 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, št. 2, str. 337-347. Dostopno na medmrežju: <http://ijsb.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/54/2/337>

Lee I.-M., Martini M., Marcone C. Zhu S.F. 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, št. 337, p. 347.

Lee I.-M., Zhao Y., Davis R., Wei W., Martini M. 2007. Prospects of DNA-based Systems for Differentiation and Classification of Phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, vol. 60, str. 239-244. Dostopno na medmrežju:  
[http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq\\_no\\_115=214192](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=214192)

Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 54, str. 221-255.

Lessio F., Alma A. 2004. Dispersal patterns and chromatic response of Scaphoideus titanus Ball (Homoptera Cicadellidae), vector of the phytoplasma agent of grapevine flavescentia doree. *Agricultural and Forest Entomology*, vol. 6, št. 2, str. 121-128. Dostopno na medmrežju:  
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/118811271/abstract>

Maher S.M., Alar P.S., Ergnes D.V., Foissac X.F. 2007. Detection and diversity of "Flavescentia doree" - related phytoplasmas in alders surrounding infected vineyards in Aquitaine (France). *Bulletin of Insectology*, vol. 60, št. 2, str. 329-330.

Malembic-Mahler S., Salar P., Carle P., Foissac X. 2009. Ecology and taxonomy of Flavescentia doree phytoplasmas: The contribution of genetic diversity studies. V: Progrès Agricole et Viticole, 2009, Hors Série – Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France, 31 Aug – 4 Sept, 2009. Dostopno na medmrežju:  
<http://www.icvg.ch/data/icvg%202009%20part%20II%20%20pp%20132-263.pdf>

Maixner M. Reinert W. 1999. Oncopsis alni (Schrank) (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) as a vector of the alder yellows phytoplasma of *Alnus glutinosa* L. *Gaertn. Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 105, str. 87-94.

Maixner M., Reinert W., Darimont H. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis*, vol. 39, str. 83-84.

Maixner M. 2006. Grapevine yellows—current developments and unsolved questions. *Journal of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine*, št. 33. Dostopno na medmrežju: <http://www.icvg.ch/data/maixner.pdf>

Marcone C., Neimark H., Raguzzino A., Lauer U., Seemüller E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, vol. 89, str. 805-810.

Margaria P., Rosa C., Marzachì C., Turina M., Palmano S. 2007. Detection of *Flavescentia doree* Phytoplasma in Grapevine by Reverse-Transcription PCR. *Plant Disease*, vol. 91, št. 11, str. 1496-1501. Dostopno na medmrežju:  
<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-91-11-1496>

Margaria P., Turina M. in Palmano S. 2009. Detection of *Flavescence dorée* and Bois noir phytoplasmas, Grapevine leafroll associated virus-1 and -3 and Grapevine virus A from the same crude extract by reverse transcription-RealTime Taqman assays. *Plant Pathology*, vol. 58, št. 5, str. 838-845. Dostopno na medmrežju: <http://blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.2009.02119.x>

Martini M., Botti S., Marzachì C., Casati P. 2002. Genetic variability among *Flavescence dorée* phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes*, vol. 16, št. 3, str. 197-208. Dostopno na medmrežju: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089085080290410X>

Mehle, N, Dermastia, M in Ravnikar, M. 2009. Zlata trsna rumenica - prihajajoča grožnja. Kmečki glas, vol. 66, št. 33, str. 8-9

Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano RS. 2009. Report on Flavescence dorée phytoplasma survey in Slovenia in the period 2002 - 2009. Ref. No.: 327-01-439/2005, 16 December 2009.

Nipah J., Jones P., Dickinson M. 2007. Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected. *Plant Pathology*, vol. 56, str. 777-489. Dostopno na medmrežju: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118484948/abstract>

Nusillard B., Malausa J., Giuge L., Millot P. 2003. Assessment of a two years study of the natural enemy fauna of *Scaphoideus titanus* Ball in its North American native area. V: *Proceedings of the Meeting Compte Rendu de la Réunion*, Volos (Hellas), str. 237-240. C Lozzia (ur).

One Shot TOP10. 2004. Competent Cells User Manual Version M. Invitrogen

Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H.Y. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.*, vol. 36, str. 27-29.

*pGEM®-T Easy Vector Systems INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1360, A1380, A3600 AND A3610.* 2009. Promega Corporation.

Purcell A.H. 1988. Increased survival of *Dalbulus maidis* DeLong in Wolcott, a specialist on maize on nonhost plants infected with mollicute plant pathogens. *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 46, str. 187-196.

Seljak, G. 2004. Contribution to the knowledge of planthoppers and leafhoppers of Slovenia (Hemiptera, Auchenorrhyncha). *Acta Entomologica Slovenica*, 12 (2): 189-216.

Sousa E., Casati P., Cardoso F., Baltazar C., Durante G., Quaglino F., Bianco P.A. 2009. *Flavescence dorée* phytoplasma affecting grapevine (*Vitis vinifera*) newly reported in Portugal. *New Disease Reports* vol. 19, št: 33. Dostopno na medmrežju: <http://www.ndrs.org.uk/ndr.php?id=019033>

Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.Y., Yamaji Y., Nishigawa H., Ugaki M. Namba S. 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 103, str. 4252-4257.

The National Institute of Environmental Health Sciences. 2009. Executive Summary Ethidium Bromide - National Toxicology Program. Dostopno na medmrežju: <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=6F5F63F6-F1F6-975E-79965F7EE68AE7C0>

Tran-Nguyen L.T., Kube M., Schneider B., Reinhardt R. Gibb K.S. 2008. Comparative genome analysis of "Candidatus Phytoplasma australiense" (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and "Ca. Phytoplasma asteris" Strains OY-M and AY-WB. *Journal of bacteriology*, vol. 190, št. 11, str. 3979-91. Dostopno na medmrežju: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18359806>

Wei W. Davis R.E., Lee I.-M. Zhao Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups.. " *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 57, št. Pt 8, str. 1855-67. Dostopno na medmrežju: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/57/8/1855>

Weintraub P., Beanland L. 2005. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 51, str. 91-111. Dostopno na medmrežju: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>

Wikipedia. 2010. Mali škržatki. Dostopno na medmrežju: [http://sl.wikipedia.org/wiki/Mali\\_%C5%99r%C5%A1atki](http://sl.wikipedia.org/wiki/Mali_%C5%99r%C5%A1atki) (20.05.2010)

Wizard Plus SV Minipreps. 2009. *DNA Purification System Technical Bulletin 3/09*, Promega Corporation.

## **ZAHVALA**

Najprej se zahvaljujem svoji mentorici, prof. dr. Marini Dermastia za pomoč in svetovanje pri raziskovanju področja fitoplazem ter vodenje pri pisanku diplomskega dela.

Zahvaljujem se mag. Nataši Mehle za odlično laboratorijsko usposabljanje in pomoč pri eksperimentalnem delu.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim sodelavcem Nacionalnega inštituta za biologijo, za koristne nasvete in prijetne raziskovalne dni.

Hvala recenzentu, doc. dr. Jerneju Jakšetu za konstruktivne kritike in pripombe.

Hvala Nevenki Valič iz Referata za študentske zadeve študija biotehnologije za pomoč pri urejanju študijskih problemov.

Velika zahvala gre staršem za moralno in finančno podporo tekom celotnega dodiplomskega študija.

Posebna zahvala pa gre dekletu Niki in vsem prijateljem, ki so poskrbeli, da je bil študij manj stresen in bolj prijeten kot bi bil sicer.

Hvala vsem.

## PRILOGE

Priloga A: Seznam vseh analiziranih vzorcev skupaj z letom vzorčenja lokacijo vzorčenja in rezultati. Razlaga simbolov v stolpcu »Bolezenski znaki«: 1, rumenenje /rdečenje; 2, mozaik; 3, sektorsko rumenenje; 4, zvijanje listov navzdol; 5, krhkni listi; 6, nénakomerno oleseneli poganjenki

Oznaka vzorca	Leto	Kraj vzorčenja	Vrsta rastline	Kultivar	Bolezenski znaki	Rezultati PCR v ralnem času	Vgnezdeni PCR F3b/R2	Vgnezdeni PCR rpVF1a/R1A	RFLP profil FD9/ <i>Tru9I</i>	RFLP profil FD9/ <i>TaqαI</i>	RFLP profil rp(V)/ <i>HpaII</i>
544	2005	Purisima	Vinska trta	Sivi pinot	1,2,4,5,6	Poz: BN, FD	neg	neg	/	/	/
547	2005	Purisima	Vinska trta	Sivi pinot	1,4,5,6	Poz: BN, FD	neg	neg	/	/	/
552	2005	Purisima	Vinska trta	Sivi pinot	1,4,5,6	Neg: BN, Poz: FD	neg	neg	/	/	/
328	2006	Purisima	Vinska trta	Sivi pinot	1,2,5,6	Sum: fitoplazme	neg	neg	/	/	/
330	2006	Purisima	Vinska trta	Sivi pinot	1,3,4,5,6,	Neg: BN; Poz: FD	neg	neg	/	/	/
410	2006	Ankaran	Vinska trta	Chardonnay	1,4,5	Neg: BN; Poz: FD	poz (šibko)	poz	/	B	B
421	2006	Vidošiči	Vinska trta	Chardonnay, Modra Frankinja	5	Sum: fitoplazme	neg	poz (šibko)	/	/	A/B*
463	2006	Tomaž	Vinska trta	Modri Pinot	ni podatka	Sum: fitoplazme	neg	neg	/	/	/
525	2006	Purisima	Vinska trta	Sivi Pinot	1,2,5,	Neg: BN; Poz: FD	poz	poz	/	B	B
586	2006	Debeli rtič	Vinska trta	Malvazija	1,5,	Neg: BN; Poz: FD	neg	poz (šibko)	/	/	A
587	2006	Debeli rtič	Vinska trta	Malvazija	1,5,6,	Neg: BN; Poz: FD	poz(šibko)	poz	/	A	A
589	2006	Debeli rtič	Vinska trta	Malvazija	1,2,5,	Sum: fitoplazme	neg	neg	/	/	/
591	2006	Debeli Rtič	Vinska trta	Malvazija	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
665	2006	Purisima	Vinska trta	Sivi Pinot	ni podatka	Neg: BN, Poz: FD	neg	neg	/	/	/
675	2006	Debeli Rtič	Vinska trta	Malvazija	ni podatka	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
676	2006	Debeli Rtič	Vinska trta	Malvazija	ni podatka	Neg: BN, Poz: FD	poz(šibko)	poz (šibko)	/	A	A/B*
680	2006	Debeli Rtič	Vinska trta	Malvazija	ni podatka	Neg: BN, Poz: FD	poz(šibko)	neg	/	A	/
762	2007	Dragonja	Vinska trta	neznana	1,3,4,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
799	2007	Dragonja	Vinska trta	neznano	1,2,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
800	2007	Dragonja	Vinska trta	neznano	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
804	2007	Dragonja	Vinska trta	neznano	1,2,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
340	2008	Pirošica	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	netipični simptomi	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B

se nadaljuje

Priloga A: Seznam vseh analiziranih vzorcev skupaj z letom vzorčenja lokacijo vzorčenja in rezultati. Razlaga simbolov v stolpcu »Bolezenski znaki«: 1, rumenjenje /rdečenje; 2, mozaik; 3, sektorsko rumenjenje; 4, zvijanje listov navzdol; 5, krhkni listi; 6, nénakomerno oleseneli poganjki

Oznaka vzorca	Leto	Kraj vzorčenja	Vrsta rastline	Kultivar	Bolezenski znaki	Rezultati PCR v ralnem času	Vgnezdeni PCR F3b/R2	Vgnezdeni PCR rpVF1a/R1A	RFLP profil FD9/ <i>Tru9I</i>	RFLP profil FD9/ <i>TaqαI</i>	RFLP profil rp(V)/ <i>HpaII</i>
383	2008	Purisima	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,2	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
450	2008	Debeli rtič	Vinska trta	Malvazija	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
466	2008	Dragonja	Vinska trta	neznana	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
473	2008	Škocjan	Vinska trta	merlot	1	Sum: fitoplazme	neg	neg	/	/	/
519	2008	Sv.Peter	Vinska trta	barbera	1, šibko 4 in 5	Sum: fitoplazme	neg	neg	/	/	/
527	2008	Debeli rtič	Vinska trta	Malvazija	1,2,4,5,	Poz: BN, FD	poz	poz sibko	/	A	A
528	2008	Debeli rtič	Vinska trta	Malvazija	1,2,3,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz sibko	/	A	A
563	2008	Višnjenik	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	močno rdečenje,rahlo krhkni listi	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
571	2008	Ljutomer	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
577	2008	Ruperče	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
660	2008	Kromberk	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,3,4	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
704	2008	Piroški vrh	Vinska trta	neznano	1,2,4,5,6,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz sibko	/	A	A
711	2008	Piroški vrh	Vinska trta	neznano	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
781	2008	Piroški vrh	Vinska trta	Modra Frankinja	1,3,4(šibko),5	Neg: BN, Poz: FD	neg	neg	/	/	/
784	2008	Piroški vrh	Vinska trta	Modra Frankinja	1,3,4(šibko),5	Poz: BN, FD	poz(šibko)	neg	/	A	/
368	2009	Straška Gora	vinska trta	Renski rizling	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	A	A	A
369	2009	Straška Gora	vinska trta	Renski rizling	1,3,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
370	2009	Straška Gora	vinska trta	Renski rizling	1,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
371	2009	Straška Gora	vinska trta	Modra Frankinja	1,3,5	Neg: BN, Poz: FD	poz(šibko)	neg	/	/	/
372	2009	Straška Gora	vinska trta	Modra Frankinja	1,3,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
374	2009	Straška Gora	vinska trta	Chardonnay	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz (zelo sibko)	A	A	/
375	2009	Straška Gora	vinska trta	Modra Frankinja	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	/	A	/

se nadaljuje

Priloga A: Seznam vseh analiziranih vzorcev skupaj z letom vzorčenja lokacijo vzorčenja in rezultati. Razlaga simbolov v stolpcu »Bolezenski znaki«: 1, rumenjenje /rdečenje; 2, mozaik; 3, sektorsko rumenjenje; 4, zvijanje listov navzdol; 5, krhki listi; 6, nénakomerno oleseneli poganjki

Oznaka vzorca	Leto	Kraj vzorčenja	Vrsta rastline	Kultivar	Bolezenski znaki	Rezultati PCR v ralnem času	Vgnezdeni PCR F3b/R2	Vgnezdeni PCR rpVF1a/R1A	RFLP profil FD9/ <i>Tru9I</i>	RFLP profil FD9/ <i>Taq1I</i>	RFLP profil rp(V)/ <i>HpaII</i>
376	2009	Straška Gora	vinska trta	Modra Frankinja	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
377	2009	Straška Gora	vinska trta	Sovingon	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	neg	poz	/	/	A
378	2009	Straška Gora	vinska trta	Sovingon	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz (zelo sibko)	/	A	/
410	2009	Ajševica	osebki	Orientus ishidae	/	Neg: AP skupina, BN; Poz: FD	poz	poz	A	A	A
458	2009	Ajševica	osebki	Orientus ishidae	/	Neg: AP skupina, BN; Poz: FD	poz	poz	A	A	A
476	2009	Gradišče nad Prvačino	vinska trta	Sivi pinot	1,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	A	A	/
563	2009	Mala Pristava	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
564	2009	Črešnjevec ob Bistrici	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,2,3	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz šibko	B	B	B
605	2009	Nemška vas	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
636	2009	Pobegi	vinska trta	Malvazija	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	A	A	A
728	2009	Počehova	vinska trta	Rizvanec	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
730	2009	Počehova	vinska trta	Rizvanec	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
731	2009	Počehova	vinska trta	Rizvanec	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
882	2009	Dobrovnik	vinska trta	Chardonnay	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	A	A	A
946	2009	Debeli rtič	vinska trta	malvazija	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	A	A	A
947	2009	Debeli rtič	vinska trta	malvazija	1,3,4,5	Poz: BN, FD	poz	poz	/	A	A
948	2009	Debeli rtič	vinska trta	malvazija	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz (šibko)	/	A	A
966	2009	Straška gora	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
967	2009	Straška gora	dren	neznano	1,3	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
968	2009	Straška gora	kivi	neznano	1,2,4,5	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
969	2009	Straška gora	muhvič	neznano	1,3	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/

se nadaljuje

Priloga A: Seznam vseh analiziranih vzorcev skupaj z letom vzorčenja lokacijo vzorčenja in rezultati. Razlaga simbolov v stolpcu »Bolezenski znaki«: 1, rumenjenje /rdečenje; 2, mozaik; 3, sektorsko rumenjenje; 4, zvijanje listov navzdol; 5, krhki listi; 6, nénakomerno oleseneli poganjki

Oznaka vzorca	Leto	Kraj vzorčenja	Vrsta rastline	Kultivar	Bolezenski znaki	Rezultati PCR v ralnem času	Vgnezdeni PCR F3b/R2	Vgnezdeni PCR rpVF1a/R1A	RFLP profil FD9/ <i>Tru9I</i>	RFLP profil FD9/ <i>TaqαI</i>	RFLP profil rp(V)/ <i>HpaII</i>
970	2009	Straška gora	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
971	2009	Straška gora	trdoleska	neznano	1,3	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
972	2009	Straška gora	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,2	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz šibko	B	B	B
973	2009	Straška gora	vinska trta	neznano	1,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	A	A	A
974	2009	Straška gora	vinska trta	neznano	1,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
975	2009	Podbočje	vinska trta	Modra Frankinja	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
976	2009	Podbočje	vinska trta	Modra Frankinja	1,3,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
977	2009	Podbočje	malina	neznano	1,4	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
978	2009	Podbočje	ribez	neznano	1,4,5,	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
979	2009	Podbočje	vinska trta	zweigelt	1,2,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
980	2009	Podbočje	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	brez	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
981	2009	Podbočje	bukev	neznano	1	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
982	2009	Podbočje	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	4	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
983	2009	Trška gora	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
984	2009	Trška gora	vinska trta	neznano	1,2,3,4,5	Neg: FD; Poz: BN	/	/	/	/	/
985	2009	Trška gora	koruza	neznano	1,2,	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
986	2009	Straška gora	trdoleska	neznano	1,2,	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
1011	2009	Mlada gora /Debenc	vinska trta	Chardonnay	1,4,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1015	2009	Begunje pri Cerknici	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,3	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
1016	2009	Begunje pri Cerknici	jesen	neznano	2	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
1017	2009	Begunje pri Cerknici	dren	neznano	1,2,	POZ: fitoplazme	/	/	/	/	/
1045	2009	Golče	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/

se nadaljuje

Priloga A: Seznam vseh analiziranih vzorcev skupaj z letom vzorčenja lokacijo vzorčenja in rezultati. Razlaga simbolov v stolpcu »Bolezenski znaki«: 1, rumenjenje /rdečenje; 2, mozaik; 3, sektorsko rumenjenje; 4, zvijanje listov navzdol; 5, krhki listi; 6, nénakomerno oleseneli poganjki

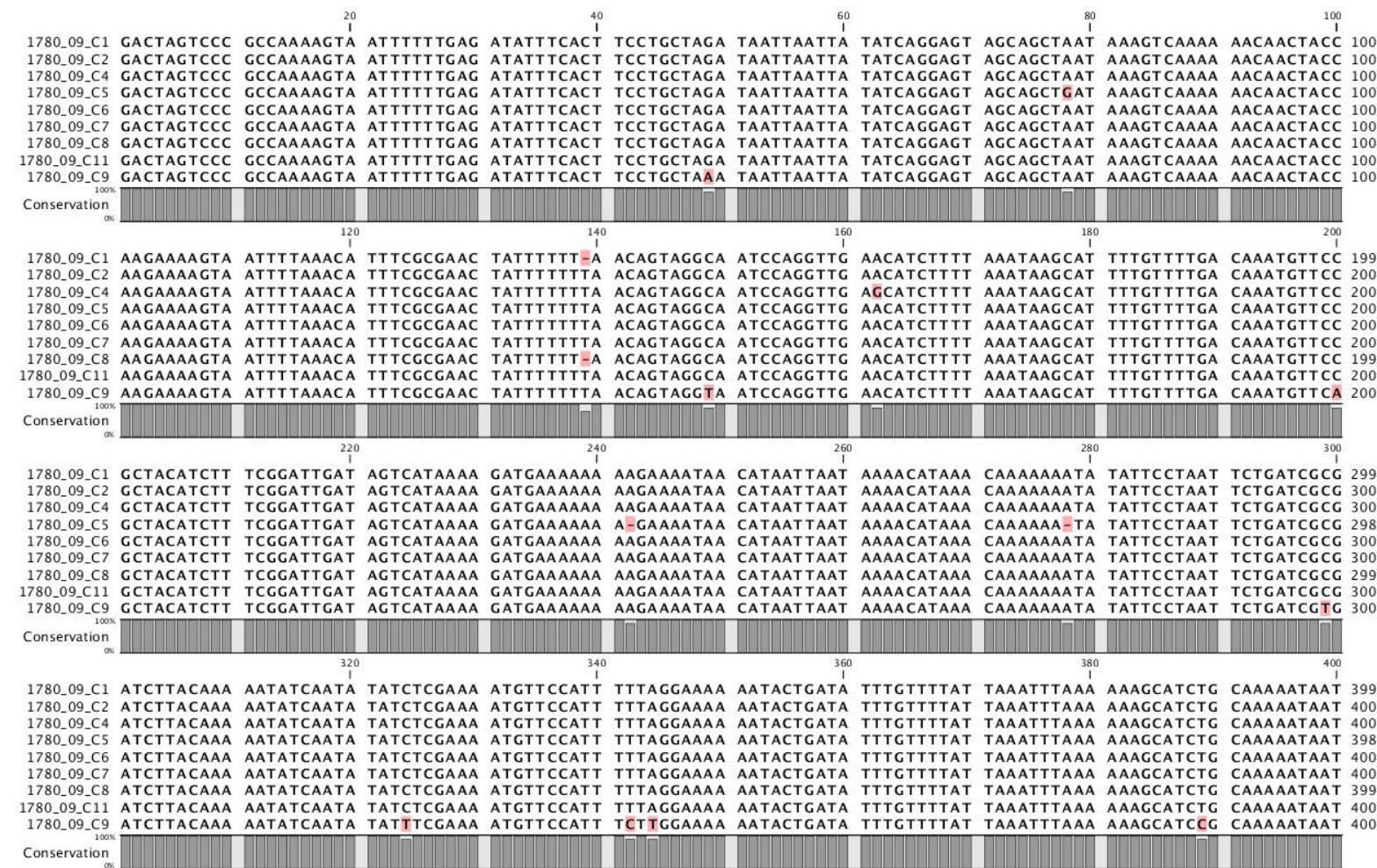
Oznaka vzorca	Leto	Kraj vzorčenja	Vrsta rastline	Kultivar	Bolezenski znaki	Rezultati PCR v ralnem času	Vgnezdeni PCR F3b/R2	Vgnezdeni PCR rpVF1a/R1A	RFLP profil FD9/ <i>Tru9I</i>	RFLP profil FD9/ <i>Taq1</i>	RFLP profil rp(V)/ <i>HpaII</i>
1046	2009	Velike Malence-Vitovec	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1120	2009	Ritoznoj	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
1123	2009	Maribor	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	4	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
1124	2009	Ajdovščina	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,2	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	/	B	/
1125	2009	Tublje pri Komni	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	brez	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
1126	2009	Ajdovščina	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	brez	Neg: BN, FD	/	/	/	/	/
1127	2009	Ajdovščina	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
1203	2009	Zdole	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	B	B	/
1204	2009	Bizeljska vas	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5, vihanje listov navzgor	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1275	2009	Zagrad Otočec	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	B	B	/
1448	2009	Globoka	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	B	B	/
1452	2009	Nebova	vinska trta	Chardonnay	1,4,5	Sum: BN, FD	neg	neg	/	/	/
1480	2009	Dravinjski vrh	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1509	2009	Kromberk	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1536	2009	Kromberk	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1578	2009	Hrib pri Orehku	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1579	2009	Ravni	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1592	2009	Prvacina	vinska trta	Chardonnay	1,4,5,6,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	A	A	B
1593	2009	Prvacina	vinska trta	Chardonnay	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	B
1618	2009	Črešnjevec	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B (z dodatno progo)	B (z dodatno progo)	B
1666	2009	Dekmanca	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	ni podatka	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	B	B	/

se nadaljuje

Priloga A: Seznam vseh analiziranih vzorcev skupaj z letom vzorčenja lokacijo vzorčenja in rezultati. Razlaga simbolov v stolpcu »Bolezenski znaki«: 1, rumenjenje /rdečenje; 2, mozaik; 3, sektorsko rumenjenje; 4, zvijanje listov navzdol; 5, krhki listi; 6, nénakomerno oleseneli poganjki

Oznaka vzorca	Leto	Kraj vzorčenja	Vrsta rastline	Kultivar	Bolezenski znaki	Rezultati PCR v ralnem času	Vgnezdeni PCR F3b/R2	Vgnezdeni PCR rpVF1a/R1A	RFLP profil FD9/ <i>Tru9I</i>	RFLP profil FD9/ <i>Taq1</i>	RFLP profil rp(V)/ <i>HpaII</i>
1690	2009	Straža	vinska trta	samorodnica	1,4,5,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	A	A	A
1691	2009	Straža	vinska trta	samorodnica	1,4,5,6,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
1692	2009	Straža	vinska trta	samorodnica	1,4,5,6,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
1693	2009	Straža	vinska trta	samorodnica	1,4,5,6,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	A	A
1708	2009	Radečka graba	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	ni podatka	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1715	2009	Gorca	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1728	2009	Mali Okič	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	neg	B	B	/
1735	2009	Turški vrh	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1780	2009	Ljuben	vinska trta	neznano	1,4,5,6,	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1781	2009	Ljuben	vinska trta	neznano	1,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	/	B	B
1782	2009	Ljuben	vinska trta	neznano	1,2,4,5,6,	Poz: BN, FD	neg	neg	/	/	/
1856	2009	Hrušica	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1857	2009	Vinji vrh	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1859	2009	Cerov log	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1880	2009	Orehovica	vinska trta	Chardonnay	1,4,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1938	2009	Bučka	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4,5,6	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B
1941	2009	Hrastov hrib	srobot	<i>Clematis vitalba</i>	1,4,5	Neg: BN, Poz: FD	poz	poz	B	B	B

Priloga B: Poravna nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorca 1780/09. Rdeče senčena so mesta, kjer so razlike med zaporedji.



se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Poravna nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorca 1780/09. Rdeče senčena so mesta, kjer so razlike med zaporedji.



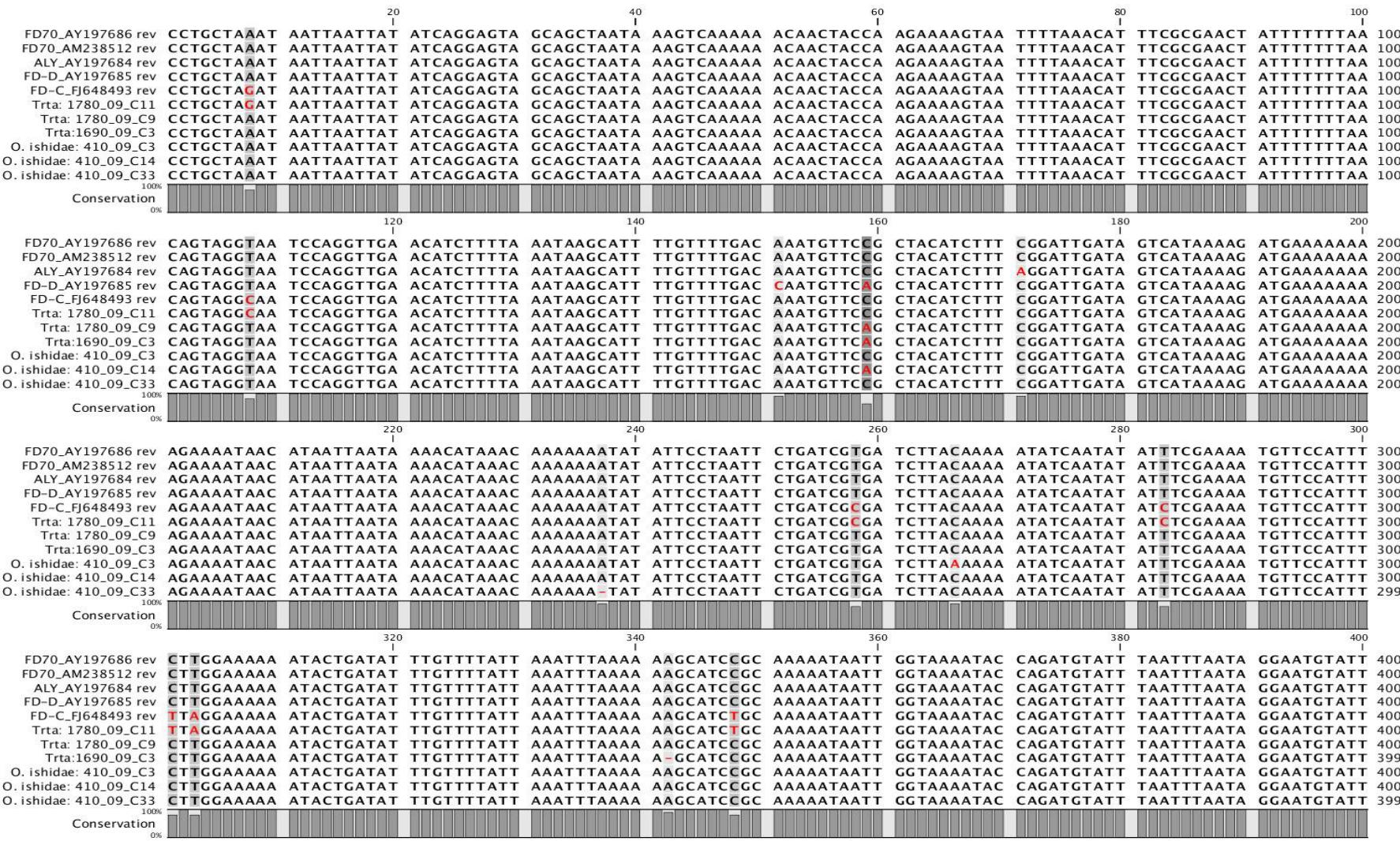
se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Poravna nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorca 1780/09. Rdeče senčena so mesta, kjer so razlike med zaporedji.



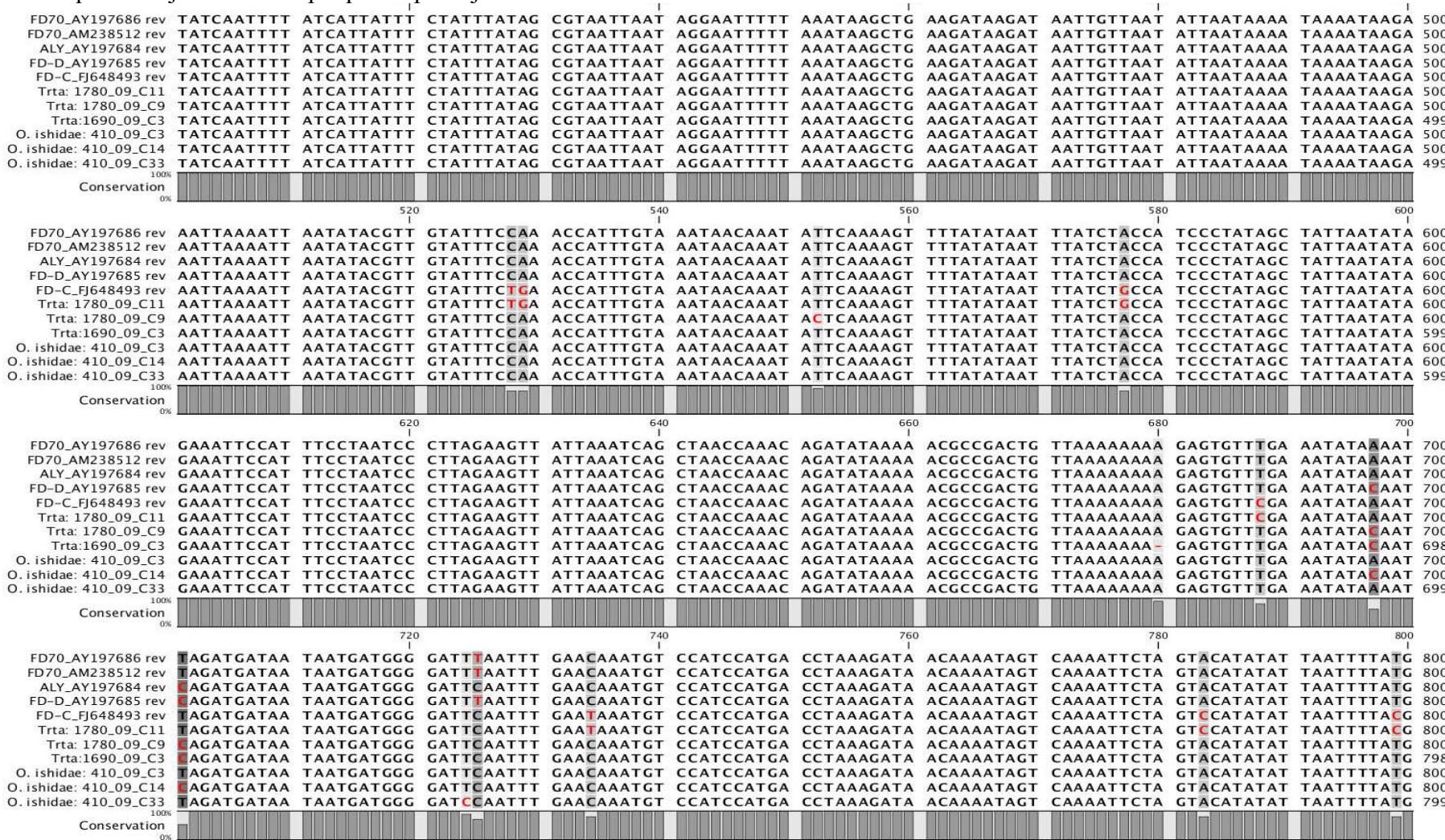
Priloga C: Poravnava nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta med začetnikoma FD9f3b/r2 pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorcev vinske trte in žuželke *Orientus ishidae*. Sivo so označena mesta neujemanja med zaporedji, simbolno je delež ujemanja predstavljen tudi s stolpci pod zaporedji.



se nadaljuje

nadaljevanje

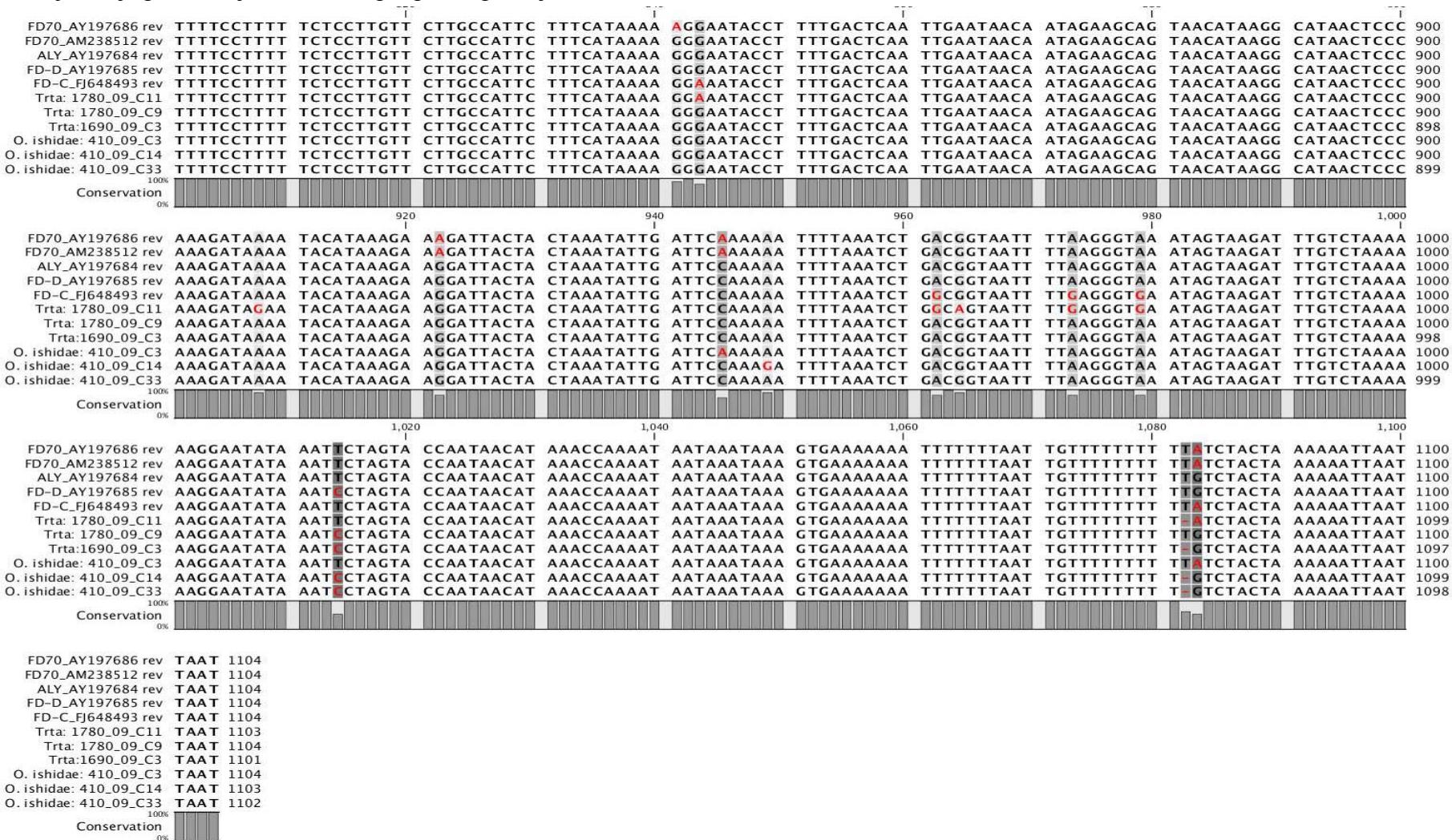
Priloga C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta med začetnikoma FD9f3b/r2 pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorcev vinske trte in žuželke *Orientus ishidae*. Sivo so označena mesta neujemanja med zaporedji, simbolno je delež ujemanja predstavljen tudi s stolpci pod zaporedji.



se nadaljuje

## nadaljevanje

Priloga C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij FD9 fragmenta med začetnikoma FD9f3b/r2 pridobljenih s sekvenciranjem klonov vzorcev vinske trte in japonskega škržatka (*O. ishidae*). Sivo so označena mesta neujemanja med zaporedji, simbolno je delež ujemanja predstavljen tudi s stolpcem pod zaporedji.



Priloga D: Članek, ki je nastal iz tega diplomskega dela in je trenutno v procesu objavljanja v New Disease Reports.

**The first detection of a phytoplasma from the 16SrV (Elm yellows) group in the mosaic leafhopper *Orientus ishidae***

N. Mehle(1)\*, G. Seljak(2), M. Rupar(1), M. Ravnikar(1), and M. Dermastia(1)

(1)National Institute of Biology, Vecna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

(2)Agriculture and Forestry Service Nova Gorica, Pri Hrastu 18, 5000 Nova Gorica, Slovenia

\*[natasa.mehle@nib.si](mailto:natasa.mehle@nib.si)

Additional key words: Slovenia, Flavescence dorée, PCR

In 2009 in Slovenia, an uncultivable cell-wall-less pathogenic bacterium of the class *Mollicutes* - a phytoplasma belonging to the 16SrV (Elm yellows) group was found in the mosaic leafhopper (*Orientus ishidae*) [Hemiptera, Cicadomorpha: Cicadellidae]. Molecular analyses showed that the phytoplasma isolates from *O. ishidae* resembled those of Flavescence dorée (FD) phytoplasma strains, which are present in European grapevines. FD phytoplasmas are in Europe classified as quarantine organisms and are associated with the most important grapevine yellows disease Flavescence dorée. FD only known natural vector is the leafhopper *Scaphoideus titanus* [Homoptera: Cicadellidae] (Mori *et al.*, 2002), although, *Dictyophara europaea* [Hemiptera: Dictyopharidae] has been shown to transmit FD phytoplasmas among grapevine plants in greenhouse conditions (Filippin *et al.*, 2009). *O. ishidae*, is a polyphagous leafhopper species, which originates from the eastern Palaearctic region, and was reported for the first time in Europe in Switzerland in 2002 (Günthart and Mühlenthaler, 2002). Since its first detection in Slovenia in 2004 (Seljak, 2004), it has spread countrywide.

In July 2009, adults of *O. ishidae* were captured on bushy vegetation by sweep net sampling in two locations (both in South West Slovenia) away from vineyards and were then stored in 96% ethanol until DNA extraction. 62 specimens from one location were divided in four subsamples and 14 specimens from the other location were divided in two subsamples. The presence of the 16SrV-group phytoplasma in all *O. ishidae* subsamples was first determined with a TaqMan real-time PCR assay using FDgen set of primers and probe, which amplified the sec Y gene (Hren *et al.*, 2007). Additional amplifications with conventional nested PCR assays (Filippin *et al.*, 2009) were carried out to obtain amplicons of longer size (about 1200 bp with rp(V)F1A/R1A and about 1150 bp with FD9f3/r2 primers) suitable for the subsequent characterization of the phytoplasma isolates by RFLP. The amplicons included genes coding for the L22 and S3 ribosomal proteins, and the L15 and SecY proteins, respectively. Amplicon digestion with the restriction enzymes *Hpa*II and *Taq*I revealed that all phytoplasmas detected in *O. ishidae* had RFLP patterns identical to those of reference strains FD70 and FD92 and FD strains found in the Slovenian grapevines (Fig. 1, Fig. 2). Additional digestion of the amplicon FD9f3b/r2 with *Alu*I suggested that both FD70 and FD92 strains were present in the samples of *O. ishidae* (Fig. 3). The nested FD9f3b/r2 PCR products were cloned into pGEM-T vector and three clones from subsamples were sequenced. The sequences (1112-1113 bp) from two subsample (GenBank Accession No. HM367596) showed the highest identity (99.7%) with the strain FD70 (GenBank Accession

No. AM238512.1), but the sequences of the other (GenBank Accession No. HM367597) showed the highest identity (99.7%) with the strain FD92 (GenBank Accession No. AY197685.1).

Further research is needed to shed light on the role of *O. ishidae* in the possible transmission of 16SrV-group phytoplasmas, including FD, from either reservoir host plants, which have not yet been found, or even from grapevine to grapevine.

#### References:

Filippin L, Jović J, Cvrković T, Forte V, Clair D, Toševski I, Boudon-Padieu E, Borgo M, Angelini E, 2009. Molecular characteristics of phytoplasmas associated with *Flavescence dorée* in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dicyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology* **58**, 826-837.

Günthart H, Mühlethaler R, 2002. Provisorische Checklist der Zikaden der Schweiz (Insecta: Hemiptera, Auchenorrhyncha). *Denisia* **04**, 176, 329-338.

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

Mori N, Bressan A, Martini M, Guadagnini M, Girolami V, Bertaccini A, 2002. Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* Ball of two Flavescence dorée type phytoplasmas. *Vitis* **41**, 99–102.

Seljak G, 2004. Contribution to the knowledge of planthoppers and leafhoppers of Slovenia (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Acta Entomologica Slovenica* **12**, 189–216.

Figure 1: Agarose gel (2%) showing RFLP patterns of nested-PCR products of FD phytoplasma isolates obtained from *O. ishidae* and Slovenian grapevines. The rp(V)F1A/R1A fragments, including the genes that encode the L22 and S3 ribosomal proteins, were digested using *Hpa*II restriction endonuclease. Lines labeled FD70 and FD92 represent reference strains provided by Boudon-Padieu E., INRA. (slika 20)

Figure 2: Agarose gel (2%) showing RFLP patterns of non ribosomal nested-PCR products of FD phytoplasma isolates obtained from *O. ishidae* and Slovenian grapevines. The FD9f3/r2 fragments, including the genes that encode the L15 and SecY proteins, were digested using *Taq*I restriction endonuclease. Lines labeled FD70 and FD92 represent reference strains provided by Boudon-Padieu E., INRA. (slika 19)

Figure 3: Agarose gel (2%) showing RFLP patterns of nested-PCR products of FD phytoplasma isolates obtained from *O. ishidae* and the Slovenian grapevines. The FD9f3/r2 fragments, including the genes that encode the L15 and SecY proteins, were digested using *Alu*I restriction endonuclease. Lines labeled FD70 and FD92 represent reference strains provided by Boudon-Padieu E., INRA. (slika 24)

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matevž RUPAR

**MOLEKULSKA RAZNOVRSTNOST SLOVENSKIH IZOLATOV FITOPLAZME,  
POVZROČITELJICE ZLATE TRSNE RUMENICE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij biotehnologije

Ljubljana, 2010