

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša TEŠIĆ

**DOLOČTEV OPTIMALNIH RAZMER ZA DIAGNOSTIKO
FITOPLAZEMSKÉ POVZROČITELJICE ZLATE TRSNE
RUMENICE V VINSKI TRTI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF THE OPTIMAL CONDITIONS FOR THE
DIAGNOSTIC OF PHYTOPLASMA CAUSER OF THE GRAPEVINE
YELLOW**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. V celoti je bilo opravljeno v laboratorijih Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 25. 3. 2011 odobrila temo in naslov diplomske naloge in za mentorico imenovala prof. dr. Marino Dermastia, za recenzentko pa prof. dr. Majo Ravnikar.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Marina DERMASTIA
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Nataša TEŠIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 632.3.08: 634.8: 577.2.08 (043) = 163.6
KG bolezninski vinske trte/ zlata trsna rumenica /fitoplazma FD/ *Flavescence dorée*/diagnostične metode/obstojnost DNA/PCR v realnem času/pufer ELISA/določanje sladkorjev
AV TEŠIĆ, Nataša
SA DERMASTIA, Marina (mentorica)/RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN DOLOČITEV OPTIMALNIH RAZMER ZA DIAGNOSTIKO FITOPLAZEMSKO POVZROČITELJICE ZLATE TRSNE RUMENICE V VINSKI TRTI
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 40 str., 6 pregl., 16 sl., 46 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Zlata trsna rumenica je gospodarsko pomembna bolezen vinske trte (*Vitis vinifera* L.), ki jo povzroča karantenska fitoplazma *Flavescence dorée* (FD). Diagnostični postopki se izvajajo po standardnih protokolih z metodo PCR v realnem času v listnih žilah vinske trte z bolezenskimi znamenji. Z diplomsko nalogo smo želeli preveriti nove pristope, ki bi pripomogli k hitrejšemu zagotavljanju zanesljivih rezultatov v diagnostiki. Vse vzorce nabrane ob koncu rastne sezone smo analizirali z metodo PCR v realnem času. Ugotovili smo, da je koncentracija fitoplazem najvišja v tkivu grozdnih jagod in je do 200-krat višja kot v listnih žilah vinske trte. Jagode bi bile tako lahko optimalno tkivo ne samo za diagnostične, ampak tudi za raziskovalne namene. Dokazali smo tudi, da na obstojnost fitoplazemske DNA odtajanje in ponovno zamrzovanje ne vplivata bistveno. Prav tako se fitoplazemska DNA ni razgradila po štirih mesecih hranjenja rastlinskega materiala pri T= -80 °C. Prvič je bila preverjena učinkovitost izolacije fitoplazemske DNA iz ekstraktov jagodnega tkiva ob dodatku destilirane vode in pufru ELISA z uporabo kartic FTA™ in filtrov Pallflex. Preliminarni poskusi nakazujejo, da je pufer ELISA primernejši za izolacijo DNA, v primerjavi z vpeljano metodo z aparaturo KingFisher® ml.

KEY WORDS DOCUMENTATION

Dn Dd
DC UDK 632.3.08: 634.8: 577.2.08 (043) = 163.6
CX grapevine diseases/grapevine yellow/ phytoplasma FD/ *Flavescence dorée*
diagnostic methods/DNA stability/real time PCR /buffer ELISA/sugar
determination
AU TEŠIĆ, Nataša
AA DERMASTIA, Marina (supervisor)/RAVNIKAR, Maja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2011
TI DETERMINATION OF THE OPTIMAL CONDITIONS FOR THE
DIAGNOSTIC OF THE PHYTOPLASMA CAUSER OF THE GRAPEVINE
YELLOW
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 40 p., 6 tab., 16 fig., 46 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The grapevine yellow is economically important disease of *Vitis vinifera* L., which is caused by the quarantine phytoplasma *Flavescence dorée* (FD). Diagnostic procedures are carried out according standard protocols with the real-time PCR method in the grapevine symptomatic leaves. With this graduation thesis we wanted to examine the new accessions, which are to contribute to the faster assurance of the reliable results in diagnostics. All samples collected by the end of growing season are analysed with the real-time PCR. We found out that the concentration of phytoplasma is 200 times higher in berries tissues compared with the grapevine leaf midrib. The berries as such represent the optimal tissue not only for the diagnostics purposes, but also for the research as well. We have also proved that the stability of the phytoplasma DNA is not influenced significantly by the effect of defroster and repeated freeze, and that after four months long storing of the plant material at temperature -80 °C did not cause its decay. First was examined the efficiency of isolation of the phytoplasma DNA from the extracts of the grape tissue with the supplement of the distilled water and ELISA buffer with the use of FTA™ Elute Cards and Pallflex filters. Results suggest that ELISA buffer is more appropriate for DNA isolation compare with method which use KingFisher® ml machine.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 VINSKA TRTA.....	2
2.2 FITOPLAZME	2
2.2.1 Osnovne značilnosti	2
2.2.2 Razvrstitev fitoplazem in z njimi povezane bolezni	3
2.2.3 Prenašalci fitoplazem	3
2.2.4 Rastlinski gostitelji in povezava z njihovim sladkornim metabolizmom	4
2.3 TRSNE RUMENICE.....	5
2.4 ZLATA TRSNA RUMENICA.....	5
2.4.1 Fitoplazma FD in raznolikost sevov	6
2.4.2 Prenašalci fitoplazme FD	6
2.4.3 Bolezenska znamenja okužbe	7
2.4.4 Razporeditev fitoplazem v tkivih vinske trte	8
2.4.5 Nadzor bolezni	9
2.5 DIAGNOSTIKA FITOPLAZEM.....	9
2.5.1 Imunološke metode	9
2.5.2 Molekulske metode	10
2.5.2.1 Izolacija DNA.....	10
2.5.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času	11
2.6 STABILNOST FITOPLAZEMSKÉ DNA.....	12
3 MATERIALI IN METODE	13

3.1 RASTLINSKI MATERIAL	13
3.1.1 Vzorci vinske trte iz vinograda, okuženega s fitoplazmo FD	13
3.1.2 Vzorci grozdnih jagod neznanega izvora	14
3.2 PRIPRAVA VZORCEV NA HOMOGENIZACIJO	14
3.2.1 Homogenizacija.....	16
3.3 IZOLACIJA DNA	16
3.3.1 Izolacija DNA z metodo KingFisher	16
3.3.2 Izolacija DNA z karticami FTA™ Elute	17
3.3.3 Izolacija DNA z uporabo filtrov Pallflex	17
3.4 METODA PCR V REALNEM ČASU.....	18
3.4.1 Izvedba PCR v realnem času	18
3.4.2 Obdelava podatkov	19
3.5 PREVERJANJE OBSTOJNOSTI FITOPLAZEMSKÉ DNA	19
3.5.1 Učinek odtajanja in zamrzovanja na obstojnost izolirane DNA	19
3.5.2 Obstojnost DNA v obliki rastlinskega tkiva shranjenega pri T = -80 °C	19
3.6 DOLOČANJE SLADKORJEV	20
3.6.1 Ekstrakcija sladkorjev	20
3.6.2 Spektrofotometrično merjenje absorbance.....	20
4 REZULTATI.....	22
4.1. KONCENTRACIJA DNA	22
4.1.1 Umeritvena krivulja za analizo vrednosti Cq	22
4.1.2 Razporeditev fitoplazem FD v posameznih delih tkiv.....	22
4.1.3 Določitev tkiva z najvišjo koncentracijo fitoplazem FD	24
4.1.4 Nove metode za izolacijo DNA	25
4.1.5 Preverjanje obstojnosti fitoplazemske DNA	27
4.1.5.1 Učinek odmrzovanja in zamrzovanja izolirane DNA.....	27
4.1.6 Obstojnost fitoplazemske DNA v obliki homogeniziranega rastlinskega tkiva, shranjenega pri T = -80 °C	28
4.2 KOLIČINA SLADKORJEV V OKUŽENIH IN NEOKUŽENIH TKIVIH.....	30
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	33
5.1 RAZPRAVA.....	33

5.1.1 Optimalno tkivo za diagnostiko fitoplazem FD	33
5.1.2 Uspešnost kartic FTA™ Elute in filtrov Pallflex za izolacijo DNA	33
5.1.3 Obstočnost fitoplazemske DNA	34
5.1.4 Sladkorji v lamini	34
5.2. SKLEPI	35
6 POVZETEK	36
7 VIRI	37
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Oznake vzorcev vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Modra frankinja)	15
Preglednica 2. Sestavine ELISA pufra	17
Preglednica 3. Sestava reakcijskih mešanic za posamezna amplikona	18
Preglednica 4. Spektrofotometrično merjenje absorbance za določanje koncentracije sladkorjev	20
Preglednica 5. Koncentracija izolirane saharoze, glukoze/- in fruktoze (mg/g sveže teže) v vzorcih jagodne sredice (oznaka F), ki so bili pozitivni ali negativni na fitoplazmo FD.....	31
Preglednica 6. Koncentracija izolirane saharoze, glukoze/- in fruktoze (mg/g sveže teže) v vzorcih lamine (oznaka B), ki so bili pozitivni ali negativni na fitoplazmo FD.....	32

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Bolezenska znamenja pri rdeči sorti vinske trte, kot posledica okužbe z zlato trsno rumenico: rdečenje ter zvijanje listnih robov navzdol (Foto: Petra Nikolić in Nina Prezelj).....	7
Slika 2. Bolezenska znamenja pri beli sorti vinske trte, kot posledica okužbe z zlato trsno rumenico: rumenenje ter zvijanje listnih robov navzdol (Foto: Petra Nikolić)	8
Slika 3. Sušenje in propadanje jagod, kot posledica okužbe z zlato trsno rumenico (Foto: Maja Ravnikar)	8
Slika 4. Računalniški prikaz rezultatov metode PCR v realnem času v obliki krivulj in vrednosti Cq	12
Slika 5. Skica vinograda v Straži v katerem smo nabrali vzorce vinske trte.	13
Slika 6a. Deli vinske trte, uporabljeni za vzorčenje	14
Slika 6b. Vzorčeno tkivo razdeljeno na posamezne dele (Foto: Nina Prezelj)	15
Slika 7. Umeritvena krivulja za amplikon Sec Y narejena z metodo PCR v realnem času za vzorec vinske trte pozitiven na fitoplazmo FD	22
Slika 8. Ocena razporeditve in koncentracije fitoplazem FD v posameznih delih simptomatičnega (S) in nesimptomatičnega (NS) tkiva lista glede na pomnoževanje amplikona SecY	23
Slika 9. Ocena razporeditve in koncentracije fitoplazem FD v posameznih delih simptomatičnega (S) in nesimptomatičnega (NS) tkiva grozdnih jagod glede na pomnoževanje amplikona SecY.....	23
Slika 10. Relativna koncentracija fitoplazem FD v posameznih tkivih glede na simptomatične listne žile	25
Slika 11. Ocena količine DNA, izolirane iz pozitivnih vzorcev vinske trte z uporabo kartic FTA™ Elute (DM) in filtrov Pallflex (DM) glede na aparaturo KingFisher® ml (KF), s primerjavo razlik v pomnoževanju amplikonov 18S rRNA ali SecY z metodo PCR v realnem času	26
Slika 12. Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po petkratnem odtajevanju in ponovnem zamrzovanju (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplikona 18S rRNA)	27

Slika 13. Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po petkratnem odtajevanju in ponovnem zamrzovanju (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplikona SecY)	28
Slika 14. Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po dveh (2) in štirih (4) mesecih (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplikona 18S rRNA)	29
Slika 15. Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po dveh (2) in štirih (4) mesecih (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplikona Sec Y)	29
Slika 16. Povprečne koncentracije sladkorjev (\pm SD) v okuženih tkivih (FD POZ.) lamine glede na neokuženo (FD NEG.)	30

OKRAJŠAVE

16S rRNA	16S ribosomalna RNA
ALY	jelšina rumenica (ang. alder yellows)
AGYp	avstralske fitoplazme trsnih rumenic
AP	filogenetska skupina fitoplazem, ki povzroča metličavost jablan (ang. apple proliferation)
bdH ₂ O	bidestilirana voda
BVGY	Buckland valley trsne rumenice
BN	fitoplazemska povzročiteljica počrnelosti lesa pri vinski trti (<i>Bois noir</i>)
Cq	cikel pri katerem fluorescenčna vrednost signala preseže vrednost ozadja (ang. cycle quantification)
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimskoimunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
FD	fitoplazemska povzročiteljica zlate trsne rumenice pri vinski trti (<i>Flavescence dorée</i>)
kbp	kilobazni pari
LY	fitoplazma, ki povzroča letalno rumenenje kokosovih palm (ang. lethal yellowing)
NKI	negativna kontrola izolacije
NTC	kontrola kontaminacij kemikalij za PCR metodo (ang. non template control)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PGY	filogenetska skupina fitoplazem, ki povzroča jelšine rumenice (ang. Palatinate grapevine yellow)
RFLP	metoda polimorfizmov restrikcijskih fragmentov
RY	fitoplazme, ki povzročajo pritlikavost riža (ang. rice yellows dwarf)
SCYP	fitoplazme, ki povzročajo rumenenje sladkornega trsa (ang. sugarcane yellows phytoplasma)
SecY	gen, ki kodira podenoto translokaznega proteina

1 UVOD

Zaradi pridelave grozdja v vino je človek gojil vinsko trto že od začetkov civilizacije. S primernim varstvom vinske trte je zagotovljen zadosten pridelek grozdja ter ohranjena njegova kakovost. Ta pomemben kmetijski segment v zadnjih letih, poleg drugih bolezni, v Sloveniji ogroža tudi zlata trsna rumenica, ki predstavlja resno grožnjo evropskemu vinogradništvu že več kot 20 let. Pojav bolezni večinoma vodi v propad okuženih trsov, kar ima za posledico veliko gospodarsko škodo. Povzročajo jo fitoplazma iz skupine brestovih rumenic (angl. Elm yellow) *Flavescence dorée* (v nadaljevanju fitoplazma FD), ki je uvrščena v prilogo II A 2 Direktive Sveta Evrope 2000/29/ES in na seznam karantenskih škodljivcev A2 organizacije EPPO. Za fitoplazmo FD je značilno, da naseljuje s sladkorji bogat floem ter jo z okuženih na zdrave trte prenaša ampelofagni ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball.) ob sesanju rastlinskih sokov. Iz Francije in Italije se je razširila tudi v Slovenijo, kjer je bila leta 2005 prvič uradno potrjena. Do danes pa je bila prisotna v vseh slovenskih vinorodnih deželah. Ob pojavu bolezenskih znamenj je zakonsko predpisano uničenje trsov in upoštevanje drugih zakonskih ukrepov. Ker fitoplazem zaenkrat ne znamo gojiti v razmerah *in vitro* in so serološke metode manj zanesljive, so diagnostični postopki možni le z uporabo molekularnih analiz rastlinskih tkiv. Diagnostiko otežujeta nizka koncentracija fitoplazem v rastlinskih tkivih in njihova neenakomerna razporeditev po rastlini. Izboljšava že obstoječih ter postopno uvajanje novih metod sta nujna za učinkovit nadzor bolezni.

O fitoplazmah vemo bolj malo, zato predstavljajo tudi velik raziskovalni izziv. Še vedno je veliko odprtih vprašanj na katera ne poznamo odgovorov. Vsaka nova ideja, podatek ali rezultat lahko prispevajo k boljšemu razumevanju zapletenih fitoplazemskih procesov in pomagajo pri hitrejši in zanesljivejši diagnostiki. Rezultati diplomske naloge bodo v pomoč pri varstvu vinske trte ter pri nadaljnjih raziskavah fitoplazem.

1.1 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE

Z diplomsko nalogo smo želeli določiti optimalno tkivo vinske trte, okuženo s fitoplazmo FD, za diagnostične in raziskovalne namene, izboljšati metode za učinkovitejšo izolacijo DNA in preveriti stabilnost fitoplazemske DNA. Želeli smo tudi preveriti hipotezo, da je količina sladkorjev v okuženih listih vinske trte večja kot v neokuženih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VINSKA TRTA

Vinska trta je uvrščena v družino vinikovk (*Vitaceae*), katere pomembnejši rod je vinska trta (*Vitis vinifera* L.) (Martinčič in sod., 2007). Vrsta *Vitis vinifera* izvira iz Evroazije, od koder jo je človek razširil po vsem svetu in ima svojevrsten pomen že od davnine. Grozdje sodi med najokusnejše plodove, medtem ko je vino živilo posebne vrste. Vinska trta je razširjena na območju Sredozemlja, Srednje Evrope in jugozahodne Azije.

Na svetu je bilo v letu 1970 z vinsko trto zasejanih 10,2 milijona hektarov vinogradov, od tega jih je 61 % na evropskih tleh. Leta 2002 je svetovna površina zasejanih vinogradov znašala 7,9 milijona hektarov. Samo v Italiji, Franciji, Španiji in na Portugalskem se je njihova površina v zadnjih 30-letih zmanjšala s 5 na 3 milijone hektarov (Jackson, 2008).

Približno 66 % svetovnega in 77 % evropskega grozdnega pridelka je namenjenega proizvodnji vina, ki letno znaša 270 milijonov hektolitrov. Državi, ki skupaj proizvedeta 50 % vseh svetovnih vin sta Italija in Francija (Jackson, 2008).

Vinsko trto, tako kot druge rastline napadajo številni škodljivci in bolezni, ki ogrožajo količino in kakovost pridelkov ter vodijo do velike gospodarske škode. Eno izmed gospodarsko najpomembnejših bolezni vinske trte predstavljajo trsne rumenice, ki močno zmanjšujejo proizvodnjo vina v Evropi in Avstraliji (Bertaccini in Duduk, 2009).

2.2 FITOPLAZME

2.2.1 Osnovne značilnosti

Fitoplazme so velika in raznolika skupina pomembnih rastlinskih škodljivcev uvrščenih v razred *Mollicutes*. Podobne so bakterijam vendar nimajo celične stene. Povzročajo več sto različnih bolezni pri gospodarsko pomembnih rastlinah po celem svetu. Predstavljajo posebnost med prokarionti, ker so znotrajcelični paraziti organizmov iz dveh različnih kraljestev, *Plantae* in *Animalia*. Znanje o njihovi biologiji je omejeno zaradi nezmožnosti gojenja v razmerah *in vitro* ter nedostopnosti znotraj gostitelja (Christensen in sod., 2005).

Celice fitoplazem so obdane z enojno membrano ter vsebujejo eno krožno dvoverižno DNA molekulo. Genom fitoplazem je velik približno 750 kbp in ima nizko vsebnost baznih parov G-C. Za fitoplazme iz skupine aster (16SrI), stolbur (16SrXII) in X-bolezni (16SrIII) je dokazana prisotnost dodatne, plazmidom podobne kromosomske DNA, katere vloga še ni razkrita. Tudi še ni znano kako se gibljejo znotraj gostitelja, ker nimajo genov za sintezo citoskeletnih elementov in migetalk (Bertaccini, 2007).

Prvič so jih odkrili japonski znanstveniki leta 1967 pri pregledu mladih listov z bolezenskimi znamenji rumenic. Z uporabo transmisijskega elektronskega mikroskopa so v celicah sitastih cevi rastlin opazili virusom podobne delce. Takrat so na novo odkrite

rastlinske patogene mikroorganizme poimenovali mikoplazmam podobni organizmi. Povezovali so jih z virusi, ker ne rastejo v razmerah *in vitro*, so obligatni paraziti ter ne morejo preživeti zunaj gostitelja (Fiarro in sod., 2007). Leta 1994 je bilo na desetem kongresu o mednarodnih raziskovalnih projektih za primerjalno mikoplazmologijo sprejeto ime fitoplazme namesto mikoplazmam podobni organizmi (Bertaccini, 2007).

Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja genomov štirih fitoplazem je pokazalo, da so ti rastlinski patogeni mikroorganizmi doživeli precejšnje evolucijske izgube genov ter okvaro ali izgubo pomembnih biosintetskih poti. Te spremembe so lahko posledica njihove popolne odvisnosti od gostiteljske rastline in žuželčjih prenašalcev. Še vedno ni znano kako izkoriščajo s sladkorji bogat floem ter kako sodelujejo s svojim gostiteljem (Christensen in sod., 2005; Hren in sod., 2009).

2.2.2 Razvrstitev fitoplazem in z njimi povezane bolezni

Prvi sistemi za identifikacijo in razvrstitev fitoplazem so temeljili na elektronskem mikroskopiranju prevodnega tkiva, specifičnosti žuželčjega prenašalca ter na pojavu bolezenskih znamenj pri gostiteljskih rastlinah. Vendar pa gensko različne fitoplazme lahko povzročajo podobna bolezenska znamenja pri rastlinah iste vrste. Uporaba molekulske metode PCR z začetnimi oligonukleotidi, pridobljenimi iz zaporedja genov za 16S rRNA, SecY ali Tuf ter genov za membransko vezane proteine, je odprlo nove poti za njihovo razvrščanje (Bertaccini, 2007; Bertaccini in Duduk, 2009).

Analiza 16S rRNA z metodo RFLP/PCR in ugnezdene PCR je razvrstila fitoplazme v 19 skupin in več kot 40 podskupin. Določena so tudi pravila za uvrstitev teh rastlinskih patogenih mikroorganizmov v samostojen takson *Candidatus* Phytoplasma (Firrao in sod., 2005). Epidemije rastlinskih bolezni v zadnjih 40 letih, povezane s fitoplazmami so bile opisane po vsem svetu. Te vključujejo predvsem bolezni sladkornega trsa, kokosove palme, zelenjave, vinske trte in sadnega drevja. Tako npr. povzročiteljica zlate trsne rumenice, karantenska fitoplazma FD iz skupine brestovih rumenic (podskupina 16SrV) povzroča propad vinogradov v Evropi. Fitoplazme iz skupine RY (16SrXI) povzročajo pritlikavost riža v Aziji, kar ima za posledico velik upad pridelka v tem delu sveta. Fitoplazme iz skupine AP (16SrX) pa v zadnjih letih uničujejo sadno drevje (hruške, slive, jabolkov...) v Evropi in ZDA, kar zmanjšuje proizvodnjo in kakovost svežega sadja. Samo v Franciji beležijo letni 5 % propad marelic (Foissac in Wilson, 2010; Bertaccini in Duduk, 2009).

2.2.3 Prenašalci fitoplazem

Fitoplazme med rastlinami prenašajo žuželke iz reda enakokrilcev (Hemiptera), predvsem škržatki iz družine Cicadellidae (Christensen in sod., 2005). Prenašajo jih tudi enakokrilci iz družin Fulgoromorpha in Psyllidae (Hogenhout in sod., 2008). Fitoplazme so različno specializirane za svoje prenašalce. Tako npr. fitoplazme iz podskupine 16SrI-B prenaša 24 različnih vrst, tiste iz 16SrV-A pa le ena ali nekaj vrst žuželk (Lee in sod., 1998).

Fitoplazme se prenesejo v žuželko ob hranjenju s floemskim sokom okužene rastline. Posledica okužbe se kaže kot kolonizacija žlez slinavk, črevesja in nekaterih drugih organov. Ta lahko traja različno dolgo preden je koncentracija fitoplazem dovolj velika za prenos in okužbo zdravih rastlin. To prikrito obdobje se lahko razlikuje od vrste prenašalca. Fitoplazemska prisotnost pri nekaterih vrstah žuželk izzove njihovo smrt v času, ko se hranijo na rastlini in so sposobni okužbe (Hogenhout in sod., 2008). Pri drugih se ta izkaže celo za koristno, ker jim omogoča preživetje pri izpostavitvi nižjim temperaturam od optimalnih ter ob pomanjkanju glavnega vira hrane (Christensen in sod., 2005).

Fitoplazme lahko na zdrave rastline prenaša tudi parazitska rastlina predenica (*Cuscuta* sp.). Bertaccini in Duduk (2009) poročata o prenosu fitoplazem, uvrščenih v skupine 16SrI, 16SrXII in 16SrII s semeni paradižnika (*Lycopersicon esculentum*). Fitoplazme se lahko širijo tudi s cepljenjem okuženih rastlin na zdrave.

Študije so pokazale, da so fitoplazme bolj povezane s svojim prenašalcem kot rastlinskim gostiteljem. Tako so npr. fitoplazme iz različnih skupin odgovorne za razvoj podobnih bolezenskih znamenj pri določeni vrsti rastlin. Tiste, ki se z žuželkami iz iste družine prenesejo v različne gostiteljske rastline so običajno uvrščene v isto skupino ali podskupino (Boudon-Paideu, 2003).

2.2.4 Rastlinski gostitelji in povezava z njihovim sladkornim metabolizmom

Za preživetje, razmnoževanje in širjenje v naravi potrebujejo fitoplazme, poleg žuželčjega prenašalca, tudi gostiteljsko rastlino. Fitoplazme imajo širok spekter rastlinskih gostiteljev, kar je odvisno od vrste na kateri se hrani prenašalec. Znano je, da najmanj 30 predvsem polifagnih žuželk prenaša fitoplazme iz skupine 16 SrI, kar ima za posledico okužbo več kot 80 rastlinskih vrst (Hogenhout in sod., 2008). Med gostitelji fitoplazem je veliko gospodarsko pomembnih rastlin, kot so vinska trta in sadno drevje (Musetti, 2010).

Okužbe s fitoplazmami imajo negativen vpliv na rastlinskega gostitelja. Bolezenska znamenja se pojavijo po sedmih dneh do 24 mesecih okužbe, odvisno od rastline in vrste fitoplazme. Redki so primeri, ko rastline okužene s fitoplazmami ne kažejo nobenih bolezenskih znamenj v vsej življenjski dobi (Marcone, 2010).

Fitoplazme se prenesejo s slino škržatka v vbodno mesto rastline, od koder se naprej razširijo po njenih tkivih, vendar se nikoli ne pojavljajo v meristemu (Bartaccini in Duduk, 2009). V rastlini naseljujejo celice floema (Christensen in sod., 2005) kjer lahko sprožijo hudo nekrozo (Hogenhout in sod., 2008). Kot splošen učinek okužbe se v okuženih izvornih listih začno kopičiti glukoza, fruktoza, saharoza in škrob. Njihovo kopičenje so zasledili v listih madagaskarskega zimzelena (*Catharanthus roseus*), okuženega z različnimi, taksonomsko nesorodnimi fitoplazmami (Lepka in sod., 1999; Choi in sod., 2004). Količina škroba in glukoze se je povečala v zrelih listih papaje, okužene s 'Ca. P.

australiense' (Guthrie in sod., 2001). Podobno so se topni sladkorji in škrob povečali v listih kokosove palme, okužene s fitoplazmo LY (Maust in sod., 2003). Količina reducirajočih sladkorjev je bila povečana tudi v listih koruze, okužene s fitoplazmo grmičaste pritlikavosti koruze (Junqueira in sod., 2004). Povečane količine sladkorjev v gostiteljskih rastlinah naj bi bile fitoplazmam vir energije za rast in razmnoževanje.

2.3 TRSNE RUMENICE

Trsne rumenice so skupno ime za več fitoplazemskih boleznih vinske trte, katerih zelo podobna bolezenska znamenja poznamo že več kot 50 let (Boudon-Padieu, 2003). Fitoplazme, ki se povezujejo z razvojem večine bolezenskih znamenj trsnih rumenic so fitoplazma jelšinih rumenic (PGY), Buckland valley fitoplazma trsnih rumenic (BVGY), Wester X, *Flavescence dorée* (FD) in *Bois noir* (BN). Trenutno največjo grožnjo evropskem in slovenskem vinogradništvu predstavljata bolezni zlata trsna rumenica in navadna trsna rumenica ali počrnelost lesa, ki ju povzročata fitoplazmi FD in BN.

Prvi izbruh bolezni, povezan s fitoplazmo FD je zabeležen leta 1950 v jugozahodni Franciji. O podobnih bolezenskih znamenjih na vinski trti so kasneje poročali tudi iz drugih delov Evrope. Znamenja okužbe se kažejo kot rdečenje ali rumenenje listov, zvijanje listnih robov navzdol, pomanjkljiva ali nepopolna olesenost poganjkov in propad jagod. Čeprav se povzročitelji po genetski sestavi med seboj razlikujejo, so bolezenska znamenja skoraj identična (Maixner, 2006).

Boljše razumevanje epidemij trsnih rumenic in razvoj novih načinov za njihovo obvladovanje zahteva dodatne raziskave na ravni povezanosti med boleznijo in prenašalcem fitoplazem. Tako npr. škržatek *Hyaesthes obsoletus* Signoret ni edini naravni prenašalec BN, ker se bolezen pojavlja tudi na območju, kjer ta žuželka ni razširjena. Možna potencialna prenašalca za BN sta *Pentastiridius beieri* in *Reptalus quinquecostatus* (Belli in sod., 2010).

Constable in sod. (2003) navajajo, da so se bolezenska znamenja trsnih rumenic pojavila že leta 1976 tudi v Avstraliji. Zaenkrat ni še znan prenašalec, vendar pojav bolezni v tem delu sveta povezujejo z avstralskimi fitoplazmami trsnih rumenic (AGYp).

2.4 ZLATA TRSNA RUMENICA

Zlata trsna rumenica se je v Evropi prvič pojavila v Franciji, od koder se je razširila v vinograde severno-zahodne Italije. Tam se je leta 1998 pojavil resen izbruh bolezni in od takrat ogroža gospodarstvo tega tradicionalnega vinorodnega območja, kljub izvajanju posebnih nadzornih ukrepov. Trenutno je ena najhujših boleznih vinske trte z občutnimi gospodarskimi posledicami, zaradi propada celih vinogradov (Morone in sod., 2007).

2.4.1 Fitoplazma FD in raznolikost sevov

Fitoplazma FD je povzročiteljica bolezni zlata trsna rumenica, ki že več let uničuje vinograde južne Francije, severne Italije in Španije. Uvrščena je v skupino brestovih rumenic (16SrV). V genomu brestovih rumenic je zelo velika podobnost v zaporedjih genov *16S rRNA* in *SecY*. Pojavlja se v obliki različnih sevov, ki v Evropi, poleg vinske trte, okužuje tudi brest, jelšo, robido in druge rastline (Arnaud in sod., 2007).

Molekulska in filogenetska analiza na dveh genskih lokusih *map* in *uvrB-degV* skupaj z genom *SecY* je razvrstila FD seve v tri genske skupke: FD1, ki vključuje refrenčni sev FD71 in je razširjena v Franciji; FD2 s sevom FD92 in se pojavlja v Franciji in Italiji ter FD3, ki so ga najprej našli v Italiji (Belli in sod., 2010). Gospodarsko so najpomembnejši sevi v genskih skupkah FD2 in FD3, saj so odgovorni za večino bolezenskih izbruhov v zadnjih 20 letih (Angelini in sod., 2003). Poleg Italije in Francije so fitoplazme FD iz vseh treh genskih skupin našli tudi v vinorodnih deželah Slovenije (Dermastia in sod., 2010).

Novije raziskave so potrdile okužbo navadnega sorbota (*Clematis vitalba* L) s fitoplazmami FD3 v severozahodni Italiji in v nekaterih Balkanskih državah. Našli so jih na področjih, kjer okužbe vinske trte s to fitoplazmo niso bile nikoli prej zabeležene oziroma daleč stran od vinogradov okuženih s FD. Te ugotovitve kažejo, da je bil prvotni naravni gostitelj tega fitoplazemskega izolata morda sorbot, s katerega se je fitoplazma prenesla na vinsko trto (Filippin in sod., 2007; Filippin in sod., 2009).

Dokazano je, da fitoplazma ALY, ki povzroča jelšino rumenico sorodna fitoplazmi FD ter je uvrščena v 16SrV skupino (Malembic-Maher in sod., 2007). Med jelšami kot tudi z okuženih jelš na zdravo vinsko trto jo prenaša škržatek *Oncopsis alni*. Pri okuženi rastlini se posledično razvijejo bolezenska znamenja, podobna tistim, ki jih povzroča fitoplazma FD (Maixner in sod., 2000). O pojavu ALY fitoplazem so poročali v Italiji, Franciji, Avstriji, Švici in Nemčiji (Arnaud in sod., 2007). Nukleotidna zaporedja izolatov fitoplazme ALY so tudi zelo podobna zaporedjem izolatov seva PGY (Malembic-Maher in sod., 2007), za katerega je bilo v Nemčiji že pokazano, da so jelše njihov naravni rezervoar (Maixner in sod., 2000).

2.4.2 Prenašalci fitoplazme FD

Naravni prenašalec fitoplazme FD je ameriški škržatek *Scaphoideus titanus* Ball, ki so ga v petdesetih letih prejšnjega stoletja prenesli iz Severne Amerike v sredozemske evropske dežele. Njegovo pojavljanje so potrdili v vinorodnih deželah Španije, Francije, Italije, Švice, Slovenije in Hrvaške (Maixner, 2006). Pred kratkim so poročali o njegovi prisotnosti tudi v Srbiji (Lessio in Alma, 2004).

Za ameriškega škržatka je značilno, da se hrani le na vinski trti in druge rastlinske gostiteljice niso znane. Ko se hrani na vinski trti, preidejo fitoplazme skozi njihovo sesalo v floem ob vbodnem mestu rastline (Marzorati in sod., 2005). Škržatek letno razvije eno

generacijo. Samica odloži jeseni jajčeca v lub dveletnega lesa, kjer ta prezimijo. Ličinke se začnejo razvijati od sredine maja do sredine julija in se hranijo na spodnji strani listov. Odrasli škržatki se pojavijo sredi junija in so prisotni vse do pozne jeseni. Ni še dokazov o prenosu fitoplazem z okuženega odraslega škržatka na jajčeca (Lessio in Alma, 2004).

Filippini in sod. (2007) navajajo, da je vloga pri prenosu fitoplazem FD3 s sorbota na vinsko trto imel škržatek *Dictyophara europaea*. Fitoplazme, ki pri vinski trti povzročajo bolezen PGY prenaša škržatek *Oncopsis alni*. Eksperimentalno še ni dokazano, da bi PGY prenašal *Scaphoideus titanus* Ball, ker se bolezen pojavlja v vinogradih, kjer ta škržatek ni prisoten (Arnaud in sod., 2007).

2.4.3 Bolezenska znamenja okužbe

Razvoj bolezenskih znamenj je odvisen od stanja gostiteljske rastline, patogena in njegovih različnih biotipov, dovzetnosti za mutacije, prisotnosti prenašalcev ter okoljskih razmer (Musetti, 2008).

Bolezenska znamenja postanejo jasno vidna v poletnem času, vendar je obolele trse možno prepoznati od pomladi predvsem po manjši rasti. Najprej se pojavi bledikavost listov, ki pri rdečih sortah pordeči (slika 1), pri belih porumeni (slika 2). Robovi listov se ob straneh zvijejo navzdol, postanejo togi in dozorevajo hitreje. Zaradi slabe olesenosti se rozge povesejo, postanejo krhke in po zimi odmrejo. Pri bolj odpornih sortah se slaba olesenost pojavlja le pri posameznih poganjkih. Prizadeti so tudi cvetovi, ki se pogosto posušijo. V obdobju dozorevanja jagod se tudi grozdje posuši (slika 3) (Maixner, 2006; EPPO, 2007).



Slika 1: Bolezenska znamenja pri rdeči sorti vinske trte, kot posledica okužbe z zlato trsno rumenico: rdečenje ter zvijanje listnih robov navzdol. (Foto: Petra Nikolić in Nina Prezelj)



Slika 2: Bolezenska znamenja pri beli sorti vinske trte, kot posledica okužbe z zlato trsno rumenico: rumenenje ter zvijanje listnih robov navzdol. (Foto: Petra Nikolić)



Slika 3: Sušenje in propadanje jagod, kot posledica okužbe z zlato trsno rumenico. (Foto: Maja Ravnikar)

2.4.4 Razporeditev fitoplazem v tkivih vinske trte

Danes je malo znanega o večini interakcij med gostiteljem in patogenim mikroorganizmom, kot npr. o razporeditvi fitoplazem in njihovi perzistentnosti v okuženih trsih. Za trto s tipičnimi znamenji okužbe ni nujno, da ima fitoplazme prisotne v določljivih koncentracijah v vseh tkivih v istem vzorčnem obdobju (Constable in sod., 2003). Trenutno dostopni rezultati kažejo, da so fitoplazme BN neenakomerno razporejene v okuženih tkivih trsov. V poletnem času jih najbolj pogosto dokažejo v listnih vzorcih

simptomatičnih poganjkov, medtem ko so redki primeri pozitivnih rezultatov pri nesimptomatičnih listih (Terlizzi in Credi, 2007; Hren in sod., 2009). Terlizzi in Credi (2007) navajata pozitivne rezultate okužbe s fitoplazami BN pri testiranju floema močno prizadetih poganjkov. V zimskem obdobju sta jih dokazala v tkivih korenin in rozg, vendar je bil njihov delež zelo nizek.

2.4.5 Nadzor bolezni

Izbruhe fitoplazemskih bolezni nadzorujemo z nadzorom prenašalca in odstranjevanjem okuženih trt. Prvi zaščitni ukrep je dokaj okoljsko neprimeren, saj zahteva intenzivno uporabo insekticidov. Eden izmed glavnih ukrepov za nadzor fitoplazemskih bolezni je tako zagotavljanje zdravega cepilnega materiala (Bertaccini, 2007).

Ob sumu pojava zlate trsne rumenice je pomembno čimprej odvzeti vzorce za laboratorijsko analizo. Če se potrdi okužba s fitoplazmami FD, je zakonsko določena odstranitev okuženih trsov iz vinograda. Ameriškega škržatka zatiramo z uporabo insekticidov ter spremljamo njegovo navzočnost v vinogradu s postavitvijo rumenih lepljivih ploščic (Pravilnik o ukrepih..., 2009). Tassart-Subiratis in sod. (2003) predlagajo uporabo termoterapevtske metode za pridobivanje neokuženih cepljenk. Te je potrebno namočiti za približno 45 minut v vodo segreto na $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5 DIAGNOSTIKA FITOPLAZEM

Nadzor nad trsnimi rumenicami zahteva nujno poznavanje vrste fitoplazme, ki ga je mogoče določiti le z laboratorijskim testiranjem. Diagnostiko fitoplazem ovira neenakomerna razporeditev, nizka koncentracija in nihanje v tkivih vinske trte skozi leto (Margaria in sod., 2007). Najvišja koncentracija fitoplazem je dokazna v zrelih listih (Bertaccini in Duduk, 2009).

Zanesljivi rezultati diagnostike so ključnega pomena za odstranjevanje okuženih trsov in za nadzor bolezni. Pomanjkanje občutljivih, zanesljivih in hitrih metod za določanje in identifikacijo fitoplazem lahko predstavlja resno oviro pri preprečevanju njihovega nadaljnega širjenja (Bianco in sod., 2004).

Prva metoda za diagnostiko fitoplazem je temeljila na opazovanju okuženega rastlinskega tkiva z mikroskopom. V zadnjih letih je bilo, poleg seroloških, razvitih tudi veliko molekularnih metod, kot sta hibridizacija in PCR (Lopez in sod., 2009).

2.5.1 Imunološke metode

Uvedba imunoloških metod je predstavljala prvo orodje za hitro odkrivanje in molekularno razlikovanje med fitoplazmami. Najbolj razširjena je bila uporaba testa ELISA. Serološko določanje je predvsem odvisno od razpoložljivih specifičnih protiteles pridobljenih iz fitoplazemskih beljakovin. Za določanje fitoplazemskih povzročiteljic bolezni so zato začeli hitro proizvajati monoklonska in poliklonska protitelesa. Imunološki testi so

relativno enostavni in učinkoviti vendar imajo tudi svoje pomanjkljivosti. Poliklonska protitelesa so zmerno uspešna zaradi visoke reaktivnosti z različnimi rastlinskimi beljakovinami. Težava je tudi pridobivanje zelo čistih fitoplazemskih antigenov. Monoklonska protitelesa so primerna za tkivno imunomikroskopijo, s katero ugotavljajo kje se fitoplazme nahajajo v rastlinah ali žuželkah, a zaradi velike raznolikosti fitoplazemskih sevov niso primerna za rutinsko diagnostično uporabo (Firrao in sod., 2007).

2.5.2 Molekulske metode

V zadnjih petnajstih letih je uporaba molekulskih tehnik izboljšala naše znanje, spremenila dosedanja sliko o fitoplazmah in odprla nove poti za razumevanje njihove biologije in bolezni, ki jih povzročajo. Molekulske metode so tudi omogočile filogenetske in genetske raziskave fitoplazem, kljub nezmožnosti njihovega gojenja v laboratoriju. Ena najpomembnejših molekulskih metod je verižna reakcija s polimerazo - PCR, ki je bila razvita leta 1980. Uporablja univerzalne ali za skupino fitoplazmem specifične začetnike, pripravljene na osnovi ohranjenih genskih zaporedij. Enostavna in učinkovita metoda za analizo velikega števila neznanih fitoplazem in tistih, ki pripadajo različnim podskupinam je ugnezdena PCR v kombinaciji z RFLP. Metoda uporablja restriksijske endonukleaze, ki režejo pomnoženo izhodiščno DNA na manjše fragmente. Neznane fitoplazme lahko določimo tako, da dobljene RFLP profile vsakega znanega vzorca primerjamo z neznanimi (Bianco in sod., 2004; Musetti, 2008). V zadnjem času je bilo razvitih veliko protokolov na osnovi novejše, hitrejše in bolj občutljive metode PCR v realnem času (Lopez in sod., 2009).

2.5.2.1 Izolacija DNA

Ne glede na uporabljeno detekcijsko metodo, je za njeno natančnost in zanesljivost ključna dobra in zadostna izolacija fitoplazemske DNA (Bianco in sod., 2004). V ta namen so raziskovalci že preizkusili več metod, kot je uporaba ultrazvoka, toplote in električnih naprav. Metode so različno učinkovite pri uporabi različnega rastlinskega materiala. Novost na tem področju predstavljajo posebne naprave za izolacijo DNA, ki temeljijo na različnih pristopih, kot je obsevanje rastlinskega materiala z laserjem ali kapilarna elektroforeza (Lopez in sod., 2009).

Natančnost molekulske analize za določanje patogenih mikroorganizmov v rastlinskem materialu zahteva učinkovite in ponovljive metode za izolacijo nukleinskih kislin. Te so se začele razvijati, ko je bila metoda PCR prvič uporabljena v rastlinski patologiji. Čeprav je veliko objavljenih metod, vse temeljijo na izolaciji prečiščene nukleinske kisline in odstranjevanju inhibitornih spojin, kot so polisaharidi, fenolne skupine ali huminske spojine iz rastlin. Danes se v ta namen uporabljajo različni tržno dostopni kompleti, ki so narejeni posebej za določeno vrsto rastlinskega materiala. Enostavni so za uporabo in ne vsebujejo toksičnih reagentov v celotnem procesu izolacije. Največ se uporabljajo

kompleti, kot so DNeasy and RNeasy Plant System, Ultra Clean Plant RNA/DNA kits in QuickPick™ Plant DNA kit (Lopez in sod., 2009).

Ena izmed prvih metod za izolacijo DNA je temeljila na uporabi pufru CTAB (Ahrens in Seemuller., 1992). Hren in sod., (2007) opisujejo izolacijo DNA po tem postopku iz tkiva listnih žil.

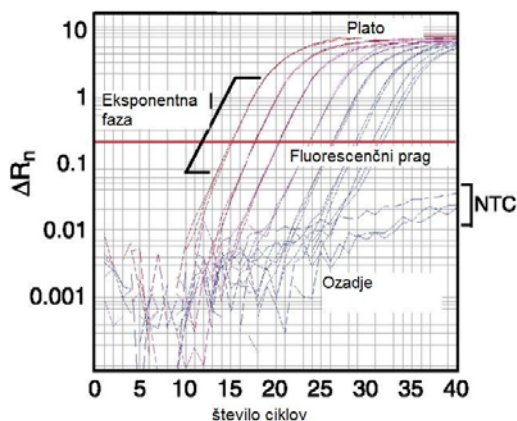
Boben in sod. (2007) navajajo, da se z optimizacijo razmer za ekstrakcijo DNA lahko diagnostika fitoplazem izboljša. Predlagajo uporabo avtomatiziranega postopka za izolacijo DNA, ki temelji na uporabi kompleta QuickPick™ Plant DNA in aparata KingFisher. Ta se v kombinaciji z metodo PCR v realnem času lahko uporablja za rutinsko odkrivanje fitoplazem sadnega drevja (REF).

Brune in sod. (2003) poročajo o uporabi kartic FTA™ za izolacijo DNA iz listov sladkornega trsa, okuženega s fitoplazmami SCYP. Uspešnost izolacije DNA s pomočjo kartic FTA™ in pufru CTAB so analizirali z metodo ugnezdene PCR. Na 1 % agaroznem gelu so v obeh primerih dobili primerljive pozitivne rezultate. Ti potrjujejo učinkovitost kartic FTA™, katerih uporaba bistveno zmanjšuje časovno izolacijo DNA iz vzorcev rastlinskega tkiva. Kartice FTA™ Elute so namenjene shranjevanju in izolaciji nukleinskih kislin iz bioloških vzorcev, katerih analiza poteka z metodo PCR v realnem času. Kartice so prekrte s posebnimi kemikalijami, ki ob stiku s celicami povzročijo njihovo lizo in denaturirajo beljakovine.

2.5.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času

PCR v realnem času temelji na metodi PCR. Metoda je občutljiva in natančna ter omogoča spremljanje produktov v času njihovega nastajanja z uporabo posebnih fluorescenčnih sond. Obstaja več vrst barvil, vendar se je dolgo let najpogosteje uporabljalo SYBR green. Ta fluorescira ob vezavi na novonastalo dvoverižno molekulo DNA; zaradi nespecifične vezave pa lahko nastajajo nespecifični produkti. Hidrolizirajoče TaqMan sonde so bolj specifične. Označene so s poročevalskim barvilom na 5'-koncu (npr. 6-carboxyfluorescein - FAM) in dušilnim barvilom na 3'-koncu (npr. tetramethyl-6-carboxy rhodamine - TAMRA). Kadar sta obe barvili v neposredni bližini na sondi, dušilec od poročevalca absorbira signal. To pomeni, da se sonda ni vezala na komplementarno zaporedje tarčne molekule DNA. Če se veže, jo med podaljševanjem verige polimeraza *Taq* cepi s 5'-3' endonukleazno aktivnostjo. Poročevalec in dušilec se ločita, kar omogoča sproščanje fluorescenčnega signala določene valovne dolžine. Rezultati se izpišejo v programu v obliki krivulj in vrednostih Cq (ang. Cycle of quantification). Vrednost Cq predstavlja cikel, kjer fluorescenca nastalega produkta preseže linijo fluorescenčnega praga (slika 4). Ta je obratno sorazmerna količini nukleinske kisline v izhodiščnem vzorcu. Večja kot je vrednost Cq, manjša je začetna količina tarčne molekule v izhodiščnem vzorcu in obratno. Relativna kvantifikacija nam omogoča primerjavo Cq vrednosti različnih tarčnih zaporedji v enem samem vzorcu. Metoda, ki se najpogosteje uporablja za relativno kvantifikacijo je

$2^{-\Delta\Delta Cq}$. Uporablja se takrat, ko je učinkovitost pomnoževanja tarčnega zaporedja povsod enaka, oziroma se pri vsakem PCR ciklu količina pomnoženega zaporedja podvoji (Mark in Repa, 2005; VanGuilder in sod., 2008).



Slika 4: Računalniški prikaz rezultatov metode PCR v realnem času v obliki krivulj in vrednosti Cq (Mark in Repa, 2005: 153)

Hren in sod. (2007) so razvili novo metodo PCR v realnem času za določanje fitoplazem. V vzorcih je možno določiti fitoplazme na splošno ter FD in BN tipa fitoplazme trsnih rumenic. Za določitev pozitivnih vzorcev, okuženih s FD fitoplazmami, so postavili zgornjo mejo povprečnih vrednosti Cq 37,3. Takšna metoda se je izkazala za občutno hitrejšo in bolj občutljivo od konvencionalne PCR v kombinaciji z ugnedeno PCR.

2.6 STABILNOST FITOPLAZEMSKÉ DNA

Različni raziskovalci se soočajo s težavami pri izolaciji fitoplazemske DNA, ki naj bi bile povezane z njeno nestabilnostjo ob daljšem shranjevanju ali postopkih zamrzovanja in ponovnega odmrzovanja (osebni razgovori). Kljub temu je objavljenih le nekaj poročil, kako ti postopki dejansko vplivajo na stabilnost fitoplazemske DNA (Margaria in sod., 2007).

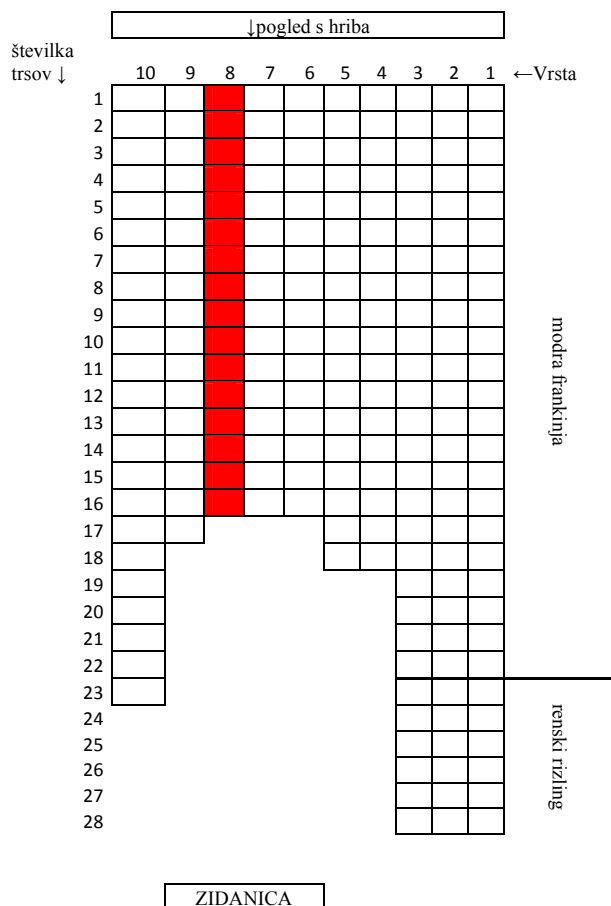
3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

3.1.1 Vzorci vinske trte iz vinograda, okuženega s fitoplazmo FD

Vzorci vinske trte (*Vitis vinifera* L. cv. Modra frankinja) smo nabrali v vinorodni deželi Posavje v vinogradu v Straži. V vinogradu je bila okužba s fitoplazmo FD potrjena v letu 2009, za raziskavo pa smo vzorčili v drugi polovici avgusta 2010. Nabrali smo enoletne poganjke skupaj z grozdnimi jagodami ločeno z in brez značilnih znamenj boleznj zlate trsne rumenice. Vzorčili smo poganjke iz debla trte in v mesecu oktobru tudi dvoletni les oziroma šparon. Vse vzorce smo prenesli v laboratorij v hladilnih torbah in jih do nadaljnje obdelave shranili v hladno sobo na $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V istem vinogradu so bile julija nabrane grozdne jagode simptomatičnega trsa 8/4.



Slika 5: Skica vinograda v Straži v katerem smo nabrali vzorce vinske trte. Z rdečo je označena vrsta, v kateri smo vzorčili.

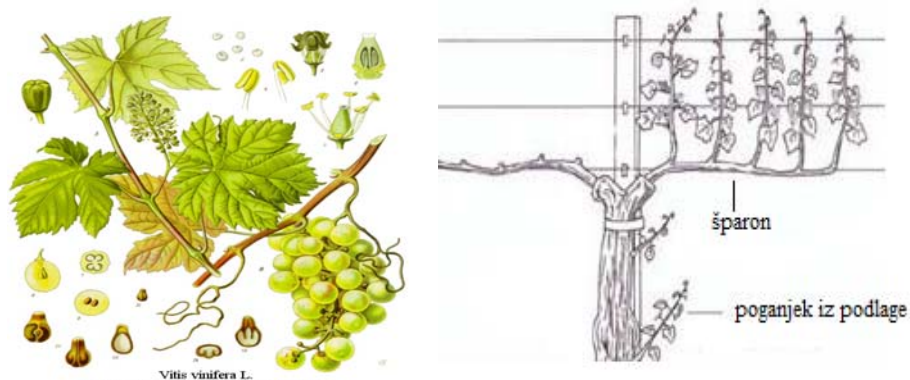
3.1.2 Vzorci grozdnih jagod neznanega izvora

Za poskus izolacije DNA iz grozdnih jagod, smo vzorce pripravili iz grozdja kupljenega v trgovini.

3.2 PRIPRAVA VZORCEV NA HOMOGENIZACIJO

Nabrane poganjke smo razdelili na posamezne dele in sicer na liste, grozodne jagode, internodij, vitice in ostanek cveta. Liste in grozodne jagode smo nato razdelili še na več podvzorcev. Iz listov smo s sterilnim skalpelom izrezali žile, lamino, listni pecelj in posebej del peclja z začetki listnih žil ter lamino. Z internodijev poganjka smo postrgali floem. Pripravili smo vzorec celih jagod, vzorec z iztisnjeno jagodno sredico in vzorec s preostalo jagodno kožico (slika 6a, b). Da bi se izognili kontaminacijam smo pri obdelavi vsakega tkiva redno razkuževali delovno površino s 70 % etanolom, menjavali rokavice in papirno delavno podlago ter za vsak vzorec uporabili svoj sterilni skalpel. Tako razdeljena tkiva smo prenesli v sterilne 15 mL-centrifugirke, jih hitro zamrznili v tekočem dušiku in spravili v zamrzovalnik pri $T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pri obdelavi dvoletnega lesa oziroma šparona smo najprej olupili zunanji del lubja ter s sterilnim skalpelom pazljivo postrgali sekundarni floem.



Slika 6a: Deli vinske trte, uporabljeni za vzorčenje (PFAF, 2010)



Slika 6b: Vzorčeno tkivo razdeljeno na posamezne dele (Foto: Nina Prezelj)

Preglednica 1: Oznake vzorcev vinske trte (*Vitis vinifera* L. cv. Modra frankinja)

	TKIVO	Oznaka
LIST	listne žile	A
	lamina	B
	listni pecelj	C
	kratek del peclja z listnimi žilami in lamino	AC
GROZDNE JAGODE	cele jagode	D
	jagodna kožica	E
	jagodna sredica	F
	grozdni pecelj	G
	jagodni pecelj	H
INTERNODIJ	floem	I
VITICE	vitice	J
LIST PODLAGE	listne žile	K
	listni pecelj	L
	kratek del peclja z listnimi žilami in lamino	KL
	brst	M
CVET	ostanek cveta	O
ŠPARON	sekundarni floem	P

3.2.1 Homogenizacija

Rastlinsko tkivo smo homogenizirali v terilnicah s tekočim dušikom. Tkivo smo trli do nastanka prahu. Med homogenizacijo smo ves čas skrbeli, da se rastlinsko tkivo ni odmrznilo in po potrebi dodajali tekoči dušik. Nato smo v predhodno ohlajene 2 mL-mikrocentrifugirke (SafeLock, Eppendorf) zatehtali približno 200 mg rastlinskega prahu in ga do nadaljnje uporabe shranili pri T=-80 °C. Za homogenizacijo naslednjega vzorca smo očistili delovno površino s 70 % etanolom, zamenjali rokavice in vzeli čiste terilnice.

3.3 IZOLACIJA DNA

3.3.1 Izolacija DNA z metodo KingFisher

Celokupno DNA smo izolirali iz približno 200 mg homogeniziranega rastlinskega tkiva vzorcev vinske trte s QuickPick™ Plant DNA kitom (BioNoble, Finska) in aparaturo KingFisher® ml (Thermo Scientific, ZDA), ki temelji na uporabi magnetnih delcev. Izolacijo DNA smo izvedli po naslednjem postopku:

1. 200 mg materiala dodamo 600 µl pufra za lizo (Plant DNA lysis buffer) in 25 µl proteinase K.
2. Vzorce vrtinčimo in nato inkubiramo na 65 °C 30 minut.
3. Med inkubacijo vstavimo v KingFisher® ml aparaturo tipse ter označimo in napolnimo luknjice stripov za KingFisher® ml:
 - v prvo damo 20 µl magnetnih delcev (Plant DNA MagaZorb™ magnetic particles) in 500 µl pufra za vezavo (Plant DNA binding buffer);
 - v drugo in tretjo luknjico stripa damo po 800 µl pufra za spiranje (Plant DNA Wash buffer);
 - v četrto damo 200 µl elucijskega pufra (Plant DNA elution buffer);
 - v peto 100 µl vode.
4. Po končani inkubaciji vzorce centrifugiramo pri sobni temperaturi: 1 min pri 6000 g.
5. 220 µl supernatanta dodamo v prvo luknjico stripa za KingFisher® ml.
6. Napolnjen strip vstavimo v KingFisher® ml aparaturo.
7. Program izolacije »QuickPick_Plant_DNA« poteka po sledečem protokolu:
 - 2-10 minutno mešanje v luknjici 1 (vezava na magnetne delce)
 - Prenos magnetnih delcev iz luknjice 1 v luknjico 2
 - 10-15 sekundno mešanje v luknjici 2 (izpiranje magnetnih delcev)
 - Prenos magnetnih delcev iz luknjice 2 v luknjico 3
 - 10-15 sekundno mešanje v luknjici 3 (dodatno izpiranje magnetnih delcev)
 - Prenos magnetnih delcev iz luknjice 3 v luknjico 4
 - 2-10 minutno mešanje v luknjici 4 (elucija iz magnetnih delcev)
 - Prenos magnetnih delcev iz luknjice 4 v luknjico 5

8. Po končani izolaciji prenesemo DNA (200 μ l) iz četrte luknjice stripa v 1,5 ml označeno epico. DNA do analize shranimo na -20 °C.

3.3.2 Izolacija DNA s karticami FTA™ Elute

Učinkovitost izolacije celokupne DNA z uporabo kartic FTA™ Elute (Whatman®) smo ugotavljali na vzorcih iz jagod (kupljene grozdne jagode ter vzorci jagod vinske trte 8/4 in 8/5). Vzorce jagod smo homogenizirali po istem postopku, kot je napisano pod metodo 3.2.1. Ekstrakte smo pripravili tako, da smo po 100 mg homogeniziranega zamrznjenega tkiva vsakega vzorca zmešali s:

- a) 300 μ L sterilne bdH₂O oziroma
- b) 300 μ L ELISA pufra (Preglednica 2).

Na kartice FTA™ Elute smo nanесли po 40 μ L ekstrakta, na eno izmed kartic pa smo iz vzorca kupljenih jagod direktno iztisnili jagodni sok. Nadaljnji postopek izolacije celokupne DNA smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca Whatman®.

Preglednica 2: Sestavine ELISA pufra

sestavine	koncentracija	količina
TRIS (Trisbase)	264 mM	16 g
TRIS-HCl	236 mM	18,6 g
NaCl	137 mM	4 g
PVP K 25	2%	10 g
Polietilengliol	2 mM	5 g
Tween 20	0,05%	0,25 g
+ dH ₂ O		0,5 L

3.3.3 Izolacija DNA z uporabo filtrov Pallflex

Iz ekstraktov omenjenih pod točko 3.3.2 smo ugotavljali učinkovitost izolacije celokupne DNA tudi z uporabo filtrov Pallflex (Pall Corporation). Filterski trak smo s sterilnim skalpelom narezali na manjše koščke in nanje nanесли po 40 μ L ekstrakta vsakega vzorca posebej. Prav tako smo na enega izmed koščkov filter papirja direktno iztisnili jagodni sok vzorca kupljenih jagod. Nadaljnji postopek izolacije smo izvedli enako kot pri uporabi kartic FTA™ Elute, s to razliko, da vzorcev nismo inkubirali v termobloku.

Iz vzorca kupljenih jagod smo iz 200 mg homogeniziranega zamrznjenega tkiva izolirali DNA tudi po postopku, ki je napisan pod metodo 3.3.1. Pri vsaki izolaciji DNA smo imeli tudi negativno kontrolo izolacije, ki je vsebovala samo uporabljene reagente. Učinkovitost izolacije smo primerjali z metodo PCR v realnem času. Ekstrakte jagodnih vzorcev 8/4 in 8/5 smo 10-krat redčili v bdH₂O in jih neposredno uporabili v reakciji PCR v realnem času.

3.4 METODA PCR V REALNEM ČASU

Za detekcijo in relativno kvantifikacijo FD fitoplazem v vzorcih vinske trte smo uporabili metodo PCR v realnem času. Za določanje prisotnosti fitoplazem FD smo pomnoževali tarčni gen Sec Y, ki kodira podenoto translokaznega proteina. Za kontrolo izolacije DNA iz rastlinskega materiala smo pomnoževali referenčni gen za evkarionsko 18S rRNA. Detekcija je temeljila na kemiji TaqMan, s sondami MGB. Uporabljeni začetni oligonuklotidi in sonde MGB so natančno opisani v Hren in sod. (2007). PCR reakcijo v realnem času smo izvedli v aparaturi LightCycle 480 (Roche).

3.4.1 Izvedba PCR v realnem času

Izolirano DNA vseh vzorcev smo redčili 5-, 10- in/ali 50-krat v bdH_2O . Pripravili smo 10 μL reakcije, sestavljene iz 8 μL reakcijske mešanice (preglednica 3) in 2 μL ustrezno redčene DNA. Z uporabo aparature MultiProbe® II PLUS EX (ParkinElmer) za avtomatsko pipetiranje smo v luknjice PCR ploščice nanесли po 8 μL reakcijske mešanice ter 2 μL vzorčne DNA v dveh paralelkah po dve redčini za vsak vzorec za vsak amplikon. Z obema amplikonoma smo testirali tudi naslednje kontrole:

- Negativno kontrolo izolacije (NKI) za preverjanje kontaminacije prostora in kemikalij uporabljenih za izolacijo DNA
- NTC (no template control) za preverjanje kontaminacije prostora in kemikalij uporabljenih za pripravo reakcijskih PCR mešanic
- Učinkovitost reakcije pomnoževanja obeh amplikonov smo ugotavljali s pozitivno kontrolo, ki je predstavljala umeritveno krivuljo vsake PCR ploščice. Pripravili smo jo iz serije redčin, predhodno določenega pozitivnega vzorca, med katerimi je bila 5-kratna razlika.

Preglednica 3: Sestava reakcijskih mešanic za posamezna amplikona

Reakcijska mešanica za FDgen (specifičnost: FD tip fitoplazem, Elm yellows group, 16SrV)	končne konc.	V za 1 reakc. (μL)
bd voda		0,2
2× TaqMan UMM (Fermentas)	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
Reakcijska mešanica za 18S rRNA, Applied Biosystems (specifičnost: evkarionska 18S rRNA)	končne konc.	V za 1 reakc. (μL)
bd voda		2,5
2× TaqMan UMM (Fermentas)	1 x	5,0
Primer/probe mix (20x)	1x	0,5
SKUPAJ		8,0

PCR reakcijo pomnoževanja smo izvedli po naslednjem programu:

- 2 min pri 50 °C
- 10 min pri 95 °C
- 45 ciklov: 15 s pri 95 °C, 1 min pri 60 °C

3.4.2 Obdelava podatkov

Po končanem programu smo dobljene podatke PCR analizirali s programom 480 Analysis Software (LightCycler). Program nam je izrisal grafikon na katerem so bili podatki prikazani v obliki krivulj in vrednosti C_q. Na osi x grafikona se izpiše število PCR ciklov, na osi y pa fluorescenca specifične valovne dolžine. Dobljene podatke smo prenesli v program Microsoft Excel, kjer smo izračunali povprečne vrednosti C_q ampliconov obeh paralelk. Ker smo za vsak vzorec imeli dve redčini, smo izračunali učinkovitost pomnoževanja. Učinkovitost reakcije pomnoževanja (E) smo izračunali po naslednji formuli:

$$E=5^{(1/\text{razlika med povprečnimi vrednostmi } C_q \text{ dveh redčin})} \quad \dots (1)$$

Rezultat smo upoštevali, če je bila učinkovitost pomnoževanja v območju od 1,7-2,2. Za relativno kvantifikacijo smo uporabili metodo $\Delta\Delta C_q$, kjer smo dobljene vrednosti C_q za amplicon SecY normalizirali na vrednost C_q referenčnega gena za 18S rRNA istega vzorca. Normalizacijo smo naredili tako, da smo od vrednosti C_q amplicona SecY odšteli vrednost C_q amplicona 18S rRNA.

3.5 PREVERJANJE OBSTOJNOSTI FITOPLAZEMSKE DNA

3.5.1 Učinek odtajanja in zamrzovanja na obstojnost izolirane DNA

Za preverjanje stabilnosti fitoplazemske DNA, shranjene pri -20 °C smo izbrali DNA izolirano iz tkiv lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev pozitivnih na FD, ki so imeli vrednosti C_q pod zgornjo mejo kvantifikacije (C_q<33). V poskus smo dodatno vključili tudi fitoplazemsko DNA iz jagod vzorca pozitivnega na FD, katerega vrednost C_q je bila na meji območja kvantifikacije. Izolirano DNA vsakega vzorca smo razdelili na več kontrolnih vzorcev po 10 μL in na testni vzorec 60 μL. Slednjega smo nato odmrznili in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi ter ponovno zamrznili pri T= -20 °C. Postopek smo ponovili 5-krat v okviru 1 tedna. Z metodo PCR v realnem času smo nato primerjali vrednosti C_q testnega odtajanega vzorca z vrednostmi C_q kontrolnega vzorca.

3.5.2 Obstojnost DNA v obliki rastlinskega tkiva shranjenega pri T = -80 °C

Za ugotavljanje obstojnosti fitoplazemske DNA v tkivu (neizolirana DNA) smo po dveh in štirih mesecih hranjenja tkiva pri T= -80 °C ponovili izolacijo DNA iz homogeniziranega rastlinskega tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev pozitivnih na FD. Za izolacijo smo uporabili postopek opisan pod metodo 3.2.1. V poskus smo dodatno vključili

tkivo jagod vzorca pozitivnega na FD, ki je bil vzorčen julija. Razlike v vrednostih Cq smo preverili z metodo PCR v realnem času.

3.6 DOLOČANJE SLADKORJEV

3.6.1 Ekstrakcija sladkorjev

Sladkorje smo izolirali iz približno 100 mg okuženega in neokuženega homogeniziranega tkiva lamine in jagodne sredice s pufrom metanol-kloroform-voda (5:2:1). Zatehtanemu tkivu lamine smo dodali 500 µL pufru, jagodni sredici pa 1000 µL pufru. Vzorce smo dobro premešali in postavili na led za 8 minut. Po inkubaciji smo jih kratko vrtinčili in centrifugirali 4 minute pri 14000 obratih pri T= 4 °C. Nato smo pazljivo prenesli supernatant v nove 1,5 mL-mikrocentrifugirke in dodali 0,5 mL bdH₂O. Ponovno smo vrtinčili in centrifugirali 2 minuti pri 14000 obratih pri T= 4 °C. Zgornjo polarno fazo smo prenesli v novo 1,5 mL-mikrocentrifugirko in jo zamrznili pri T= -20 °C do nadaljnje analize.

3.6.2 Spektrofotometrično merjenje absorbance

Za določanje koncentracije (mg/g sveže teže) izolirane saharoze, glukoze/- in fruktoze smo uporabili K-SURFG Kit (Megazyme). Sladkorje smo določali z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 340 nm z uporabo spektrofotometra UV 180 (Shimadzu). Postopek spektrofotometričnega določanja izoliranih sladkorjev iz ekstraktov je opisan v preglednici 4.

Preglednica 4: Spektrofotometrično merjenje absorbance za določanje koncentracije sladkorjev

sestavine	Saharoza		Glukoza/Fruktoza	
	Slepi vzorec	Vzorec	Slepi vzorec	Vzorec
	volumen v kivetih (µL)		volumen v kivetih (µL)	
β-fruktozidaza	100	100		
ekstrakt vzorca		x		x
premešamo in inkubiramo 5 min				
dH ₂ O	1000	1000-x	1100	1100-x
Imidazolni pufer	50	50	50	50
NADP+ ATP	50	50	50	50
premešamo				
odčitamo A1 absorbanco pri 340 nm po 3 minutah				
HK/G6P-DH	10	10	10	10
premešamo				
odčitamo A2 absorbanco pri 340 nm po 2 minutah				
PGI			10	10
premešamo				
odčitamo A3 absorbanco pri 340 nm po 10 minutah				

Pri določanju sladkorjev okuženih vzorcev lamine smo dodali po 10 μL ekstrakta, pri neokuženih pa 20 μL . Za okužene in neokužene vzorce jagodne sredice smo dodali 5 μL oz. 10 μL ekstrakta. Znotraj okuženih tkiv smo imeli 6 bioloških ponovitev, pri neokuženih pa 5. Vsak vzorec smo naredili v dveh tehničnih ponovitvah in dobljene rezultate obdelali v programu Microsoft Excel. Rezultata vzorca nismo upoštevali, kadar je bila sprememba absorbanca, pred in po dodatku encima manjša od vrednosti 0,05.

Koncentracijo sladkorjev (mg/g sveže teže tkiva) smo izračunali z naslednjimi formulami:

$$c(\text{g/L}) = V1 * \Delta A \text{ prostega sladkorja} * Mw / 6300 * 1 * V \quad \dots (2)$$

$$c = c(\text{g/L}) * V \text{ dodanega pufra} / \text{mg zatehtanega tkiva} * 1000 \quad \dots (3)$$

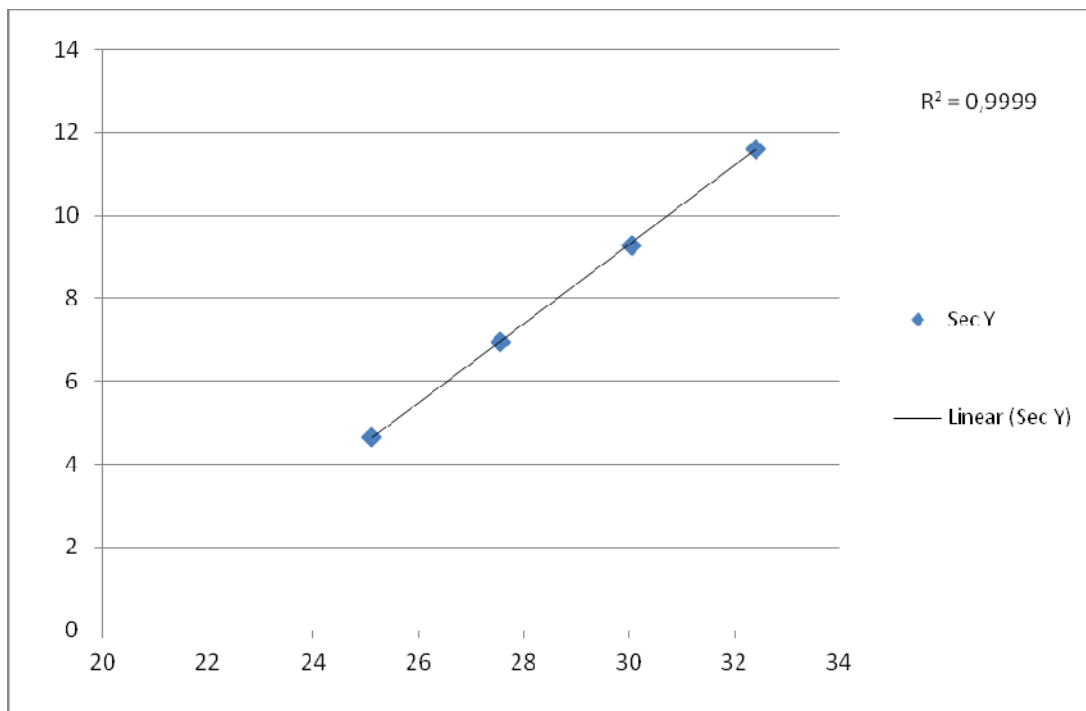
Pri tem je $V1$ končni volumen, ΔA je razlika v absorbancah dodanega vzorca in slepega vzorca, Mw molska masa sladkorjev in $V2$ volumen dodanega vzorca.

4 REZULTATI

4.1. KONCENTRACIJA DNA

4.1.1 Umeritvena krivulja za analizo vrednosti Cq

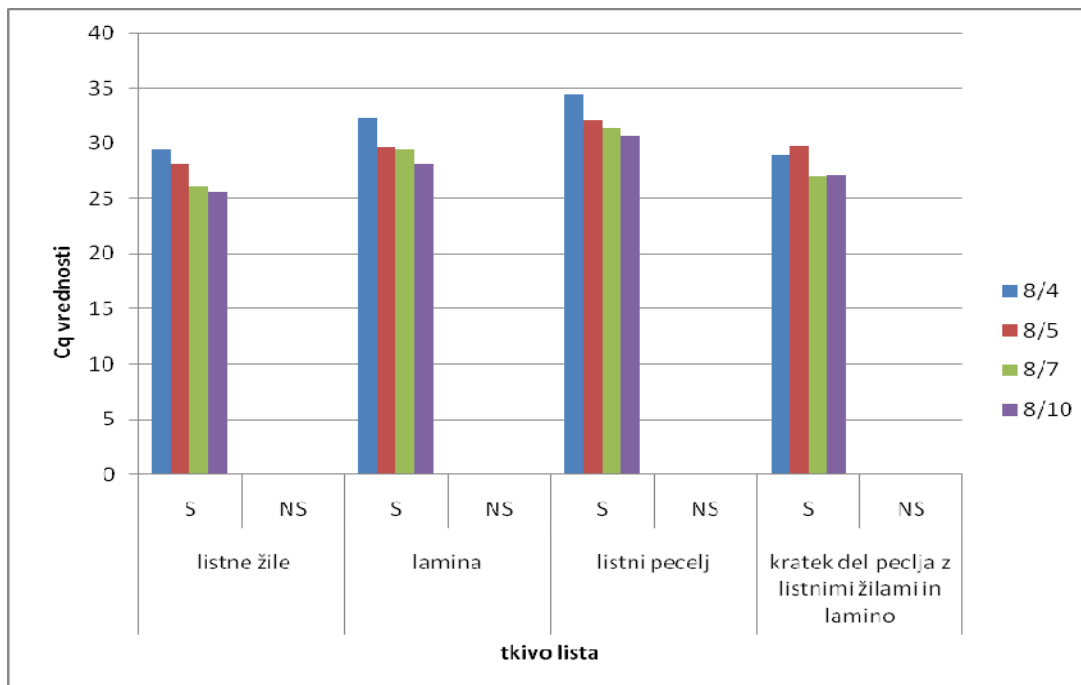
Umeritveno krivuljo za analizo vrednosti Cq dobljenih z metodo PCR v realnem času smo pripravili iz redčitvene vrste vzorca pozitivnega na fitoplazmo FD. Iz krivulje smo določili zgornjo mejo kvantifikacije, ki je bila 33 Cq (slika 7).



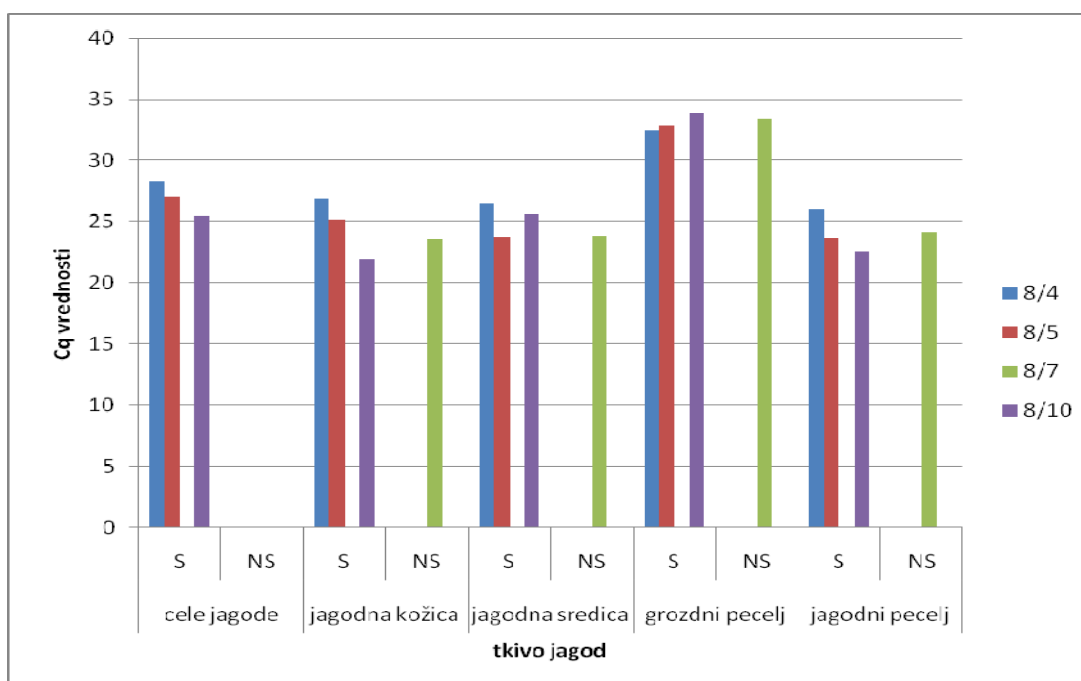
Slika 7: Umeritvena krivulja za ampikon Sec Y narejena z metodo PCR v realnem času za vzorec vinske trte pozitiven na fitoplazmo FD.

4.1.2 Razporeditev fitoplazem FD v posameznih delih tkiv

Pri vseh vzorcih smo določili fitoplazmo FD le v simptomatičnem tkivu posameznih delov lista (slika 8), medtem ko, za tkivo grozdnih jagod tudi v nesimptomatičnem tkivu vzorca 8/7 (slika 9).



Slika 8: Ocena razporeditve in koncentracije fitoplazem FD v posameznih delih simptomatičnega (S) in nesimptomatičnega (NS) tkiva lista glede na pomnoževanje amplikona SecY.



Slika 9: Ocena razporeditve in koncentracije fitoplazem FD v posameznih delih simptomatičnega (S) in nesimptomatičnega (NS) tkiva grozdnih jagod glede na pomnoževanje amplikona SecY.

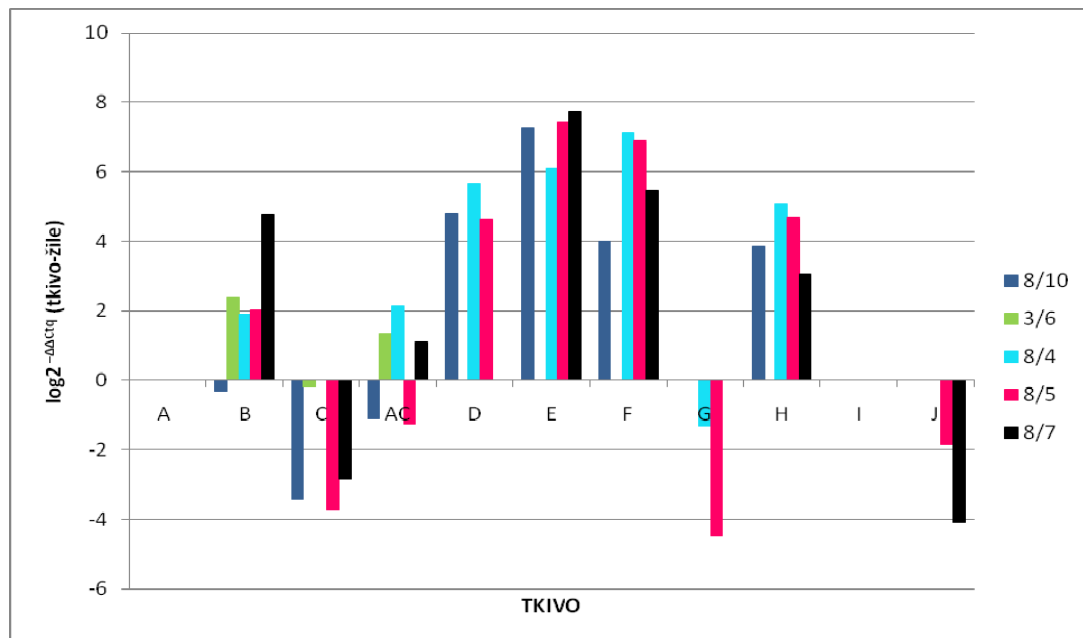
4.1.3 Določitev tkiva z najvišjo koncentracijo fitoplazem FD

Za določitev tkiva z najvišjo koncentracijo fitoplazem FD smo izvedli relativno kvantifikacijo, kjer smo normalizirane vrednosti C_q različnih tkiv primerjali z vrednostmi C_q v listnih žilah. Slednje smo izbrali kot kontrolno tkivo, ker obstoječe diagnostične metode za določanje fitoplazem v vzorcih vinske trte temeljijo na tem tkivu. Pri poskusu smo upoštevali le rezultate pozitivnih vzorcev katerih povprečna vrednost C_q ni presegala zgornje meje kvantifikacije določene z umeritveno krivuljo.

Pri učinkovitosti pomnoževanja amplikona SecY smo določili območje od 1,7 do 2,2 in upoštevali vzorce, ki so bili znotraj tega območja oz. povprečno vrednost C_q manjše redčitve, če so bili izven območja. V primeru inhibicije smo upoštevali vrednosti C_q, dobljene pri večjih redčitvah. Dobljene vrednosti smo zaradi velikih razlik med posameznimi tkivi logaritmirali.

Najvišja koncentracija fitoplazem FD je bila v tkivu jagod v vseh testiranih okuženih rastlinah (slika 10). Največ fitoplazem FD je bilo v jagodni kožici (slika 10), primerljivo ali le nekoliko manj pa v jagodni sredici (slika 10). Koncentracija fitoplazem je bila zelo visoka tudi v vzorcih jagodnega peclja (slika 10), a v primerjavi z listnimi žilami nižja kot v grozdnem peclju (slika 10). V posameznih tkivih jagod je bila koncentracija fitoplazemske DNA tudi do 200-krat višja kot v listnih žilah.

Povprečno višjo koncentracijo fitoplazem kot v izoliranih žilah smo določili tudi v lamini (slika 10). Koncentracija pa je bila nižja kot v žilah v listnem peclju in viticah.



Slika 10: Relativna koncentracija fitoplazem FD v posameznih tkivih glede na simptomatične listne žile. Povprečne vrednosti Cq amplikona SecY različnih tkiv so normalizirane na povprečno vrednost Cq amplikona 18S rRNA. Razlika v koncentraciji fitoplazem FD med posameznimi tkivi in listnimi žilami vzorcev je označena kot $\log_2^{-\Delta\Delta Cq}$. Dobljene vrednosti so logaritmirane. Oznake posameznih tkiv: A-listne žile; B- lamina; C-listni pecelj; AC- kratek del pecelja z listnimi žilami in lamino; D-cele jagode; E-jagodna kožica; F-jagodna sredica; G-grozni pecelj; H-jagodni pecelj; I-sekundarni floem; J-vitice

4.1.4 Nove metode za izolacijo DNA

Preverili smo, kakšna je učinkovitost izolacije celokupne DNA iz rastlinskega tkiva jagod pozitivnih vzorcev z uporabo kartic FTA™ Elute in filtrov Pallflex glede na izolacijo z aparaturom KingFisher® ml (slika 11). Za testiranja smo izbrali jagodno tkivo, v katerem smo določili najvišjo koncentracijo fitoplazem FD (slika 10). Za primerjavo smo uporabili metodo PCR v realnem času, kjer smo primerjali vrednosti Cq, dobljene po različnih načinih izolacije vzorcev. Višje vrednosti Cq pomenijo manj izhodiščne oziroma izolirane DNA. Za vsak vzorec smo vrednosti Cq posamezne izolacije odšteli vrednost Cq, ki smo jo dobili po izolaciji z aparaturom King Fisher. Večja kot je razlika med vrednostmi Cq, manj DNA smo izolirali iz ekstraktov s karticami FTA™ Elute in filtri Pallflex glede na ekstrakcijo z aparaturom KingFisher® ml.

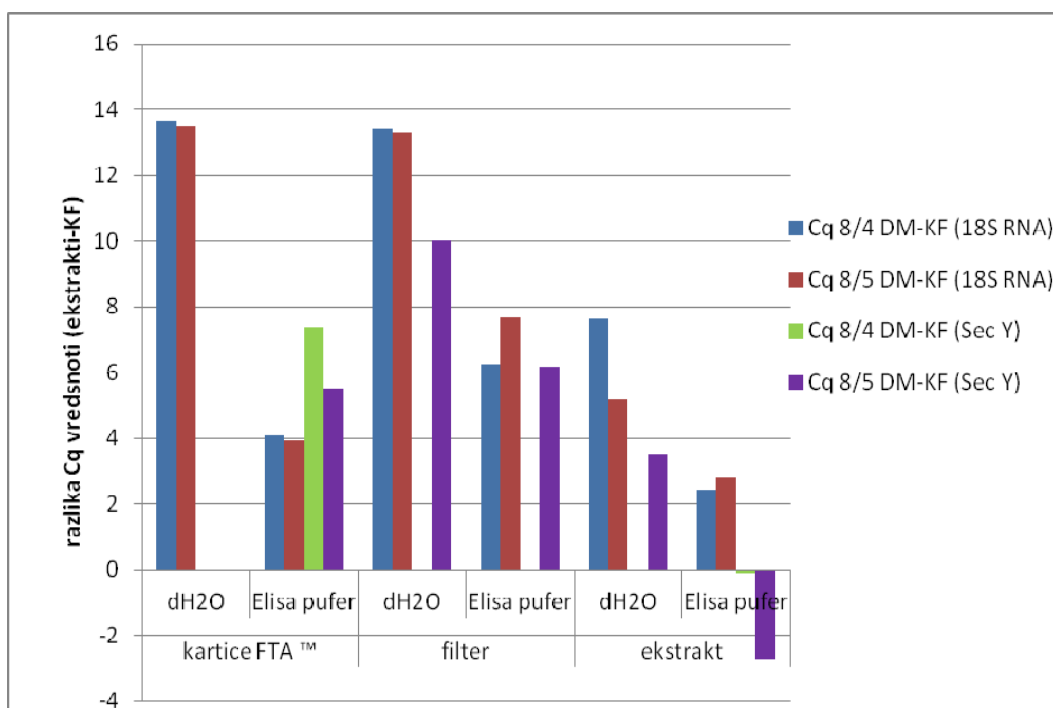
Pri izolirani celokupni DNA smo zaznali pomnoževanje amplikona 18S rRNA (slika 11) pri obeh pozitivnih vzorcih. Dobljene vrednosti Cq so bile višje v primerjavi z izolacijo z aparaturom KingFisher® ml.

Glede na slabo ali nedoločljivo pomnoževanje amplikona SecY smo sklepali, da smo iz vodnega ekstrakta izolirali manj ali nedoločljive količine fitoplazemske DNA s filtri

Pallflex in s karticami FTA™ Elute (slika 11). Fitoplazemsko DNA smo uspeli pomnožiti le po eni ekstrakciji z uporabo filtra Pallflex.

Pri uporabi pufru ELISA za izolacijo fitoplazemske DNA s kartico FTA™ Elute in filtrom Pallflex smo dobili višje vrednosti Cq v primerjavi z izolacijo z aparaturom KingFisher® ml. Rezultati tako kažejo, da je učinkovitost izolacije DNA s filtri Pallflex in s karticami FTA™ Elute slabša od metode KingFisher.

Da bi se izognili enemu koraku izolacije DNA smo 10-krat redčen ekstrakt v pufru ELISA neposredno dodali v reakcijsko mešanico za PCR v realnem času. Dobljene vrednosti Cq so bile nižje v primerjavi z 10-krat redčeno DNA izolirano z aparaturom KingFisher® ml. Dobljena razlika med vrednostmi Cq je bila negativna. To pomeni, da je bilo v ekstraktu ELISA več izhodiščne DNA kot v ekstraktu, pridobljenem z aparaturom KingFisher® ml (slika 11).

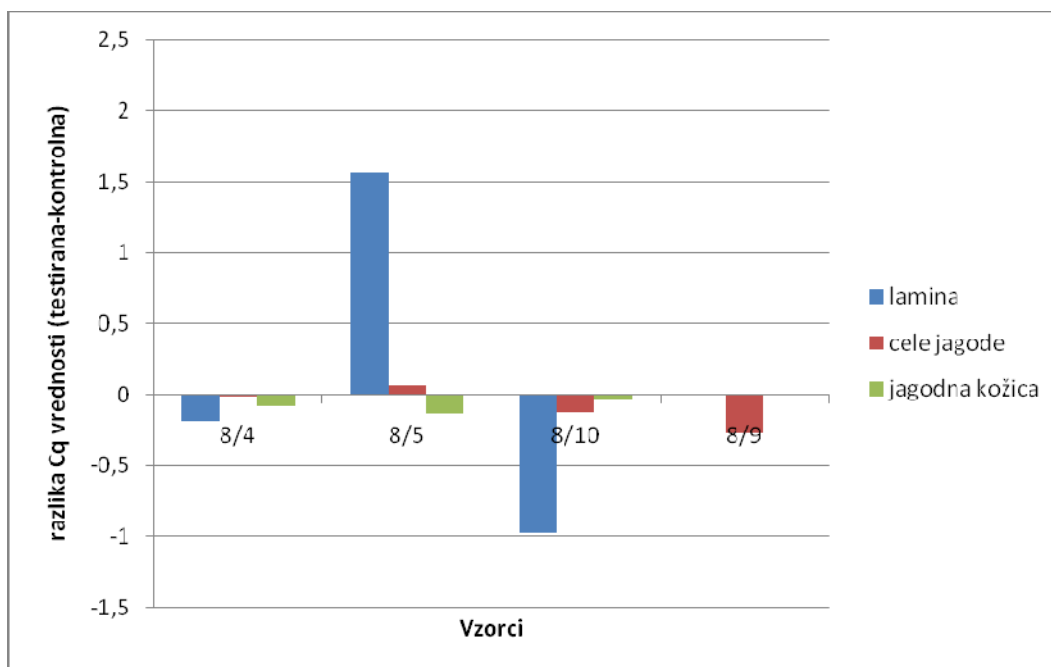


Slika 11: Ocena količine DNA, izolirane iz pozitivnih vzorcev vinske trte z uporabo kartic FTA™ Elute (DM) in filtrov Pallflex (DM) glede na aparaturom KingFisher® ml (KF), s primerjavo razlik v pomnoževanju ampliconov 18S rRNA ali SecY z metodo PCR v realnem času. Oznake: kartice FTA™-izolacija DNA iz vodnega in ELISA ekstrakta s karticami FTA™ Elute; filter-izolacija DNA iz vodnega in ELISA ekstrakta s filterskim papirjem; ekstrakt-vodni in ELISA ekstrakt jagodnih vzorcev redčen 10-krat v bdH₂O in neposredno uporabljen v reakciji PCR v realnem času.

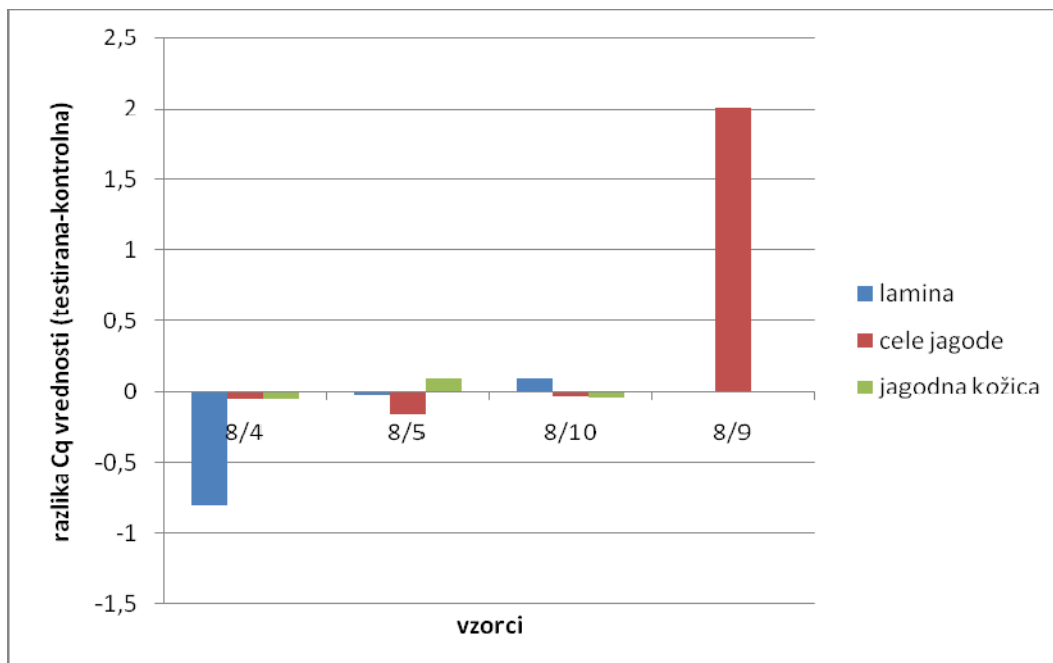
4.1.5 Preverjanje obstojnosti fitoplazemske DNA

4.1.5.1 Učinek odmrzovanja in zamrzovanja izolirane DNA

Za preverjanje obstojnosti fitoplazemske DNA smo uporabili metodo PCR v realnem času, kjer smo primerjali vrednosti Cq 5-krat odtajane in ponovno zamrznjene celokupne DNA (testni vzorec) s tisto, ki je bila ves čas bila zamrznjena pri $T = -20\text{ °C}$ (kontrolni vzorec). Ugotovili smo, da nekajkratno odtajanje in zamrzovanje ne vplivata bistveno na obstojnost izolirane DNA (sliki 12 in 13). Če je vrednost Cq testirane DNA večja od vrednosti Cq kontrolnega vzorca, pomeni več DNA pri kontroli. V tem primeru razliko med njima opazimo na grafikonu kot pozitivno in obratno. Največjo razliko med vrednostjo Cq testirane DNA in kontrolne DNA pri pomnoževanju amplikona 18S rRNA smo opazili pri vzorcu 8/5 za tkivo lamine in je znašala 1,5 Cq (slika 12), pri pomnoževanju amplikona SecY pa pri mejnem vzorcu 8/9 ($Cq > 33$) in je znašala 2 Cq (slika 13). Pri ostalih vzorcih je bila razlika zanemarljiva.



Slika 12: Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po petkratnem odtajevanju in ponovnem zamrzovanju (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplikona 18 S rRNA).

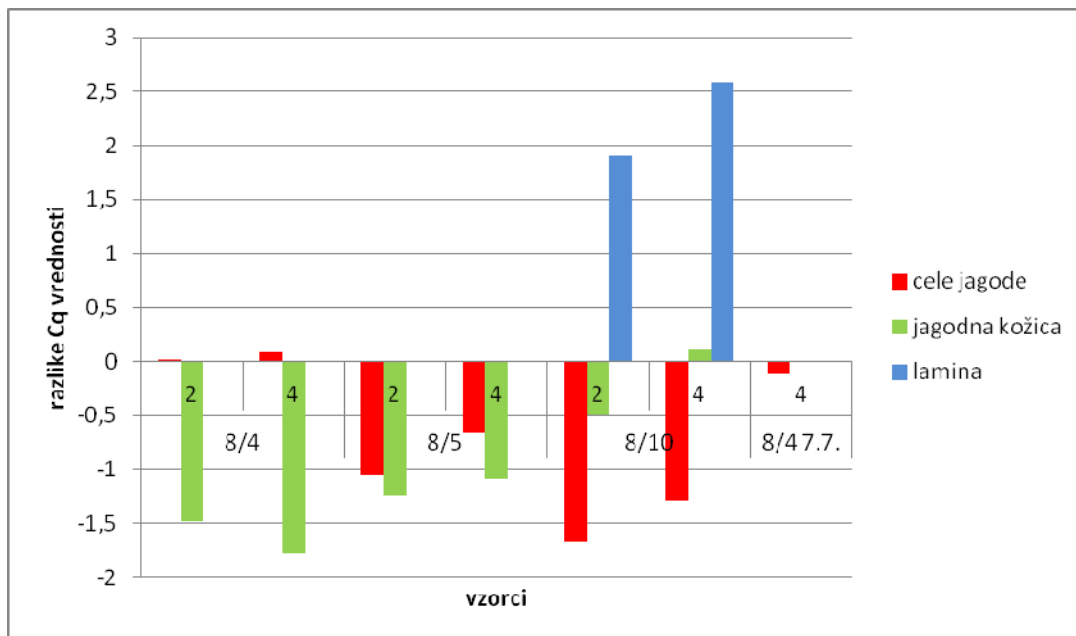


Slika 13: Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po petkratnem odtajevanju in ponovnem zamrzovanju (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplikona SecY).

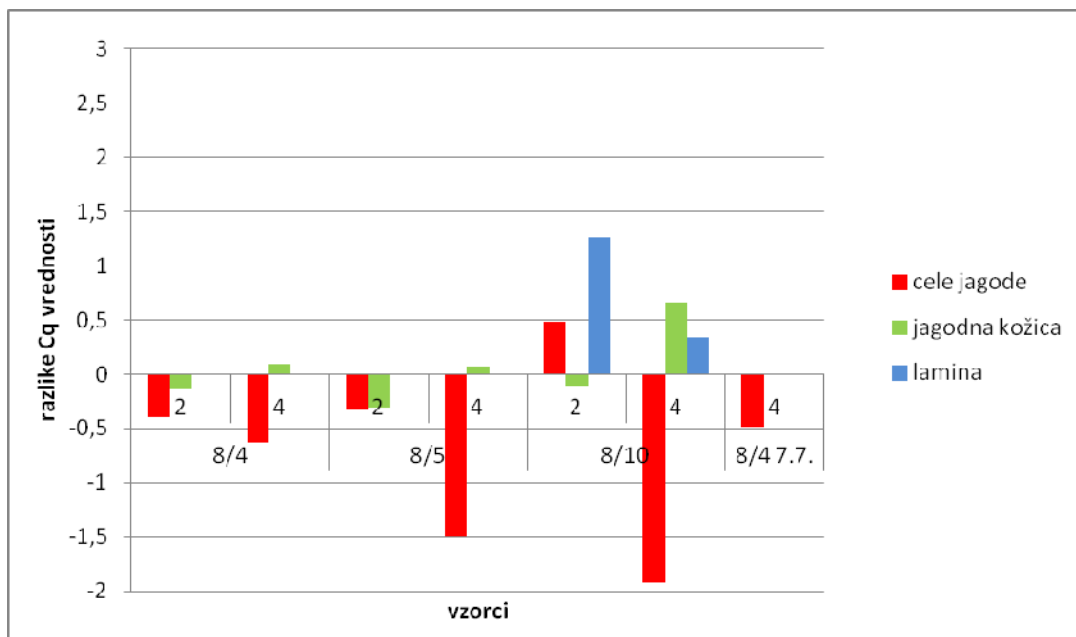
4.1.6 Obstojnost fitoplazemske DNA v obliki homogeniziranega rastlinskega tkiva, shranjenega pri $T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Preverili smo, ali fitoplazemska DNA, zamrznjena pri $T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v obliki homogeniziranega rastlinskega tkiva, s časom propada. Če se količina fitoplazemske DNA zmanjša po drugi (po dveh mesecih) oziroma tretji ekstrakciji (po štirih mesecih) glede na prvo, jo opazimo kot pozitivno vrednost na grafikonu in obratno.

Pri testiranih vzorcih smo po dveh in štirih mesecih ponovili izolacijo DNA in s PCR v realnem času preverili njeno količino s pomnoževanjem amplikona 18S rRNA (slika 14) in amplikona SecY (slika 15). Pri pomnoževanju amplikona 18S rRNA po izolaciji DNA iz lamine smo po dveh mesecih dobili za 2 nižje vrednosti Cq in za 2,6 Cq po štirih mesecih (slika 14). Razlika 2 Cq pomeni 4-krat slabšo izolacijo. Pri ostalih vzorcih je bila izolacija nekoliko boljša oziroma enaka kot na začetku poskusa. Največjo razliko v količini fitoplazemske DNA smo opazili po drugi ekstrakciji za tkivo lamine in je znašala 1,3 Cq (slika 15). Pri ostalih vzorcih sprememb v količini fitoplazemske DNA nismo opazili.



Slika 14: Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po dveh (2) in štirih (4) mesecih (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplicona 18S rRNA). Vzorci vzorčeni avgusta: 8/4; 8/5; 8/10. Vzorec vzorčen julija: 8/4 7.7.

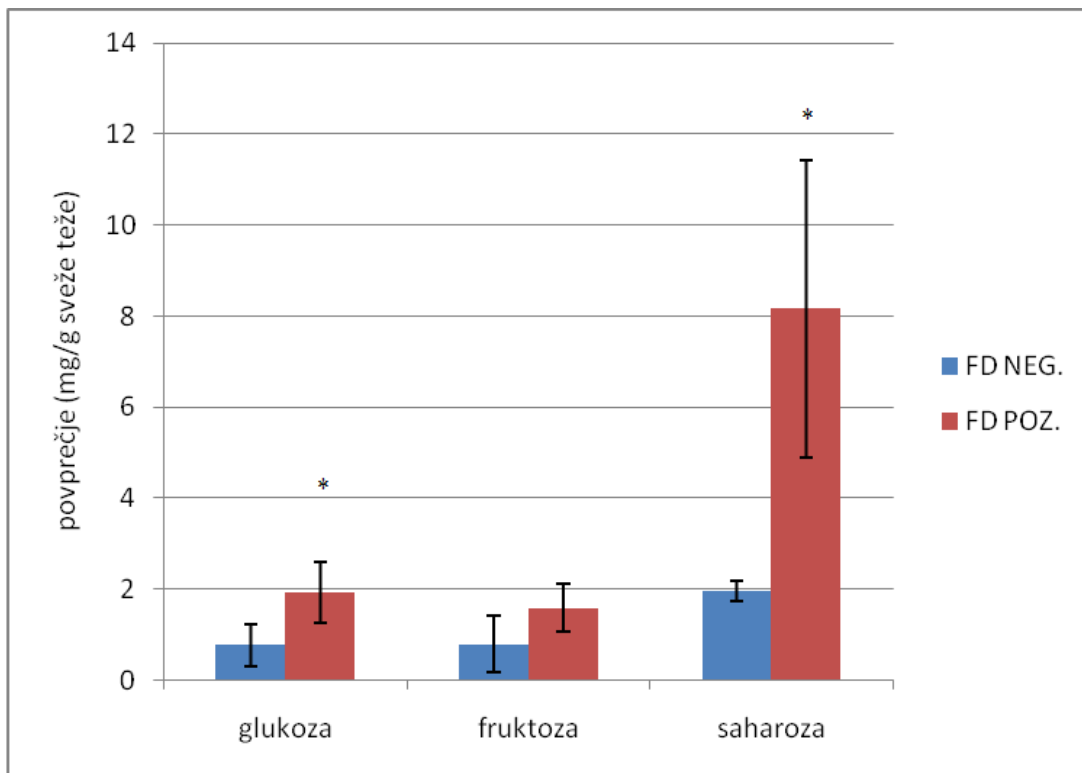


Slika 15: Razlike v vrednostih Cq med testirano in kontrolno DNA, izolirano iz tkiva lamine, celih jagod in jagodne kožice vzorcev vinske trte pozitivnih na fitoplazmo FD po dveh (2) in štirih (4) mesecih (primerjava razlik je glede na pomnoževanje amplicona SecY). Vzorci vzorčeni avgusta: 8/4; 8/5; 8/10. Vzorec vzorčen julija: 8/4 7.7.

4.2 KOLIČINA SLADKORJEV V OKUŽENIH IN NEOKUŽENIH TKIVIH

Preverili smo, če se količina sladkorjev (mg/g sveže teže) razlikuje v okuženih in neokuženih tkivih lamine (slika 16, preglednica 6) in jagodne sredice (preglednica 5).

Ugotovili smo, da okuženo tkivo lamine vsebuje večjo količino saharoze glede na neokuženo.



Slika 16: Povprečne koncentracije sladkorjev (\pm SD) v okuženih tkivih (FD POZ.) lamine glede na neokuženo (FD NEG.)

* Prikazuje statistično značilno razliko med negativnimi in pozitivnimi vzorci (t-test, $p < 0,05$).

V jagodni sredici so bile izmerjene koncentracije saharoze paralelk istega vzorca preveč različne (preglednica 5), da bi na njihovi osnovi lahko sklepali o razlikah med zdravimi in okuženimi rastlinami.

Preglednica 5: Koncentracija izolirane saharoze, glukoze/- in fruktoze (mg/g sveže teže) v vzorcih jagodne sredice (oznaka F), ki so bili pozitivni ali negativni na fitoplazmo FD.

	Vzorci	glukoza (mg/gFw)	Povprečje	Standardni odklon	fruktoza (mg/gFw)	Povprečje	Standardni odklon	saharoza (mg/gFw)	Povprečje	Standardni odklon
FD negativni	8/6 F	21,684	23,167	1,730	17,851	19,145	1,653	13,039	/	/
		25,068			21,007			/		
		22,750			18,578			/		
	8/8 F	29,446	28,096	0,906	24,991	24,065	0,625	4,092	/	/
		27,505			23,638			0,134		
		27,752			23,887			/		
		27,681			23,745			/		
	8/9 F	27,748	31,595	3,645	25,629	29,133	3,416	27,182	/	/
		34,998			32,452			5,684		
		32,040			29,319			/		
	8/13 F	25,816	26,098	3,107	22,025	22,197	2,476	15,778	/	/
		23,142			19,812			12,545		
29,336		24,755			/					
FD pozitivni	8/4 F	26,574	25,490	1,027	22,084	21,084	0,866	8,349	/	/
		25,363			20,584			14,069		
		24,532			20,584			5,654		
	8/5 F	20,294	19,744	2,695	17,326	16,912	2,180	16,546	/	/
		16,817			14,555			7,069		
		22,122			18,855			/		
	8/7 F	18,572	22,716	4,116	15,806	19,221	3,449	15,295	/	/
		26,803			22,704			3,085		
		22,773			19,152			/		
	8/10 F	13,720	14,271	1,198	10,861	11,335	1,013	14,178	/	/
		13,448			10,646			4,202		
		15,646			12,499			/		
	3/5 F	23,422	20,802	3,706	20,396	18,269	3,007	9,861	9,772	0,127
		18,181			16,143			9,682		
	3/6 F	25,704	23,303	3,395	19,936	18,245	2,391	4,508	5,239	1,034
		20,902			16,554			5,971		

Preglednica 6: Koncentracija izolirane saharoze, glukoze/- in fruktoze (mg/g sveže teže) v vzorcih lamine (oznaka B), ki so bili pozitivni ali negativni na fitoplazmo FD.

	Vzorci	glukoza (mg/gFw)	Povprečje	Standardni odklon	fruktoza (mg/gFw)	Povprečje	Standardni odklon	saharaza (mg/gFw)	Povprečje	Standardni odklon
FD negativni	8/2 B	/	0,465	0,310	/	0,450	0,280	/	1,591	0,577
		0,465			0,450			1,591		
	8/6 B	1,222	1,440	0,309	1,477	1,723	0,348	2,307	2,178	0,181
		1,659			1,969			2,050		
	8/8 B	/	0,519	0,232	/	0,375	0,227	/	1,907	0,287
		0,519			0,375			1,907		
	8/13 B	/	0,619	0,383	/	0,608	0,391	/	1,312	0,619
		0,619			0,608			1,312		
FD pozitivni	8/4 B	1,984	2,025	0,057	1,488	1,536	0,068	7,767	8,630	1,220
		2,065			1,584			9,492		
	8/5 B	2,307	3,129	1,163	1,834	2,615	1,105	7,895	7,096	1,129
		3,952			3,397			6,297		
	8/7 B	0,841	1,300	0,649	/	1,366	0,597	5,100	3,714	1,960
		1,759			1,366			2,328		
	8/10 B	1,748	1,782	0,049	1,480	1,551	0,100	13,879	13,813	0,094
		1,817			1,621			13,746		
	3/5 B	1,866	1,980	0,161	1,266	1,287	0,030	7,702	7,681	0,031
		2,093			1,308			7,659		
	3/6 B	1,159	1,333	0,245	/	1,147	0,226	8,946	7,973	1,376
		1,506			1,147			7,000		

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Optimalno tkivo za diagnostiko fitoplazem FD

V obstoječih diagnostičnih postopkih določanja fitoplazem v simptomatičnih tkivih fitoplazemsko DNA določamo v listnih žilah. Terlizzi in Credi (2007) navajata pozitivne rezultate okužbe s fitoplazami BN pri testiranju floema močno prizadetih poganjkov. Zanimivo je, da fitoplazme niso nikoli bile določene v tkivih stebela. V zimskem obdobju jih je možno dokazati v pozitivnih tkivih korenin in rozg, vendar je njihov delež zelo nizek. Glede na poročila, da so fitoplazme v vinski trti razporejene neenakomerno (Constable in sod., 2003), smo želeli ugotoviti, v katerem tkivu vinske trte je koncentracija fitoplazme FD najvišja. Za analizo ekstraktov izoliranih iz različnih tkiv vinske trte smo uporabili metodo PCR v realnem času po postopku, ki so ga razvili Hren in sod. (2007). V tkivih listov in jagod s tipičnimi bolezenskimi znamenji zlate trsne rumenice smo detektirali fitoplazemsko DNA (sliki 8 in 9). Z našo analizo smo potrdili, da se v posameznih delih istega okuženega tkiva koncentracija fitoplazem FD razlikuje. Do sedaj je veljalo, da je največja koncentracija fitoplazem FD v osrednjih rebrih, tako da so ta uporabljena v diagnostičnih postopkih.

V nalogi smo pokazali, da je najvišja koncentracija fitoplazem FD v tkivih jagod (slika 10). Čeprav so bile brez bolezenskih znamenj zlate trsne rumenice, smo fitoplazmo FD določili tudi v jagodah vzorca 8/7 (slika 9). Primerjava relativne koncentracije fitoplazemske DNA v jagodnem tkivu in osrednjih rebrih je pokazala, da je v jagodah do 200-krat več fitoplazem (slika 10). S tem smo potrdili zastavljeno hipotezo, da je ob koncu rastne sezone največja koncentracija fitoplazem v tkivih z največjo vsebnostjo sladkorjev. Odkritje je zanimivo in prvič pokazano v tej diplomski nalogi. Za razliko fitoplazem nismo določili v sekundarnem floemu (slika 10), listu podlage in šparonu okuženih rastlin ali pa so bili rezultati nad zgornjo mejo kvantifikacije pozitivnih vzorcev ($>37,3$ Cq). S tem smo potrdili, da v vinski trti, s tipičnimi znamenji okužbe, fitoplazme niso prisotne v določljivi koncentraciji v vseh tkivih.

5.1.2 Uspešnost kartic FTA™ Elute in filtrov Pallflex za izolacijo DNA

V nalogi smo preverili ali lahko za ekstrakcijo DNA uporabimo pufer ELISA, ki je cenejši od pufrov, ki jih potrebujemo za izolacijo DNA z aparaturom KingFisher® mL in bi bila izolacija z njegovo uporabo tudi časovno manj zamudna. Primerjavo ekstrakcijskih pufrov smo izvedli sočasno s preverjanjem uspešnosti izolacije DNA z uporabo kartic FTA™ Elute in filtrov Pallflex. Kartice FTA™ Elute so že uporabili za izolacijo DNA iz listov sladkornega trsa, okuženega s fitoplazmami SCYP (Brune in sod., 2003). Mi smo preverili njihovo učinkovitost za izolacijo celokupne in fitoplazemske DNA iz rastlinskega tkiva grozdnih jagod. Analiza ekstraktov z metodo PCR v realnem času je pokazala, da je

izolacija DNA boljša kot s karticami FTA™ Elute ali filtri Pallflex z uporabo kompleta QuickPick™ Plant DNA kita z aparaturo KingFisher® mL (Boben in sod., 2007) (slika 11). Iz slike 11 je razvidno, da so dobljene vrednosti Cq pri vodnih ekstraktih in ekstraktih ELISA bistveno višje oz. nedoločljive, če za izolacijo fitoplazemske DNA uporabimo kartice FTA™ Elute in filtre Pallflex namesto aparature KingFisher® mL (slika 11). Kljub temu, da je bila ekstrakcija s karticami in filtri slabša, pa je bila izolacija fitoplazemske DNA iz ekstraktov ELISA boljša kot iz vodnih ekstraktov (slika 11).

Pomembna ugotovitev teh poskusov je, da 10-krat redčeni ekstrakt ELISA, ki ga neposredno uporabimo v reakcijski mešanici za PCR v realnem času, vsebuje več fitoplazemske DNA od 10-krat redčenih ekstraktov dobljenih z aparaturo KingFisher® mL (slika 11).

5.1.3 Obstočnost fitoplazemske DNA

Kljub težavam z obstojnostjo fitoplazemske DNA, s katerimi se srečujejo nekateri raziskovalci pri njeni izolaciji (osebni razgovori), je bila po naših podatkih izvedena le ena sistematična analiza vpliva daljšega shranjevanja ali zamrzovanja in odmrzovanja na stabilnost DNA fitoplazme FD (Margaria in sod. 2007). V svoji raziskavi so preverili obstojnost fitoplazemske rRNA z metodo RT-PCR za ekstrakte pridobljene iz listnih vzorcev vinske trte ali madagaskarskega zimzelena okuženih s fitoplazmo FD, ki so jih različno dolgo hranili pri T= -20 °C in T= -80 °C. Pri ponovnem testiranju zamrznjenih celih listov in ekstraktov so fitoplazmo FD določili v vseh vzorcih. V naši raziskavi smo z metodo PCR v realnem času zaznali pomnoževanje amplicona 18S rRNA in amplicona SecY v vseh vzorcih, ki smo jih večkrat odtalili in ponovno zamrznili (sliki 12 in 13). Edina razlika, ki smo jo opazili je bila pri vzorcu, pri katerem je bila vrednost Cq večja od 33 in je bila tako koncentracija fitoplazme FD v vzorcu zelo nizka. Ugotovitev je v skladu z rezultati raziskave Margaria in sod. (2007), ki predvidevajo, da so njihovi pozitivni rezultati povezani z zelo visoko koncentracijo fitoplazem FD v madagaskarskem zimzelenu v primerjavi z vinsko trto.

Z ugotovitvami Margaria in sod. (2007) se skladajo tudi rezultati raziskave vpliva hranjenja ekstraktov pri T= -80 °C (sliki 14 in 15). Kljub manjšim odstopanjem v obeh smereh, so bili rezultati analize po štirih mesecih hranjenja primerljivi s tistimi z začetka poskusa.

5.1.4 Sladkorji v lamini

Hipoteza naše naloge je bila, da je količina sladkorjev v s FD okuženih listih vinske trte večja kot v neokuženih. Hipotezo smo postavili na osnovi objavljenih poročil, da okužba s fitoplazmo grmičaste pritlikavosti koruze, LY in '*Ca. P. australinese*' povzroči kopičenje sladkorjev v tkivih okuženih listov (Lepka in sod., 1999; Choi in sod., 2004; Guthrie in sod., 2001; Maust in sod., 2003; Junqueira in sod., 2004). Zastavljeno hipotezo smo

potrdili, saj smo po pričakovanjih dobili večje povprečne koncentracije sladkorjev v okuženih listih v primerjavi z neokuženimi (slika 16).

Glede na dobljene rezultate o največji koncentraciji fitoplazem FD v grozdnih jagodah, ki v času dozorevanja predstavljajo velik ponor sladkorjev, smo želeli preveriti, ali se koncentracija sladkorjev v okuženih jagodah razlikuje od koncentracije v neokuženih. Za izolacijo sladkorjev iz jagod smo uporabili isto metodo kot za izolacijo iz lamine. Uporabljena metoda se ni pokazala za primerno, saj so bile meritve med posameznimi paralelkami preveč variabilne. Na osnovi dobljenih rezultatov ne moremo sklepati na povezanost okužbe s sladkorji v grozdnih jagodah. Za ustrežnejše rezultate bi bilo potrebno metodo optimizirati.

5.2. SKLEPI

V diplomski nalogi smo pokazali da:

- jagodno tkivo ob koncu rastle sezone vsebuje največjo koncentracijo fitoplazem FD in da je kot takšno optimalno za diagnostiko FD fitoplazem;
- za izolacijo in kasnejše količinsko ovrednotenje fitoplazemske DNA lahko uporabimo pufer ELISA; z njegovo uporabo postopek detekcije pocenimo in skrajšamo;
- shranjevanje tkiva vinske trte za dva do štiri mesece pri $T = -80\text{ °C}$ in večkratno odtajanje in zamrzovanje ekstraktov ne vplivajo na obstojnost DNA fitoplazme FD, kadar je ta prisotna v razmeroma dovolj visoki koncentraciji;
- fitoplazme kopičijo sladkorje v listnem tkivu;
- poskusi so bili narejeni na 4 vzorcih ene sezone in ene sorte, zato bi jih bilo potrebno ponoviti v večjem poskusu.

6 POVZETEK

Fitoplazme so odgovorne za veliko gospodarsko škodo kmetijsko pomembnih rastlin po vsem svetu. Popolnoma so odvisne od svojih gostiteljev in prenašalcev, izven katerih ne morejo preživeti. Karantenska fitoplazma *Flavescence dorée* (FD) povzroča nevarno bolezen vinske trte, ki se imenuje zlata trsna rumenica. Bolezen predstavlja resno grožnjo vinogradništvu, saj v primeru okužbe pride do propada celotne rastline, zato je zakonsko določeno odstranjevanje okuženih rastlin. Posledično je gospodarska škoda velika. Bolezenska znamenja se ne pokažejo takoj po okužbi, zato bolezen opazimo šele po nekaj mesecih do letih. Fitoplazma FD ima velik epidemiološki potencial v evropskih vinogradih zaradi razširjenosti in prisotnosti prenašalca, ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus* Ball), ki fitoplazmo FD prenaša z okuženih na zdrave trse ob sesanju rastlinskih sokov.

Fitoplazem še ne znamo gojiti v razmerah *in vitro*, zato so diagnostični pristopi zaenkrat omejeni na uporabo molekulskih analiz. Te v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo izvajajo po protokolih z metodo PCR v realnem času v osrednjih listnih žilah vinske trte po pojavu bolezenskih znamenj. Da bi pravočasno odkrili bolezen in s tem preprečili njeno nadaljnje širjenje, iščejo učinkovitejše in časovno ter cenovno bolj optimalne postopke.

V diplomski nalogi smo z metodo PCR v realnem času analizirali ekstrakte izolirane iz različnih tkiv vinske trte, ki smo jih nabrali ob koncu rastne sezone, da bi ugotovili v katerem tkivu je koncentracija fitoplazem FD najvišja. Analizirana tkiva so imela ali pa ne izražena tipična bolezenska znamenja zlate trsne rumenice, kot posledice okužbe s fitoplazmo FD. Ob koncu rastne sezone je bila najvišja koncentracija fitoplazme FD v tkivu grozdnih jagod.

Ugotovili smo, da zamrzovanje in odmrzovanje ter štirimesečno hranjenje pri $T = -80\text{ °C}$ ne vpliva bistveno na obstojnost izolirane fitoplazemske DNA.

Testiranje kartic FTATM Elute in filtrov Pallflex je pokazalo, da so te metode manj učinkovite pri izolaciji DNA od vpeljane metode z aparaturo KingFisher mL. Ugotovili smo, da 10-krat redčen ekstrakt jagodnega tkiva v pufri ELISA lahko neposredno uporabimo v reakciji z metodo PCR v realnem času. V takem ekstraktu je tudi več DNA kot v 10-krat redčenem ekstraktu, ki ga dobimo z aparaturo KingFisher® mL. S takim načinom ekstrakcije lahko celoten postopek izolacije DNA izvedemo ceneje in hitreje.

V laminah listov vinske trte smo izmerili količino sladkorjev, ki je bila višja v okuženih laminah v primerjavi z neokuženimi.

Dobljeni rezultati diplomske naloge bogatijo dosedanje znanje prisotnosti fitoplazme FD v različnih tkivih vinske trte, ter lahko pomagajo pri izboljšavi že obstoječih ter uvedbi novih pristopov za diagnostiko in nadzor okužbe s povzročiteljico zlate trsne rumenice.

7 VIRI

- Ahrens U., Seemuller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832
- Angelini E., Squizzato F., Lucchetta G., Borgo M. 2003. Identification of a grapevine *Flavescence dorée*-C phytoplasma and two deletion mutants in clematis. V: 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, September 12-17, 2003, Locorotondo, Bari, Italy. Locorotondo, University of Bari: 60-62
- Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-Padieu E., Foissac X. 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct *Flavescence dorée* phytoplasma strain clusters and group 16S rV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 12: 4001-4010
- Belli G., Bianco P.A., Conti M. 2010. Grapevine yellows in Italy: Past, present and future. *Journal of Plant Pathology*, 92, 2: 303-326
- Bertaccini A., Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: A review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 355-378
- Bertaccini A. 2007. Phytoplasmas: Diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12: 673-689
- Bianco P. A., Casati P., Marziliano N. 2004. Detection of phytoplasmas associated with grapevine *Flavescence dorée* disease using real-time PCR. *Journal of Plant Pathology*, 86: 257-261
- Boben J., Mehle N., Ravnkar M. 2007. Optimization of extraction procedure can improve phytoplasma diagnostics. *Bulletin of Insectology*, 60: 249-250
- Boudon-Padieu E. 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: Distribution, diversity, vectors, diffusion and control. V: 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, September 12-17, 2003, Locorotondo, Bari, Italy. Locorotondo, University of Bari: 47-53
- Brune A.E., Chandrasena G., Rutherford R. 2003. Improvement of quarantine procedures for the detection of sugarcane phytoplasmas. *South African Sugar Technology Association*: 124-128
- Choi Y.H., Tapias E.C., Kim H.K., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Verhoeven J.T.J., Brzin J., Zel J., Verpoorte R. 2004. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using 1H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology*, 135: 2398-2410

- Christensen N. M., Axelsen K. B., Nicolaisen M., Schulz A. 2005. Phytoplasmas and their interaction with hosts. *Trends in Plant Science*, 10: 526-536
- Constable F.E., Gibb K.S., Symons R.H. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52 :267-276
- Dermastia M., Mehe N., Rupar M., Seljak G., Ravnikar M., Orešek E. 2010. Zlata trsna rumenica - potencialna nevarnost slovenskemu vinogradništvu = *Flavescence dorée* - a potential threat to the Slovenian viticulture. V: *Vinarski dan 2010*, 17. november 2010, Ljubljana. Čuš F. (ur). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 133-142
- EPPO 2007. Grapevine *Flavescence dorée* phytoplasma. *EPPO Bulletin*, 37: 536-542
- Filippin L., Jović J., Forte V., Cvrković T., Toševski I., Borgo M., Angelini E. 2007. Occurrence and diversity of phytoplasmas detected in clematis and their relationships with grapevine "*Flavescence dorée*" phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 60, 2: 327-328
- Filippin J., Jović J., Cvrković T., Forte V., Clair D., Toševski I., Boudon-Padieu E., Borgo M., Angelini A. 2009. Molecular characteristics of phytoplasmas associated with *Flavescence dorée* in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europea* as a vector. *Plant Pathology*, 58: 826-837
- Firrao G, Gibb K, Streten C. 2005. Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus Phytoplasma*'. *Journal of Plant Pathology*, 87, 4: 249-263
- Firrao G., Conci L., Locci R. 2007. Molecular Identification and Diversity of phytoplasmas. V: *Biotechnology and Plant Disease Management*. Punja Z., De Boer S. H., Sanfacon H. (eds.). London, CABI: 250-277
- Foissac X., Wilson M.R. 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. V: *Phytoplasmas genome, plant hosts and vectors*. Weintraub P.G., Jones P. (eds). London, CABI: 309-325
- Guthrie J.N., Walsh K.B., Scott P.T., Rasmussen T.S. 2001. The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58: 23-30
- Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar D., Kakizawa S., Kingdom H., Namba S. 2008. Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9, 2: 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*, 56: 785-796

- Hren M., Nikolić P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden K. 2009. '*Bios noir*' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, 10: 1-17
- Jackson R.S. 2008. *Wine science*. 3rd ed. Oxford, Elsevier: 5-5
- Junqueira A., Bedendo I., Pascholati S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65: 181-185
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Bertaccini A. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88, 12: 1359-1366
- Lepka P., Stitt M., Moll E., Seemüller E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 59-68
- Lessio F., Alma A. 2004. Seasonal and daily movement of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology*, 33, 6: 1689-1694
- Lopez M. M., Llop P., Olmos A., Marco-Noales E., Cambra M., Bertolini E. 2009. Are molecular tools solving challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Molecular Biology*, 11: 13-46
- Maixner M. 2006. Grapevine yellows-current developments and unsolved questions. V: Extended abstracts: 15th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, April 3-7, 2006, Stellenbosch, South Africa. Stellenbosch, South African Society for Entology and Viticulture: 88-86. <http://www.icvg.ch/data/maixner.pdf> (20.5.2011)
- Maixner M., Reinert W., Darimont H. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis*, 39, 2: 83-84
- Malembic-Maher S., Salar P., Vergnes D., Foissac X. 2007. Detection and diversity of *Flavescence dorée* - related phytoplasmas in alders surrounding infected vineyards in Aquitaine (France). *Bulletin of Insectology*, 60, 2: 329-330
- Marcone C. 2010. Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. V: *Phytoplasmas genome, plant hosts and vectors*. Weintraub P.G., Jones P. (eds). London, CABI: 114-132
- Margaria P., Rosa P., Marzachi C., Turina M., Almano S. 2007. Detection of *Flavescence dorée* phytoplasma in grapevine by reverse transcription PCR. *Plant Disease*, 91: 1496-1501
- Mark A. V., Repa J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159

- Martinčič A., Wraber T., Jogana N., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 2007. Mala flora Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967-967
- Marzorati M., Alma A., Sacchi L., Pajoro M., Palermo S., Brusetti L., Radaddi N., Balloi A., Tedeschi R., Clementi E., Corona S., Quaglino F., Bianco A.P., Beninati T., Bandi C., Daffonchio D. 2005. A novel *Bacteroidetes* symbiont is localized in *Scaphoideus titanus*, the insect vector of *Flavescence doree* in *Vitis vinifera*. Applied and Environmental Microbiology, 72, 2: 1467-1475
- Maust B. E., Espadas F., Talavera C., Aguilar M., Santamaria J. M., Oropeza C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in cocount palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. Phytopathology, 93: 976-981
- Morone C., Boveri M., Giosue S., Gotta P., Rossi V., Scapin I., Marzachi C. 2007. Epidemiology of *Flavescence dorée* in vineyards in northwestern Italy. Phytopathology, 97: 1422-1427
- Musetti R. 2008. Management and ecology of phytoplasma diseases of grapevine and fruit crops. V: Integrated Management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria. Ciancio A., Mukerji K. G. (eds.). New York, Springer: 43-60
- Musetti R. 2010. Biochemical changes in plants infected by phytoplasmas. V: Phytoplasmas genome, plant hosts and vectors. Weintraub P.G., Jones P. (eds.). London, CABI: 132-147
- PFAF. 2010. *Vitis vinifera* L. Cornwall, PFAF- Plant for a future: 1 str. [http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Vitis vinifera](http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Vitis+vinifera) (1.6.2011)
- Pravilnik o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje zlate trsne rumenice. 2009. Uradni list Republike Slovenije, 19, 73: 9830-9940
- Tassart-Subirats V., Clair D., Grenan S., Boudon-Padieu E., Larrue J. 2003. Hot water treatment: Curing efficiency for phytoplasma infection and effect on plant multiplication material. V: 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine Conference, September 12-17, 2003, Locorotondo, Bari, Italy. Locorotondo, University of Bary: 69-70
- Terlizzi F., Credi R. 2007. Uneven distribution of stolbur phytoplasma in Italian grapevines as revealed by nested-PCR. Bulletin of Insectology, 60, 2: 365-366
- VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques, 44: 619-626

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Marini Dermastia, ki mi je omogočila opravljanje zanimivega diplomskega dela, pri čemer sem pridobila ogromno znanja na področju fitoplazem. Hvala tudi za vse koristne nasvete tekom dela in pisanja diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi prof.dr. Maji Ravnikar, za recenzijo diplomske naloge.

Velika hvala tudi Nini Prezelj, uni. dipl. biokem. za vso pomoč, potrpežljivost in ideje pri izvajanju praktičnega dela diplomske naloge.

Hvala za prijaznost in razumevanje tudi vsem zaposlenim na oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo.

Hvala sošolcem in prijateljem Anji Zagožen, Elizabeti Benigar, Damjani Barbič, Roku Tomazinu in Špeli Miklavič za nasmejana in nepozabna študijska leta!

Velika hvala tudi mojim sorodnikom, ker so vedno bili tukaj, ko sem jih potrebovala. Hvala bratrancu Igorju Krunić, za lektoriranje diplomske naloge! Irena hvala za pomoč pri prevodu ključne dokumentacijske informacije!

Največja zahvala gre mojima staršema Dušku in Sofiji ter bratu Nebojši, ki mi ves čas stojijo ob strani, me spodbujajo in verjamejo vame.

Najlepša hvala vsem!