

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sanda KAVČIČ

**MOLEKULSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV  
FITOPLAZME, POVZROČITELJICE  
POČRNELOSTI LESA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sanda KAVČIČ

**MOLEKULSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV FITOPLAZME,  
POVZROČITELJICE POČRNELOSTI LESA**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**MOLECULAR DIVERSITY OF PHYTOPLASMA ISOLATES  
ASSOCIATED WITH GRAPEVINE BOIS NOIR**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakultete Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Marino Dermastia, za somentorico dr. Natašo Mehle in za recenzenta doc. dr. Tomaža Accetta.

Mentorica: prof. dr. Marina Dermastia

Somentorica: dr. Nataša Mehle

Recenzent: doc. dr. Tomaž Accetto

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: dr. Nataša MEHLE  
Nacionalni inštitut za biologijo

Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Sanda Kavčič

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Du2
- DK UDK 632.35:634.8:577.2.083(043)=163.6
- KG fitoplazme/fitoplazma BN/bolezen trsnih rumenic/počrnelost lesa/molekularne tehnike/PCR/ugnezdena PCR/RFLP/*tuf/vmp1*
- AV KAVČIČ, Sanda, dipl. mikrobiol. (UN)
- SA DERMASTIA, Marina (mentorica)/MEHLE, Nataša (somentorica)/ ACCETTO, Tomaž (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
- LI 2015
- IN MOLEKULSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV FITOPLAZME,  
POVZROČITELJICE POČRNELOSTI LESA
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
- OP XI, 57 str., 13 pregl., 14 sl., 14 pril., 84 vir.
- IJ Sl
- JL sl/en
- AI Bois noir je bolezen trsnih rumenic, ki jo povzroča fitoplazma '*Ca. P. solani*'. Je ena najbolj pomembnih bolezni rumenic v Evropi in Sredozemlju, saj povzroča veliko gospodarsko škodo v pridelavi grozdja. V Sloveniji je ta bolezen prisotna že dalj časa, malo pa vemo o epidemiologiji fitoplazme, ki jo povzroča. Namen te naloge je bil molekularno opredeliti slovenske vzorce vinske trte, okužene s '*Ca. P. solani*'. V raziskavo smo vključili 188 vzorcev vinske trte, pozitivnih na okužbo s '*Ca. P. solani*' iz let 2007 in 2013 ter 13 vzorcev nekaterih drugih rastlin in žuželk, okuženih z obravnavano fitoplazmo. Uporabili smo metodo PCR-RFLP, analizirali pa smo dva gena, ohranjen gen *tuf* in variabilni gen *vmp1*, ki kodira membranski protein. Z analizo RFLP na genu *tuf* smo dobili dva različna profila, tuf-a in tuf-b. Oba smo zaznali v vseh območjih Slovenije, najpogosteje pa tip tuf-b (80 %), ki je najpogostejši podtip tudi v Avstriji in na Hrvaškem. Tip tuf-a pa je bil najpogostejši prisoten na zahodnem delu države in v letu 2007 tudi v severozahodnem delu. Pri analizi gena *vmp1* je bila variabilnost profilov večja, določili smo najmanj 16 različnih profilov v vzorcih trte, ter dodatna dva na vzorcih gostiteljskih rastlin in žuželk. Najpogostejši profil vmp v letu 2007 je bil vmp 9 (48 %), v letu 2013 pa vmp 1 (46 %).

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

ND Du2  
DC UDC 632.35:634.8:577.2.083(043)=163.6  
CX phytoplasmas/BN phytoplasmas/grapevine yellows/bois noir/molecular methods/PCR/nested PCR/RFLP/*tuf/vmp1*  
AU KAVČIČ, Sanda, dipl. mikrobiol. (UN)  
AA DERMASTIA, Marina (supervisor)/MEHLE, Nataša (co-advisor)/ACCETTO, Tomaž (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic study in Microbiology  
PY 2015  
TY MOLECULAR DIVERSITY OF PHYTOPLASMA ISOLATES ASSOCIATED WITH GRAPEVINE BOIS NOIR  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)  
NO XI, 57 p., 13 tab., 14 fig., 14 ann., 84 ref.  
LA sl  
AI sl/en  
AB Bois noir disease is a grapevine yellow disease caused by phytoplasma '*Ca. P. solani*'. It is one of the most important grapevine diseases in Euro-Mediterranean regions, causing great economic loss in the production of grapes. In Slovenia, the presence of bois noir has been known before, but to better understand its epidemiology we carried out a molecular characterisation of the Slovenian samples of the grapevine plants infected with '*Ca. P. solani*'. We analyzed 188 samples from grapevine positive to the infection with '*Ca. P. solani*', from the year 2007 and 2013, and 13 infected samples from vectors and weeds. We investigated two different genes with the use of PCR-RFLP method, a conserved gene *tuf* and a variable gene *vmp1* that code for the variable membrane protein 1. The PCR-RFLP analysis of *tuf* gene showed two profiles, tuf-a and tuf-b. Tuf types were detected in all areas, but tuf-b type was the prevalent type in both years (80 %), like in Austria and Croatia. The tuf-a type was mostly detected in the western and in 2007 also in the northeastern part of Slovenia. Based on the *vmp1* gene, variability was much higher, thus we identified at least 16 different genotypes on grapevine, and additional two on herbaceous plants and vectors. A prevalent vmp genotype in 2007 was vmp 9 (46,7 %), and in 2013 vmp 1 (46,0 %).

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 FITOPLAZME.....	3
2.1.1 Osnovne značilnosti .....	3
2.1.2 Biologija fitoplazem .....	4
2.1.3 Sistematika in genotipizacija fitoplazem .....	5
2.1.4 Epidemiologija .....	7
2.2 BOLEZNI TRSNIH RUMENIC .....	7
2.2.1 Posledice okužbe .....	8
2.3 FITOPLAZMA 'Ca. P. solani' IN POČRNELOST LESA .....	9
2.3.1 Počrnelost lesa ali navadna trsna rumenica .....	9
2.3.2 Žuželčji prenašalci in gostiteljske rastline.....	10
2.3.3 Taksonomska uvrstitev 'Ca. P. solani' in genotipizacija.....	11
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1 MATERIAL.....	13
3.2 REFERENČNI VZORCI DNA FITOPLAZME BN .....	13
3.3 PREGLED METOD .....	13
3.4 REAKCIJE PCR .....	14
3.5 ANALIZA POLIMORFIZMA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV (RFLP).....	17

3.6	AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA .....	19
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>21</b>
4.1	ANALIZA VZORCEV Z UGNEZDENO PCR .....	21
4.2	ANALIZA RFLP .....	21
<b>4.2.1</b>	<b>Analiza RFLP pomnožkov gena <i>tuf</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Analiza RFLP pomnožkov gena <i>vmp1</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Povezava profilov <i>tuf</i> in <i>vmp</i> na vzorcih vinske trte .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Skupni rezultati analize RFLP genov <i>tuf</i> in <i>vmp1</i> .....</b>	<b>30</b>
4.3	GEOGRAFSKA RAZPOREDITEV PROFILOV TUF IN VMP V SLOVENIJI	40
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>43</b>
5.1	ANALIZA VZORCEV VINSKE TRTE .....	43
<b>5.1.1</b>	<b>Analiza RFLP pomnožkov gena <i>tuf</i> na vzorcih iz vinske trte.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Analiza RFLP pomnožkov gena <i>vmp1</i> na vzorcih iz vinske trte .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Povezava profilov <i>tuf</i> in <i>vmp</i> na izolatih iz vinske trte .....</b>	<b>45</b>
5.2	ANALIZE NA VZORCIH DRUGIH MOŽNIH GOSTITELJEV IN PRENAŠALCEV ' <i>Ca. P. solani</i> '.....	46
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>50</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

**KAZALO SLIK**

Sl. 1: Filogenetsko drevo rodu ' <i>Candidatus Phytoplasma</i> ' (Maejima in sod., 2014) .....	6
Sl. 2: Shema ugotavljanja molekulske raznolikosti izolatov ' <i>Ca. P. solani</i> ' na genu <i>tuf</i> in <i>vmp</i> . .....	14
Sl. 3: Cepitveni mesti za encim <i>HpaII</i> .....	18
Sl. 4: Cepitveni mesti za encim <i>RsaI</i> .....	19
Sl. 5: Pomnožki ugnezdene reakcije PCR gena <i>tuf</i> z začetniki tufAY f/r, ter gena <i>vmp1</i> z začetniki TYPH10F/R. .....	21
Sl. 6: Prikaz raznolikosti fragmentov pomnožkov gena <i>tuf</i> vzorcev, ki smo jih uporabili kot referenčne kontrole, po cepitvi z restriktionskim encimom <i>HpaII</i> .....	22
Sl. 7: Prikaz raznolikosti fragmentov pomnožkov gena <i>tuf</i> po razrezu z restriktionskim encimom <i>HpaII</i> .....	22
Sl. 8: Število vzorcev in delež podtipov tuf-a in tuf-b za vzorce izolirane leta 2007 in 2013. ....	23
Sl. 9: Grafični prikaz števila podtipov tuf-a in tuf-b za vsak profil vmp za vzorce vinske trte iz leta 2007. ....	30
Sl. 10: Grafični prikaz števila podtipov tuf-a in tuf-b za vsak profil vmp za vzorce vinske trte iz leta 2013.. ....	30
Sl. 11: Primerjava profila vzorca okuženega s ' <i>Ca. P. convolvuli</i> ' (D285/12; velikost fragmentov: 600, 500, 400 bp) z vzorcem ameriškega škržatka (D604/09; velikost fragmentov: 700, 400, 300 bp). ....	38
Sl. 12: Primerjava profilov podtipov tuf-a (D720/13) in tuf-b (D992/13, D689/07) z vzorcema okuženima s ' <i>Ca. P. convolvuli</i> ' .. ....	39
Sl. 13: Prikaz geografske razporeditve podtipov tuf in vmp ' <i>Ca. P. solani</i> ' iz vzorcev vinske trte vzorčene leta 2007.....	41
Sl. 14: Prikaz geografske razporeditve podtipov tuf in vmp ' <i>Ca. P. solani</i> ' iz vzorcev vinske trte vzorčene leta 2013.....	42

**KAZALO PREGLEDNIC**

Pregl. 1: Pregled oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih v nalogi .....	15
Pregl. 2: Sestava reakcijske mešanice za reakcije PCR za vse pare oligonukleotidnih začetnikov.....	16
Pregl. 3: Pregled programov reakcij PCR za vse pare oligonukleotidnih začetnikov.....	17
Pregl. 4: Sestava reakcijske mešanice za analizo RFLP z encimom <i>RsaI</i> ali <i>HpaII</i> . ....	18
Pregl. 5: Sestava agaroznega gela glede na velikost banjice.....	20
Pregl. 6: Prisotnost podtipov tuf-a in tuf-b po vinorodnih deželah v Sloveniji v letih 2007 in 2013.....	23
Pregl. 7: Rezultati analize RFLP fragmentov DNA gena <i>vmp1</i> in razrezanih z encimom <i>RsaI</i> .....	25
Pregl. 8: Prikaz raznolikosti profilov vmp po vinorodnih deželah iz vzorcev iz leta 2007.	28
Pregl. 9: Prikaz raznolikost profilov vmp po vinorodnih deželah iz vzorcev iz leta 2013..	29
Pregl. 10: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov <i>tuf</i> in <i>vmp1</i> razcepljenih z encimoma <i>HpaII</i> in <i>RsaI</i> iz vzorcev vinske trte iz leta 2007. ....	31
Pregl. 11: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov <i>tuf</i> in <i>vmp1</i> razcepljenih z encimoma <i>HpaII</i> in <i>RsaI</i> iz vzorcev vinske trte iz leta 2013. ....	34
Pregl. 12: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov <i>tuf</i> in <i>vmp1</i> razcepljenih z encimoma <i>HpaII</i> in <i>RsaI</i> iz ostalih vzorcev. ....	40
Pregl. 13: Prikaz profilov iz drugih raziskav, ki so enaki našim profilom vmp.....	46

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI*, vzorci so iz leta 2013, oznaka vzorcev Dxy/13.

Priloga A1: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D232 do D438.

Priloga A2: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D454 do D600.

Priloga A3: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D626 do D764.

Priloga A4: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D768 do D860, ter D255, D447 in D448.

Priloga A5: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorca D537.

Priloga B: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI*, vzorci so iz leta 2007, oznaka vzorcev Dxy/07.

Priloga B1: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D499 do D668.

Priloga B2: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D668 do D859.

Priloga B3: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D860 do D1015 in D629.

Priloga C: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI*, vzorcev ostalih rastlin in žuželk.

Priloga D: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI*.

Priloga D1: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev D285/12, D249/12, D472/13, D550/13, D635/13, D559/13, D560/13, D541/13, D319/13, D361/13, D654/13.

Priloga D2: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev D297/13, D319/13, D361/13, D654/13, D252/13, D770/07, D250/13, D271/13, D292/13, D288/12.

Priloga D3: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev D501/07, D502/07, D547/07, D580/07, D776/07, D296/13,

D309/13, D313/13, D375/13, D860/13,D661/07, D767/13, D255/13, D751/13, D472/13, D476/13, D540/13.

Priloga D4: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev D232/13, D234/13, D305/13, D326/13, D733/13, D709/13, D705/13, D365/13, D768/13, D232/13.

Priloga E: Analiza RFLP pomnožka gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev referenčnih kontrol.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16SrXII-A	ribosomska skupina, v katero spada fitoplazma ' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> '
BdH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
BN	trsna rumenica tipa počrnelosti lesa ali navadna trsna rumenica
Bp	bazni par
Ct	fluorescenčni prag (ang. Cycle threshold)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi nukleozid trifosfat
EDTA	etilen diamin tetraocetna kislina (ang. Ethylenediaminetetraacetic acid)
FD	zlata trsna rumenica
Kb	kilobaza
NKP	negativna kontrola reakcije PCR
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction)
RFLP	metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. Restriction fragment length polymorphism)
TAE	pufer Tris-acetat-EDTA

## 1 UVOD

Fitoplazme so majhne bakterije brez celične stene. So obligatni znotrajcelični zajedavci rastlin in žuželk. Zaradi zelo reducirane genome nimajo večine metabolnih poti, zato morajo nujne metabolite pridobiti od gostitelja. Za fitoplazme je značilen tudi unikaten in kompleksen življenjski cikel. V rastlinah živijo v floemu, od rastline do rastline pa jih prenašajo žuželke, ki se hranijo s floemskim sokom. So povzročiteljice številnih bolezni mnogih rastlinskih vrst po vsem svetu, nekatere povzročajo veliko gospodarsko škodo. Kljub temu njihovo biologijo še zelo slabo poznano, predvsem zato, ker jih še ne znamo rutinsko gojiti v razmerah *in vitro*. Z razvojem molekularnih metod smo dobili vpogled v njihovo genetsko pestrost, ki je osnova za epidemiološke študije.

Na vinski trti fitoplazme povzročajo gospodarsko pomembne bolezni imenovane trsne rumenice. Poznamo več tipov trsnih rumenic, najbolj pomembni v Evropi sta zlata trsna rumenica (flavescence dorée; FD) in trsna rumenica tipa počrnelosti lesa ali navadna trsna rumenica (bois noir; BN). BN povzroča fitoplazma '*Candidatus Phytoplasma solani*', ki jo uvrščamo v ribosomsko skupino 16SrXII-A. Na vinsko trto jo prvenstveno prenaša svetleči škržatek (*Hyalesthes obsoletus* Signoret). Bolezen BN je zelo razširjena v Evropi in jo je težko nadzorovati. Preučevanje molekulske raznolikosti sevov fitoplazme povzročiteljice BN je pokazalo, da obstajajo med sevi genetske razlike, kar lahko uporabljamo za epidemiološke študije.

BN je zelo razširjena tudi v Sloveniji. Namen te magistrske naloge je raziskati epidemiologijo fitoplazme, ki jo povzroča, v Sloveniji. V ta namen bomo zbrane vzorce iz vinske trte in drugih gostiteljskih rastlin molekularno opredelili.

### 1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen te magistrske naloge je raziskati epidemiologijo fitoplazme '*Ca. P. solani*' v Sloveniji. Z analizo pomnožkov RFLP ugnezdene PCR smo vzorce fitoplazem iz vinske trte, nekaterih žuželk in gostiteljskih rastlin uvrstili v eno od genskih podskupin glede na gen *tuf* in *vmp1*, ter poskusili ugotoviti njihovo časovno in geografsko razporeditev. Dobljene rezultate smo primerjali z rezultati raziskav iz drugih, predvsem sosednjih držav, ter tako poskusili določiti možen izvor in pot širjenja '*Ca. P. solani*'.

Delovne hipoteze:

- Vinska trta je v Sloveniji okužena s podtipom tuf-a in tuf-b, saj sta oba podtipa prisotna na vinski trti v sosednjih državah (Avstrija, Hrvaška in Italija).
- V vinorodnih deželah v bližini meje z Avstrijo in Hrvaško je pogostejši podtip tuf-b; pojavnost podtipa tuf-a je največja na Primorskem, saj v Avstriji in na Hrvaškem prevladuje tuf-b, v Italiji pa tuf-a.
- V razdobju od 2007 do 2013 se pojavnost podtipov gena *tuf* spreminja.

- Podtip je vezan na sorto vinske trte.
- Raznolikost med profili je večja pri analizi gena *vmp1*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 FITOPLAZME

#### 2.1.1 Osnovne značilnosti

Fitoplazme so majhne, pleomorfne bakterije brez celične stene velikosti od 80 do 900 nm. Nima celicne stene, obdaja pa jih trilaminarna membrana. So večinoma okrogle do ovoidne oblike. Zanje je značilen tudi majhen genom, od 530 do 1350 kb (Marcone, 2014). Spadajo v razred *Mollicutes*, razvile pa naj bi se iz po Gramu pozitivnega prednika, verjetno *Clostridium* ali *Lactobacillus* spp. (Hogenhout in sod., 2008). Med evolucijo naj bi izgubile celično steno. Prišlo je tudi do redukcije genov in s tem do izgube genov za različne metabolne poti. To naj bi bil poglaviti razlog, da jih za enkrat še ne znamo gojiti v aksenični kulturi (Hogenhout in sod., 2008; Quaglino in sod., 2013). Kljub temu novejše raziskave že nakazujejo možnost takšnega načina gojenja fitoplazem v prihodnosti (Contaldo in sod., 2012).

Fitoplazme imajo najmanjši genom med rastlinskimi patogenimi bakterijami, le nekateri bakterijski simbionti žuželk imajo manjše. Nekateri glavni vzdrževalni geni (ang. housekeeping genes) so prisotni v večih kopijah, pogosta je tudi podvojenost genov (Bertaccini in Duduk, 2009), ki sodelujejo pri pomnoževanju DNA, ter genov, ki kodirajo proteine, pomembne za začetek transkripcije, in membranske proteine (Bai in sod., 2006). Veliko število transpozonskih genov in insercijskih sekvenc jim povečuje raznolikost genoma. Pomembne naj bi bile za fitnes fitoplazem, s čimer naj bi se povečala možnost njihovega preživetja v različnih okoljih rastlin in živali. Fitoplazme imajo tudi izvenkromosomske DNA, kot so plazmidi, kjer so kodirani tudi geni odgovorni za patogenost in virulenco. Genom fitoplazem ima veliko genov za transporterske sisteme, kot so transporterji za malat, kovinske ione in aminokislinski transporterji, nekateri od teh so kodirani v več kopijah. Te transporterske sisteme fitoplazme verjetno uporabljajo za vnos snovi iz gostitelja. S tem oslabijo njihovo ravnotežje metabolitov, kar povzroči nastanek bolezni in pojav bolezenskih znamenj pri rastlinah (Bertaccini in sod., 2014).

Fitoplazme se nahajajo znotraj celic in nimajo celične stene, zato so pri interakcijah s prenašalcji pomembni tudi membranski proteini in proteini, ki jih izločajo (Bertaccini in sod., 2014). Ključno vlogo pri tem imajo antigenski (imunodominantni) membranski proteini, kot sta AMP in spiralin, ki se vežejo na aktinske mikrofilamente in glikoproteine celic žuželk (Cimerman in sod., 2009; Cvrković in sod., 2014). Ti glavni površinski proteini naj bi bili pomembni pri prepoznavanju, vezavi na rastlinske ali žuželčje celice, patogenosti in sprožitvi obrambnega odgovora rastlin ali žuželk. Prisotnost glavnih epitopov je značilna za vsako vrsto fitoplazem posebej (Bertaccini in Duduk, 2009). Študije kažejo, da interakcije med gostiteljem in patogenom spodbujajo variabilnost bakterijskih membranskih proteinov. Pri fitoplazmah je ta raznolikost posledica prilagoditve izogibanju

imunskemu sistemu žuželke, ali pritrditvi na proteine gostitelja, kar je pomemben korak pri okužbi (Kakizawa in sod., 2006).

### 2.1.2 Biologija fitoplazem

Fitoplazme so med baterijskimi patogeni rastlin posebne, saj za razmnoževanje, preživetje in razširjanje v naravi potrebujejo različne gostitelje, rastline in žuželke (Hogenhout in sod., 2008). Prenašajo jih žuželke in zajedavske rastline, prenašajo pa se tudi z vegetativnim razmnoževanjem, kot je cepljenje okuženega rastlinskega tkiva (poganjki) na zdrave rastline, z rezjo ali mikropagacijo (Bertaccini in sod., 2014; Cvrković in sod., 2014).

So znotrajcelični in zunajcelični patogeni/simbionti rastlin in žuželk. V rastlinah se nahajajo v elementih sitastih cevi floema, tako v zrelih elementih brez jedra, kot tudi v nezrelih z jedri. Po rastlini se premikajo skozi pore sitastih plošč, ki ločujejo elemente sitastih cevi (Hogenhout in sod., 2008). V rastline jih vnašajo žuželčji prenašalci med hranjenjem in od mesta vstopa se sistemsko razširijo po celotnem rastlinskem floemu. Fitoplazme prezimijo v žuželkah ali rastlinah trajnicah. Interakcija s prenašalcem lahko zmanjša ali poveča fitnes prenašalca z vplivom na plodnost, dolgoživost in preživetje odraslih žuželk (Bertaccini in sod., 2014; Johanessen in sod., 2008). Interakcije so lahko kompleksne in odvisne od temperature in gostiteljske rastline. Fitoplazme v rastlini lahko tudi vplivajo na prenašalca tako, da ta okuži le specifično gostiteljsko rastlino, in sicer preko hlapnih organskih snovi, ki jih izloča rastlina zaradi prisotnosti patogena (Maixner in sod., 2014; Mayer in sod., 2008).

Prenašalci fitoplazem so večinoma žuželke iz redu Hemiptera, predvsem iz družin Cicadellidae, Fulgoromorpha in Psyllidae, ki se prehranjujejo s floemskim sokom. V žuželkah fitoplazme naselijo celice in njihovo zunanjost v črevesu, žlezah slinavkah in drugih tkivih. Med hranjenjem žuželk morajo fitoplazme priti do slin, da se z njo nato prenesejo v floemski sok. Latentno obdobje, to je čas med tem, ko žuželke pridobijo fitoplazme iz rastlin in jih prenesejo nazaj v rastlino, traja med 7 in 80 dni. Na rastlinah se bolezenska znamenja pojavijo po približno 7 dneh, pri nekaterih pa tudi pozneje (po 6 do 24 mesecih), odvisno od fitoplazme, vrste rastline, starosti rastlin v času okužbe in od okoljskih pogojev. Fitoplazme imajo širok razpon rastlinskih gostiteljev, kar je odvisno od razpona žuželčjih prenašalcev. Zaradi tako širokega razpona rastlinskih in žuželčjih gostiteljev je izbruhe težko napovedati. Zaradi dolge inkubacijske dobe v rastlinah in žuželkah izbruhe pogosto prepozno opazimo, šele tik pred pobiranjem pridelka in po razširitvi z žuželkami. Vse to otežuje nadzor in prekinitev cikla bolezni (Hogenhout in sod., 2008).

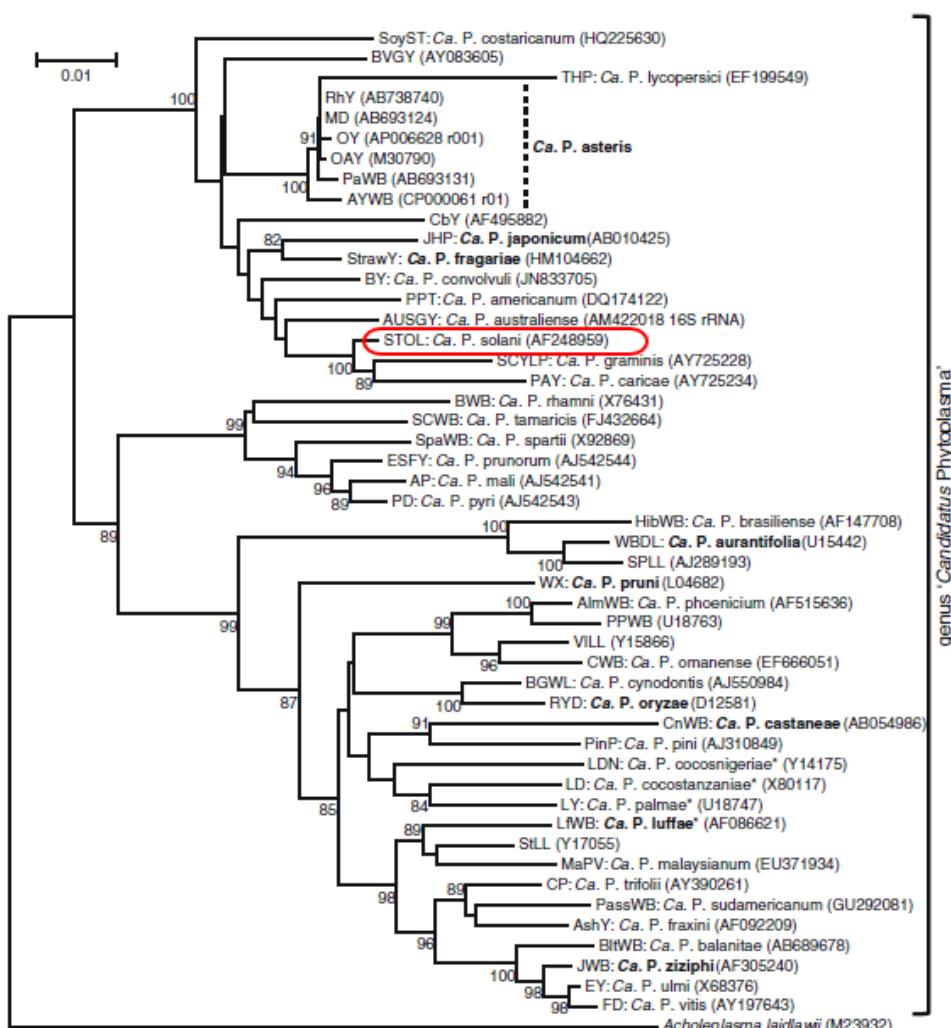
Fitoplazme lahko povzročijo velike izgube pridelka pri okoli 700 vrstah rastlin po vsem svetu, tudi izgubo pridelka gospodarsko pomembnih rastlin, sadnega drevja in okrasnih rastlin. Okužene rastline lahko kažejo različna bolezenska znamenja kot so okrnjena rast, rumenenje, metličavost, filodija (nastanek listom podobnih struktur namesto cvetov),

virescenza (zelenenje cvetnih delov), proliferacija (rast poganjkov iz cvetnih delov), rdečenje listov in stebla, nekroza floema. Okužba s fitoplazmami je pogosto usodna in povzroči veliko škode na pridelkih (Maejima in sod., 2014).

### 2.1.3 Sistematika in genotipizacija fitoplazem

Bolezni rumenic so sprva pripisovali virusom. Doi in sodelavci pa so leta 1967 pokazali, da so povzročitelji prokarionti brez celične stene. Te organizme so takrat poimenovali mikoplazmam podobni organizmi (mycoplasma-like organisms-MLOs), zaradi njihove morfološke podobnosti mikoplazmam (Bertaccini in Duduk, 2009). Nasprotno od mikoplazem, ki povzročajo različna obolenja ljudi in živali, fitopatogenih mikoplazem ni mogoče gojiti v brezceličnem gojišču, zato so jih lahko natančneje opredelili šele z razvojem molekularne biologije. Ime fitoplazme so tem organizmom podelili leta 1994, leta 2004 pa so fitoplazme uvrstili znotraj novega rodu *Candidatus Phytoplasma* (*Ca. P.*) (Maejima in sod., 2014). Taksonomski status *Ca.* je začasen in neprimerljiv s formalno sistematiko, saj jih lahko opredelimo le glede na habitat, morfologijo in nekatere značilnosti membrane in nukleinskih kislin, in ne še na osnovi biokemijskih, fizioloških in gojitvenih lastnostih (Firrao in sod., 2005; Marcone, 2014). Do sedaj znane fitoplazme so uvrstili v 30 skupin (Maejima in sod., 2014). Sekvenciranje ribosomske DNA je pokazalo, da spadajo v široko monofiletsko skupino znotraj razreda *Mollicutes* (IRPCM, 2004). Sekvenčna analiza 16S rDNA in drugih vzdrževalnih genov je pokazala, da so najbolj sorodni *Acholeplasma* spp., in ne spiroplazmam, kot je večina ostalih rastlinskih patogenov iz razreda molikutov (sl. 1) (Bertaccini in sod., 2014).

Prva celovita klasifikacija fitoplazem temelji na pomnožitvi 1,2 kbp dolgega fragmenta gena 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo (polymerase chain reaction, PCR) z začetniki R16F2n in R16R2, ter nato ugnezdeno PCR z začetniki P1 in P7, ter analizi polimorfizma dolžin restriktionskih fragmentov (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Bertaccini in Duduk, 2009; Makarova in sod., 2012).



Slika 1: Filogenetsko drevo rodu '*Candidatus Phytoplasma*' (Maejima in sod., 2014). Označena je skupina stolbur, v kateri so fitoplazme, obravnavane v tej nalogi.

Za detekcijo in identifikacijo bakterij ter ločevanje med sevi bakterij lahko uporabimo genotipsko analizo, tako da jih primerjamo na ravni DNA (Madigan in sod., 2009: 387). Za filogenetske analize najpogosteje uporabljam gen, ki kodira 16S rRNA, saj je to gen, ki ga najdemo pri vseh organizmih, je zelo ohranjen, njegova funkcija se tekom časa ni spremenila in je primerne dolžine za analizo (Madigan in sod., 2009).

Delovna skupina IRPCM (Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group) priporoča, da je opis nove vrste v rodu *Candidatus* utemeljen, če je podobnost sekvence 16S rRNA z ostalimi do sedaj opisanimi vrstami v tem rodu manj kot 97,5 % (IRPCM, 2004; Duduk in Bertaccini, 2011). Na podlagi filogenetske analize sekvenca 16S rDNA, lahko fitoplazme zaenkrat razvrstimo v 30 glavnih filogentskih skupin. Raziskave so pokazale, da nekaterih zelo sorodnih sevov fitoplazme ne moremo ločiti med seboj samo s sekvenco 16S rDNA, ker je ta zelo ohranjena (Marcone, 2014; Duduk in Bertaccini, 2011). Zato moramo za bolj natančno diferenciacijo upoštevati tudi

druge biološke lastnosti, kot so protitelesna specifičnost, razpon gostiteljev, specifičnost prenašalcev ter druge manj ohranjene gene, kot so *rpsV* (*rpl22*), *rpsC* (*rps3*), *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *tuf*, *secA*, *secY*, *nus*, *vmp1*, *stamp*, *groEL*, *rpoB*, *potC* in geni 23S rRNA, ter vmesna regija med 16S in 23S rRNA (Marcone, 2014; Duduk in Bertaccini, 2011).

Za genotipizacijo fitoplazem se veliko uporablja gene neribosomskih proteinov, predvsem *tuf* in druge bolj polimorfne gene, kot je *vmp1* (Schneider in sod., 1997; Fialova in sod., 2009). Gen *tuf* kodira elongacijski faktor Tu (EF-Tu) in ima glavno vlogo pri prevajjanju (Schneider in sod., 1997). Fitoplazme imajo kompleksen življenjski cikel v žuželčjih vektorjih, kar vključuje pritrditev in invazijo v celice črevesnega epitelija in žlez slinavk, kot tudi trofične interakcije med znotrajceličnem pomnoževanjem. Površinski proteini imajo zato verjetno veliko vlogo pri procesu vdiranja. Eden izmed takih proteinov je Vmp1, ki kaže večjo raznolikost v primerjavi z vzdrževalnimi geni. Proteina nima ‚Ca. P. asteris‘, je pa malo podoben variabilnemu površinskemu proteinu bakterije *Mycoplasma agalactiae* (Pacifico in sod., 2009).

#### **2.1.4 Epidemiologija**

Epidemiologija rastlinskih bolezni, ki se prenašajo z žuželkami, temelji na interakciji med prenašalcem, patogenom in rezervoarjem za razmnoževanje patogena, pri katerem pa ne pride nujno do bolezni (Maixner in sod., 2014).

Fitoplazme se ohranjajo s kroženjem med zelnatimi rastlinami in prenašalcem (Johannesen in sod., 2012). Epidemiologija teh patogenov je neposredno odvisna od vrste žuželke in njenega načina življenja, ki vključuje fazo mirovanja, specifičnost rastlinskih gostiteljev, preference hrانjenja, načine hrانjenja (polifagni ali monofagni) in zmožnosti razširjanja (Cvrkovič in sod., 2014; Johannesen in sod., 2008). Ozek spekter gostiteljev vodi k bolj specializiranim ciklom prenosa, polifagni prenašalci pa raznašajo patogene na več gostiteljev ali različne patogene k specifičnemu gostitelju. Širok razpon gostiteljev lahko vodi v prenos na neoptimalnega in nerezervoarnega gostitelja (Johannesen in sod., 2012). Polifagni prenašalci imajo sicer veliko gostiteljskih rastlin, na katerih se hranijo, vendar pa nabor gostiteljskih rastlin v določenih območjih omejujejo geografske in podnebne značilnosti (Imo in sod., 2013). Zlasti spremenjanje slednjih lahko vodi do vključevanja novih rastlin v prehrano polifagnih prenšalcev in ima lahko resne posledice za razširitev žuželk in z njimi rastlinskih patogenov na nova območja. Če se spekter gostiteljev razširi, se lahko poveča možnost za gensko izmenjavo med sevi patogena. Nasprotno, omejevanje nabora gostiteljev vodi v zelo specifične cikle prenosa (Imo in sod., 2013).

## **2.2 BOLEZNI TRSNIH RUMENIC**

Na trti fitoplazme povzročajo hude in po celem svetu prisotne bolezni, znane kot trsne rumenice. Čeprav jih povzročajo različne fitoplazme, imajo okužene rastline podobna bolezenska znamenja, kot so vihanje, lomljivost in rumenenje ozziroma rdečenje listov,

neenakomerne olesenitve trsa in sušenje grozdov. Lahko pride do nekroze listov in cepljenja lubja. Bolezenska znamenja se ponavadi pokažejo pozno spomladi ali poleti, nekateri trsi lahko tudi odmrejo (Mehle in sod., 2011).

Najpomembnejši bolezni v glavnih vinorodnih območjih v Evropi sta zlata trsna rumenica (flavescence dorée, FD) in navadna trsna rumenica ali počrnelost lesa (bois noir, BN) (Bertaccini in sod., 2014). Zlato trsno rumenico povzroča fitoplazma iz skupine brestovih rumenic (16SrV), ki je uvrščena na evropski karantenski seznam rastlinam škodljivih organizmov II.A.II (Council Directive 2000/29/EC, 2000). Fitoplazmo, ki povzroča FD (FDp), so prvič določili v 1950-ih letih na jugozahodu Francije, od koder se je nato razširila na druga vinorodna območja Francije (Angelini in sod., 2001) in severne Italije (Martini in sod., 1999). Ugotovljena je bila tudi v Španiji (Batlle in sod., 1997), na Portugalskem (Sousa in sod., 2011), v Srbiji (Krnjajić in sod., 2007), Švici (Schaerer in sod., 2007), na Hrvaškem (Plavec in sod., 2015), Avstriji (Reisenzein in sod., 2011), na Madžarskem (EPPO, 2013) in v Sloveniji (Mehle in sod., 2011).

V zadnjih letih se povečuje pojavljanje fitoplazme ‚*Ca. P. solani*‘, ki povzroča BN, predvsem na področjih, kjer ni fitoplazme FD (Bertaccini in sod., 2014; Berger 2009b). Leta 1961 (Belli in sod., 2010) je Caudwell opisal bolezen pod imenom »bois noir«. Sprva se je pojavljala na severu Francije z bolezenskimi znamenji, podobnimi FD, le da se je širila počasneje, zato so mislili da je le neepidemična oblika FD. Čez 10 let pa so ugotovili, da je ta bolezen različna od rumenice tipa FD, saj njenega povzročitelja ne prenaša ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball). Čez nekaj let so podobna bolezenska znamenja opazili tud v Nemčiji, kjer so jo poimenovali ‖Vergilbungskrankheit‖ (VK). Leta 1994 je Maixner eksperimentalno pokazal prenosljivost bolezni s svetlečim škržatkom (*Hyalesthes obsoletus*). Pozneje so o tej bolezni poročali tudi iz Romunije, Italije, Izraela, Grčije, Čila, Avstralije, ZDA in drugih vinorodnih območij po Evropi (Belli in sod., 2010). V naslednjih desetletjih so se pojavile še druge bolezni, podobne FD in BN (Belli in sod., 2010), ki jih povzročajo druge fitoplazme kot so ‚*Ca. P. asteris*‘ (16SrI-B) v Italiji in Južni Afriki, ‚*Ca. P. fraxini*‘ (16SrVII-A) v Čilu, in ‚*Ca. P. australiense*‘ v Avstraliji (16SrXII-B) (Bertaccini in sod., 2014).

### **2.2.1 Posledice okužbe**

Trta je občutljiva za okužbo s fitoplazmami. Bolezenska znamenja so pri občutljivih sortah močna, pri tolerantnih sortah pa milejša. Popolnoma odporna sorta na fitoplazme ni znana (Albertazzi in sod., 2009).

Trsnih rumenic ne moremo ločiti med seboj po bolezenskih znamenjih, saj so si ta zelo podobna. Do razlik lahko pride le na specifičnih sortah ali v nekaterih fazah rasti. Zgodaj spomladi okužene trte lahko nepravilno odženejo, v začetku poletja se nato listi začnejo obračati navzdol in postanejo klorotični do rumeni v belih sortah in vijolično rdeči v rdečih sortah. Nenormalno razbarvanje je lahko omejeno le na področje okrog glavnih žil, ali na dele listne ploskve. Razbarva se lahko celotna listna ploskev, ki kasneje postane debelejša

in krhka (Belli in sod., 2010). Do teh učinkov pride, ker okužba s fitoplazmo povzroči inhibicijo in znižanje učinkovitosti fotosinteze in metabolizma sladkorjev, kar zmanjša količino klorofila v listih (Hren in sod., 2009). Grozdi se začnejo sušiti, trs zori neenakomerno, zato se povesi, pri nizkih temperaturah pozimi pa počrni (od tod ime počrnelost lesa, iz fr. "bois noir"). Bolezenska znamenja se ne pojavijo nujno na celotni trti, ampak so lahko omejena le na en del. Poleg značilnih bolezenskih znamenj se lahko pojavijo tudi druga, odvisno od sorte, fiziološkega stanja okuženega trsa, okoljskih in rastnih razmer. Tako lahko rastlina kasneje odžene, zaostane v rasti, pride do nekroze mladih poganjkov, krajšanja internodijev in nekroze socvetij. Pri občutljivih sortah in večkratni okužbi lahko trsi odmrejo. Okužene so lahko tudi trsne cepljenke, pri katerih so redko vidna bolezenska znamenja in lahko predstavljajo vir kontaminacije za nove vinograde in za nova geografska območja (Belli in sod., 2010). Podobna bolezenska znamenja lahko povzročijo tudi drugi biotski in abiotski dejavniki, kot je na primer stres. Okužba s fitoplazmami prizadane vitalnost rastlin, posledično je pridelek manjši in kakovost vina slabša (Endeshaw in sod., 2012). Za trsne rumenice so značilni nenadni izbruhi bolezni, katerim sledi endemično obdobje s konstantno ali zmanjšano stopnjo bolezni. Včasih pride tudi do t.i. ozdravitve, ko bolezenskih znamenj na rastlini ne opazimo več. (Maixner in sod., 2011; Albertazzi in sod., 2009).

## 2.3 FITOPLAZMA 'Ca. P. Solani' IN POČRNELOST LESA

### 2.3.1 Počrnelost lesa ali navadna trsna rumenica

Trsna rumenica tipa počrnelosti lesa (BN) (sinonimi: Legno nero v Italiji in Vergilbungskrankheit v Nemčiji) je bolezen vinske trte, ki povzroča velike izgube v vinogradništvu, o čemer poročajo zlasti v zadnjih letih (Cvrković in sod., 2014; Quaglino in sod., 2009).

BN se pojavlja od Španije (Sabate in sod., 2007) do Ukrajine (Milkus in sod., 2005) in od Nemčije (Langer in Maixner, 2004) in Francije (Pacifico in sod., 2009) do Turčije (Canik in sod., 2011) ter Irana (Mirchenari in sod., 2015). Bolezen je zelo razširjena na Madžarskem na divjih rastlinah, trti in razhudnikovkah (Acs in sod., 2010). Prisotna je na Hrvaškem, tudi v Bosni in Hercegovini, Črni gori in Srbiji (Duduk in sod., 2004; Radonjić in sod., 2009), v Italiji je razširjena po vsej državi (Belli in sod., 2010).

V Sloveniji je BN prisotna že od leta 1983, ko so jo na sorti Chardonnay zaznali v Goriških brdih in v spodnji Vipavski dolini. Predvidevajo, da se je bolezen k nam razširila iz Furlanije Julijske krajine. V vzhodni Sloveniji so jo opazili konec osemdesetih let (Seljak in Osler, 1997). Dosedanje laboratorijske analize vzorcev vinske trte so pokazale, da je prisotna po vseh vinorodnih deželah Slovenije in da je med trsnimi rumenicami najbolj razširjena (Mehle in sod., 2011).

### 2.3.2 Žuželčji prenašalci in gostiteljske rastline

Glavni prenašalec fitoplazme '*Ca. P. solani*' je polifagni svetleči škržatek, ki je prisoten v osrednji in južni Evropi ter na Bližnjem vzhodu (Berger in sod., 2009a). Primarno je sredozemska vrsta, ki se je razširila na vzhod do Turčije, Irana, Afganistana, Kazahstana, Tadžikistana, in Uzbekistana, najbolj severno pa do kserotermnih habitatov (s toplim in suhim podnebjem) jugozahodne Nemčije in severne Francije, predvsem v vinograde na pobočjih rečnih dolin. Do pred 25 leti je bil v teh severnih območjih prenašalec redek in večinoma povezan z njivskim slakom. Danes je zelo razširjen in sovpada s širitevijo gostiteljskih rastlin na veliko koprivo (Johanessen in sod., 2012; Cvrković in sod., 2014). V Evropi ima ta žuželka eno generacijo, dve generaciji letno pa ima v Izraelu (Maixner, 2007). Poleti oplojene samice odlagajo jajčeca na vrhnje plasti prsti, v bližino korenin zelnatih rastlin, kjer se larve hranijo. Odrasle žuželke se nato pomaknejo navzgor po rastlini in se hrani na različnih zelnatih vrstah. Trajanje letenja žuželk je odvisno od temperatur spomladi in gostiteljskih rastlin (Kessler in sod., 2011), v Evropi traja od junija do sredine avgusta (Bressan in sod., 2007).

'*Ca. P. solani*' okužujejo veliko rastlin, tako zelnatih kot lesnatih. Med njimi so naravní rezervoarji patogena le tiste, na katerih se razmnožuje in razvija svetleči škržatek. Pogosto so okužene rastline kot sta pasje zelišče (*Solanum nigrum*) in srhodlakavi ščir (*Amaranthus retroflexus*), saj se na njih hrani odrasli prenašalci. Kljub temu te rastline za epidemiologijo BN niso pomembne, ker so enoletnice (Maixner, 2011). Epidemiološko pomembne gostiteljske rastline so le trajnice, saj juvenilne faze svetlečega škržatka po hibernaciji pridobijo fitoplazme iz njihovih korenin. Glavni gostiteljski rastlini svetlečega škržatka in rezervoarja '*Ca. P. solani*' v evropskih vinogradih sta njivski slak (*Convolvulus arvensis*) in velika kopriva (*Urtica dioica*). Znamenja bolezni so vidna le na njivskem slaku, ne pa tudi na veliki koprivi in na prenašalcu, kar kaže na dolg skupen evolucijski odnos (Johanessen in sod., 2012). V njivskem slaku in veliki koprivi se pojavljata specifična seva '*Ca. P. solani*' (Kaul in sod., 2009). Prenašalci so v več kot 95 % okuženi s sevom '*Ca. P. solani*', ki je prisoten tudi na gostiteljski rastlini, na kateri so se hrani (Johhanesen in sod., 2012). Geografsko območje svetlečega škržatka se prekriva z geografsko razširjenostjo BN (Cvrković in sod., 2014). Populacije svetlečega škržatka, ki živijo na njivskem slaku, so, zaradi zamika v času letenja, ločene od tistih ki živijo na veliki koprivi. Obstajajo tudi regionalne razlike zaradi različnih preferenc svetlečega škržatka do gostiteljskih rastlin (Maixner in sod., 2007).

Nimfe svetlečega škržatka se lahko razvijajo tudi na drugih zelnatih rastlinah. V Franciji se preferenčno razvijajo na plotnem slaku (*Calystegia sepium*), njivskem slaku, pravi sivki (*Lavandula angustifolia*), draguši (*Lepidium draba*) in veliki koprivi, odrasle pa so našli tudi na vednozelenem trpotcu (*Plantago cynops*), madronščici (*Linaria striata*), lakoti (*Galium verum*), in kraškem šetraju (*Satureia montana*) (Kessler in sod., 2011). V Nemčiji sta najpomembnejši gostiteljski rastlini njivski slak in velika kopriva, a se nimfe včasih razvijejo tudi na plotnem slaku in gomoljasti zlatici (*Ranunculus bulbosus*). V Italiji so

opazovali odrasle živali na ambroziji (*Ambrosia artemisiifolia*), pelinu (*Artemisia vulgaris*), vratiču (*Tanacetum vulgare*), njivskem in plotnem slaku ter veliki koprivi, a so se nimfe razvile le na zadnjih štirih (Kessler in sod., 2011). V Izraelu je najljubša gostiteljska rastlina svetlečega škržatka konopljika (*Vitex agnus-castus*), a so odrasle živali našli tudi na srhodlakavem ščiru, njivskem slaku, mirti (*Myrtus communis*), oljki (*Olea europaea*) in vinski trti (Kessler in sod., 2011). V splošnem je bil do vročega in sušnega poletja 2003 v osrednji Evropi najljubši gostitelj svetlečega škržatka njivski slak, od takrat pa se povečujejo populacije na veliki koprivi (Kessler in sod., 2011; Boudon-Padieu in Maixner, 2007).

‘*Ca. P. solani*’ verjetno prenašajo tudi drugi prenašalci, saj se navadna trsna rumenica pojavlja tudi na območjih, kjer svetleči škržatek ni prisoten (Cvrković in sod., 2014). Nedavno so v laboratorijskih razmerah pokazali, da panzerjev mrežekrili škržatek (*Reptalus panzeri*) učinkovito prenaša ‘*Ca. P. solani*’ na vinsko trto (Cvrković in sod., 2014). Pogosta vrsta v vinogradih v Avstriji je polifagna žuželka *Anaceratagallia ribauti*. Predvidevajo, da prenaša ‘*Ca. P. solani*’ iz ene gostiteljske rastline, predvsem njivskega slaka, ki je v Avstriji najpogostejši vir inokuluma, do drugih rastlin v vinogradu. Ker so potencialno okužene žuželke prisotne v vinogradih celo leto, je lahko že majhno število teh pomembno. Je pa to dokaj neaktivna vrsta, ki ne leti dolgih razdalj, zato samo ta vrsta verjetno ni odgovorna za raznos ‘*Ca. P. solani*’ (Riedle-Bauer in sod., 2008).

Epidemiologija BN je neposredno povezana z obema gostiteljskima rastlinama ‘*Ca. P. solani*’ – njivskim slakom in veliko koprivo, ne pa tudi z vinsko trto, saj je to končna gostiteljska rastlina, nanjo jo svetleči škržatek prenese pri hranjenju, a se na njej ne razmnožuje in ne razvija (Imo in sod., 2013; Johannessen in sod., 2008). V zadnjih 15 letih se je BN v Evropi zelo razširila, saj v nekaterih območjih stopnja okužbe dosega 50-80 % (Johannessen in sod., 2008). Bolezen je običajno endemična, v nekaterih primerih pa lahko pride tudi do hujših epidemij, kot je to v Italiji v zadnjih 15 letih (Santi in sod., 2013; Belli in sod., 2010). Prisotnost fitoplazme ‘*Ca. P. solani*’ v vinogradih med sezonomi niha, saj fitoplazmo prenaša prenašalec, katerega prisotnost je zelo odvisna tudi od okoljskih razmer (npr. prisotnosti gostiteljskih rastlin, vlažnosti) (Botti in Bertaccini, 2007).

Fitoplazma ‘*Ca. P. solani*’ okužuje tudi druge rastline in povzroča rdečenje koruze, rumenice na sivki (Aryan in sod., 2014; Johannessen in sod., 2012), krompirju, paradižniku, jajčevcih, popru, tobaku, peteršilju, korenju, jagodi, sladkorni pesi in navadnem poprovniku (Kessler in sod., 2011).

### **2.3.3 Taksonomska uvrstitev ‘*Ca. P. solani*’ in genotipizacija**

Vrsto ‘*Ca. P. solani*’ uvrščamo v taksonomsko podskupino 16SrXII (stolbur), in sicer v podskupino A (Langer in Maixner, 2004). Sevi fitoplazem, ki povzročajo počrnelosti lesa v gojenih vinskih trtah, so poleg sevov, ki povzročajo bolezen stolbur na krompirju, paradižniku in papriki, ter rdečenje koruze, uvrščeni v vrsto ‘*Ca. P. solani*’. Znotraj skupine 16SrXII so opisane še tri vrste: ‘*Ca. P. australiense*’, ki okužuje vinsko trto in druge

rastlinske gostitelje v Avstraliji in na Novi zelandiji, ‚*Ca. P. japonicum*‘, ki okužuje japonske hortenzije na Japonskem, in ‚*Ca. P. fragariae*‘, ki okužuje jagode v Evropi (Quaglino in sod., 2013).

Za boljše razumevanje epidemiologije ter nadzor nad bolezni jo uporabljamo več molekularnih označevalcev na ohranjenih regijah DNA ter bolj variabilnih, kot sta *stamp* in *vmp1* (Oliveri in sod., 2015). Z analizo RFLP gena *tuf* lahko med sevi ‚*Ca. P. solani*‘ opredelimo dva glavna genska podtipa – tuf-a in -b ter dodatno še tip tuf-c. Domnevno so ti podtipi tuf povezani z naravnim epidemičnim ciklom fitoplazme ‚*Ca. P. solani*‘. Sevi s podtipom tuf-a naj bi bili vključeni v epidemični cikel, ki vključuje veliko koprivo kot glavno zelnato gostiteljsko rastlino, sevi tuf-b pa v cikel, v katerem prevladuje njivski slak. Seve s podtipom tuf-b so našli tudi na drugih zelnatih rastlinah, kar kaže na to, da je ta podtip manj specifičen do gostiteljskih rastlin. Podtip tuf-c je povezan s plotnim slakom, a so ga do sedaj našli le na področju doline Mosel v Nemčiji (Aryan in sod., 2014; Langer in Maixner, 2004; Berger in sod., 2009a).

Pojavljajo se razlike v geografski porazdelitvi podtipov tuf. Sevi tuf-a so najpogosteje prisotni v severozahodnem delu Evrope (Francija, Švica), kjer so tudi epidemični, sevi tuf-b pa so najpogosteje na jugozahodu in vzhodu (Cvrković in sod., 2014). V Nemčiji in Avstriji prevladuje podtip tuf-b, čeprav so pred približno desetimi leti v Nemčiji opazili porast sevov podtipa tuf-a (Maixner in sod., 2007). V Avstriji glavni epidemiološki cikel vključuje kot glavnega gostitelja veliko koprivo, v kateri so našli le genotip, ki ustreza podtipu tuf-b (Arjan in sod., 2014). V Italiji prevladuje podtip tuf-a, vendar od leta 2003 poročajo o širjenju podtipa tuf-b na severu Italije (Berger in sod., 2009a). Na Hrvaškem sta prisotna oba podtipa, prevladuje pa podtip tuf-b (Šeruga Musić in sod., 2011).

Molekulska raznolikost sevov ‚*Ca. P. solani*‘ se še poveča z analizo RFLP gena *vmp1*, ki kodira membranski protein (Murolo in sod., 2010). Do sedaj so identificirali 23 (Murolo in sod., 2015) različnih genotipov tega gena, ni pa še jasno, kako so te različice povezane z različnimi gostitelji in epidemiologijo (Murolo in sod., 2010).

Poleg teh dveh genov se za ugotavljanje genetske raznolikosti ‚*Ca. P. solani*‘ uporablja tudi neribosomski vzdrževalni gen *secY*, ki kodira glavno membransko enoto v sekretorni poti (Šeruga Musić in sod., 2011; Cimerman in sod., 2009; Fialova in sod., 2009), *tufB* (Šeruga Musić in sod., 2011) ter gene za membranske proteine, kot je *stamp* (Arjan in sod., 2014; Atanasova in sod., 2015; Cvrković in sod., 2014; Fabre in sod., 2011).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

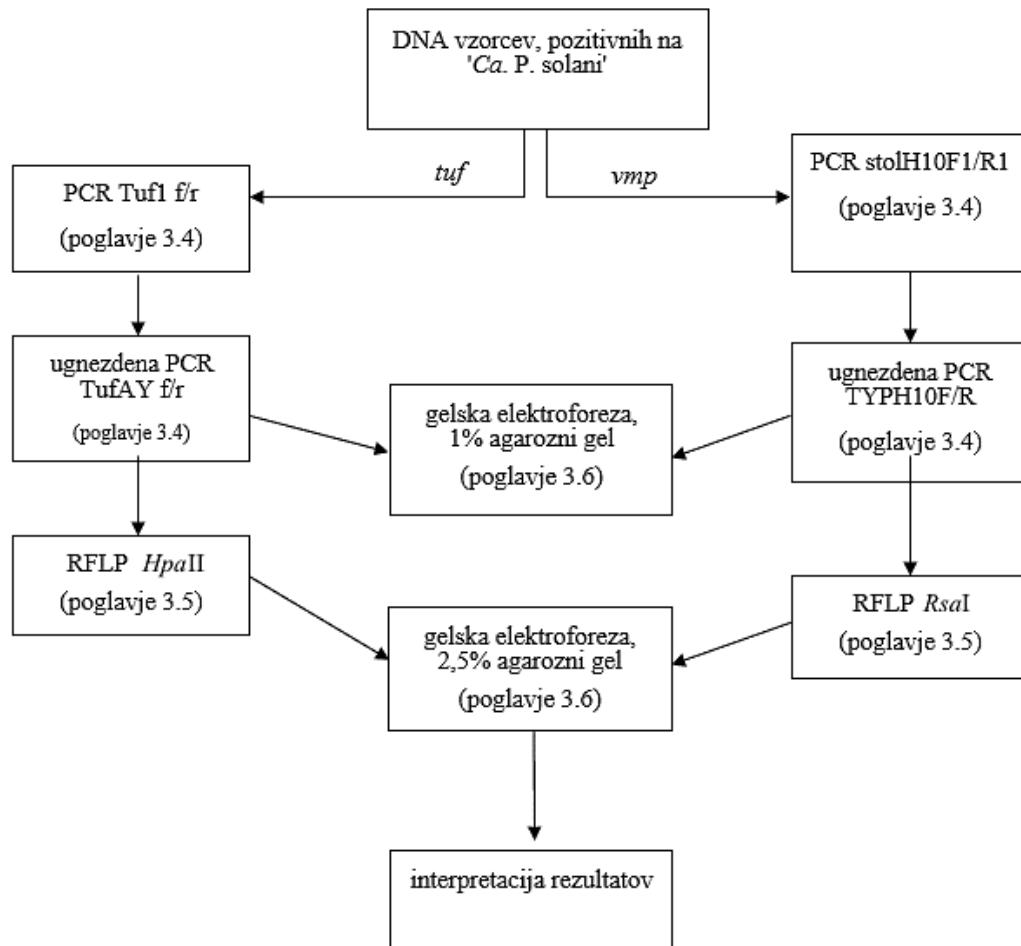
Vzorci žuželk (en vzorec je bil sestavljen iz do 10 osebkov, nabranih v enem nasadu), vinske trte (*Vitis vinifera*) (en vzorec je bil sestavljen iz do 5 trsov iz istega nasada) in drugih rastlin z bolezenskimi znamenji iz vseh vinorodnih območij Slovenije so bili predhodno analizirani s PCR v realnem času po postopku Hren in sod., 2007 (podrobni protokol izolacije DNA in analize s PCR v realnem času je opisan v Mehle in sod., 2013a in 2013b) v okviru posebnega nadzora, ki ga koordinira Uprava Republike Slovenije za veterinarstvo, varno hrano in varstvo rastlin.

#### 3.2 REFERENČNI VZORCI DNA FITOPLAZME BN

Dr. Günter Brader iz Avstrije (Austrian Institute of Technology) nam je odstopil vzorce DNA fitoplazme '*Ca. P. solani*', ki so že bili uvrščeni v enega izmed podtipov tuf in smo jih tako uporabili kot referenčno kontrolo za primerjavo cepitvenih profilov (oznaka vzorcev v zbirkki NIB: NIB F90 - NIB F95).

#### 3.3 PREGLED METOD

Molekulska raznolikost izolatov (besedo izolat smo v tej nalogi uporabili kot poimenovanje za vzorce DNA fitoplazme '*Ca. P. solani*', in ne kot čiste kulture fitoplazme) fitoplazme smo določali na vzorcih vinske trte nabranih v Sloveniji v letih 2007 in 2013, ter na vzorcih iz drugih rastlin in žuželk, ki so bili že predhodno opredeljeni kot pozitivni na '*Ca. P. solani*'. Shema postopka ugotavljanja molekulske raznolikosti na genu *tuf* in *vmp* je prikazana na sliki 2.



Slika 2: Shema ugotavljanja molekulske raznolikosti izolatov 'Ca. P. solani' na genu *tuf* in *vmp*.

### 3.4 REAKCIJE PCR

#### Material

- Aparatura PCR System 9700 geneamp PCR Cycler, Applied biosystems
- Centrifuga Sigma 3-18ks
- Vrtinčnik Biosan multispin vortex
- Sterilna bidestilirana voda (bd H<sub>2</sub>O)
- Avtomatske pipete
- Sterilni nastavki s filtri za pipete
- Zamrzovalnik (-20 °C)
- Komora za pripravljanje reakcijskih mešanic za PCR: BIOSAN DNA/RNA cleaner UVT-S-AR
- Komora za delo s PCR produkti: EHRET, BIOSAFE 2

- Komora za dodajanje DNA: BIOSAN DNA/RNA cleaner UVC/T-M-AR
- Sterilne mikrocentrifugirke (2 ml) (za pripravo reakcijskih mešanic)
- Sterilne mikrocentrifugirke (0,2 ml) ali ploščice s 96 luknjicami za PCR
- Rokavice
- Polistirenska posoda z ledom
- Stojalo za mikrocentrifugirke
- Odlagalnik za odpadke
- Kemikalije:
  - Oligonukleotidni začetniki so navedeni v preglednici 1 (proizvajalec oligonukleotidnih začetnikov: IDT)
  - dNTP mix: vsak 10mM, Promega, kat. št. C1145
  - Polimeraza: GoTaq flexi DNA polimeraza, kat. št. M8306 in M7806, Promega
  - 25mM MgCl<sub>2</sub>, Promega
  - Pufer: 5x Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffer, Promega

Preglednica 1: Pregled oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih v nalogi.

Oligonukleotidi začetnik*	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Tarča	Produkt PCR	Vir
<b>Tuf1f</b>	CACATTGACCACGGTAAAAC			Schneider in sod., 1997;
<b>Tuf1r</b>	CCACCTTCACGAATAGAGAAC	gen <i>tuf</i>	1085 bp	Altschul in sod., 1990
<b>TufAYf</b>	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA			Schneider in sod., 1997
<b>TufAYr</b>	CGTTGTCACCTGGCATTACC	gen <i>tuf</i>		
<b>StolH10F1</b>	AGGTTGTAAAATCTTTATGT	gen		Fialova in sod., 2009,
<b>StolH10R1</b>	GCGGATGGCTTTCATTATTTGAC	<i>vmp1</i>		Cimerman in sod., 2009; Altschul in sod., 1990
<b>TYPH10F</b>	AACGTTCATCAACAATCAGTC	gen	1200-1800	Fialova in
<b>TYPH10R</b>	CACTTCTTCAGGCAACTTC	<i>vmp1</i>	bp	sod., 2009

\*f oz. F je oznaka za smiseln oligonukleotidni začetnik, r oz. R pa oznaka za protismisleni oligonukleotidni začetnik.

## Metode

Vse reakcije PCR smo izvedli po sledečem postopku:

- V komori za pripravo reakcijskih mešanic smo pufer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-je in oligonukleotidne začetnike, odtalili, zvrtinčili ter centrifugirali. Polimerazo smo do uporabe hranili v zamrzovalniku.
- V sterilni mikrocentrifugirki smo pripravili mešanico za vse vzorce in kontrole kot je navedeno v preglednici 2.
- Pripravljeno reakcijsko mešanico smo dobro zvrtinčili, centrifugirali in razdelili po 24 µl v mikrocentrifugirke za PCR ali ploščice (mikrocentrifugirke oziroma ploščico s pripravljeno mešanico smo imeli ves čas dela na ledu).
- V komori za dodajanje DNA smo dodali v reakcijsko mešanico 1 µl DNA vzorcev, ki smo ga predhodno odtalili in zvrtinčili. V primeru ugnezdenie PCR smo (v komori za dodajanje pomnožkov PCR) v reakcijsko mešanico dodali 1 µl 30x razredčenega pomnožka PCR. Pri vzorcih, pri katerih je bila uspešnost pomnoževanja genov slaba, smo ponovili poskus in za ugnezdeno PCR dodali neredčen pomnožek PCR.
- Pri vsaki seriji reakcij PCR smo pripravili tudi negativno kontrolo reakcije PCR (NKP). Pripravili smo jo tako, da smo mešanici za reakcijo PCR namesto DNA dodali 1 µl bidestilirane vode pri reakciji PCR in ugnezdeni PCR.
- Reakcijske mešanice z DNA oziroma pomnožki PCR smo zvrtinčili in centrifugirali.
- Reakcija PCR je potekala v termobloku po programu navedenem v preglednici 3.
- Uspešnost pomnoževanja ugnezdenie PCR smo preverili z 1 % agarozno gelsko elektroforezo (poglavlje 3.6). Na gel smo nanesli 10 µl pomnožka, elektroforeza pa je potekala pri 100 V 30 min.

Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za reakcije PCR za vse pare oligonukleotidnih začetnikov.

Reakcijska mešanica PCR	Končna koncentracija	µl za 1 reakcijo
<b>BdH2O</b>		14,88
<b>5x GoTaq Flexi pufer (Promega)</b>	1x	5
<b>dNTP mix (10 mM vsak)</b>	200 µM	0,5
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1,5 mM	1,5
<b>Smiselni ologonukleotidni začetnik (10 µM)</b>	0,4 µM	1
<b>Protismiselni oligonukleotidni začetnik (10 µM)</b>	0,4 µM	1
<b>5U/µl GoTaq DNA polimeraza (Promega)</b>	0,6 U	0,12

<b>Skupaj</b>	24 µl
---------------	-------

Preglednica 3: Pregled programov reakcij PCR za vse pare oligonukleotidnih začetnikov.

	<b>PCR Tuf1f/r1</b>	<b>Ugnezdena PCR TufAYf/r</b>	<b>PCR StolH10F1/R1</b>	<b>Ugnezdena PCR TYPH10F/R</b>
<b>Začetna denaturacija</b>	94 °C/ 4 min	94 °C/ 4 min	94 °C/ 4 min	94 °C/ 4 min
<b>Denaturacija</b>	94 °C/ 30 s	94 °C/ 30 s	94 °C/ 30 s	94 °C/ 30 s
<b>Vezava začetnikov</b>	45 °C/ 30 s	53 °C/ 30 s	52 °C/ 30 s	55 °C/ 30 s
<b>Podaljševanje</b>	72 °C/ 1 min	72 °C/ 1 min	72 °C/ 2 min	72 °C/ 2 min
<b>Število ciklov</b>	35	35	35	35
<b>Končno podaljševanje</b>	72 °C/ 7 min	72 °C/ 7 min	72 °C/ 7 min	72 °C/ 7 min
<b>Končna inkubacija</b>	4 °C/ ∞	4 °C/ ∞	4 °C/ ∞	4 °C/ ∞

### 3.5 ANALIZA POLIMORFIZMA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV (RFLP)

#### Materiali in naprave

- Aparatura PCR System 9700 geneamp PCR Cycler
- Centrifuga Sigma 3-18ks
- Vrtinčnik Biosan multispin vortex
- Sterilna bidestilirana voda (bd H<sub>2</sub>O)
- Avtomatske pipete
- Sterilni nastavki s filtri
- Rokavice
- Zamrzovalnik (-20 °C)
- Komora za pripravljanje reakcijskih mešanic za PCR: BIOSAN DNA/RNA cleaner UVT-S-AR
- Komora za delo s pomnožki PCR: EHRET, BIOSAFE 2
- Mikrocentrifugike
- Polistirenska posoda z ledom

- Stojalo za mikrocentrifugirke
- Odlagalnik za odpadke
- Kemikalije:
  - Restrikcijski encim *HpaII*, Time-Saver™, CutSmart™, Recombinant, 10.000 U/ml, kat. št. R0171L, New England Biolabs.
  - Restrikcijski encim *RsaI*, Time-Saver™, CutSmart™, Recombinant, 10.000 U/ml, kat. št. R0167L, New England Biolabs.
  - Reakcijski pufer, 10x NEB Buffer, New England Biolabs.

## Metoda

- V komori za pripravljanje reakcijskih mešanic za PCR smo odtalili pufer, ga zvrtinčili in centrifugirali. Encim smo do uporabe hranili v zamrzovalniku.
- V sterilni mikrocentrifugirki smo za vse vzorce in kontrole pripravili reakcijsko mešanico kot je navedeno v preglednici 4, razen ugnezdeni pomnožek, ki smo ga dodali kasneje v komori za dodajanje pomnožkov PCR. Cepitvena mesta za encima *HpaII* in *RsaI* so prikazana na slikah 3 in 4.
- Pripravljeni mešanici smo premešali z obračanjem in centrifugirali, ter razdelili po 40 µl v mikrocentrifugirke za PCR, ki so bile ves čas dela na ledu.
- V komori za dodajanje pomnožkov PCR smo pripravljeni mešanici dodali 10 µl ugnezdnega pomnožka PCR, premešali in centrifugirali.
- Reakcijske mešanice smo inkubirali 10 min (priporočen čas glede na navodila proizvajalca: 5-15 min) pri 37 °C.
- Fragmente smo ločili na 2,5 % agaroznem gelu (poglavlje 3.6), in sicer smo nanesli 20 µl pomnožka, elektroforeza pa je potekala 90 min pri 100 V.

Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za analizo RFLP z encimom *RsaI* ali *HpaII*.

<u>Za 1 reakcijo</u>	
<b>Bd H2O</b>	34 µl
<b>10x pufer</b>	5 µl
<b>Encim</b>	1 µl
<b>Ugnezdjeni pomnožek PCR</b>	10 µl



Slika 3: Cepitveni mesti za encim *HpaII* (HpaII datacard, 2015).



Slika 4: Cepitveni mesti za encim *RsaI* (RsaI datacard, 2015).

### 3.6 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

To metodo smo uporabili za preverjanje uspešnosti pomnožitve ugnezdenega pomnožka PCR, ter za ločevanje fragmentov po cepitvi pomnožka PCR z encimi.

#### **Materiali in naprave:**

- Nitrilne rokavice
- Mikrovalovna pečica
- Parafilm
- Sterilna bidestilirana voda
- Pipete z nastavki
- Erlenmajerice
- Banjica za elektroforezo, Biorad, Sub-cell GT
- Glavniki in nosilci za gele, Biorad
- Vir električne napetosti, Biorad Powerpack 3000
- Računalnik povezan z napravo za slikanje gelov
- UV transiluminator: sistem za slikanje gelov, Biosystematica, UVI prosystem.
- Tehnica Santorius BP 310 S
- Kemikalije:
  - Raztopina etidijevega bromida, 10 mg/ml
  - Dolžinski standard, GeneRuler 100 bp DNA ladder plus, MBI fermentas, Thermo scientific
  - Agaroza, Sigma, A-9539
  - 6x koncentrirani nanašalni pufer (za 25 ml: 0,05 g bromfenol modro, 0,05 g xylene cyanol FF, 4,76 ml glicerol, 20 ml bidestilirane vode)
  - pufer TAE (za 1000 ml 50x koncentriran pufer TAE: 242 g Tris-base, 57,1 ml ledocetna kislina, 100 ml 0,5 EDTA (pH 8,0))

#### **Metoda**

- Priprava agaroznega gela: glede na število vzorcev smo pripravili agarozne gele različnih velikosti v ustreznih nosilcih (pregl. 5). Koncentracijo agaroznega gela smo prilagodili dolžini fragmentov, ki smo jih pričakovali na gelu (za večje fragmente 1% in za manjše fragmente 2,5 % agarozni gel). Agarozo smo raztopili v 1x pufru TAE, jo ohladili in dodali etidijev bromid, premešali, ter razlili po nosilcu z glavničkom. Preverili smo, da ni mehurčkov in pokrili z aluminijsto folijo, ter

počakali da se je gel strdil. Strjeni gel smo skupaj z nosilcem postavili v elektroforezno banjico s pufom TAE, da je ta prekril gel, ter odstranili glavnice.

- Nanos vzorcev na gel: na parafilmu smo vzorcu primešali nanašalni pufer. Dolžinski standard smo pripravili tako, da smo kapljici nanašalnega pufra dodali 1  $\mu\text{l}$  dolžinskega standarda in eno kapljico bd vode.
- Elektroforezno banjico smo pokrili s pokrovom, priključili na vir električne napetosti in vnesli ustrezne parametre (100 V in 30 oz. 90 minut).
- Po končani elektroforezi smo gele slikali s pomočjo UV transiluminatorja.

Preglednica 5: Sestava agaroznega gela glede na velikost banjice.

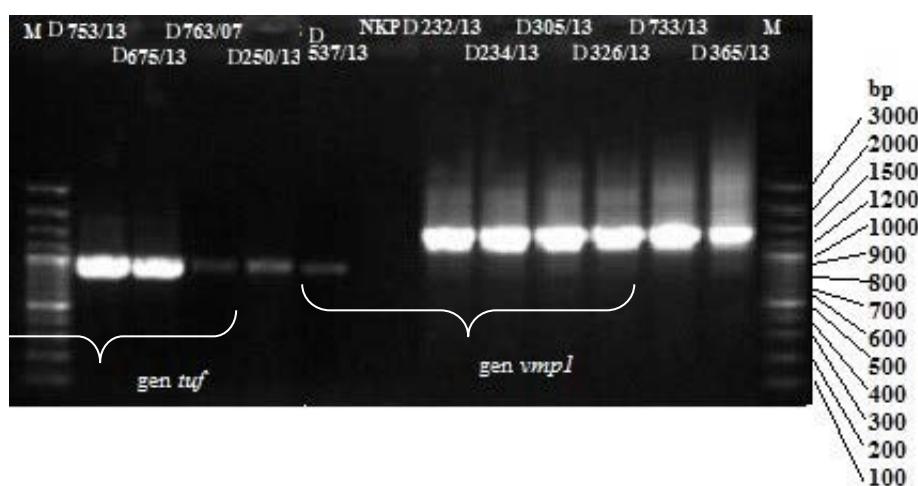
Nosilec gela	1x pufer TAE (ml)	Agaroza (g) za 1 % agarozni gel	Agaroza (g) za 2,5 % agarozni gel	Etidijev bromid ( $\mu\text{l}$ )
<b>Manjši za malo banjico</b>	40	0,4	1	2
<b>Večji za malo ali manjši za srednjo banjico</b>	60	0,6	2,5	3
<b>Večji za srednjo banjico</b>	100	1	1,5	5
<b>Večji za veliko banjico</b>	180	1,8	2,5	9

## 4 REZULTATI

### 4.1 ANALIZA VZORCEV Z UGNEZDENO PCR

Vzorce vinske trte iz let 2007 in 2013, ter vzorce ostalih rastlin in žuželk, ki so bili predhodno že opredeljeni kot pozitivni na fitoplazmo '*Ca. P. solani*', smo analizirali z ugnezdeno PCR po postopku prikazanem na sliki 2.

Na sliki 5 je predstavljen primer agaroznega gela, kjer smo testiranim vzorcem uspešno pomnožili gen *tuf*, pri katerem je velikost pomnožka 940 bp, oz. gen *vmp1* dolžine 1400 bp. Gen *tuf* smo uspešno pomnožili pri 83 % vzorcev vinske trte (analiziranih 188 vzorcev), gen *vmp1* pa pri 86,7 % vzorcev vinske trte (analiziranih 183 vzorcev).



Slika 5: Pomnožki ugnezdene reakcije PCR gena *tuf* z začetniki tufAY f/r, ter gena *vmp1* z začetniki TYPH10F/R. Elektroforeza je potekala na 1% agaroznem gelu. M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific. NKP, negativna kontrola reakcije PCR.

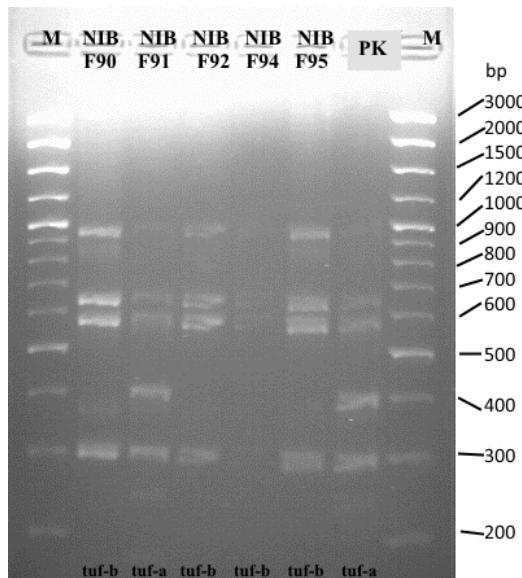
### 4.2 ANALIZA RFLP

Pomnožke ugnezdene PCR smo cepili z ustreznimi encimi, in sicer pomnožek gena *tuf* z encimom *Hpa*II in pomnožek gena *vmp1* z encimom *Rsa*I. Analiza RFLP na vzorcih iz vinske trte je pokazala, da nam cepitev z encimom *Hpa*II da dva različna profila, z encimom *Rsa*I pa najmanj 16 različnih profilov (število različnih opaženih cepitev z encimom *Rsa*I pa je 24). Rezultati analize vseh vzorcev vinske trte za oba gena so zbrani v preglednici 10 (za vzorce nabранe v letu 2007) in 11 (za vzorce nabранe v letu 2013). Profile RFLP iz vzorcev vinske trte smo nato primerjali še s profili vzorcev DNA fitoplazem iz drugih možnih gostiteljev '*Ca. P. solani*' (pregl. 12).

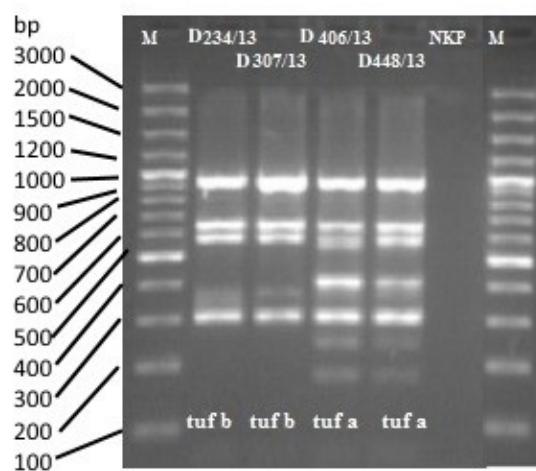
#### 4.2.1 Analiza RFLP pomnožkov gena *tuf*

Na sliki 7 je prikazan primer obeh profilov (tuf-a in tuf-b), dobljenih s cepitvijo gena *tuf* z encimom *Hpa*II vzorcev '*Ca. P. solani*' iz vzorcev vinske trte. Velikost cepitvenih

pomnožkov ugnezdene PCR v primeru profila tuf-a je približno 650 bp, 550 bp 410 bp, 300 bp, 250 bp in 180 bp, v primeru profila tuf-b pa 650 bp, 550 bp, 360 bp in 300 bp (940 bp ustreza nerazrezanemu pomnožku ugnezdene PCR). Rezultate smo primerjali z rezultati vzorcev DNA, ki smo jih uporabili kot referenčne kontrole NIB F90-95, ki so imeli že opredeljen podtip tuf (sl. 6).



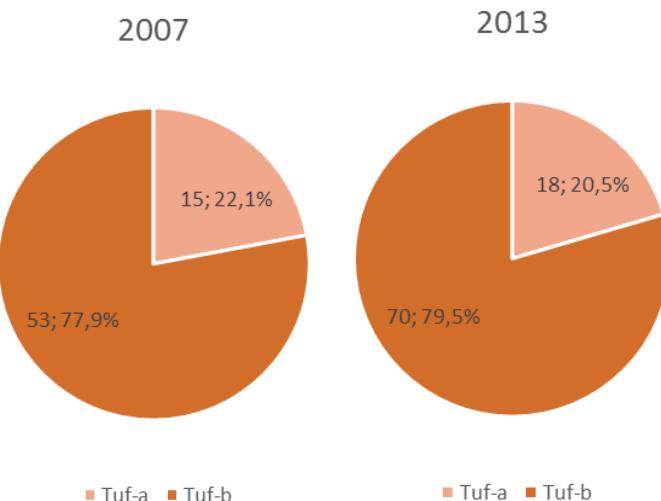
Slika 6: Prikaz raznolikosti fragmentov pomnožkov gena *tuf* vzorcev, ki smo jih uporabili kot referenčne kontrole, po cepitvi z restriktijskim encimom *Hpa*II. Elektroforeza je potekala na 2,5% agaroznem gelu, M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific. PK, pozitivna kontrola reakcije PCR (D720/13).



Slika 7: Prikaz raznolikosti fragmentov pomnožkov gena *tuf* po razrezu z restriktijskim encimom *Hpa*II. Elektroforeza je potekala na 2,5% agaroznem gelu, M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific. NKP, negativna kontrola reakcije PCR.

Analiza RFLP s cepitvijo pomnožka gena *tuf* z encimom *Hpa*II je pokazala, da sta v Sloveniji prisotna dva opisana seva tuf, tuf-a in tuf-b. V letih 2007 in 2013 je bil večinoma prisoten podtip tuf-b (sl. 8).

Leta 2007 je delež sevov tuf-a znašal 22,1 %, tuf-b pa 77,9 %, leta 2013 je bilo podobno, delež tuf-a 20,5 %, tuf-b pa 79,5 % (sl. 8, 13 in 14). V preglednici 6 je razviden delež posameznega podtipa tuf po vinorodnih deželah.



Slika 8: Število vzorcev in delež podtipov tuf-a in tuf-b za vzorce izolirane leta 2007 in 2013. Upoštevani so le pozitivni rezultati.

Preglednica 6: Prisotnost podtipov tuf-a in tuf-b po vinorodnih deželah v Sloveniji v letih 2007 in 2013.

	2007			2013		
	Št. vzorcev	Tuf-a (%)	Tuf-b (%)	Št. vzorcev	Tuf-a (%)	Tuf-b (%)
<b>Primorska</b>	39	23,1	76,9	22	40,9	59,1
<b>Posavje</b>	17	11,8	88,2	34	17,6	82,4
<b>Podravje</b>	11	36,4	63,6	32	9,4	90,6
<b>Skupaj</b>	<b>67*</b>	<b>22,4</b>	<b>77,6</b>	<b>88</b>	<b>20,5</b>	<b>79,5</b>

\* en vzorec ni imel opredeljenega kraja izvora, zato ga v tej preglednici nismo upoštevali.

#### 4.2.2 Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1*

V preglednici 7 so prikazane vse različice profilov gena *vmp1* po analizi RFLP. Iz vzorcev vinske trte smo dobili najmanj 16 različnih profilov gena *vmp1* (število cepitvenih pomnožkov, ki smo jih opazili pri analizi RFLP je 24). Za nadaljnjo analizo rezultatov smo upoštevali rezultate, ki so v preglednici 7 označeni kot najverjetnejši profil vmp (v nadaljevanju profil vmp). Označili smo jih kot profil vmp in s številko od 1 do 13, 16, 18 in 23. Primerjava le-teh s profili DNA 'Ca. P. solani' iz drugih možnih gostiteljev (pregl.

12) je pokazala prisotnost še dveh drugih profilov gena *vmp1*, ki smo jih označili s številko 14 in 15. Profil vmp 29 smo dobili le na dveh vzorcih referenčnih kontrol. Slike vseh rezulatov analize RFLP na genu *vmp1* so v Prilogah A-E, kjer so rezultati vzorcev označeni kot oznaka cepitve z encimom *RsaI*.

Preglednica 7: Rezultati analize RFLP fragmentov DNA gena *vmp1* in razrezanih z encimom *RsaI*. Prisotnost/odsotnost fragmenta za vsak profil je označena s številko 1/0. ?, nejasni fragmenti\*.

Oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	**	15	**	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	**	28	**	29
Najverjetnejši profil <i>vmp</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	4	18	9	9	6	1	23	9	1	6	4	28	29				
<b>1350</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<b>1000</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0		
<b>900</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0		
<b>800</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0		
<b>700</b>	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0		
<b>650</b>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0		
<b>600</b>	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<b>550</b>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1		
<b>440</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<b>420</b>	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 8: Rezultati analize RFLP fragmentov DNA gena *vmpI* in razrezanih z encimom *RsaI*. Prisotnost/odsotnost fragmenta za vsak profil je označena s številko 1/0. ?, nejasni fragmenti\*.

Oznaka cepitve z encimom	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	**	15	**	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	**	28	**	29
Najverjetnejš i profil <i>vmp</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	4	18	9	9	6	1	23	9	1	6	4	28	29	*	**	*	**
<b>390</b>	?	0	0	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>320</b>	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
<b>250</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>180</b>	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	
<b>120</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>80</b>	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

\*Fragmenti, ki so pri nekaterih vzorcih jasno vidni, pri nekaterih pa ni jasno ali so prisotni ali ne, zaradi bližine drugega fragmenta.

\*\* cepitev z encimom *RsaI*, ki smo jo dobili le pri vzorcih prenašalcev in drugih gostiteljskih rastlin.

\*\*\*cepitev z encimom *RsaI*, ki smo jo dobili pri vzorcu, okuženem s 'Ca. P. convolvuli'

\*\*\*\* cepitev z encimom *RsaI*, ki smo jo dobili le pri referenčnem vzorcu.

Z analizo PCR/RFLP gena *vmp1* smo skupaj dobili najmanj 16 različnih profilov: leta 2007 16 različnih profilov (pregl. 8), leta 2013 pa 10 različnih profilov (pregl. 9).

Vzorci so bili pogosto sestavljeni iz do petih trsov, nabranih v istem vinogradu, zato obstaja velika verjetnost, da so bili le-ti okuženi z različnimi fitoplazmami, kar je ena izmed možnih razlag za večjo pestrov profilov vmp.

Leta 2007 je bil najpogosteji profil vmp 9 (46,7 %), sledi mu profil vmp 1 (10,7 %), ostali so se pojavljali manj pogosto (pregl. 8). Leta 2013 pa je bil najpogosteji profil vmp 1 (46,0 %), nato profil vmp 9 (32,2 %) (pregl. 9).

V obeh letih je bil profil vmp 9 na Primorskem najpogosteji tip, v Posavju in Podravju leta 2007 profil vmp 9, leta 2013 pa profil vmp 1. Upad deleža profila vmp 9 v letu 2013 glede na leto 2007 je opažen v Posavju in Podravju, v vseh vinorodnih deželah pa je porasel delež profila vmp 1 v letu 2013.

Preglednica 9: Prikaz raznolikosti profilov vmp po vinorodnih deželah iz vzorcev iz leta 2007.

<b>Profil vmp/ vinorodna dežela</b>	<b>Primorska</b>	<b>Posavje</b>	<b>Podravje</b>	<b>Skupaj (%)</b>
<b>1</b>	0	15	33,3	<b>10,7</b>
<b>2</b>	2,5	0	0,0	<b>1,3</b>
<b>3</b>	15	0	0,0	<b>8,0</b>
<b>4</b>	0	5	0,0	<b>1,3</b>
<b>5</b>	2,5	0	0,0	<b>1,3</b>
<b>6</b>	2,5	15	0,0	<b>5,3</b>
<b>7</b>	0	15	0,0	<b>4,0</b>
<b>8</b>	0	5	0,0	<b>1,3</b>
<b>9</b>	47,5	35	60,0	<b>46,7</b>
<b>Delež posameznega profila vmp (%)</b>				
<b>10</b>	15	0	0,0	<b>8,0</b>
<b>11</b>	2,5	0	0,0	<b>1,3</b>
<b>12</b>	2,5	5	6,7	<b>4,0</b>
<b>13</b>	2,5	0	0,0	<b>1,3</b>
<b>14*</b>	0	0	0,0	<b>0,0</b>
<b>15**</b>	0	0	0,0	<b>0,0</b>
<b>16</b>	5	0	0,0	<b>2,7</b>
<b>18</b>	0	5	0,0	<b>1,3</b>
<b>23</b>	2,5	0	0,0	<b>1,3</b>
<b>28***</b>	0	0	0,0	<b>0,0</b>
<b>29***</b>	0	0	0,0	<b>0,0</b>
<b>Število vzorcev</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>75</b>

\* profile vmp 14 in 15 smo dobili le pri vzorcih vektorjev in drugih gostiteljskih rastlin (pregl. 12).

\*\* profil vmp 28 smo dobili le pri vzorcu okuženem s '*Ca. P. convolvuli*'.

\*\*\*profil vmp 29 smo dobili le pri vzorcih referenčnih kontrol.

Preglednica 10: Prikaz raznolikost profilov vmp po vinorodnih deželah iz vzorcev iz leta 2013.

<b>Profil vmp/ vinorodna dežela</b>	<b>Primorska</b>	<b>Posavje</b>	<b>Podravje</b>	<b>Skupaj (%)</b>
<b>1</b>	4,3	55,9	66,7	<b>46,0</b>
<b>2</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>3</b>	0,0	0,0	3,3	<b>1,1</b>
<b>4</b>	0,0	2,9	10,0	<b>4,6</b>
<b>5</b>	4,3	2,9	0,0	<b>2,3</b>
<b>6</b>	26,1	2,9	3,3	<b>9,2</b>
<b>7</b>	0,0	2,9	0,0	<b>1,1</b>
<b>8</b>	0,0	0,0	3,3	<b>1,1</b>
<b>9</b>	65,2	32,4	6,7	<b>32,2</b>
<b>Delež posameznega profila vmp (%)</b>				
<b>10</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>11</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>12</b>	0,0	0,0	3,3	<b>1,1</b>
<b>13</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>14*</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>15**</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>16</b>	0,0	0,0	3,3	<b>1,1</b>
<b>18</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>23</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>28***</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>29****</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>Število vzorcev</b>	<b>23</b>	<b>34</b>	<b>30</b>	<b>87</b>

\* profile vmp 14 in 15 smo dobili le pri vzorcih vektorjev in drugih gostiteljskih rastlin (pregl. 12).

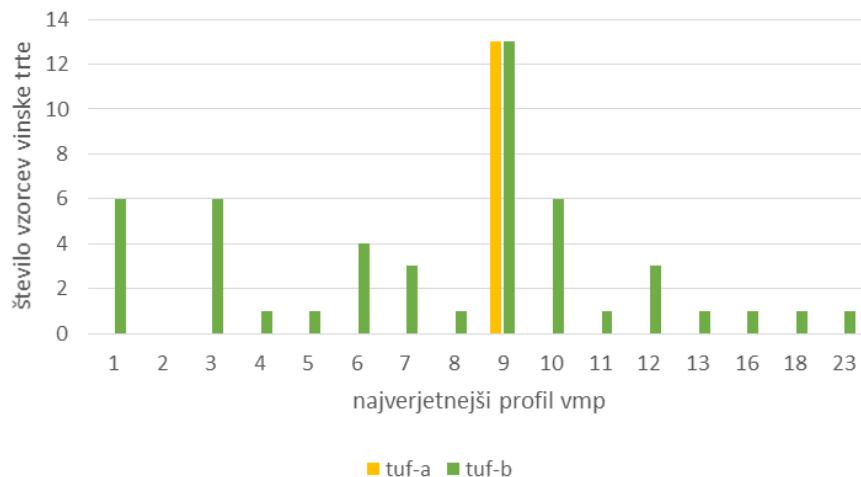
\*\* profil vmp 28 smo dobili le pri vzorcu okuženem s 'Ca. P. convolvuli'.

\*\*\*profil vmp 29 smo dobili le pri vzorcih referenčnih kontrol.

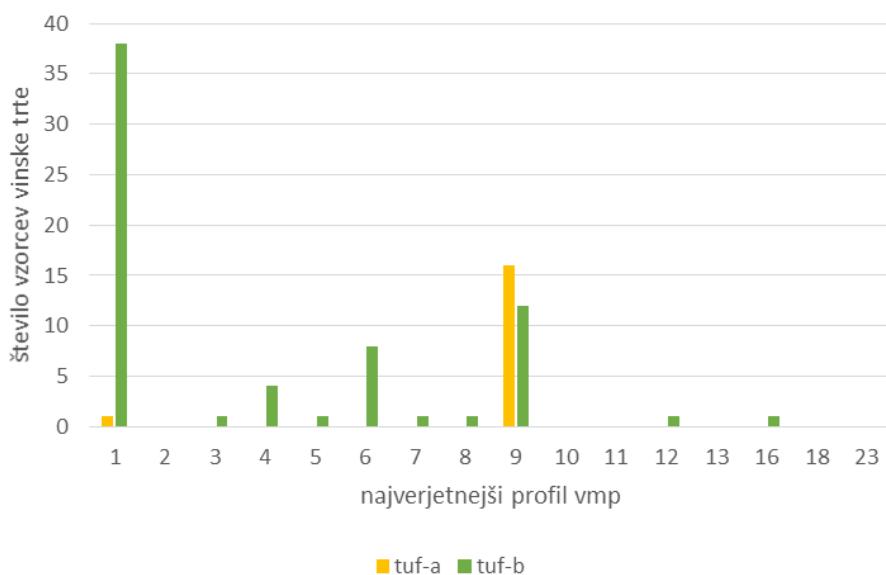
#### 4.2.3 Povezava profilov tuf in vmp na vzorcih vinske trte

Raziskali smo povezavo med profili tuf in vmp (sl. 9, 10). Vidimo lahko, da je med vzorci, ki imajo profil tuf-a raznolikost profilov vmp bistveno manjša. Tako imajo vzorci vinske

trte iz leta 2007 s profilom tuf-a v 100 % profil vmp 9. Leta 2013 pa od 17 vzorcev s profilom tuf-a jih ima 94,1 % profil vmp 9, 5,9 % pa profil vmp 1.



Slika 9: Grafični prikaz števila podtipov tuf-a in tuf-b za vsak profil vmp za vzorce vinske trte iz leta 2007. Prikazani so samo rezultati vzorcev, pri katerih sta bila opredeljena oba profila.



Slika 10: Grafični prikaz števila podtipov tuf-a in tuf-b za vsak profil vmp za vzorce vinske trte iz leta 2013. Prikazani so samo rezultati vzorcev, pri katerih sta opredeljena oba profila.

#### 4.2.4 Skupni rezultati analize RFLP genov *tuf* in *vmp1*

Vsi rezultati testiranih vzorcev so prikazani v preglednicah 10, 11 in 12 (glej tudi priloge A-E). Rezultati so razvrščeni glede na vinorodno deželo izvora vzorca vinske trte (Primorska, Posavje in Podravje). Znotraj vsake dežele so vzorci razvrščeni še glede na sorto vinske trte. Skupno smo analizirali 188 vzorcev vinske trte in 13 vzorcev ostalih

možnih gostiteljev fitoplazme '*Ca. P. solani*'. Profil tuf smo uspešno ugotovili pri 156 vzorcih vinske trte in 7 vzorcih ostalih gostiteljev, profil vmp pa 163 vzorcih vinske trte in 8 vzorcem ostalih gostiteljev.

V preglednici so prikazane tudi vrednosti Ct (angl. Cycle threshold) PCR v realnem času za amplikon BN (vir rezultatov: arhiv NIB).

Za vzorce vinske trte iz leta 2007 smo dobili 15 vzorcev, ki so ustrezali profilu tuf-a in 53 vzorcev, ki so ustrezali profilu tuf-b. Za vzorce, nabранe leta 2013, pa smo dobili 18 profilov tuf-a in 70, ki so ustrezali podtipu tuf-b.

Preglednica 11: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* razcepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2007. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje; bela barva, vzorec, za katerega ni podatka o izvoru. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR.

ID (Dxy/07)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct *	Profil tuf	Najverjetnejši profil vmp (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
<b>763</b>	Ricorvo	Auxerrois	35,3	<b>x</b>	16
<b>770</b>	Markovce	Beli Pinot	32,6	a	<b>x</b>
<b>571</b>	Ceglo	Beli Pinot	30,5	b	9 (19)
<b>504</b>	Visoko	Chardonnay	32,1	<b>x</b>	2
<b>758</b>	Sečovlje	Chardonnay	29,4	b	3
<b>764</b>	Ricorvo	Chardonnay	32,8	b	3
<b>583</b>	Zajčevca	Chardonnay	30,2	b	5
<b>499</b>	Sp. Škofije	Chardonnay	29,7	a	9
<b>547</b>	Dobrovo	Chardonnay	29,5	<b>a</b>	<b>9</b>
<b>569</b>	Medansko	Chardonnay	29,9	a	9
<b>581</b>	Male Žablje	Chardonnay	30,9	<b>a</b>	9
<b>864</b>	Slap	Chardonnay	30	<b>a</b>	9
<b>501</b>	Vogrsko	Chardonnay	30,4	b	<b>9</b>
<b>539</b>	Vipava	Chardonnay	31,5	b	9
<b>580</b>	Vrtovče	Chardonnay	30,2	b	<b>9</b>
<b>578</b>	Kozana Gmajna	Chardonnay	32,7	<b>x</b>	9
<b>577</b>	Kozana Gmajna	Chardonnay	31,7	b	10
<b>757</b>	Sečovlje	Chardonnay	30,4	b	23
<b>567</b>	Kozlink	Chardonnay	31,5	b	9 (19)
<b>570</b>	Medana	Chardonnay	28,6	b	9 (19)
<b>572</b>	Grotišče	Chardonnay	30,1	b	9 (19)

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* razcepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2007. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje; bela barva, vzorec, za katerega ni podatka o izvoru. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdeno PCR.

ID (Dxy/07)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct *	Profil tuf	Najverjetnejši profil vmp (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
723	Brič	Chardonnay	30,3	b	9 (20)
582	Šmarje-pokopališče	Chardonnay	29,6	b	6 (21)
502	Brežič	Chardonnay	32,0	<b>b</b>	x
503	Vrnaki	Chardonnay	31,8	b	x
833	Dragonja	Chardonnay	28,5	<b>x</b>	x
669	Debeli rtič	Malvazija	31,4	b	3
740	Škocjan	Malvazija	31,3	b	3
819	Dragonja	Malvazija	29,4	a	9
820	Dragonja	Malvazija	28,5	a	9
760	Labor	Malvazija	31,6	<b>x</b>	9
643	Debeli Rtič	Malvazija	31,0	b	10
668	Debeli rtič	Malvazija	32,3	b	10
671	Debeli rtič	Malvazija	34,1	b	13
642	Debeli Rtič	Malvazija	31,5	b	16
670	Debeli rtič	Malvazija	35,3	b	x
579	Griže	Ni podatka	30,6	b	3
538	Vipava	Ni podatka	32,9	b	10
537	Vipava	Pinela	31,4	a	9
500	Kromberk	Rebula	31,3	<b>x</b>	9
566	Kozlink	Rebula	31,8	b	12
739	Škocjan	Refošk	30,7	b	3
754	Purisima	Refošk	33,2	b	10
866	Vipava	Refošk	35,1	<b>x</b>	x
648	Debeli Rtič	Sivi Pinot	33,7	b	10
646	Debeli Rtič	Sivi Pinot	34,1	b	11
647	Debeli Rtič	Sivi Pinot	32,9	<b>x</b>	x
769	Markovce	Vitovska garganja	31,3	<b>x</b>	x
629	Lazec	Beli Pinot	27,9	b	1
691	Sremič	Chardonnay	31,1	b	7
686	Drensko rebro	Chardonnay	29,3	b	8

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* razcepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2007. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje; bela barva, vzorec, za katerega ni podatka o izvoru. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR.

ID (Dxy/07)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct *	Profil tuf	Najverjetnejši profil vmp (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
<b>650</b>	Golušnik	Chardonnay, Modra Frankinja	31,8	b	6
<b>651</b>	Doblička gora	Chardonnay, Modra Frankinja, Kerner	30,4	b	7
<b>707</b>	Ravni	Modra Frankinja	28,2	b	1
<b>662</b>	Gradnik/Sodji vrh	Modra Frankinja	29,1	b	6
<b>705</b>	Križe	Modra Frankinja	30,1	b	6
<b>659</b>	Vinomer	Modra Frankinja	31,8	b	7
<b>603</b>	Železniki	Modra Frankinja	31,8	x	9
<b>660</b>	Vinomer	Modra Frankinja	30,2	b	12
<b>687</b>	Drensko rebro	Modra Frankinja	30,1	b	18
<b>859</b>	Ravni	Modra Frankinja	30,9	b	1 (25)
<b>661</b>	Vinomer	Modra Frankinja	28,1	a	9 (19)
<b>692</b>	Sremič	Modra Frankinja	29,0	a	9 (19)
<b>1015</b>	Drašiči	Modra Frankinja	30,5	b	9 (19)
<b>706</b>	Breznovska gora	Modra Frankinja	31	b	9 (20)
<b>649</b>	Paha	Modra Frankinja	32,2	x	x
<b>901</b>	Drča	Modra Frankinja	32,9	x	x
<b>652</b>	Vaupča vas	Modri Pinot, Sivi Pinot, Kraljevina	34,5	x	9
<b>860</b>	Bizeljsko	Sivi Pinot	35,4	x	9 (19)
<b>851</b>	Malkovec	Žametovka	30,4	b	4
<b>684</b>	Zg. Gabernik	Chardonnay	28,0	b	1
<b>736</b>	Juršinci	Chardonnay	28,1	a	9
<b>683</b>	Tolsti vrh	Chardonnay	29,2	b	9
<b>608</b>	G. Radogna	Chardonnay	28,7	b	12
<b>710</b>	Juršinci	Chardonnay	30,8	b	9 (19)
<b>779</b>	Strezetina	Chardonnay	31,5	x	x
<b>681</b>	Tolsti vrh	Kerner	29,4	a	9
<b>680</b>	Klokočovnik	Modra Frankinja	29,0	b	1
<b>682</b>	Tolsti vrh	Modra Frankinja	30,8	x	1
<b>711</b>	Juršinci	Modra Frankinja	30,3	x	9 (19)

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* razcepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2007. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje; bela barva, vzorec, za katerega ni podatka o izvoru. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR.

ID (Dxy/07)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct *	Profil tuf	Najverjetnejši profil vmp (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
<b>712</b>	Juršinci	Modri Pinot	33,9	b	1
<b>607</b>	G. Radogna	Modri Pinot	32,0	x	9 (19)
<b>787</b>	Litmerk	Ni podatka	33,2	x	x
<b>776</b>	Veliki brebrovnik	Renski Rizling	31,8	a	x
<b>781</b>	Veličane	Rizvanec	35,0	x	x
<b>786</b>	Litmerk	Sauvignon	33,4	x	1
<b>597</b>	Litmerk	Sivi Pinot	32,3	b	9 (19)
<b>785</b>	Litmerk	Šipon	32,2	x	9
<b>596</b>	Litmerk	Šipon	30,0	a	9 (19)
<b>783</b>	Jeruzalem	Šipon	32,2	x	x
<b>1014</b>	Ni podatka	Modra Frankinja	31,4	b	4

\*Vzorci so bili analizirani na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrXII, ki vključuje 'Ca P. solani' v okviru posebnega nadzora trsnih rumenic s PCR v realnem času po Hren in sod. (2007) (podane so Ct vrednosti dobljene z amplikonom BNgen)

\*\*za nadaljnjo analizo smo upoštevali rezultat, ki ni v oklepaju.

Preglednica 12: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* razcepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2013. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR. #, analiza ni bila izvedena.

ID (Dxy/13)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct*	Profil tuf	Najverjetnejši profil vmp (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
<b>471</b>	Nova gorica	Beli pinot	26,5	a	9
<b>472</b>	Nova gorica	Cabernet sauvignon, Alicante	29,3	b	6 (21)
<b>709</b>	Cetore	Chardonay	28,3	b	5
<b>297</b>	Biljana	Chardonnay	27,4	x	<b>1</b>
<b>560</b>	Nova gorica	Chardonnay	26,3	b	6
<b>776</b>	Labor	Chardonnay	29,4	a	9
<b>296</b>	Biljana	Chardonnay	26,2	b	<b>9</b>
<b>303</b>	Nova gorica	Chardonnay	27,2	b	9 (19)
<b>301</b>	Fojana	Chardonnay	29,2	b	9 (20)
<b>476</b>	Nova gorica	Chardonnay	25,4	b	9 (20)

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 11: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* cepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2013. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR. #, analiza ni bila izvedena.

ID (Dxy/13)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct*	Profil <i>tuf</i>	Najverjetnejši profil vmp (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
<b>751</b>	Ceglo	Chardonnay	28,5	b	<b>6 (21)</b>
<b>860</b>	Lokvica	Chardonnay	26,5	b	9 (24)
<b>271</b>	Rimci	Chardonnay	29,2	x	x
<b>562</b>	Nova gorica	Chardonnay, Malvazija	27,2	b	6 (26)
<b>705</b>	Koštabona	Malvazija	26,4	b	6
<b>559</b>	Nova gorica	Malvazija	29,5	b	6 (21)
<b>564</b>	Nova gorica	Malvazija, Rebula, Sauvignon	29,2	a	9 (24)
<b>537</b>	Saksid	Neznana	27,1	a	9 (20)
<b>626</b>	Barban	Neznano	26,8	b	9
<b>764</b>	Slap	Pinela	24,9	a	9 (24)
<b>767</b>	Šmarje	Refošk	29,4	a	<b>9</b>
<b>768</b>	Tomaj	Refošk	27,9	a	9
<b>416</b>	Dekani	Refošk	27,6	x	#
<b>341</b>	Koper	Refošk	29,1	a	9 (24)
<b>753</b>	Kojsko	Sauvignon	27,1	a	9 (24)
<b>232</b>	Veliki kamen	Acolon	28,5	b	1
<b>733</b>	Čurile	Chardonnay	28,8	b	4
<b>763</b>	Brod	Chardonnay	25,6	b	1 (25)
<b>367</b>	Ples	Kerner	26,8	b	1
<b>239</b>	Vrh pri Trebelnem	Modra frankinja	26,9	b	1
<b>267</b>	Vinji vrh	Modra frankinja	27,1	b	1
<b>383</b>	Vinomer	Modra frankinja	27,8	b	1
<b>407</b>	Straža pri Raki	Modra frankinja	27,3	b	1
<b>434</b>	Stara bučka	Modra frankinja	26,1	b	1
<b>635</b>	Gazice	Modra frankinja	27,2	b	<b>1</b>
<b>675</b>	Orehovica	Modra frankinja	28,8	b	1
<b>679</b>	Golušnik	Modra frankinja	24,6	b	1
<b>735</b>	Metlika	Modra frankinja	29,8	b	1
<b>438</b>	Gornje orle	Modra frankinja	24,9	b	7
<b>364</b>	Dekmanca	Modra frankinja	27,8	x	#

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 11: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* cepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2013. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR. #, analiza ni bila izvedena.

ID (Dxy/13)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct*	Profil <i>tuf</i>	Najverjetnejši profil <i>vmp</i> (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
<b>632</b>	Dolenje bočje	Modra frankinja	28,5	x	#
<b>358</b>	Imenska gorca	Modra frankinja	26,4	b	1 (22)
<b>234</b>	Veliki kamen	Modra frankinja	30,4	b	1 (25)
<b>402</b>	Dule sela	Modra frankinja	24,3	b	1 (25)
<b>571</b>	Piršenbreg	Modra frankinja	27	b	1 (25)
<b>597</b>	Slinovce/oštroc	Modra frankinja	27	b	1 (25)
<b>600</b>	Blažova gorca	Modra frankinja	27	b	1 (25)
<b>406</b>	Križe	Modra frankinja	26,7	a	9 (19)
<b>447</b>	Dragomlja vas	Modra frankinja	26,8	a	9 (20)
<b>466</b>	Kremen	Modra frankinja	26,1	b	9 (20)
<b>365</b>	Hrastje ob Bistrici	Modra frankinja	29,9	b	6 (21)
<b>275</b>	Gorenja vas pri Šmarjeti	Modra frankinja	29,4	a	9 (24)
<b>448</b>	Radovica	Modra frankinja	28,4	a	9 (24)
<b>454</b>	Brezovica pri Metliki	Modra frankinja	26,1	a	9 (24)
<b>741</b>	Debenec	Modra frankinja	26,7	a	9 (24)
<b>361</b>	Verače	Modra frankinja	29,1	<b>b</b>	<b>9 (24)</b>
<b>467</b>	Zdole	Modra frankinja	27,1	b	9 (24)
<b>292</b>	Libna	Modra frankinja	27,2	x	x
<b>456</b>	Bereča vas	Modra frankinja, Žametna črnina	29,2	b	<b>9 (24)</b>
<b>550</b>	Semič	Neznano	28,2	b	9 (24)
<b>736</b>	Metlika	Šentlovrenka	27,7	b	5
<b>436</b>	Studenec	Žametna črnina	24,7	b	1 (25)
<b>393</b>	Stanovsko	Beli pinot	26,3	x	#
<b>307</b>	Kalvarija	Chardonnay	27,9	b	1
<b>665</b>	Krčevina pri Vurbergu	Chardonnay	25	b	1
<b>326</b>	Strehovci	Chardonnay	29,8	b	3
<b>312</b>	Lendava	Chardonnay	27,8	b	4
<b>427</b>	Ivanjševci	Chardonnay	28,9	b	12
<b>254</b>	Sp. Jakobski dol	Chardonnay	27,3	b	1 (25)
<b>261</b>	Mali brebrovnik	Chardonnay	27,2	b	1 (25)

se nadaljuje

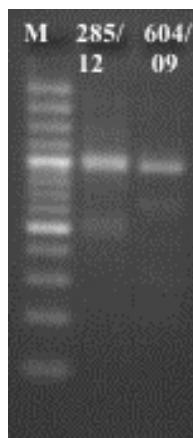
Nadaljevanje preglednice 11: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* cepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz vzorcev vinske trte iz leta 2013. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR. #, analiza ni bila izvedena.

ID (Dxy/13)	Kraj vzorčenja	Sorta	Ct*	Profil <i>tuf</i>	Najverjetnejši profil <i>vmp</i> (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )**
331	Šentjur	Chardonnay	28,9	b	1 (25)
333	Uršula	Chardonnay	27,4	b	1 (25)
354	G. Radgona	Chardonnay	28,3	b	4 (17)
575	Gerlinci	Chardonnay	28,1	b	4 (17)
340	Vodule, dramlje	Chardonnay	28,8	b	6 (26)
250	Maribor	Chardonnay	26,3	x	x
336	Grušče	Chardonnay, Modra frankinja	26,6	b	1 (22)
309	Špičnik	Kerner	28,6	b	1
375	Lekmarje	Kerner	27,7	b	16
720	Slovenska bistrica, Vrhole pri laporju	Modra frankinja	26,1	a	9
654	Zg. Partinje	Modra frankinja	28	b	x
255	Ročica	Renski rizling	26,3	b	1
541	Trgovišče	Renski rizling	27	b	1
666	Krčevina pri Vurbergu	Renski rizling	27,6	b	1
540	Podgorci	Renski rizling	27,9	b	8
252	Celestrina	Renski rizling	27,2	a	x
259	Ormož	Renski rizling	26,0	x	#
657	Stanetinci	Renski rizling	26,5	a	1 (22)
285	Ilovci	Renski rizling	28	b	1 (22)
355	Maribor	Renski rizling	25,7	b	1 (22)
305	Kalvarija	Renski rizling	28,1	b	1 (25)
319	Dolga vas	Renski rizling	25,9	b	9 (24)
357	Fram -počehova	Rizvanec	29,4	b	1
372	Sveti štefan	Sauvignon	27,5	b	1 (25)
313	Dolga vas	Savignon	29,5	b	1
314	Okolica Maribora	Savignon	25,9	b	1
282	Straža na gori	Savignon	27,6	b	1 (22)

\*Vzorci so bili analizirani na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrXII, ki vključuje 'Ca P. solani' v okviru posebnega nadzora trsnih rumenic s PCR v realnem času po Hren in sod. (2007) (podane so vrednosti Ct dobljene z amplifikonom BNGen)

\*\*za nadaljnjo analizo smo upoštevali rezultat, ki ni v oklepaju.

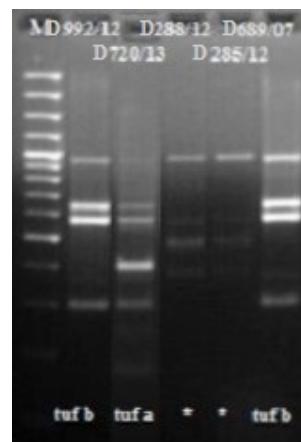
Analizirali smo tudi druge vzorce, ki so bili predhodno potrjeni kot okuženi s fitoplazmo iz skupine 16SrXII (njivski slak, svetleči škržatek, kadulja, rdeči dren, ameriški škržatek) (pregl. 12). Pri vseh teh vzorcih, razen pri vzorcu ameriškega škržatka, smo dobili profil tuf-b, profili vmp pa so bili raznoliki. Profil tuf vzorca ameriškega škržatka (D604/09) je bil drugačen od vzorcev, ki so okuženi s '*Ca. P. solani*', prav tako je drugačen od profila tuf vzorcev, ki so okuženi s '*Ca. P. convolvuli*' (sl. 11). Pri drugem vzorcu ameriškega škržatka pa gena *tuf* nismo uspeli pomnožiti.



Slika 11: Primerjava profila vzorca okuženega s '*Ca. P. convolvuli*' (D285/12; velikost fragmentov: 600, 500, 400 bp) z vzorcem ameriškega škržatka (D604/09; velikost fragmentov: 700, 400, 300 bp). M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific.

Profili vmp fitoplazme '*Ca. P. solani*' iz svetlečega škržatka in rdečega drena, so bili enaki kot pri nekaterih fitoplazmah iz vinske trte (profili vmp 3, 4, 6 in 7). Fitoplazme '*Ca. P. solani*', izolirane iz slaka, kadulje in ameriškega škržatka pa so imele profile vmp, ki jih pri vinski trti nismo zaznali (profili vmp 14 in 15).

V analizo smo vključili tudi tri vzorce njivskega slaka, ki so bili predhodno potrjeni kot okuženi s '*Ca. P. convolvuli*' in en vzorec *Euscelis incisus*, ki je bil okužen s '*Ca. P. asteris*'. Cepitveni profili gena *tuf* vzorcev njivskega slaka okuženega s '*Ca. P. convolvuli*', so bili drugačni od profilov vzorcev okuženih s '*Ca. P. solani*' (pregl. 12 in sl. 12), profil vmp pa smo dobili le pri enem vzorcu slaka. Le-ta je drugačen od profilov vmp, ki smo jih opazili v primeru okužbe s '*Ca. P. solani*'. V primeru vzorca okuženega s '*Ca. P. asteris*' (pregl. 12) pa se produkt ugnezdzene PCR z encimom ni razcepil, gena *vmp1* pa nismo uspeli pomožiti.



Slika 12: Primerjava profilov podtipov tuf-a (D720/13) in tuf-b (D992/13, D689/07) z vzorcema okuženima s 'Ca. P. convolvuli' (označenima z \*). M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific.

Preglednica 13: Rezultati analize RFLP pomnožkov genov *tuf* in *vmp1* razcepljenih z encimoma *HpaII* in *RsaI* iz ostalih vzorcev. Oranžna barva, vinorodna dežela Primorska; modra barva, vinorodna dežela Posavje; zelena barva, vinorodna dežela Podravje. Rezultat napisan s krepkimi črkami, pomnožek PCR za analizo z ugnezdeno PCR ni bil redčen. X, ni pomnožka ugnezdena PCR.

ID	Kraj vzorčenja	Vzorčeno	BN (Ct)*	Profil tuf	Najverjetnejši profil vmp (oznaka cepitve z encimom <i>RsaI</i> )
D288/12	Dane pri Sežani	<i>Convolvulus arvensis</i> (slak)	neg**	neznan-1	28
D285/12	Dane pri Sežani	<i>Convolvulus arvensis</i> (slak)	neg**	neznan-1	x
D249/12	Dane pri Sežani	<i>Convolvulus arvensis</i> (slak)	neg**	x	x
D772/03	Kromberk 1	<i>Scaphoideus titanus</i> (ameriški škržatek)	poz	x	x
D519/03	Strežetina v Ormoških goricah	<i>Convolvulus arvensis</i> (slak)	poz	b	15
D639/03	Strežetina, Kog	<i>Euscelis incisus</i>	neg***	produkt ni razrezan	x
D522/03	Mali Brebrovnik	<i>Hyalesthes obsoletus</i> (svetleči škržatek)	poz	b	3
D524/03	Kog	<i>Hyalesthes obsoletus</i> (svetleči škržatek)	poz	b	6 (21)
D523/03	Kog	<i>Hyalesthes obsoletus</i> (svetleči škržatek)	poz	b	6 (21)
D689/07	Sremič	<i>Convolvulus arvensis</i> (slak)	poz (23)	b	4 (27)
D461/12	Straža	<i>Cornus sanguinea</i> (rdeči dren)	poz (30)	b	7
D992/12	Straža	<i>Salvia</i> sp. (kadulja)	poz (23)	b	14
D604/09	Stražnji vrh	<i>Scaphoideus titanus</i> (ameriški škržatek)	poz (36)	neznan-2	14

\*Vzorci so bili analizirani na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrXII, ki vključuje 'Ca P. solani' v okviru posebnega nadzora trsnih rumenic s PCR v realnem času po Hren in sod. (2007) (v oklepaju so podane vrednosti Ct dobljene z amplifikonom BNgen) oziroma z ugnezdeno PCR z začetniki STOL11F3/R2.

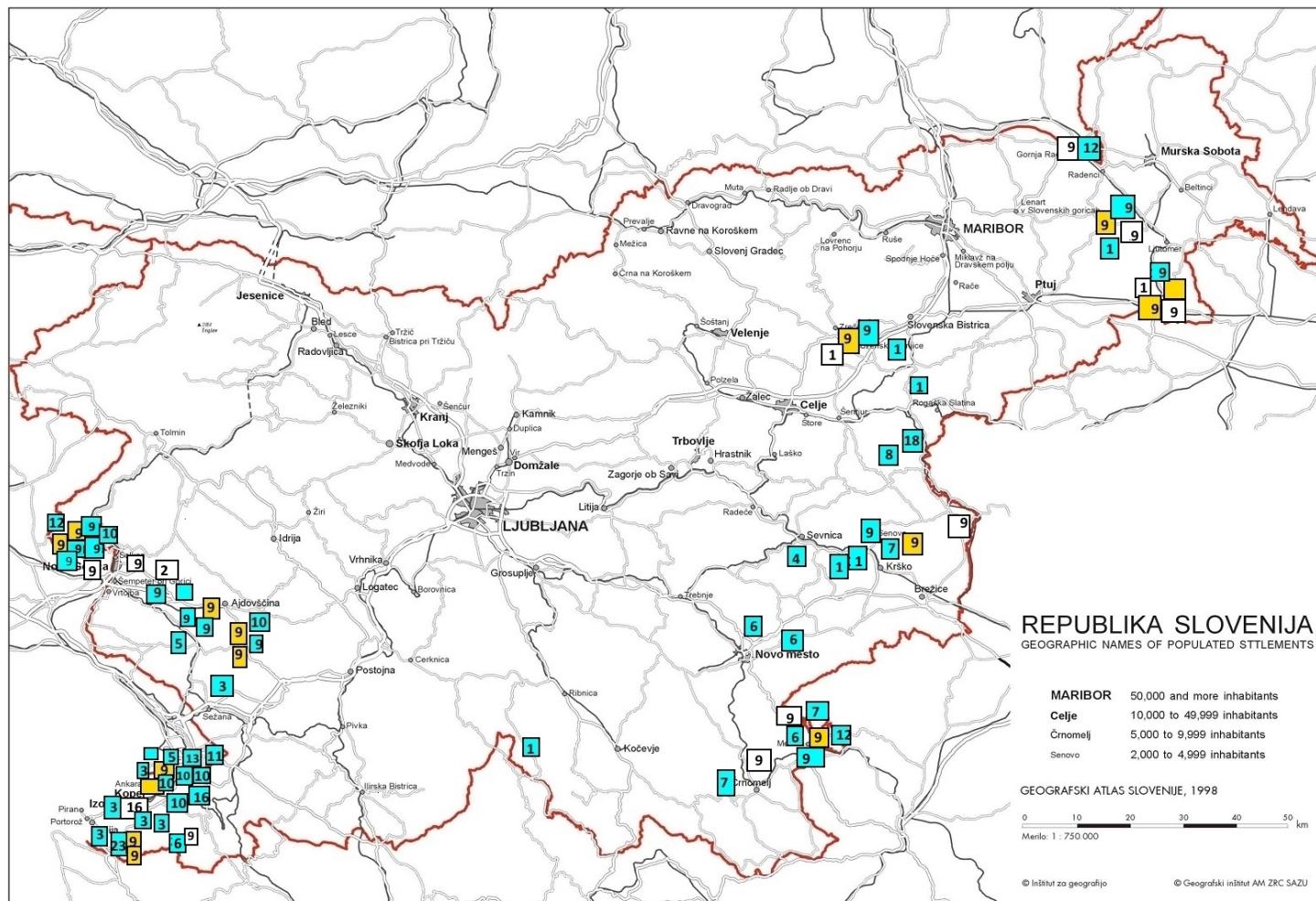
\*\*Največja podobnost sekvenciranja pomnožka ugnezdena PCR z začetniki U3/U5 je bila s 'Ca. P. convolvuli' (Bindweed yellows phytoplasma) (Porocilo o preizkušanju ustreznosti D0001/14, 2014).

\*\*\*Vzorec okužen s 'Ca. P. asteris' (Aster yellows phytoplasma) (Porocilo o preizkušanju ustreznosti D0001/15, 2015).

Preverjali smo tudi, če je kateri izmed podtipov povezan s sorto vinske trte. V preglednicah 10 in 11 so tako rezultati razvrščeni po vinorodnih deželah in znotraj vsake še glede na sorto vinske trte, a te povezave z našimi rezultati nismo potrdili.

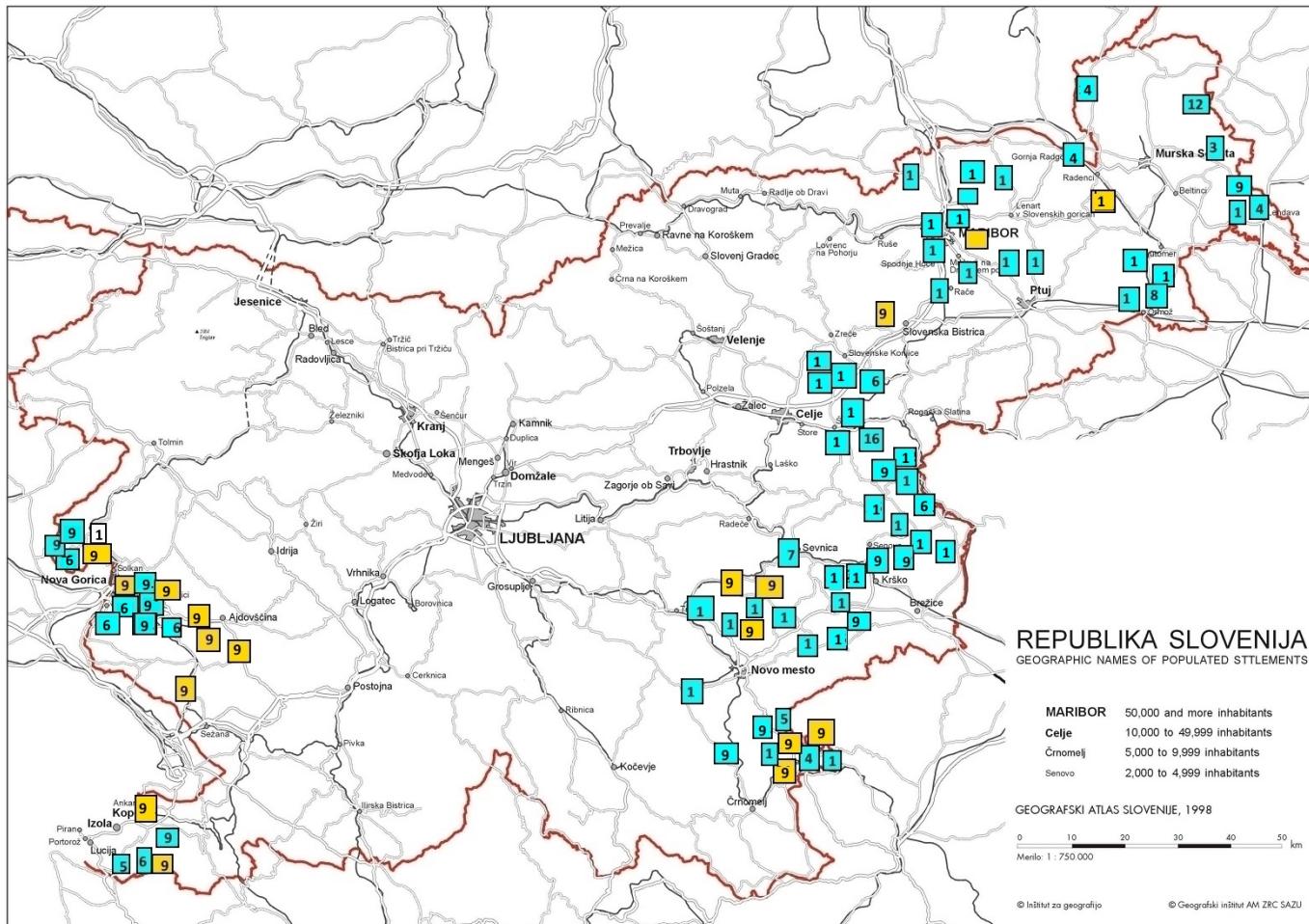
#### 4.3 GEOGRAFSKA RAZPOREDITEV PROFILOV TUF IN VMP V SLOVENIJI

Kavčič S. Molekulska raznolikost izolatov fitoplazme, povzročiteljice počrnelosti lesa.  
 Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije, 2015



Slika 13: Prikaz geografske razporeditve podtipov tuf in vmp 'Ca. P. solani' iz vzorcev vinske trte vzorčene leta 2007. Rumeni kvadratki označujejo podtip tuf-a, modri podtip tuf-b. Številke označujejo profil vmp.

Kavčič S. Molekulska raznolikost izolatov fitoplazme, povzročiteljice počrnelosti lesa.  
Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije, 2015



Slika 14: Prikaz geografske razporeditve podtipov tuf in vmp 'Ca. P. solani' iz vzorcev vinske trte vzorčene leta 2013. Rumeni kvadratki označujejo podtip tuf-a, modri podtip tuf-b., številke označujejo profil, rumeni kvadratki označujejo vmp.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 ANALIZA VZORCEV VINSKE TRTE

Glede na rezultate laboratorijskih testiranj v okviru strokovne naloge (Ravnkar in sod., 2008, 2014) lahko ugotovimo, da je bila incidenca fitoplazme '*Ca. P. solani*' v Sloveniji leta 2007 in 2013 visoka, 62,8 % (148 testiranih vzorcev vinske trte) in 73 % (333 testiranih vzorcev vinske trte). Preostali delež vzorcev je bilo pozitivnih na fitoplazmo FD, nedoločljivega tipa fitoplazme ali pa negativnih, kar pomeni, da je bil titer fitoplazem prenizek za detekcijo ali pa so značke rumenice povzročili drugi, abiotiski dejavniki.

Z oligonukleotidni začetniki *Tuf1* f/r in *TufAY* f/r smo uspešno pomnožili gen *tuf*. Ti začetniki omogočajo specifično pomnožitev 940 bp dolgega kosa gena *tuf* fitoplazem iz skupine rumenic aster in iz skupine stolbur (Schneider in sod., 1997). Pri vseh vzorcih je bila dolžina ugnezdenega produkta enaka, okoli 940 bp, kar se ujema tudi z ostalimi raziskavami drugih avtorjev, ki so uporabili te oligonukleotidne začetnike (Schneider in sod., 1997; Langer in Maixner, 2004; Fialova in sod., 2009).

Za pomnožitev neribosomskega gena *vmp1* smo uporabili začetnike TYPH10F1/R1 in STOLH10F/R. Dolžina ugnezdenega produkta je bila pri vseh vzorcih enaka, okoli 1400 bp, kar se tudi sklada z ugotovitvami ostalih avtorjev, ki so uporabili te začetnike (Cvrković in sod., 2014; Murolo in sod., 2014; Fialova in sod., 2014; Šeruga Musić in sod., 2011).

Pri testiranih vzorcih vinske trte iz leta 2007 in 2013 smo dobili ugnezden pomnožek za gen *tuf* pri 156 od skupaj 188 (83,0 %) vzorcih, za gen *vmp1* pa pri 163 od 183 (86,7 %) vzorcih. Za analizo vzorcev iz leta 2013 smo uporabili le vzorce, ki so imeli vrednost Ct, izmerjeno z analizo PCR v realnem času po Hren in sod. (2007), pod 30, saj nižja vrednost Ct kaže na višjo koncentracijo fitoplazemske DNA v vzorcu, kar nam omogoča uspešnejšo pomnožitev z ugnezdeno PCR in nadaljno analizo RFLP. S PCR v realnem času merimo fluorescentni signal, ki nastane pri podvojevanju tarčnega gena. Vrednost Ct pomeni število ciklov, da fluorescentni signal preseže ozadje. Vrednost je obratno sorazmerna s količino tarčne DNA v vzorcu. Iz preglednic 10 in 11 je razvidno, da produktov ugnezdeni PCR nismo dobili predvsem pri vzorcih, ki so imeli visoke vrednosti Ct. Od 32 vzorcev, pri katerih produkta ugnezdeni PCR za gen *tuf* nismo dobili, je 22 vzorcev imelo Ct nad 30, trije vzorci pa med 28 in 30, ostali pod Ct 28. Od 20 vzorcev, pri katerih produkta ugnezdeni PCR za gen *vmp1* nismo dobili pa jih je imelo vrednost Ct višjo od 30 14 vzorcev, med 28 in 30 pa trije vzorci, trije vzorci pa pod 28. Koncentracija DNA pri teh vzorcih je bila namreč prenizka in zato po analizi z agarozno gelsko elektroforezo pomnožka nismo zaznali.

Pri vzorcih D649/07, D769/07, D779/07, D787/07, D833/07, D901/07, D647/07, D781/07, D866/07, D783/07, D250/13, D271/13, D292/13 ni uspela pomnožitev nobenega izmed genov, kljub ponovitvi poskusa nekaterih vzorcev z dodajanjem neredčenega pomnožka PCR za ugnezdeno PCR. Pri nekaterih vzorcih je uspela pomnožitev le enega izmed genov. Pri 14 vzorcih je uspela pomnožitev le gena *vmp*, *tuf* pa ne kljub neredčenju pomnožka PCR, pri 13 od teh je bila Ct vrednost nad 30. Pri sedmih vzorcih pa kljub neredčenju DNA nismo dobili profila *vmp*, *tuf* pa ja. Razlog za take rezultate bi bil lahko večja občutljivost reakcije PCR za pomnoževanje gena *tuf* na inhibitorje. Lahko pa je to posledica večjega števila kopij gena *vmp1* v samem genomu. V genomu sta namreč prisotni vsaj dve homologni kopiji gena *vmp1* in še ostale nepopolne ali manj homologne kopije (Cimerman in sod., 2009). Gen *tuf* je prisoten v eni kopiji (Schneider in sod., 1994).

### 5.1.1 Analiza RFLP pomnožkov gena *tuf* na vzorcih iz vinske trte

Z analizo RFLP gena *tuf* z encimom dobimo dva cepitvena profila. Z uporabo programa NebCutter (Vincze in sod., 2003) vidimo, da encim *Hpa*II reže 946 bp dolgo sekvenco gena *tuf* (GenBank številka sekvence FJ394552, ki po Berger in sod., 2009b ustreza profilu tuf-b) na mestu 301 in 367, taka cepitev nam da fragmente dolžine 645, 579, 366, 300 in 65 bp, kar ustreza profilu tuf-b tudi v naših rezultatih, z izjemo fragmenta dolžine 65 bp, ki ga na gelu nismo vedno opazili. Po podatkih raziskave Berger in sod., 2009b, se sekvenci (GenBank številka sekvence za gen *tuf* podtip tuf-a FJ394551 in podtip tuf-b FJ394552) podtipov tuf-a in tuf-b razlikujeta v dveh nukleotidih na mestih 543 in 604 bp, zamenjava na mestu 543 bp povzroči nastanek dodatnega cepitvenega mesta za encim *Hpa*II, po analizi RFLP bi tako morali dobiti fragmente dolžine 65, 174, 240, 300, 366, 404, 541, 579, 645 bp. Pri vzorcih, kjer smo dobili profil tuf-a, smo na gelu jasno videli šest fragmentov, ki se skladajo z zgoraj napisanimi, fragmenta dolžine 65 bp nismo vedno opazili, fragmenta dolžine 366 bp in 541 bp pa nista jasno vidna, najverjetneje zaradi bližine drugih fragmentov. Boljšo ločljivost bi omogočil daljši čas elektroforeze.

Po literarnih podatkih naj bi se podtip tuf-a v Evropi pojavljal večinoma na severozahodu Evrope, tuf-b pa na jugozahodu in vzhodu (Cvrković in sod., 2014). Analiza RFLP s cepitvijo pomnožka gena *tuf* z encimom *Hpa*II je pokazala, da sta v Sloveniji prisotna oba opisana podtipa tuf, vendar je v obeh letih prevladoval podtip tuf-b (pregl. 6). Na Primorskem in tudi v Posavju je bil delež podtipa tuf-a leta 2013 višji kot leta 2007, v Podravju pa smo leta 2013 zaznali manj podtipa tuf-a glede na leto 2007. Naši rezultati delno sovpadajo s podatki iz sosednjih državah, kjer sicer na južnem Tirolskem in v severni Italiji prevladuje podtip tuf-a, vendar se od leta 2002 povečuje delež tuf-b (Berger in sod., 2009a; Baric in Dalla Via, 2007), na Hrvaškem in v Avstriji pa prevladuje podtip tuf-b (Šeruga Musić in sod., 2011; Arjan in sod., 2014).

### 5.1.2 Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* na vzorcih iz vinske trte

Z analizo RFLP gena *vmp1* dobimo veliko različnih fragmentov, ta gen namreč kodira membranski protein, ki se zaradi adaptacije na kompleksno zunanje okolje zelo spreminja,

in se zato spreminjajo tudi mesta, kjer encim cepi in tako dobimo različno velike fragmente (Murolo in sod., 2010).

Potrebno pa je poudariti, da je analiza metode RFLP z uporabo agarozne gelske elektroforeze težavna pri cepitvi tega gena, saj smo dobili profile, ki so si zelo raznoliki med seboj, prav tako je bilo pri vsakem profilu veliko število fragmentov, ti pa se pri vsakem poteku elektroforeze niso enako dobro ločili, ločljivost posameznih fragmentov pa je bila odvisna tudi od osvetlitve gela. Zato smo najprej profile, ki smo jih dobili po analizi RFLP označili kot Oznaka cepitve z encimom *RsaI*, nato pa smo profile, za katere menimo da so verjetno enaki uvrstili v najverjetnejše profile vmp. Tako smo vzorce z oznako cepitve z encimom *RsaI* 19, 20 in 24 uvrstili v profil vmp 9, vzorce z oznako cepitve z encimom *RsaI* 22 in 25 v profil vmp 1, vzorce z oznako cepitve z encimom *RsaI* 17 in 27 v profil vmp 4, ter vzorce z oznako cepitve z encimom *RsaI* 21 in 26 v profil vmp 6.

Za bolj natančno določitev profila vmp bi morali ponoviti analizo RFLP z daljšim časom inkubacije pri 37 °C, saj obstaja verjetnost, da pri nekaterih vzorcih po 10 minutah inkubacije z restriktijsko endonukleazo ni prišlo do popolne cepitve. Smiselno bi bilo tudi, da bi uporabili še druge metode, kot je na primer virtualna restrikcija sekvenc tega gena.

Preverjali smo tudi, če je kateri izmed podtipov povezan s sorte vinske trte. V preglednicah 10 in 11 so tako rezultati razvrščeni po vinorodnih deželah in znotraj vsake še glede na sorte vinske trte, kjer je razvidno, da tega z našimi rezultati ne moremo potrditi.

### 5.1.3 Povezava profilov tuf in vmp na izolatih iz vinske trte

Tako kot Murolo in sod., 2010, 2013 in Pacifico in sod., 2009 smo tudi mi analizirali povezavo med profili tuf in vmp (sl. 9, 10). V raziskavi Murolo in sod. iz leta 2010 poročajo o tem, da so vzorci iz osrednje in južne Italije s profiloma V3 oz. V18, ki ustrezata našim profilom vmp 9 in 1, ustrezali podtipom tuf-a, ostali profili V pa s tuf-b. To lahko potrdimo tudi z našimi rezultati, saj so bili vzorci s podtipom tuf-a v večini profila vmp 9, nekaj pa vmp 1.

V večini raziskav avtorjev, navedenih v preglednici 13, profile po RFLP analizi gena *vmp1* označujejo s črko V in številko, uporabljajo namreč oznake kot v člankih avtorjev Pacifico in sod., ter Murolo in sod., 2010 in 2013, ter nomenklaturo po SEE.ERA-NET, kjer v sklopu projekta 'Global epidemiology of phytoplasma diseases of economical importance in south-eastern Europe' poteka molekularna označitev tudi fitoplazem iz skupine 16SrXII-A (Murolo in sod., 2010). Mi smo naše profile poimenovali profil vmp ter ustrezna številka, saj je pestrost naših profilov večja kot v drugih raziskavah in za vse naše profile nismo našli ustreznih profilov iz drugih raziskav, nekaj pa je enakih (pregl. 13).

V raziskavi avtorjev Murolo in sod., 2010 in 2013 so od 160 vzorcev vinske trte in drugih zelnatih rastlin, katerim so uspešno pomnožili gen *vmp1*, iz osrednje in južne Italije dobili med letoma 2004 in 2009 devet različnih profilov V, od teh sta bila najpogostejsa profil V3 in V14, iz vzhodnega dela osrednje Italije (Murolo in sod., 2014) leta 2011 in 2012 pa od

160 vzorcev vinske trte osem različnih profilov, najpogosteje V14 in V12. V raziskavi avtorjev Landi in sod., 2015 so uporabili vzorce velike koprive, njivskega slaka in svetlečega škržatka iz osrednje Italije. Od 152 vzorcev z uspešno pomoženim genom *vmp1* so dobili sedem različnih profilov, in sicer iz vzorcev koprive najpogosteje V3, iz njivskega slaka V9 in V12.

Na Hrvaškem (Šeruga Musić in sod., 2011; Plavec in sod., 2015) so od 29 vzorcev, kjer so poleg vinske trte analizirali tudi vzorce svetlečega škržatka in njivskega slaka, doslej odkrili sedem različnih profilov, najbolj pogosto V18, V14 in V3. Na Češkem (Fialova in sod., 2009) pa od 47 vzorcev vinske trte in več zelnatih rastlin pet različnih profilov, najpogosteje profil I.

V Avstriji so na njihovih vzorcih vinske trte, velike koprive, slaka in svetlečega škržatka dobili 11 različnih profilov, najpogosteje Vm\_At1.

Preglednica 14: Prikaz profilov iz drugih raziskav, ki so enaki našim profilom vmp.

Naš profil vmp	Profil iz ostalih raziskav	vir
<b>1</b>	<b>V18; Vm_At1</b>	Murolo in sod, 2010; Murolo in sod, 2013; Landi in sod., 2015; Murolo in sod., 2014; Plavec in sod., 2015; <b>Aryan in sod., 2014</b>
<b>3</b>	<b>V14; II</b>	Šeruga Musić in sod., 2011; Murolo in sod, 2010; Murolo in sod, 2013; Cvrković in sod., 2014; Murolo in sod., 2014; <b>Fialova in sod., 2009</b> ; Landi in sod., 2015
<b>4</b>	<b>Vm_At10</b>	Aryan in sod., 2014
<b>9</b>	<b>V3; Vm_At4</b>	Šeruga Musić in sod., 2011; Murolo in sod, 2010; Murolo in sod, 2013; Murolo in sod., 2014; Landi in sod., 2015; Plavec in sod., 2015; <b>Aryan in sod., 2014</b>
<b>13</b>	<b>V11</b>	Murolo in sod, 2010; Murolo in sod., 2013; Landi in sod., 2015; Murolo in sod., 2014
<b>12</b>	<b>V1, I</b>	Murolo in sod., 2010; Murolo in sod., 2013; <b>Fialova in sod., 2009</b>

## 5.2 ANALIZE NA VZORCIH DRUGIH MOŽNIH GOSTITELJEV IN PRENAŠALCEV 'Ca. P. Solani'

Pri dveh vzorcih njivskega slaka se RFLP profili gena *tuf* niso ujemali s profilom tuf-a in tuf-b, kar pa je pričakovano, glede na to, da je bila v teh vzorcih potrjena '*Ca. P. convolvuli*'(bindweed yellows) (Poročilo o preizkušanju ustreznosti D0001/14, 2014). Pri teh dveh vzorcih smo le za enega dobili tudi profil vmp (vmp 28), katerega pa nismo našli v nobenem vzorcu, okuženem s '*Ca. P. solani*'.

Pri vzorcih njivskega slaka, ki so bili okuženi s fitoplazmo iz skupine 16SrXII smo dobili profil tuf-b, prav tako pri vzorcih kadulje, rdečega drena in svetlečega škržatka. Za vzorce njivskega slaka in svetlečega škržatka smo tak rezultat pričakovali, saj so to znane

gostiteljske rastline in prenašalec fitoplazme '*Ca. P. solani*', rezultati pa kažejo, da okužuje tudi kaduljo in rdeči dren. Profili vmp so bili pri teh vzorcih raznoliki, na vzorcih slaka in kadulje smo dobili profile vmp, ki jih na trti nismo našli (profila vmp 14 in 15), ostali pa so bili takšni kot na trti (profil vmp 3, 4, 7 in 9).

Pri vzorcu DNA iz žuželke *Euscelis incisus* je ugnezdeni produkt gena *tuf* sicer bil prisoten, ampak ga encim *HpaII* ni razrezal. Pomnožitev gena *vmpI* pa ni uspela. Ta žuželka je znan vektor prenašalec fitoplazme '*Ca. P. asteris*' in v temu vzorcu smo tudi potrdili prisotnost te fitoplazme, in ker so začetniki specifični za stolbur skupino in fitoplazme rumenic tipa aster smo ugnezdeni produkt pridobili, ni pa bilo cepitvenih mest za encim *HpaII*.

Gen *tuf* smo uspešno pomnožili tudi pri enem vzorcu ameriškega škržatka (D604/09), ki je bil glede na predhodne analize s PCR v realnem času okužen z relativno nizko količino fitoplazme iz skupine 16SrXII, kamor sodi tudi '*Ca. P. solani*' (Ct za amplikon BN je bil 36) (Poročilo o preizkušanju ustreznosti D0001/15, 2015). V omenjenem vzorcu niso dokazali prisotnosti '*Ca. P. asteris*' in ne fitoplazme tipa FD (ta žuželka je sicer monofagni prenašalec fitoplazme tipa FD). Dobljeni profil po analizi z RFLP za gen *tuf* se ni ujemal z drugimi podtipi, hkrati pa se tudi profil gena *vmp* ni ujemal z nobenim izolatom iz vinske trte. Enak profil gena *vmp* smo zasledili tudi v vzorcu kadulje (D992/12), kjer pa se je profil gena *tuf* ujemal s profilom *tuf-b*.

## 6 SKLEPI

- Ugotovili smo, da so trte v Sloveniji, podobno kot v sosednjih državah, okužene s podtipom '*Ca. P. solani*' tuf-a in tuf-b.
- V Sloveniji je, podobno kot na Hrvaškem in v Avstriji, pogostejši podtip tuf-b (tako v letu 2007, kot tudi v letu 2013).
- Na Primorskem in v Posavju se je delež tuf-a v obdobju šestih let zvišal, v Podravju pa zmanjšal.
- Z analizo gena *vmp1* smo opazili večjo molekulsko raznolikost sevov. Največ variabilnosti med profili vmp je povezanih s podtipom tuf-b, podtip tuf-a so imeli le vzorci s profilom vmp 9 in vmp 1.
- Leta 2007 je bil najpogostejši profil vmp 9, leta 2013 pa profil vmp 1. Porast deleža profila vmp 1 in upad deleža profila vmp 9 v letu 2013 glede na leto 2007 je opažen v vseh treh vinorodnih območjih. Profil vmp 1 je bil med najbolj pogostimi profili v Podravju že leta 2007, ko ga na Primorskem še nismo zasledili.
- Z našimi rezultati nismo pokazali povezave med različnimi podtipi in sorto vinske trte.

## 7      POVZETEK

Počrnelost lesa ali navadna trsna rumenica (BN) je bolezen, ki jo povzroča fitoplazma '*Ca. P. solani*' in povzroča veliko gospodarsko škodo v pridelavi vina. Razširjena je po celotni Evropi in sredozemskem območju. Glede na gen *tuf* uvrščamo seve v dva glavna podtipa, *tuf-a* in *tuf-b*, vsak ima tudi drugačen epidemiološki cikel. Podtip *tuf-a* je povezan z veliko koprivo kot glavno gostiteljsko rastlino, podtip *tuf-b* pa z njivskim slakom. Z našo raziskavo sicer tega ne moremo potrditi, saj smo imeli premajhno število vzorcev drugih gostiteljskih rastlin. Pojavljajo se tudi razlike v geografski razporeditvi obeh podtipov, podtip *tuf-a* najdemo večinoma v severni Italiji, v večini ostale Evrope pa prevladuje podtip *tuf-b*.

Glavni namen magistrske naloge je bil z molekularnimi metodami, in sicer z analizo RFLP pomnožkov ugnezdenje PCR določiti molekulska raznolikost vzorcev DNA '*Ca. P. solani*' iz Slovenije in jih uvrstiti v že znane podtipe. Rezultate smo nato poskušali povezati z rezultati sosednjih držav.

Za analizo smo izbrali vzorce DNA fitoplazme '*Ca. P. solani*' iz vzorcev vinske trte in sicer iz leta 2007 in 2013, da bi ugotovili, ali je v šestletnem obdobju prišlo do bistvenih razlik v pojavljanju posameznih sevov te fitoplazme. Analizirali smo tudi vzorce iz nekaterih okuženih žuželk in zelnatih rastlin. Najprej smo z reakcijami PCR z ustreznimi začetniki in protokoli pomnožili gena *tuf* in *vmp1*. Pomnožek smo nato uporabili za ugnezdeno reakcijo PCR. Rezultat smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Vzorce z uspešno pomnoženimi geni smo nato analizirali z metodo polimorfizmov restrikcijskih fragmentov. Pomnožek gena *tuf* smo razrezali z encimom *HpaII*, gena *vmp1* pa z encimom *RsaI*. Fragmente smo med seboj ločili z agarozno gelsko elektroforezo, in primerjali profile. Dobljene rezultate smo primerjali z raziskavami avtorjev iz ostalih evropskih držav, predvsem s sosednjimi državami.

BN na vinski trti je v Sloveniji zelo razširjena bolezen. Z analizo gena *tuf* smo ugotovili, da sta v Sloveniji prisotna oba, *tuf-a* in *tuf-b*, pri čemer je prevladujoči podtip v Sloveniji *tuf-b*. Z analizo gena *vmp1* smo pridobili še večjo pestrost med sevi (najmanj 16 različnih profilov).

S to raziskavo smo pokazali, da v Sloveniji vinsko trto okužujejo različni izolati '*Ca. P. solani*'. Poglobljena raziskava drugih gostiteljskih rastlin v vinogradih bi bila nujna za določitev epidemioloških ciklov. Za še boljšo opredelitev raznolikosti sevov bi bilo smiselno uporabiti tudi druge genske označevalce, kot je *secY*, ki kodira membransko enoto sekretorne poti in gen za membranski protein *stamp*, ter uporaba drugih metod, kot je sekvenciranje.

8       **VIRI**

- Acs Z., Ember I., Contaldo N., Nagy Z., Bertaccini A., Kölber M. 2010. Tuf-type characterization of Hungarian stolbur strains from different host species. V: Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management: abstract book of the combined meeting of work groups 1-4. February 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>, 2010, Sitges, Spain. COST action FA0807: integrated management of phytoplasma epidemics in different crop system. Bertaccini A., Laviña A., Batlle A. (eds.). Sitges, Institut de recerca i tecnologia agroalimentarie: 2.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.
- Albertazzi G., Milc J., Caffagni A., Francia E., Roncaglia E., Ferrari F., Tagliafico E., Stefani E., Pecchioni N. 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science*, 176: 792–804.
- Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. 2001. Flavescence doree in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40, 2: 79–86.
- Aryan A., Brader G., Mörtel J., Pastar M., Riedle-Bauer M. 2014. An abundant ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ tuf b strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 2: 213–227.
- Atanasova B., Jakovljević M., Spasov D., Jović J., Mitrović M., Toševski I., Cvrković T. 2015. The molecular epidemiology of bois noir grapevine yellows caused by ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ in the Republic of Macedonia. *European Journal of Plant Pathology*, 142:759–770.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Jancso Radek A., Shechenko D. V., Tsukerman K., Waunas T., Lapidus A., Campbell J., W., Hogenhout S. A. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188, 10: 3682–3696.
- Baric S., Dalla Via J. 2007. Temporal shifts of bois noir phytoplasma types infecting grapevine in South Tyrol (northern Italy). *Vitis*, 46: 101–102.
- Battle A., Laviña A., Kuszala C., Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E. 1997. Detection of flavescence doree phytoplasma in grapevine in northern Spain. *Vitis*, 36, 4: 211–212.
- Belli G., Bianco P. A., Conti M. 2010. Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Plant Pathology*, 92, 2: 303–326.

- Berger J., Schweikofler W., Kerschbamer C., Roschatt C., Dalla via J., Baric S. 2009a. Occurrence of Stolbur phytoplasma in the vector *Hyalesthes obsoletus*, herbaceous host plants and grapevine in South Tyrol (Northern Italy). *Vitis*, 48, 4: 185–192.
- Berger J., Dalla Via J., Baric S. 2009b. Development of a TaqMan allelic discrimination assay for the distinction of two major subtypes of the grapevine yellows phytoplasma Bois noir. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 521–526.
- Bertaccini A., Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 355–378.
- Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S., Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 1763–1788.
- Botti S., Bertaccini A. 2007. Grapevine yellows in Northern Italy: molecular identification of Flavescence dorée phytoplasma strains and of Bois Noir phytoplasmas. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2325–2330.
- Boudon-Padieu E., Maixner M. 2007. Potential effects of climate change on distribution and activity of insect vectors of grapevine pathogens. V: Proceedings of the International and multi-disciplinary colloquium Global warming, which potential impacts on the vineyards. 28-30 marec, 2007, Dijon, France. Dijon, Université de Bourgogne : 8 str. [http://chaireunesco-vinetculture.ubourgogne.fr/colloques/actes\\_clima/Actes/Article\\_Pdf/BoudonPadieu.pdf](http://chaireunesco-vinetculture.ubourgogne.fr/colloques/actes_clima/Actes/Article_Pdf/BoudonPadieu.pdf) (september 2015)
- Bressan A., Turata R., Spiazzi S., Boudon-Padieu E., Girolami V. 2007. Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology*, 150: 331–339.
- Canik D., Ertunc F., Paltrinieri S., Contaldo N., Bertaccini A. 2011. Identification of different phytoplasmas infecting grapevine in Turkey. *Bulletin of Insectology*, 64, Suppl.: S225–S226.
- Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac X. 2009. Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 9: 2951–2957.
- Contaldo N., Bertaccini A., Paltrinieri S., Windsor M. H., Windsor D. G. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 3: 607–617.
- Council Directive 2000/29/EC. On protective measures against the introduction into the community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the community. 2000. Official Journal of the European Union, 43, L169: 1–148.

- Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Toševski I. 2014. Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. Plant Pathology, 63: 42–53.
- Duduk B., Botti S., Krstić B., Dukić N., Bertaccini A. 2004. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. Journal of Phytopathology, 152: 575–579.
- Duduk B., Bertaccini A. 2011. Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? Phytopathogenic Mollicutes, 1, 1: 3–13.
- Endeshaw T. S., Murolo S., Romanazzi G., Neri D. 2012. Effects of Bois noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay. Physiologia Plantarum, 145: 286–295.
- EPPO. 2013. First report of grapevine flavescent dorée phytoplasma in Hungary. EPPO Global Database. Reporting service, 10: Num. article 2013/211.  
<https://gd.eppo.int/reporting/article-2673> (9. 9. 2015)
- Fabre A., Danet J-L., Foissac X. 2011. The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. Gene, 472: 37–41.
- Fialova R., Balakishiyeva G., Danet L-J., Šafarova D., Foissac X., Navratil M. 2009. Genetic variability of stolbur phytoplasma In annual crop and wild plant species in south Moravia. Journal of Plant Pathology, 91, 2: 411–416.
- Firrao G., Gibb K., Streten C. 2005. Short taxonomic guide to the genus ‘*Candidatus*’ phytoplasma. Journal of Plant Pathology, 87, 4: 249–263.
- Hogenhout A. S., Oshima K., Ammar E.-D., Kakizawa S., Kingdom N. H., Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molecular Plant Pathology, 9, 4: 403–423.
- HpaII datacard. 2015. Ipswich, New England Biolabs: 1 str.  
<https://www.neb.com/~/media/Catalog/AllProducts/DA0BD241F2C24644B397E1CEE A6B351C/Datacards%20or%20Manuals/R0171Datasheet-Lot0621301.pdf> (13.9.2015).
- Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Real-time PCR detection systems for flavescent dorée and bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. Plant Pathology, 56: 785–796.
- Imo M., Maixner M., Johannessen J. 2013. Sympatric diversification vs. immigration: deciphering host-plant specialization in a polyphagous insect, the stolbur phytoplasma vector *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). Molecular Ecology, 22: 2188–2203.

- IRPCM. 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1243–1255.
- Johannesen J., Lux B., Michel K., Seitz A., Maixner M. 2008. Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* in Europe. Entomologia Experimentalis et Applicata, 126: 217–227.
- Johannesen J., Foissac X., Kehrli P., Maixner M. 2012. Impact of vector dispersal and host-plant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. PLoS ONE, 7, 12: e51809, doi:10.1371/journal.pone.0051809: 12 str.
- Kakizawa S., Oshima K., Namba S. 2006. Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. Trends in Microbiology, 14, 6: 254–256.
- Kaul C., Maixner M., Johannesen J. 2009. Infection of bois-noir tuf-type-I stolbur phytoplasma in *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) larvae and influence on larval size. Journal of Applied Entomology, 133: 596–601.
- Kessler S., Schaefer S., Delabays N., Turlings Ted C. J., Trivellone V., Kehrli P. 2011. Host plant preferences of *Hyalesthes obsoletus*, the vector of the grapevine yellows disease ‘bois noir’, in Switzerland. Entomologia Experimentalis et Applicata, 139: 60–67.
- Krnjajić S., Mitrović M., Cvrković T., Jović J., Petrović A., Forte V., Angelini E., Toševski I. 2007. Occurrence and distribution of *Scaphoideus titanus* in multiple outbreaks of “flavescence dorée” in Serbia. Bulletin of Insectology, 60, 2: 197–198.
- Landi L., Riolo P., Murolo S., Romanazzi G., Nardi S., Isidoro N. 2015. Genetic variability of stolbur phytoplasma in *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) and its main host plants in vineyard agroecosystems. Journal of Economic Entomology, 108, 4: 1506–1515.
- Langer M., Maixner M. 2004. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. Vitis, 43, 4: 191–199.
- Madigan T. M., Martinko M. J., Dunlap V. P., Clark P. D. 2009. Brock biology of microorganisms. 12<sup>th</sup> ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 377–387.
- Maejima K., Oshima K., Namba S. 2014. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. Journal of General Plant Pathology, 80, 3: 210–221.
- Maixner M. 1994. Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes-obsoletus* (Auchenorrhyncha, Cixiidae). Vitis, 33: 103–104.

- Maixner M. 2007. Biology of *Hyalesthes obsoletus* and approaches to control this soilborne vector of Bois noir disease. IOBC/WPRS Bulletin, 30: 3–9.
- Maixner M. 2011. Recent advances in Bois noir research. V: 2<sup>nd</sup> European Bois Noir workshop 2011. Book of abstracts. February 27 - March 1, 2011, Castelbrando, Cison di Valmarino, Italy. Padova, Universitá di Padova, Universitá di Udine: 17–32.
- Maixner M., Johannesen J., Michel K., Lux B., Seitz A. 2007. Host plant specificity of *Hyalesthes obsoletus* and consequences for “Bois noir” epidemiology. Bulletin of Insectology, 60, 2: 399–400.
- Maixner M., Kr Klappe DY. 2011. Symptom remission and recovery in ‘bois noir’ infected grapevines. Bulletin of Insectology, 64, Suppl.: S175–S176.
- Maixner M., Albert A., Johannesen J. 2014. Survival relative to new and ancestral host plants, phytoplasma infection, and genetic constitution in host races of a polyphagous insect disease vector. Ecology and Evolution, 4, 15: 3082–3092.
- Makarova O., Contaldo N., Paltrinieri S., Kawabe G., Bertaccini A., Nicolaisen M. 2012. DNA Barcoding for Identification of ‘*Candidatus Phytoplasmas*’ using a fragment of the elongation factor Tu gene. Plos One, 7, 12: 9 str.
- Marcone C. 2014. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. Annals of Applied Biology, 165: 199–221.
- Martini M., Murari E., Mori N., Bertaccini A. 1999. Identification and epidemic distribution of two Flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). Plant Disease, 83, 10: 925–930.
- Mayer J. C., Vilcinskas A., Gross J. 2008. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. Journal of Chemical Ecology, 34: 1518–1522.
- Mehle N., Ravnikar M., Seljak G., Knapič V., Dermastia M. 2011. The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. Phytopathogenic Mollicutes, 1, 2: 65–76.
- Mehle N., Nikolić P., Rupar M., Boben J., Ravnikar M., Dermastia M. 2013a. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. Methods in Molecular Biology, 938: 139–145.
- Mehle N., Prezelj N., Hren M., Boben J., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M. 2013b. A real-time PCR detection system for the bois noir and flavescence dorée phytoplasmas and quantification of the target DNA. Methods in Molecular Biology, 938: 253–268.
- Milkus B., Clair D., Idir S., Habili N., Boudon-Padieu E. 2005. First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. Plant Pathology, 54: 236.

- Mirchenari M. S., Massah A., Zirak L. 2015. ‘Bois noir’: new phytoplasma disease of grapevine in Iran. *Journal of Plant Protection Research*, 55, 1: 88–93.
- Murolo S., Marcone C., Prota V., Garau R., Foissac X., Romanazzi G. 2010. Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 2049–2059.
- Murolo S., Marcone C., Prota V., Garau R., Foissac X., Romanazzi G. 2013. Corrigendum. *Journal of Applied Microbiology*, 115: 631–633.
- Murolo S., Mancini V., Romanazzi G. 2014. Spatial and temporal stolbur population structure in a cv. Chardonnay vineyard according to *vmp1* gene characterization. *Plant Pathology*, 63: 700–707.
- Murolo S., Romanazzi G. 2015. In-vineyard population structure of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ using multilocus sequence typing analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 31: 221–230.
- Oliveri C., Pacifico D., D'Urso V., La Rosa R., Marzachi C., Tessitori M. 2015. Bois noir phytoplasma variability in a mediterranean vineyard system: new plant host and putative vectors. *Australasian Plant Pathology*, 44: 235–244.
- Pacifico D., Alma A., Bagnoli B., Foissac X., Pasquini G., Tessitori M., Marzachì C. 2009. Characterization of bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a stolbur-specific putative membrane protein gene. *Bacteriology*, 99, 6: 711–715.
- Plavec J., Križanac I., Budinšćak Ž., Škorić D., Šeruga Musić M. 2015. A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. *European Journal of Plant Pathology*, 142: 591–601.
- Poročilo o preizkušanju ustreznosti D0001/14. 2014. Barcoding 16S in Tuf v diagnostiki fitoplazem. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 8 str.
- Poročilo o preizkušanju ustreznosti D0001/15. 2015. Aster yellows – naknadno testiranje vzorcev. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 37 str.
- Quaglino F., Zhao Y., Bianco P. A., Casati P., Durante G., Davis E.R. 2009. New 16Sr subgroups and distinct single nucleotide polymorphism lineages among grapevine Bois noir phytoplasma populations. *Annals of Applied Biology*, 154: 279–289.
- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Attilio B. P., Wei W., Davis R. E. 2013. ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2879–2894.

- Radonjić S., Hrnčić S., Jović J., Cvrković T., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I. 2009. Occurrence and distribution of grapevine yellows caused by stolbur phytoplasma in Montenegro. *Journal of Phytopathology*, 157: 682–685.
- Ravnikar M., Mehle N., Dreö T., Boben J., Tušek-Žnidarič M., Pirc M., Erjavec J., Prijatelj-Novak Š., Blatnik A., Matičič L., Slovnik Udovč M., Mihevc A., Camloh M., Nikolić P. 2008. Program strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin: končno poročilo o opravljenem delu na strokovni nalogi: diagnosticiranje bakterijskih in virusnih bolezni za leto 2007. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 147 str.
- Ravnikar M., Mehle N., Pirc M., Dreö T., Dermastia M., Tušek Žnidarič M., Camloh M., Naglič T., Kogovšek P., Prijatelj Novak Š., Blatnik A., Matičič L., Dobnik S. 2014. Program strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin: diagnosticiranje bakterijskih in virusnih bolezni. Končno poročilo o opravljenem delu na strokovni nalogi za leto 2013. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 235 str.
- Riedle-Bauer M., Sara A., Regner F. 2008. Transmission of a stolbur phytoplasma by the agalliinae leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Journal of Phytopathology*, 156: 687–690.
- RsaI datacard. 2015. Ipswich, New England Biolabs: 1 str.  
<https://www.neb.com/~/media/Catalog/AllProducts/EE4895EB6295428CAE08E7D37D8AA19A/Datacards%20or%20Manuals/R0167Datasheet-Lot0491212.pdf>  
(14.9.2015).
- Sabate J., Laviña A., Batlle A. 2014. Incidence of Bois Noir phytoplasma in different viticulture regions of Spain and Stolbur isolates distribution in plants and vectors. *European Journal of Plant Pathology*, 139:185–193.
- Schaerer S., Johnston H., Gugerli P., Linder C., Shaub L., Colombi L. 2007. “Flavescence dorée” in Switzerland: spread of the disease in canton of Ticino and of its insect vector, now also in cantons of Vaud and Geneva. *Bulletin of Insectology*, 60, 2: 375–376.
- Schneider B., E. Seemüller E. 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 9: 3409–3412.
- Schneider B., Gibb K. S., Seemüller E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381–3389.
- Seljak G., Osler R. 1997. Potrditev trsne rumenice vrste ‘črni les’ (grapevine Bois noir phytoplasma) na Primorskem. V: Zbornik predavanj in referatov s 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, 4.-5.marec, 1997, Portorož. Maček J. (ur.) Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 63–69.

Sousa E., Cardoso F., Mimoso C. M., Sa C., Teixeira K. 2011. The complex ‘Flavescence doreé phytoplasma/*Scaphoideus titanus* in Portugal. Phytopathogenic Mollicutes, 1, 1: 51–53.

Šeruga Musić M., Pusic P., Fabre A., Škoric D., Foissac X. 2011. Variability of stolbur phytoplasma strains infecting Croatian grapevine by multilocus sequence typing. Bulletin of Insectology, 64, Suppl.: S39–S40.

Plavec J., Križanac I., Budinščak Ž., Škorić D., Šeruga Musić M. 2015. A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. European Journal of Plant Pathology, 142, 3: 591–601.

Vincze T., Posfai J., Roberts R. J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes, Nucleic Acids Research, 31: 3688–3691.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se prof. dr. Marini Dermastia, ker mi je omogočila opravljanje te zanimive naloge, ter za strokovni pregled in nasvete.

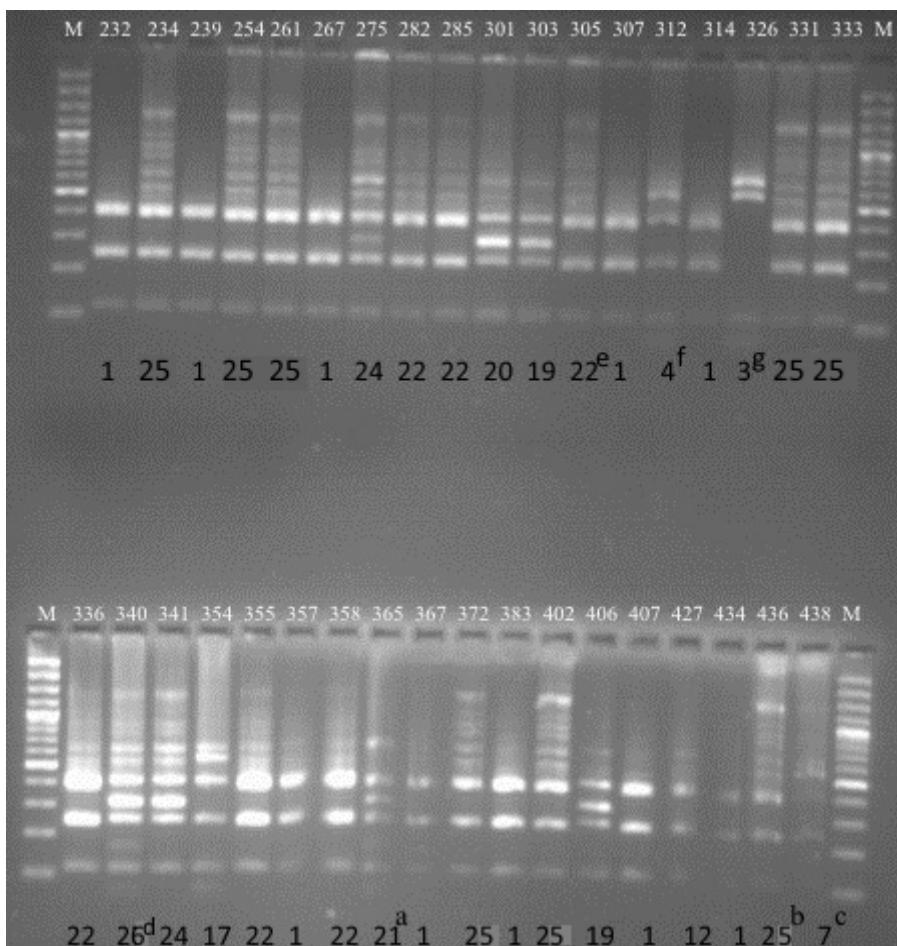
Velika zahvala gre tudi dr. Nataši Mehle za vso pomoč pri uvajanju v laboratorijsko delo, ter potrpežljivost in trud pri popravi naloge.

Hvala tudi doc. dr. Tomažu Accettu za pregled naloge in nasvete.

Hvala vsem mojim najbližnjim za vso podporo tekom celotnega študija.

## PRILOGE

Priloga A: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnim encimom *RsaI*, vzorci so iz leta 2013, oznaka vzorcev Dxy/13. Elektroforeza je potekala na 2,5% agaroznem gelu. M, GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific. NK, negativna kontrola reakcije PCR.



Priloga B1: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnim encimom *RsaI* vzorcev od D232 do D438.

<sup>a</sup> vzorcu D365 smo določili oznako cepitve z encimom *RsaI* 21, saj se pri spremenjanju kontrasta vidita tudi fragmenta dolžine 80 bp in 180 bp.

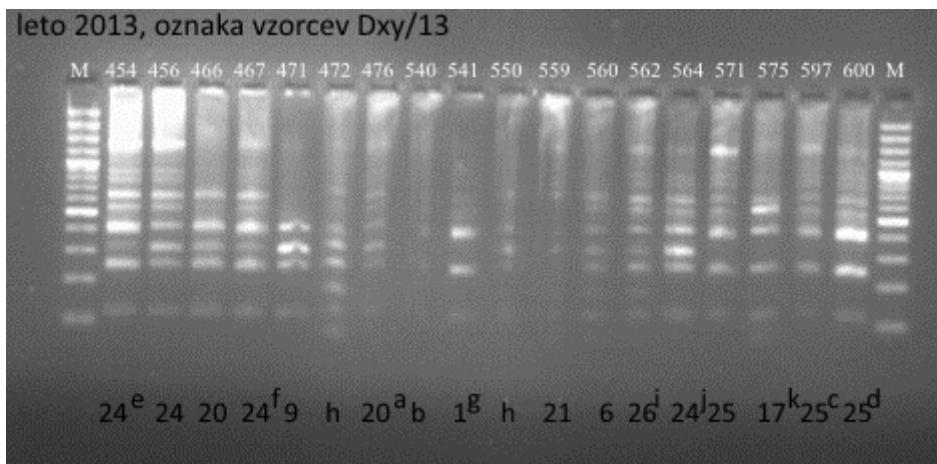
<sup>b</sup> pri tem vzorcu so fragmenti dolžine nad 420 bp nejasni, a se vidijo pri spremenjanju kontrasta.

<sup>c</sup> vzorcu D438 smo določili oznako cepitve z encimom *RsaI* 7, čeprav se na sliki slabo vidijo fragmenti 420, 250, 180, 120 in 80 bp, a so pri spremenjanju kontrasta slike vidni.

<sup>d</sup> vzorcu D340 smo določili oznako cepitve z encimom *RsaI* 26, saj se pri spremenjanju kontrasta vidi fragment dolžine 80 bp.

<sup>e</sup> pri spremenjanju kontrasta sta vidna tudi fragmenta dolžine 650 in 550 bp.

<sup>f,g</sup> pri obeh vzorcih sta slabo vidna fragmenta dolžine 80 bp pri spremenjanju kontrasta vidna.



Priloga C2: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmpI* razcepljenih z restriktičnim encimom *RsaI* vzorcev od D454 do D600.

<sup>a</sup> pri vzorcu D476 se fragmenti dolžine nad 420 bp razločijo pri spremnjanju kontrasta,

<sup>b</sup> zaradi slabše ločljivosti smo analizo ponovili (glej prilogi D1 in D3).

<sup>c,d</sup> pri obeh vzorcih so večji fragmenti nejasni, ampak so pri spremnjanju kontrasta slike vidi, da ustrezajo oznaki cepitve z encimom *RsaI* 25.

<sup>e</sup> vzorcu D454 smo določili oznako cepitve z encimom *RsaI* 24, saj se pri spremnjanju kontrasta vidi tudi fragment dolžine 320 bp.

<sup>f</sup> vzorec D467 ima fragmente dolžine nad 420 bp nejasne, ampak so pri spremnjanju kontrasta vidni tudi fragmenti dolžine 900 in 800 bp.

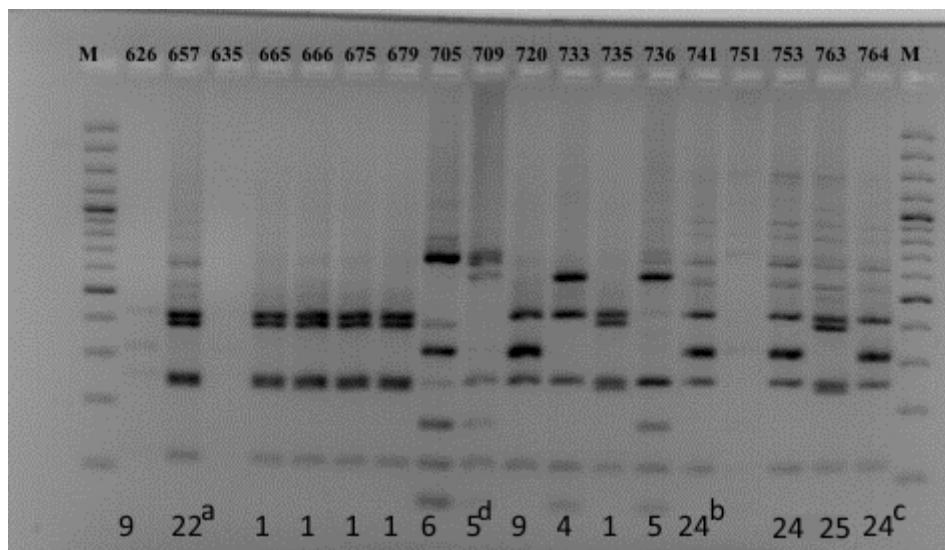
<sup>g</sup> temu vzorcu smo določili profil *vmp* 1, saj se pri spremnjanju kontrasta vidi tudi fragment dolžine 120 bp.

<sup>h</sup> zaradi slabše ločljivosti smo analizo ponovili (glej prilog D1).

<sup>i</sup> vzorcu D562 se slabo vidijo fragmenti dolžine 900, 800 in 80 bp, ampak so pri spremnjanju kontrasta vidni.

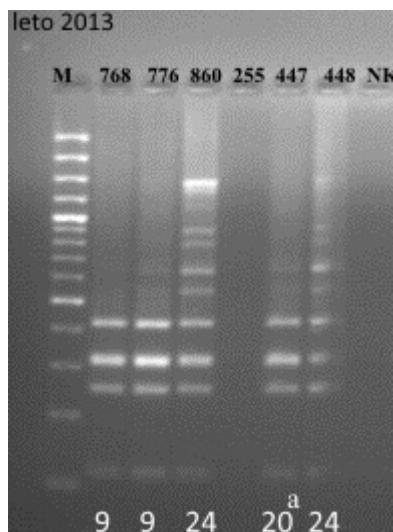
<sup>j</sup> slabo vidni fragmenti dolžine 900 in 800 bp so pri spremnjanju kontrasti vidni.

<sup>k</sup> vzorcu se pri spremnjanju kontrasta vidi tudi fragment dolžine 80 bp.



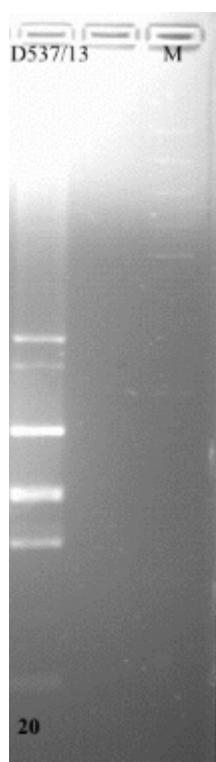
Priloga D3: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmpI* razcepljenih z restriktičnim encimom *Rsa*I vzorcev od D626 do D764.

<sup>a</sup> pri vzorcu D657 je slabo viden fragment dolžine 550 bp, a se ga pri spremnjanju kontrasta opazi.  
<sup>b,c</sup> vzorcema se slabo vidijo fragmenti nad 420 bp, ampak se pri obeh, pri spremnjanju kontrasta, vidijo fragmenti dolžine 550, 650, 800 in 900 bp.  
<sup>d</sup> slabše viden fragment dolžine 80 bp se vidi pri spremnjanju kontrasta.



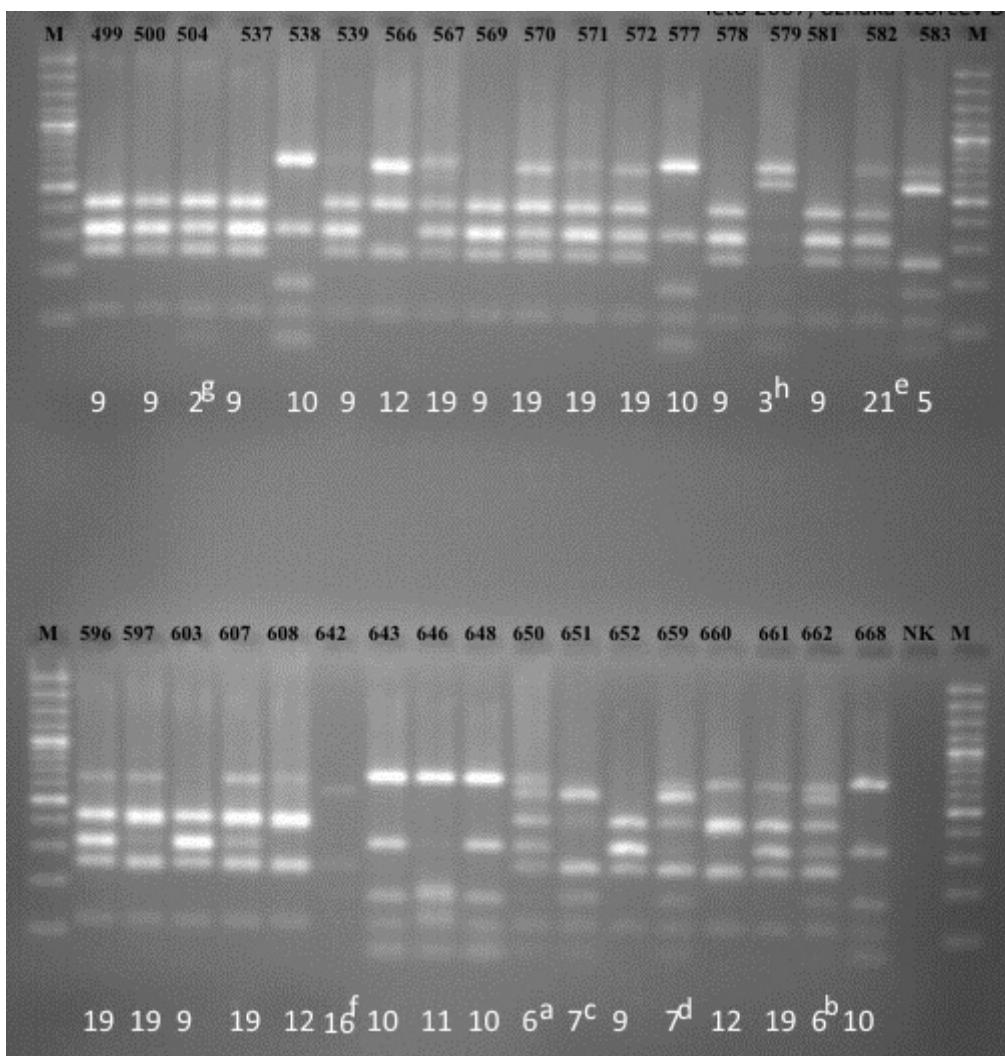
Priloga E4: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmpI* razcepljenih z restriktičnim encimom *Rsa*I vzorcev od D768 do D860, ter D255, D447 in D448.

<sup>a</sup> pri vzorcu D447 sta fragmenta dolžine 550 in 650 bp bolje vidna pri spremnjanju kontrasta in ustreza oznaki cepitve z encimom *Rsa*I 20.



Priloga F5: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorca D537.

Priloga G: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktijskim encimom *RsaI*, vzorci so iz leta 2007, oznaka vzorcev Dxy/07. Elektroforeza je potekala na 2,5% agaroznem gelu. M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific. NK, negativna kontrola reakcije PCR.



Priloga H1: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnim encimom *Rsa*I vzorcev od D499 do D668.

<sup>a</sup> vzorec D650 ustreza oznaki cepitve z encimom *RsaI* 6, saj se pri spremnjanju kontrasta vidi fragment dolžine 180 bp.

<sup>b</sup> vzorec D662 prav tako ima oznako cepitve z encimom *Rsa*I 6, saj je pri spremenjanju kontrasta viden fragment dolžine 80 bp.

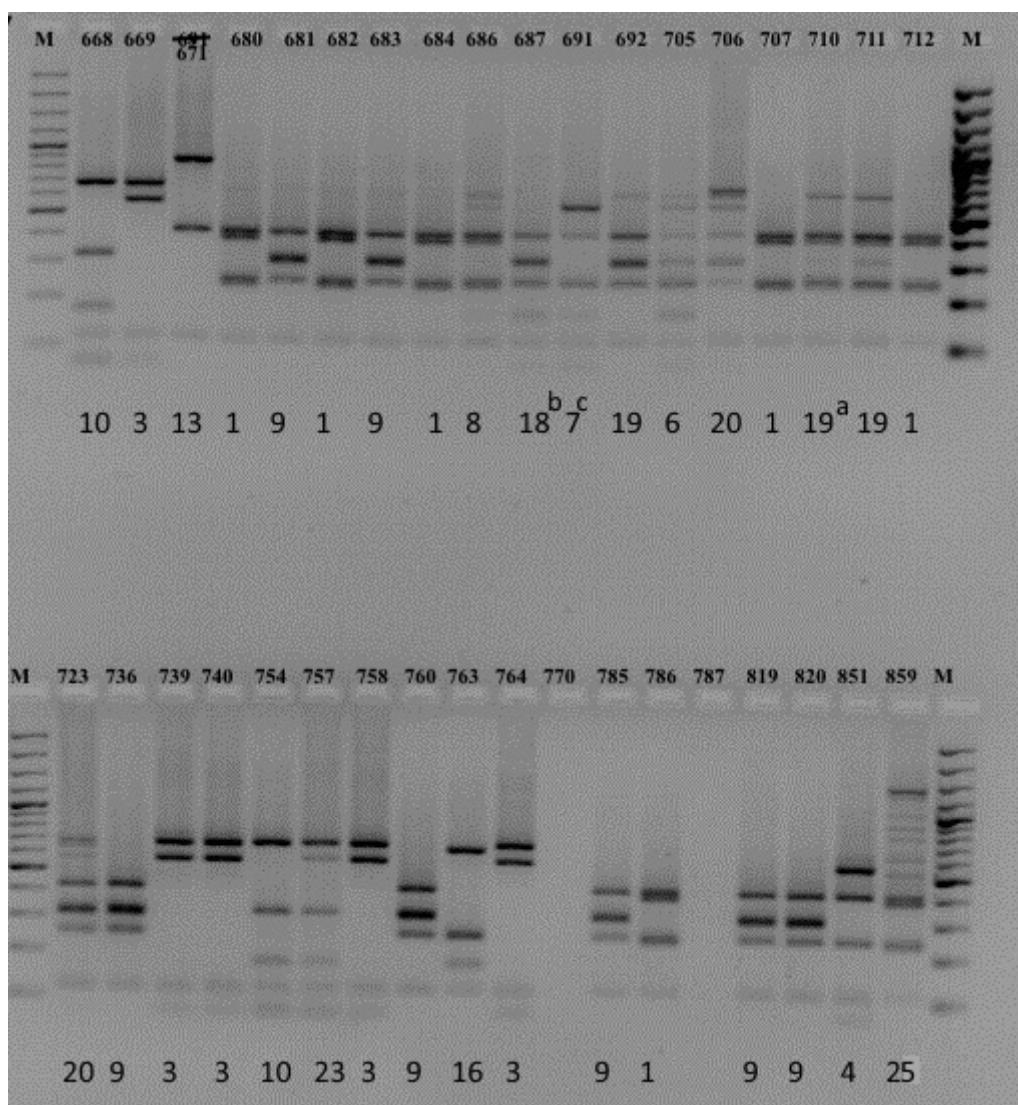
<sup>c</sup> pri vzorcu D652 se slabo vidijo fragmenti dolžine 420 in 80 bp, ampak se pri sprememjanju kontrasta razločijo.

<sup>d</sup> vzorec D659 ustreza oznaki cepitve z encimom *RsaI* 7, saj se fragment dolžine 80 bp pri spremnjanju kontrasta dobro vidi.

<sup>e</sup> slabо видни фрагменти 180, 120 и 80 bp се сприједају контрасту видија.

<sup>f</sup> pri vzorcu D642 se fragmenti 250, 180 in 120 bp zelo slabo vidijo, ampak so pri spremnjanju kontrasta opazni.

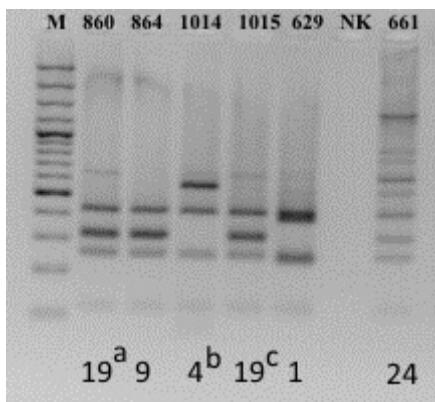
<sup>g,h</sup> pri obeh vzorcích se pri spreminjanju kontrasta vidi fragment dolžine 80 bp.



Priloga I2: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnim encimom *RsaI* vzorcev od D668 do D859.

<sup>a</sup> pri vzorcu D710 s spremenjanjem kontrasta jasno vidimo fragment dolžine 320 bp.

<sup>b,c</sup> pri obeh vzorcih se pri spremenjanju kontrasta vidi fragment dolžine 80 bp.

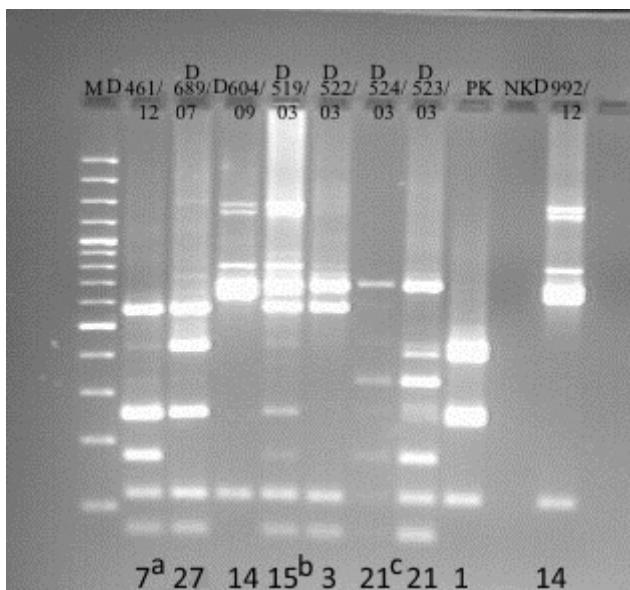


Priloga J3: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmpI* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI* vzorcev od D860 do D1015 in D629.

<sup>a, c</sup> slabo viden fragment dolžine 650 bp se pri spremenjanju kontrasta vidi.

<sup>b</sup> vzorcu se pri spremenjanju kontrasta vidi tudi fragment dolžine 80 bp.

Priloga K: Analiza RFLP pomnožkov gena *vmpI* razcepljenih z restrikcijskim encimom *RsaI*, vzorcev ostalih rastlin in žuželk. Elektroforeza je potekala na 2,5% agaroznem gelu. M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific. PK, pozitivna kontrola PCR reakcije (D232/13). NK, negativna kontrola PCR reakcije.

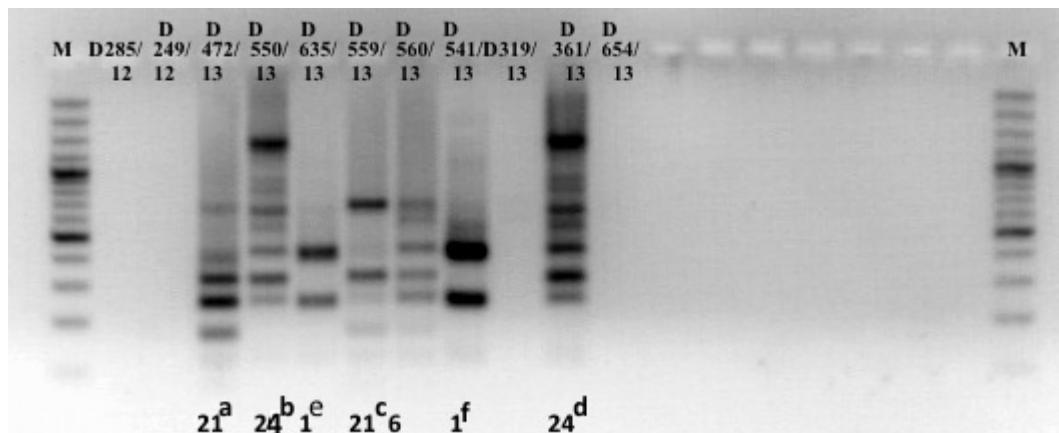


<sup>a</sup> vzorcu D461/12 se pri spremenjanju kontrasta jasno vidi fragment dolžine 420 bp.

<sup>b</sup> vzorcu D519/09 se na sliki slabše vidijo fragmenti dolžine 440, 250 in 180 bp, a so pri spremenjanju kontrasta jasno vidni.

<sup>c</sup> vzorcu D524/03 se slabše vidijo fragmenti dolžine 700, 420, 320, 250, 180, 120 in 80 bp, a so pri spremenjanju kontrasta vidni.

Priloga L: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnim encimom *RsaI*. Elektroforeza je potekala na 2,5% agaroznem gelu. M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific. NK, negativna kontrola reakcije PCR.



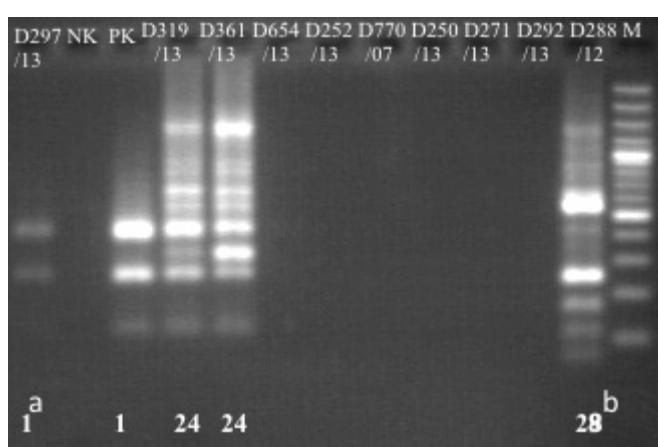
Priloga M1: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnim encimom *RsaI* vzorcev D285/12, D249/12, D472/13, D550/13, D635/13, D559/13, D560/13, D541/13, D319/13, D361/13, D654/13.

<sup>a</sup> temu vzorcu smo določili oznako cepitve z encimom *RsaI* 21, saj pri spreminjanju kontrasta opazimo tudi fragmenta dolžine 120 bp in 80 bp.

<sup>b,d</sup> pri obeh vzorcih pri spreminjanju kontrasta razločimo fragmente dolžine 900, 800, 650, 550 bp, ter 120 bp.

<sup>c</sup> vzorcu D559/13 se slabše viden fragment dolžine 420 bp vidi pri spreminjanju kontrasta.

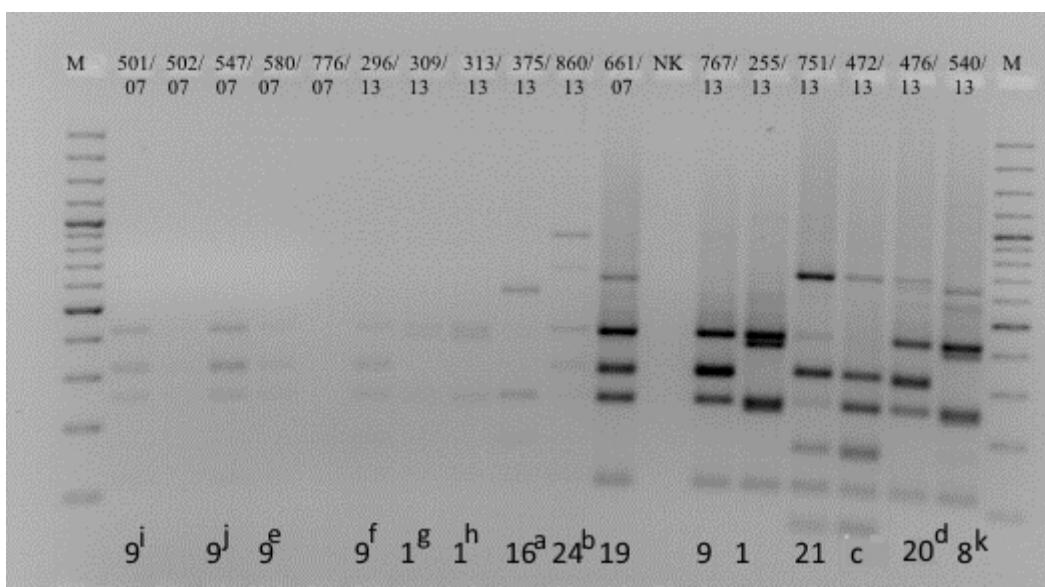
<sup>e,f</sup> vzorcema se pri spreminjanju kontrasta vidi tudi fragment dolžine 120 bp.



Priloga N2: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnim encimom *RsaI* vzorcev D297/13, D319/13, D361/13, D654/13, D252/13, D770/07, D250/13, D271/13, D292/13, D288/12. PK, pozitivna kontrola reakcije PCR (232/13).

<sup>a</sup> fragment dolžine 120 bp, se vidi pri spreminjanju kontrasta slike.

<sup>b</sup> pri spreminjanju kontrasta so vidni fragmenti dolžine 1000, 900, 800, 550, 420 in 320 bp.



Priloga O3: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktijskim encimom *RsaI* vzorcev D501/07, D502/07, D547/07, D580/07, D776/07, D296/13, D309/13, D313/13, D375/13, D860/13, D661/07, D767/13, D255/13, D751/13, D472/13, D476/13, D540/13.

<sup>a,b</sup> profil vzorca D375/13 se slabše vidi, ampak se pri spreminjanju kontrasta vidijo fragmenti značilni za oznako cepitve z encimom *RsaI* 16, podobno pri vzorcu D860/13, kjer je profil enak oznaki cepitve z encimom *RsaI* 24, kot v prilogi A4.

<sup>c</sup> za vzorec D472/13 ni bilo jasno ali sta prisotna fragmenta dolžine 650 in 420 bp, zato smo analizo ponovili (glej prilogi D1).

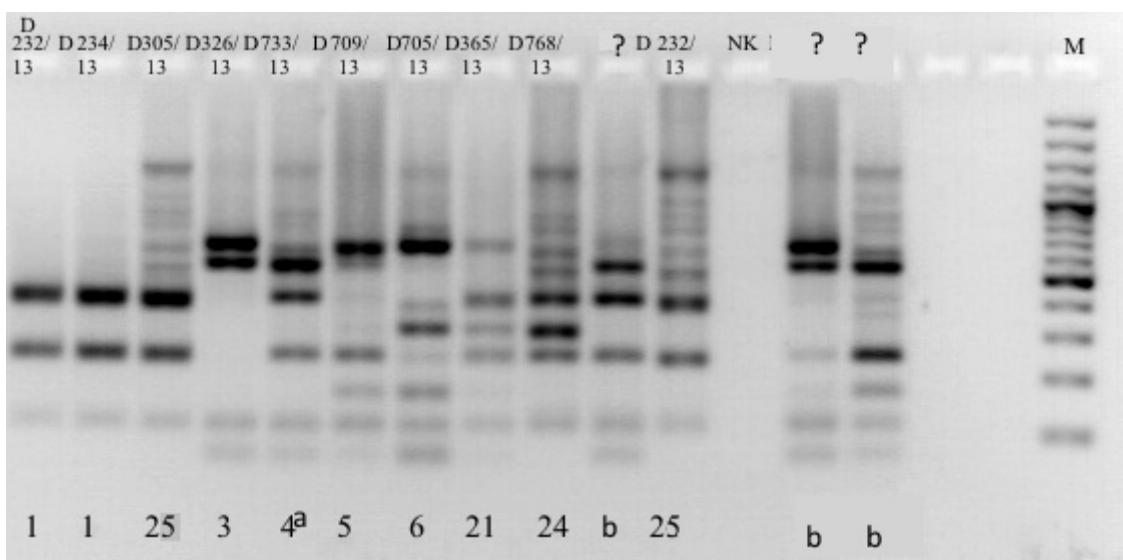
<sup>d</sup> vzorcu D476/13 smo določili oznako cepitve z encimom *RsaI* 20, ker ima tudi fragment dolžine 550 bp, ki pa je viden pri spreminjanju kontrasta slike

<sup>e,f</sup> obema vzorcema se pri spreminjanju kontrasta vidijo fragmenti 420, 320, 250 in 120 bp

<sup>g,h</sup> vzorcema se pri spreminjanju kontrasta razločijo fragmenti dolžine 420, 250 in 120 bp.

<sup>i,j</sup> pri obeh vzorcih se pri spreminjanju kontrasta vidijo fragmenti značilni za oznako cepitve z encimom *RsaI* 9, torej 420, 320, 250 in 120 bp.

<sup>k</sup> vzorcu se pri spreminjanju kontrasta vidijo tudi fragmenti dolžine 650, 550, 180 in 120 bp.

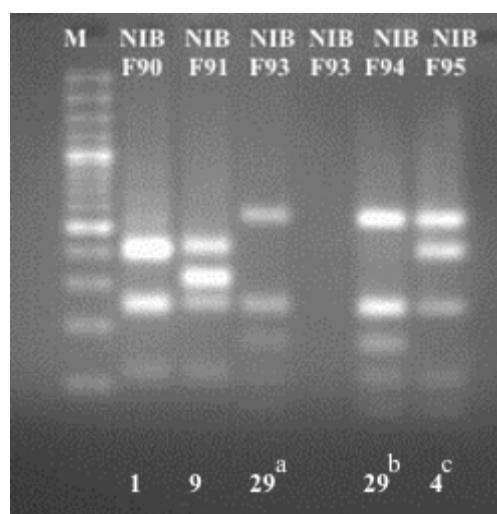


Priloga P4: Ponovitev analize RFLP pomnožkov gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnimi encimom *RsaI* vzorcev D232/13, D234/13, D305/13, D326/13, D733/13, D709/13, D705/13, D365/13, D768/13, D232/13.

<sup>a</sup> Vzorec 733/13 v prilogi A3 kaže jasno oznako cepitve z encimom *RsaI* 4, na tej sliki pa ni jasno ali so nad fragmentom dolžine 600 bp še kakšni drugi fragmenti.

<sup>b</sup> napaka pri pipetiranju.

Priloga Q: Analiza RFLP pomnožka gena *vmp1* razcepljenih z restriktičnimi encimom *RsaI* vzorcev referenčnih kontrol. Elektroforeza je potekala na 2,5% agaroznem gelu. M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, Thermo Scientific.



<sup>a,b</sup> vzorcema se pri spremjanju kontrasta jasno vidijo tudi fragmenti dolžine 180, 120 in 80 bp.

<sup>c</sup> vzorcu se pri spremjanju kontrasta jasno vidi tudi fragment dolžine 80 bp.