

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena R. Mitrović

**Gen za veliku subjedinicu šaperonina  
(groEL gen) kao dodatni molekularni  
marker za diferencijaciju fitoplazmi  
srodnih '*Candidatus Phytoplasma  
asteris*'**

-doktorska disertacija-

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena R. Mitrović

**Molecular chaperonin large subunit  
gene (groEL gene) as an additional  
marker for differentiation of  
'*Candidatus Phytoplasma asteris*'-  
related strains**

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2013

Biološki fakultet – Univerzitet u Beogradu

Mentori:

**Dr Svetlana Radović**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

**Dr Bojan Duduk**, viši naučni saradnik

Institut za pesticide i zaštitu životne sredine

Član komisije:

**Dr Marina Stamenković-Radak**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

*Najlepše hvala*

*Dr Bojanu Duduku na svemu što me je naučio, na pruženoj mogućnosti usavršavanja u prestižnim evropskim institutima i na izvanrednoj saradnji koju smo imali svih ovih godina a koja je rezultirala izradom ove doktorske teze.*

*Profesorki Svetlani Radović na lepoj, visokoprofesionalnoj saradnji i svim konstruktivnim savetima tokom pisanja teze.*

*Profesorki Marini Stamenković-Radak na svim korisnim savetima i stečenom znanju u okviru dugogodišnje saradnje tokom osnovnih i doktorskih studija.*

*Svim kolegama sa posla koji su imali pregršt razumevanja tokom izrade i pisanja doktorata.*

*Mojim prijateljima na svojoj podršci, ljubavi i strpljenju.*

*Mojoj porodici što je bila uz mene i verovala u mene u svakom momentu i na svakom koraku.*

*Mom Milošu što je u mom životu i što je takav kakav jeste jer bez njega ovo sve ne bi imalo toliki sjaj kakav ima.*

**Gen za veliku subjedinicu šaperonina (groEL gen) kao dodatni molekularni marker za diferencijaciju fitoplazmi srodnih '*Candidatus Phytoplasma asteris*'**

**Jelena R. Mitrović**

**REZIME**

Na teritoriji Republike Srbije su u periodu od 2009. do 2011. godine sakupljeni uzorci biljaka sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi. Upotrebom PCR metode pomoću univerzalnih prajmera P1/P7 i R16F2n/R16R2 u njima su detektovane fitoplazme. Upotrebom restrikcioni enzima *TruII*, *HhaI*, *RsaI* i *Tsp509I* na R16F2n/R16R2 amplikone, ove fitoplazme su na osnovu dobijenih restrikcioni profila identifikovane kao Aster yellows fitoplazme (ribozomalna grupa 16SrI), podgrupe 16SrI-B, I-C i I-P, odnosno kao Stolbur fitoplazme (ribozomalna grupa 16SrXII).

Upotrebom iste PCR-RFLP metode kod 19 sojeva Aster yellows fitoplazmi iz kolekcije i tri soja poreklom iz šargarepe iz Srbije, potvrđena je pripadnost podgrupama 16SrI-A, I-B, I-C i I-F preuzeta iz literature. Takođe je utvrđena pripadnost određenoj podgrupi kod četiri soja iz kolekcije, koji se prvi put koriste u analizi i o kojima nema literaturnih podataka.

Upotrebom novodizajniranih prajmera AYgroesF/AYampR i AYgroelF/AYgroelR umnožen je *groEL* gen kod sva 34 testirana soja Aster yellows fitoplazmi. Analizom restrikcioni profila dobijenih pomoću *TruII* i *AluI* restrikcioni enzima na AYgroelF/R amplikone, utvrđeno je postojanje šest, odnosno osam različitih profila na osnovu kojih su svi testirani sojevi svrstani u devet groELI podgrupa (groELI-I do groELI-IX). Na osnovu *groEL* gena podgrupe 16SrI-A i I-C su dalje diferencirane u dve groELI podgrupe, 16SrI-B u tri, dok podgrupe 16SrI-M i I-L nisu pokazale nikakve međusobne razlike u odnosu na jedan deo podgrupe 16SrI-B. Podgrupe 16SrI-F i I-P se razlikuju od ostalih podgrupa i na nivou *groEL* gena kao i na nivou 16S rDNK. Takođe je utvrđeno da sedam novodetektovanih sojeva Aster yellows fitoplazmi iz Srbije pripada podgrupama groELI-III, I-VII i I-IX.

Analizom *tuf* gena, dela *rp* operona i *secY* gena kod 22 odabrana od 34 testirana soja Aster yellows fitoplazmi moguće je testirane sojeve klasifikovati u šest *tufI* i sedam *rpI* i *secYI* podgrupa na osnovu *MboI*, *Tsp509I* i *TruII* restrikcioni profila za *tuf* gen, *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* za *rp* gen i *Tsp509I* i *TruII* za *secY* gen. Podgrupa 16SrI-A je dalje diferencirana u dve *tufI* podgrupe, odnosno 16SrI-A i I-B u po dve *rpI* i *secYI* podgrupe, dok podgrupe 16SrI-B, I-M i I-L nisu pokazale nikakve međusobne razlike. Podgrupe 16SrI-C, I-F i I-P se razlikuju od ostalih podgrupa i na nivou sva tri testirana gena kao i na nivou 16S rDNK.

Analizom *tuf* gena kod 116 detektovanih sojeva Stolbur fitoplazmi iz Srbije, pomoću *HpaII* restrikcioni enzima, utvrđeno je da svi testirani sojevi pripadaju *tuf* type II podgrupi. Od ovih uzoraka je za dalju analizu *groEL* gena odabrano 39 sojeva, a radi kompletnije slike o varijabilnosti *groEL* gena kod Stolbur fitoplazmi, u analizu su uključena i dva soja Stolbur fitoplazmi iz Hrvatske, poreklom sa vinove loze, kao kontrolni sojevi Stolbur fitoplazmi *tuf* type I podgrupe.

Kod sva 41 testirana uzorka Stolbur fitoplazmi uspešno je umnožen *groEL* gen upotrebom novodizajniranih prajmera STOLgroesF/STOLstampR i

AYgroelF/STOLgroelR2. Analizom dobijenih fragmenata pomoću restrikcionog enzima *TruII* uočeno je postojanje dva tipa profila. Analizom dobijenih sekvenci osam odabranih sojeva, među kojima su i sojevi tuf type I podgrupe, uočeno je postojanje tri varijabilna mesta na osnovu kojih se razlikuje ukupno pet genotipova. Prvo varijabilno mesto se nalazi u okviru *groES* gena i ono ne rezultuje u promeni predviđene AK, dok se druga dva nalaze u okviru *groEL* gena i oni rezultuju u promeni predviđene AK. Takođe se uočava da se na AK mestu 338 kod svih sojeva iz Srbije koji pripadaju tuf type II podgrupi tu nalazi alanin (A) dok se kod sojeva iz Hrvatske, koji predstavljaju tuf type I fitoplazme, nalazi treonin (T).

Upotrebom AYgroelF, AYgroelR i STOLstampR prajmera u multipleks PCR reakciji moguće je detektovati Aster yellows i Stolbur fitoplazme u uzorcima u kojima se ove fitoplazme nalaze kako u pojedinačnim tako i u mešanim infekcijama.

Analizom sekvenci *groEL* gena 27 testiranih sojeva Aster yellows fitoplazmi kod kojih je sekvenciran ovaj region, utvrđeno je da dužina celog *groEL* gena kod AY fitoplazmi iznosi 1611 bp (protein je dužine 536 aminokiselina), da postoje ukupno 144 varijabilna mesta od kojih 55 rezultuje u promeni predviđene AK a 89 je sinonimno, da među proučavanim sojevima postoji ukupno 50 AK razlike u proteinskoj sekvenci, da je podgrupa 16SrI-A najvarijabilnija, da ekvatorijalni domen GroEL proteina čine AK 5-132 i 406-521, apikalni 189-373, a intermedijarni 133-188 i 374-405. Takođe je utvrđeno da kod GroEL proteina AY fitoplazmi postoje određena odstupanja u mestima koja po literaturnim podacima imaju određenu ulogu tokom procesa savijanja proteina.

Uporednom analizom sekvenci 16S rRNK i *groEL* gena utvrđeno je da srednja vrednost procenta međusobne identičnosti svih sojeva AY fitoplazmi iznosi 99.5% odnosno 98.1%, pri čemu je opseg za 16S rRNK od 98.7 do 100%, a za *groEL* gen od 93.7 do 100%. Srednja vrednost procenta identičnosti aminokiselinskih sekvenci GroEL proteina AY fitoplazmi iznosi 97.8%, a kreće se od 94.6 do 100%.

Analizom sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena kod sojeva kod kojih su sekvencirani ovi geni, utvrđeno je da srednja vrednost procenta međusobne identičnosti sojeva AY fitoplazmi za *tuf* gen iznosi 97.2% (opseg je od 93 do 99.9%), za *rp* gen iznosi 97.4% (opseg je od 93.2 do 100%), a za *secY* gen iznosi 94.8% (opseg je od 84 do 100%).

Najnižu vrednost procenta sličnosti sekvenci u odnosu na svih pet posmatranih gena ima soj PopD (16SrI-P) sa nekim od sojeva iz podgrupe 16SrI-A ili I-B.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci celog *groEL* gena ima u osnovi istu topologiju kao i stablo 16S rRNK s tim što je ovde došlo još i do izdvajanja novih klastera unutar podgrupa 16SrI-A, I-B i I-C. Soj AY-A koji je pripadnik podgrupe 16SrI-F, se nalazi kao zasebna grana, dok soj PopD (16SrI-P) čini potpuno odvojenu granu od svih ostalih sojeva. Devet zasebnih linija koje se izdvajaju na ovom filogenetskom stablu su u skladu sa podelom na groELI podgrupe napravljenu na osnovu RFLP analize. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu združenih sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena ima identičnu topologiju kao i stablo rekonstruisano na osnovu *groEL* gena.

Na osnovu PCR-RFLP metode je pokazano da je *groEL* gen informativniji u odnosu na 16S rRNK, *tuf*, *rp* i *secY* gen, a filogenetskom analizom je potvrđeno da *groEL* gen poseduje manju međugrupnu sličnost sekvenci nego 16S rDNK i stoga ima veću moć razdvajanja srodnih sojeva. Ovi rezultati pokazuju da je upotreba *groEL* gena i njegova analiza PCR-RFLP metodom pouzdana metoda kako za detekciju tako i za

identifikaciju sojeva AY fitoplazmi i to ne samo onih iz kolekcije, već i iz uzoraka uzetih iz prirode.

**Ključne reči:** varijabilnost gena, RFLP, groELI podgrupe, tufI podgrupe, rpI podgrupe, secYI podgrupe, Stolbur fitoplazme, filogenetska analiza

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Genetika

**UDK broj:** 575.22:579.887 (043.3)

**Molecular chaperonin large subunit gene (*groEL* gene) as an additional marker for differentiation of '*Candidatus* *Phytoplasma asteris*'-related strains**

**Jelena R. Mitrović**

**ABSTRACT**

The plant samples with symptoms typical for phytoplasma infection were collected in Serbia from 2009 till 2011. In those samples phytoplasmas were detected by PCR technique with universal primers P1/P7 and R16F2n/R16R2 and identified according to their *TruII*, *HhaI*, *RsaI* and *Tsp509I* restriction profiles of digested R16F2n/R16R2 amplicons as Aster yellows phytoplasma (ribosomal group 16SrI), subgroups 16SrI-B, I-C and I-P or as Stolbur phytoplasma (ribosomal group 16SrXII).

Applying the same PCR-RFLP method on 19 strains of Aster yellows phytoplasmas from collection and three strains from carrot from Serbia, it was confirmed that this strains belong to subgroups 16SrI-A, I-B, I-C and I-F as stated in literature. Also the subgroups were determined for four strains from collection that are used in analyses for the first time and that have no literature data.

Using newly designed primers AYgroesF/AYampR and AYgroelF/AYgroelR, the *groEL* gene was successfully amplified in all 34 strains of Aster yellows phytoplasma tested. RFLP analyses of AYgroelF/AYgroelR amplicons with *TruII* i *AluI* restriction enzymes revealed existence of six and eight different restriction profiles, respectively, according to which all tested strains were classified in nine groELI subgroups (groELI-I till groELI-IX). On the basis of *groEL* gene, subgroups 16SrI-A and I-C were further differentiated into two groELI subgroups, 16SrI-B into three, while subgroups 16SrI-M and I-L showed no difference to some strains belonging to subgroup 16SrI-B. Subgroups 16SrI-F and I-P could be differentiated from other subgroups on the basis of *groEL* gene as on the basis of 16S rDNA. The seven newly detected Aster yellows strains from Serbia were affiliated to subgroups groELI-III, I-VII and I-IX.

RFLP analyses with *MboI*, *Tsp509I* and *TruII* restriction enzymes of *tuf* gene, *HhaI*, *AluI* and *Tsp509I* of *rp* gene and *Tsp509I* and *TruII* of *secY* gene, classified 22 selected Aster yellows strains into six tufI subgroups and seven rpI and secYI subgroups. Subgroup 16SrI-A was further differentiated into two tufI subgroups and subgroups 16SrI-A and I-B were further differentiated into two rpI and secYI subgroups each. On the other hand subgroups 16SrI-B, I-M and I-L showed no mutual differences, while subgroups 16SrI-C, I-F and I-P could be differentiated from other subgroups on the basis of all three genes tested as on the basis of 16S rDNA.

RFLP analysis of *tuf* gen with *HpaII* restriction enzyme showed that all 116 tested Stolbur phytoplasma strains from Serbia belong to tuf type II variant. For further analyses, 39 Stolbur strains were selected out of 116 detected and two strains from grapevine from Croatia were also included in analyses as tuf type I reference strains to gain a larger picture of variability of *groEL* gene in Stolbur phytoplasmas.

In all 41 Stolbur tested strains, *groEL* gene was successfully amplified with newly designed primers STOLgroesF/STOLstampR and AYgroelF/STOLgroelR2. RFLP analysis of these amplicons with *TruII* restriction enzyme determined the presence of two different profiles. Analysis of *groEL* gene sequences of eight selected



strains, including *tuf* type I strains, revealed the presence of three SNPs leading to determination of five genotypes in total. First SNP is inside *groES* gene and it is a synonymous one resulting in no predicted amino acid difference, while two others are inside the *groEL* gene and they lead to different predicted amino acid sequences. Also it can be noticed that in the predicted amino acid sequences at the position 338 all strains from Serbia, belonging to *tuf* type II variant, have alanine (A), while two strains from Croatia, *tuf* type I variants, have threonine (T).

Applying AYgroelF, AYgroelR and STOLstampR primers together in multiplex PCR reaction, it was possible to detect only Aster yellows and Stolbur phytoplasma, or both together, in positive samples from collection as well as in field collected samples.

Analyzing *groEL* gene sequences of 27 Aster yellows tested phytoplasma strains, it has been established that whole *groEL* gene was 1611 bp long (protein consisted of 536 amino acids), that there were 144 polymorphic positions in total, 55 of them resulted in different amino acid when translated while 89 was synonymous ones, that among the observed strains there was difference in 50 amino acids in protein sequences, that subgroup 16SrI-A is the most variable one, that equatorial domain of GroEL consisted of residues 5-132 and 406-521, apical domain of 189-373 and intermediate domain consisted of residues 133-188 and 374-405. Also, it has been determined that in GroEL protein of AY phytoplasmas there were some differences in amino acid composition in positions that are, from literature, important for its role in folding other proteins.

Comparative sequence analyses of 16S rRNA and *groEL* gene revealed that the average nucleic acid similarity of examined AY strains was 99.5% and 98.1%, respectively, ranging from 98.7 till 100% for 16S rRNA and from 93.7 till 100% for *groEL* gene. Average amino acid similarity of GroEL protein of AY phytoplasmas tested was 97.8% ranging from 94.6 till 100%.

Analysis of sequences of *tuf*, *rp* and *secY* genes determined that average nucleic acid similarity of examined AY strains for *tuf* gene was 97.2% (93-99.9%), for *rp* 97.4% (93.2-100%) and for *secY* gene it was 94.8% (84-100%).

The lowest nucleic acid similarity regarding all five observed genes had strain PopD (ribosomal subgroup 16SrI-P) in respect to some of the strains from subgroups 16SrI-A or I-B.

Phylogenetic tree reconstructed on the basis of nucleic acid sequences of whole *groEL* gene had basically the similar topology like the one made on the basis of 16S rDNA sequences, with the difference that new clusters inside subgroups 16SrI-A, I-B and I-C have emerged. Strain AY-A, which belongs to subgroup 16SrI-F, was situated as a separate lineage, while the strain PopD (16SrI-P) was separated forming the new lineage outside all the other strains which clustered together. Nine lineages delineated on this phylogenetic tree were in agreement with the affiliation to groELI subgroups, made on the basis of RFLP analyses. Phylogenetic tree reconstructed on the basis of *tuf*, *rp* and *secY* gene sequences put together had identical topology as the one made on the basis of *groEL* gene sequences.

On the basis of PCR-RFLP method it has been shown that *groEL* gene is more informative in regard to 16S rRNA, *tuf*, *rp* and *secY* genes and by phylogenetic analyses it has been confirmed that *groEL* gene has lower intergroup sequence similarities than 16S rDNA and therefore has more resolution power in separating closely related strains. These results show that usage of *groEL* gene and its analyses with PCR-RFLP method

is reliable tool for detection as well as for identification of Aster yellows phytoplasma strains from collection and from field collected samples.

**Keywords:** gene variability, RFLP, groELI subgroups, tufI subgroups, rpI subgroups, secYI subgroups, Stolbur phytoplasma, phylogenetic analysis

**Scientific field:** Biology

**Scientific discipline:** Genetics

**UC number:** 575.22:579.887 (043.3)

## SADRŽAJ

### SKRAĆENICE

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE FITOPLAZMI</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1. Vektori</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.2. Veličina i osobine genoma fitoplazmi</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.3. Klasifikacija</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.4. '<i>Candidatus Phytoplasma</i>' rod i podela na 16Sr grupe</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.5. Detekcija fitoplazmi</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2. OPŠTE OSOBINE I ZNAČAJ <i>groEL</i>, <i>tuf</i>, <i>rp</i> I <i>secY</i> GENA</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.1. Molekularni šaperoni i gen za veliku subjedinicu šaperonina (<i>groEL</i> gen)</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.1.1. Šaperonini</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.1.2. Mehanizam delovanja GroEL-GroES kompleksa na savijanje proteina supstrata</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2.1.3. Proučavanje šaperonina kod molikuta i drugih bakterija</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2.2. Gen faktora elongacije kod fitoplazmi</b> .....	<b>28</b>
<b>1.2.3. Geni ribozomalnih proteina kod fitoplazmi</b> .....	<b>29</b>
<b>1.2.4. Sec sistem</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3. '<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>' VRSTA</b> .....	<b>31</b>
<b>1.4. STOLBUR FITOPLAZME</b> .....	<b>32</b>
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	<b>35</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1. UZORKOVANJE I IZOLACIJA DNK</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1.2. Izolacija DNK iz biljnog materijala</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2. DIZAJNIRANJE PRAJNERA ZA UMNOŽAVANJE <i>groEL</i> GENA</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2.1. Aster yellows fitoplazme</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2.2. Stolbur fitoplazme</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3.1. Multipleks PCR</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3.2. Vizuelizacija produkata PCR reakcije</b> .....	<b>44</b>

---

3.4. ANALIZA POLIMORFIZMA DUŽINE RESTRIKCIONIH FRAGMENTA (RFLP ANALIZA) .....	45
3.5. SEKVENCIRANJE I FILOGENETSKA ANALIZA .....	47
4. REZULTATI .....	50
4.1. ODREĐIVANJE PROTOKOLA ZA UMNOŽAVANJE <i>groEL</i> GENA KOD ASTER YELLOWS FITOPLAZMI .....	50
4.2. DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA ASTER YELLOWS FITOPLAZMI - REFERENTNIH SOJEVA I SOJEVA IZ SRBIJE .....	55
4.2.1. Soj PopD .....	56
4.2.2. Sojevi Aster yellows fitoplazmi iz kolekcije i iz šargarepe .....	58
4.2.3. Ostali sojevi Aster yellows fitoplazmi iz Srbije .....	62
4.3. ANALIZA <i>groEL</i> GENA KOD ASTER YELLOWS FITOPLAZMI .....	64
4.3.1. Sojevi Aster yellows fitoplazmi iz kolekcije i iz šargarepe .....	64
4.3.2. Ostali sojevi Aster yellows fitoplazmi poreklom iz Srbije .....	72
4.4. ANALIZA OSTALIH GENA KOD ASTER YELLOWS FITOPLAZMI .....	73
4.4.1. Analiza <i>tuf</i> gena kod Aster yellows fitoplazmi .....	73
4.4.2. Analiza <i>rp</i> gena kod Aster yellows fitoplazmi .....	77
4.4.3. Analiza <i>secY</i> gena kod Aster yellows fitoplazmi .....	81
4.5. STOLBUR FITOPLAZME .....	85
4.5.1. Detekcija i identifikacija Stolbur fitoplazmi .....	85
4.5.2. Analiza <i>tuf</i> gena kod Stolbur fitoplazmi .....	88
4.5.3. Analiza <i>groEL</i> gena kod Stolbur fitoplazmi .....	88
4.6. MULTIPLEKS PCR .....	94
4.7. ANALIZA SEKVENCI I FILOGENETSKA ANALIZA .....	96
4.7.1. Analiza sekvenci <i>groEL</i> gena kod Aster yellows fitoplazmi ....	96
4.7.2. Analiza sekvenci <i>groEL</i> gena kod Stolbur fitoplazmi .....	98
4.7.3. Analiza sekvenci 16S rRNK, <i>tuf</i> , <i>rp</i> i <i>secY</i> gena kod Aster yellows fitoplazmi .....	100
4.7.4. Filogenetska analiza sekvenci 16S rDNK, <i>groEL</i> , <i>tuf</i> , <i>rp</i> i <i>secY</i> gena .....	104
5. DISKUSIJA .....	114
6. ZAKLJUČCI .....	123
7. LITERATURA .....	125
PRILOZI .....	141

<b>PRILOG A</b> .....	<b>141</b>
<b>PRILOG B</b> .....	<b>144</b>
<b>Biografija</b> .....	<b>145</b>
<b>Прилог 1</b> .....	<b>146</b>
<b>Прилог 2</b> .....	<b>147</b>
<b>Прилог 3</b> .....	<b>148</b>

**SKRAĆENICE**

ADP – adenzin di fosfat

AK – aminokiselina

APS – amonijumpersulfat

ATP – adenzin tri fosfat

AY – Aster yellows fitoplazme

CTAB – cetiltrimetilamonijumbromid ( $C_{19}H_{42}N^+Br^-$ )

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiamintetraacetatna kiselina disodium so ( $C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \cdot 2H_2O$ )

ORF – Open Reading Frame (otvoreni okvir čitanja)

PCR – Polymeraze Chain Reaction (lančana reakcija polimeraze)

rDNK – ribozomalna dezoksiribonukleinska kiselina

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata)

rRNK – ribozomalna ribonukleinska (dezoksiribonukleinska) kiselina

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

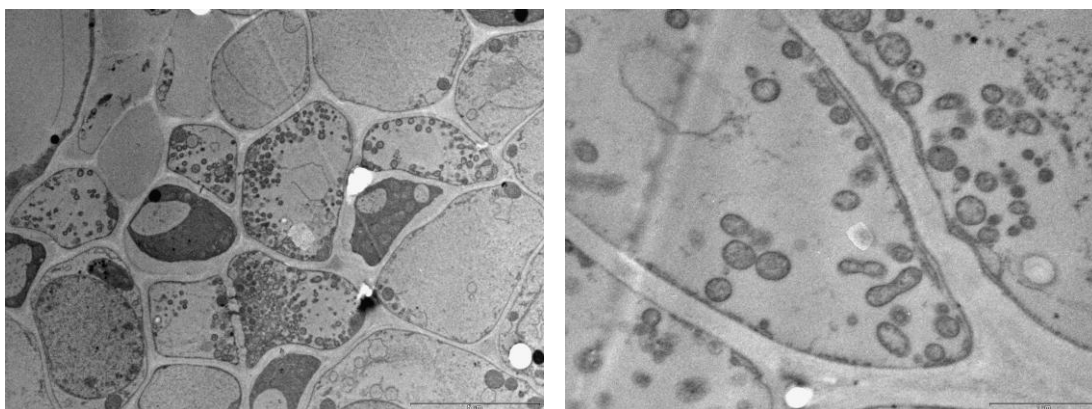
TRIS – hidroksimetil aminometan ( $C_4H_{11}NO_3$ )

## 1. UVOD

### 1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE FITOPLAZMI

Fitoplazme je prvi put u literaturi opisao Kunkel 1926. godine, koji ih je okarakterisao kao viruse izazivače bolesti žutila aстера (**Kunkel, 1926**). Nekoliko decenija kasnije (1967. godine) Doi i saradnici su ih zvanično otkrili i opisali posmatrajući pod elektronskim mikroskopom tanke poprečne preseke mladih listova i izdanaka biljke dudu koja je pokazivala izražene simptome kržljivosti (dwarf disease) (**Doi i sar., 1967**). Dugo godina su, zbog svoje morfološke sličnosti sa mikoplazmama, nazivane „organizmi slični mikoplazmama“ (MLOs, mycoplasma-like organisms) da bi svoj definitivni naziv „fitoplazme“ stekle 1994. godine (**Sears i Kirkpatrick, 1994**).

Fitoplazme su jednoćelijski prokariotski organizmi pleomorfne oblika, veličine od 0.2 do 0.8  $\mu\text{m}$ , bez ćelijskog zida umesto koga se nalazi dvoslojna membrana. One su obligatni patogeni biljaka, gde nastanjuju sitaste cevi floema, kao i insekata (vektora) koji se hrane floemskim sokom biljaka (**Doi i sar., 1967**).



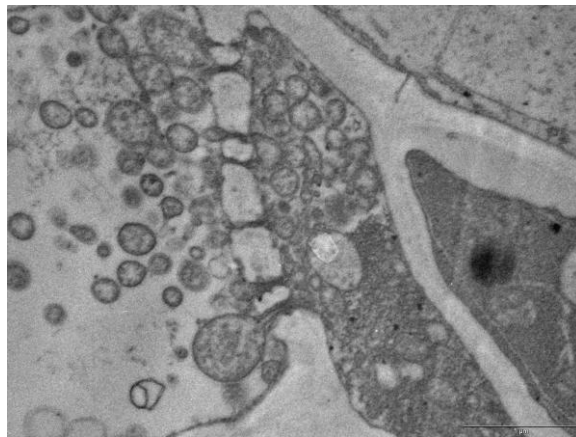
Slika 1. Poprečni presek sitastih ćelija floema vinke 84/11 uzorkovane na Tašmajdanu i zaražene Aster yellows (AY) fitoplazmom posmatrane pod elektronskim mikroskopom pod uvećanjem 4400 (levo) i 19500 (desno).

Fitoplazme su odgovorne za pojavu nekoliko stotina bolesti različitih biljnih vrsta širom sveta, među kojima su i ekonomski značajne gajene biljke: kukuruz, vinova loza, duvan, peršun, šargarepa, breskva, jabuka i dr. (**Khadhai i sar., 1998; Duduk i Bertaccini, 2006; Duduk i sar., 2008a, 2008b; Mitrović i Duduk, 2011**). Takođe, u

određenim regionima u svetu povremeno dolazi i do pojave epidemija bolesti izazvanih fitoplazmama (**Lee i sar., 1998a**). Zaražene biljke ispoljavaju širok opseg simptoma kao što su pojava veštičjih metli, proliferacija, promene na cvetu (virescencija, filodije), žutilo i crvenilo listova, kao i postepeno odumiranje biljke (**Christensen i sar., 2005**). Do pojave ovakvih simptoma dolazi usled promena u metabolizmu zaraženih biljaka, koje se ogledaju u poremećaju balansa biljnih hormona i transporta aminokiselina (**Lepka i sar., 1999; Maust i sar., 2003; Choi i sar., 2004; Favali i sar., 2004**), kao i promeni sastava floemskog soka i poremećaju u funkcionisanju floema koji je histološki praćen taloženjem kaloze u sitastim cevima, nekrozom i kolapsom sitastih cevi (**Lee i sar., 2000**). Takođe jedan od mehanizama nastanka simptoma može biti akumulacija ugljenih hidrata, koja dovodi do povratne inhibicije procesa fotosinteze i do pojave hloroze (**Lepka i sar., 1999; Maust i sar., 2003**). Važan parametar u epidemiologiji bolesti prouzrokovanih fitoplazmama je širok krug domaćina pojedinih fitoplazmi. Osetljivost biljke na određenu fitoplazmu, kao i preferencija vektora u odnosu na tip ishrane, u velikoj meri određuju krug domaćina određene fitoplazme (**Lee i sar., 1998a**). Preklapanje biljnih domaćina i vektora različitih grupa fitoplazmi takođe daje velike mogućnosti fitoplazmama za interakciju i razmenu genetičkog materijala. U biljci domaćinu fitoplazme su detektovane u skoro svim organima gde okupiraju sitaste cevi floema. S obzirom na to da sitaste cevi nemaju nikakav direktan kontakt sa semenom, smatra se da prenošenje fitoplazmi semenom nije moguće iako dolazi do zaraženosti cveta (**Christensen i sar., 2005**). Međutim, neki autori su ipak uspeli da dokažu prisustvo fitoplazmi u semenu (**Cordova i sar., 2003; Nipah i sar., 2007**) tako da pitanje transmisije putem semena ostaje i dalje otvoreno.

S obzirom na to da fitoplazme ne poseduju nijedan gen koji kodira citoskelet ili flagele, a pleomorfnog su oblika i dovoljno male veličine, smatra se da kod njih ne postoji mogućnost aktivnog kretanja, već da mogu slobodno da prolaze kroz pore sitastih cevi i da se na taj način nesmetano pasivno kreću kroz biljku zajedno sa tokom floemskog soka (**Christensen i sar., 2005**).





Slika 2. Prolazak AY fitoplazmi kroz pore sitastih cevi u uzorku vinke 84/11 posmatrano pod mikroskopom pod uvećanjem 19500.

Fitoplazme nemaju nekoliko osnovnih gena potrebnih za autonomni ćelijski metabolizam (npr. nedostaju im geni za *de novo* sintezu aminokiselina, masnih kiselina i nukleotida). Iz tog razloga fitoplazme moraju da se oslanjaju na unos nutritijenata iz šećerom bogatog floemskog soka biljaka domaćina. Pošto se ovaj unos obavlja putem membranskog transporta, kod njih je, u odnosu na druge gram-pozitivne bakterije sa kojima su evolutivno povezane, zadržan veliki broj membranskih proteina transportera (**Christensen i sar., 2005**).

Zbog gubitka gena za sintezu komponenata ćelijskog zida, aminokiselina i kofaktora, kao i zbog značajne redukcije gena odgovornih za metabolizam lipida i nukleotida, fitoplazme su primorane da osnovne nutritijente uzimaju od domaćina (**Razin i sar., 1998**). Pošto nije jednostavno postići ove uslove u hranljivoj podlozi, svi pokušaji kultivacije fitoplazmi u *in vitro* uslovima su do sada, u većoj ili manjoj meri, bili bezuspešni, što otežava proces njihovog istraživanja (**Lee i Davis, 1992; Firrao i sar., 2007**). Iz tog razloga jedini način njihovog očuvanja za sada je unutar biljke domaćina, pa je i proces mikropropagacije biljaka jedan od važnih načina održavanja nekih sojeva fitoplazmi (**Bertaccini, 2010**). Gajenje biljaka u *in vitro* uslovima je počelo ubrzano da se razvija i primenjuje od kada je 1933. godine francuski naučnik Rodžer Gotre uspešno odgajio: a) parenhimsko tkivo iz korena, b) krtole i c) kambijalno tkivo drvenastih biljaka na hranljivoj podlozi (<http://paulownia.bg/en/tissue-culture.html>).

### 1.1.1. Vektori

Fitoplazme se prenose na biljku domaćina perzistentnim načinom uz pomoć insekata iz familija *Cicadellidae*, *Cixiidae*, *Psyllidae*, *Delphacidae*, *Derbidae* (**D'Arcy i Nault, 1982; Weintraub i Beanland, 2006**) i *Fulgoroidea* (**Lee i sar., 2000**). Neke fitoplazme imaju nisku specifičnost za vektora i mogu se prenositi putem većeg broja insekata kao što je slučaj sa fitoplazmama žutila astra (*Aster yellows* fitoplazme-AY) koje imaju najmanje 24 vrste vektora. Druge su opet visoko specifične i prenosi ih svega nekoliko vrsta insekata (**Tsai, 1979; Seemuller i sar., 2002; Lee i sar., 2003**).

Da bi se vektor zarazio, on mora prvo da se hrani na zaraženoj biljci i taj period se naziva period akvizicije (AAP – acquisition access period). Do prenosa fitoplazmi iz vektora u novu biljku domaćina može doći samo nakon završetka latentnog perioda tokom kog dolazi do umnožavanja fitoplazmi u srednjem crevu i pljuvačnim žlezdama vektora, a do kojih su došle putem hemolimfe (**Tsai, 1979**). U latentnom periodu se fitoplazme umnožavaju do infektivne količine a dužina ovog perioda se razlikuje od vrste do vrste i u proseku iznosi tri nedelje (**Webb i sar., 1999**). Potom vektor prenosi patogena na zdravu biljku hraneći se na njoj i ovo predstavlja period inokulacije (IAP – inoculation access period). Kada insekt jednom postane infektivan, on ostaje infektivan do kraja života (**Carraro i sar., 2001; Palermo i sar., 2001**). Uspešnost prenošenja fitoplazmi zavisi od mnogih faktora kao što su životna faza, pol i prisustvo simbionata vektora, ponašanje vektora tokom leta, mere kontrole korova, temperatura, soj fitoplazme, vrsta biljke domaćina, kao i vrsta biljke koja je bila početni izvor zaraze (**Swenson, 1971; Purcell i Suslow, 1987; Murrall i sar., 1996; Bosco i sar., 1997; Beanland i sar., 1999; Palermo i sar., 2001; Tedeschi i sar., 2002; Lessio i Alma, 2004**).

Uticaj fitoplazmi na vektora može biti različit, pa su tako pronađeni vektori kojima je bio smanjen fitnes (**Bressan i sar., 2005**), ali takođe i oni kod kojih se povećala sposobnost preživljavanja zimskog perioda kao i fertilitnost i dužina života (**Beanland i sar., 2000; Ebbert i Nault, 2001**). Rezultati dosadašnjih istraživanja o prenošenju fitoplazmi, načinu ishrane vektora, kao i osetljivosti biljaka, pokazuju da mnogi vektori mogu prenositi više od jednog tipa fitoplazmi, kao i da mnoge biljke domaćini mogu biti zaražene većim brojem filogenetski udaljenih fitoplazmi. U

Severnoj Americi često se mogu naći biljke u kojima se u isto vreme u mešanoj infekciji nalaze Aster yellows (16SrI) i X-bolest (16SrIII) fitoplazme, a koje se u prirodi prenose istim vrstama vektora. U Evropi su takođe ustanovljene mešane infekcije Aster yellows, Stolbur (16SrXII) i elm yellows (16SrV) fitoplazmi kod kojih dolazi do preklapanja biljaka domaćina i vektora. Ovo preklapanje domaćina različitih grupa fitoplazmi im omogućava da interaguju međusobno i razmenjuju genetički materijal kako vertikalno tako i horizantlno. U Tabeli 1 dat je pregled jednog broja vektora koji prenose Aster yellows fitoplazme zajedno sa drugim grupama fitoplazmi (Lee i sar., 1998a).

Tabela 1. Vrste insekata vektora fitoplazmi, njihov tip ishrane i geografska rasprostranjenost i grupe fitoplazmi koje prenose (Lee i sar., 1998a)

Vektor	Tip ishrane	Geografska rasprostranjenost	Grupe fitoplazmi koje prenosi u prirodi
<i>Macrosteles fascifrons</i>	Polifagna	Severna Amerika, Evropa	Aster yellows (16SrI-A, -B), clover phyllody (16SrI-C), clover proliferation (16SrVI-A)
<i>Macrosteles laevis</i>	Polifagna	Južna Evropa	European aster yellows (16SrI-B), clover phyllody, clover dwarf (16Sr-B), Stolbur (16SrXII-A)
<i>Macrosteles striifrons</i>	Polifagna	Japan	Misuba W.B., garland chrysanthemum W.B., eggplant dwarf, tomato yellows, marguerite yellows (16SrI-B)
<i>Euscelis plebejus</i>	Polifagna	Evropa, Severna Amerika	Clover phyllody, strawberry green petal (16SrI-C), Stolbur, cabbage W.B. (16SrI-B), rape phyllody (16SrI-B)
<i>Euscelis lineolatus</i>	Polifagna	Evropa, Severna Amerika	Clover phyllody, chrysanthemum yellows (16SrI-B)
<i>Aphrodes bicinctus</i>	Polifagna	Severna Amerika, Evropa	Clover phyllody, strawberry green petal, Aster yellows (16SrI-A), European aster yellows, clover yellow edge (16SrIII-B)
<i>Orosius argentatus</i>	Polifagna	Australija	Tomato big bud (16SrII-D), tobacco virescence, lucerne W.B., legume little leaf, potato purple top
<i>Acinopterus angulatus</i>	Polifagna	Severna Amerika	Western X-disease (16SrIII-A), Aster yellows (16SrI-B)
<i>Colladonus montanus</i>	Polifagna	Severna Amerika	Western X-disease, Aster yellows
<i>Colladonus geminatus</i>	Polifagna	Severna Amerika	Western X-disease, Aster yellows
<i>Fieberiella florii</i>	Polifagna	Severna Amerika	Western and eastern X-disease (16SrIII-A), Aster yellows
<i>Paraphlepsius irroratus</i>	Polifagna	Severna Amerika	Eastern X-disease, clover phyllody
<i>Scaphytopius acutus delogi</i>	Polifagna	Severna Amerika	Western X-disease, Aster yellows
<i>Scaphytopius magdalensis</i>	Oligofagna	Severna Amerika	Blueberry stunt (16SrI-E)

Tabela 1 (nastavak). Vrste insekata vektora fitoplazmi, njihov tip ishrane i geografska rasprostranjenost i grupe fitoplazmi koje prenose (Lee i sar., 1998a)

Vektor	Tip ishrane	Geografska rasprostranjenost	Grupe fitoplazmi koje prenosi u prirodi
<i>Dalbulus elimatus</i>	Oligofagna	Amerika	Maize bushy stunt (16SrI-B(rp-L))
<i>Hishimonoides sellatiformis</i>	Oligofagna	Japan	Mulberry dwarf (16SrI-B)
<i>Scaphoideus luteolus</i>	Monofagna	Severna Amerika	American elm yellows (16SrV-A)
<i>Scaphoideus titanus</i>	Oligofagna	Evropa	Flavescence dorée (16SrV-C)
<i>Hyalestes obsoletus</i>	Oligofagna	Evropa	Stolbur, grapevine yellows (16SrXII-A)
<i>Hishimonus concavus</i>	Oligofagna	Tajvan	Loofah witches' broom (16SrVIII-A)
<i>Cacopsylla pyri, C. pyricola</i>	Monofagna	Evropa	Pear decline (16SrX-C)

### 1.1.2. Veličina i osobine genoma fitoplazmi

Uz pomoć PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis-elektroforeza u pulsirajućem polju jednosmerne struje) metode određena je veličina genoma kod oko 70 različitih fitoplazmi i određene su fizičke mape hromozoma. Najmanji genom ima 'Candidatus Phytoplasma cynodontis' i on iznosi 530 kb, dok najveći genom ima soj Stolbur fitoplazme sa paradajza i on iznosi 1350 kb, što ga čini otprilike 2.5 puta većim. Velike razlike u veličini genoma su uočene čak i kod evolutivno bliskih sojeva, pa tako Rape virescence fitoplazma i Hydrangea phylody fitoplazma (iz Belgije) koje pripadaju podgrupi 16SrI-B i malo se razlikuju u svojim biološkim karakteristikama, imaju genome veličina 1130 kb, odnosno 660 kb (Marcone i sar., 1999). Ova različita veličina genoma kod fitoplazmi se ne pripisuje različitom stepenu reduktivne evolucije već količini dupliranih gena i redundanciji (Firrao i sar., 2007). Podatak koji ovo potvrđuje je da je procenjeno da 18% genoma Onion Yellows (OY) fitoplazme čine multipne kopije samo pet gena (Oshima i sar., 2004).

Minimalna veličina genoma čini fitoplazme najjednostavnijom prirodnom do sada poznatom samo-replikujućom životnom formom koja je na granici između živog ćelijskog organizma i virusa, a to što imaju domaćine koji su iz dva carstva, nameće pitanje ograničenja brzine njihove evolucije (Christensen i sar., 2005).

Do sada su u celosti sekvencirana četiri genoma fitoplazmi. Prva dva sekvencirana su članovi 'Ca. P. asteris' taksona i to su soj OY-M koji spada u 16SrI-B podgrupu (Oshima i sar., 2004) i soj AYWB koji spada u 16SrI-A podgrupu (Bai i sar., 2006). Potom su 2008. godine objavljena i druga dva genoma, 'Ca. P. australiense' (Tran-Nguyen i sar., 2008) i 'Ca. P. mali' (Kube i sar., 2008). U poređnom analizom sva četiri genoma moguće je proceniti na koji način funkcioniše metabolizam fitoplazmi i u kom smeru su se fitoplazme kretale tokom njihove reduktivne evolucije (Kube i sar., 2012). Njima filogenetski najrodnija je *Acholeplasma laidlawii* čiji je genom takođe sekvenciran u celosti (Lazarev i sar., 2011). U poređni prikaz osnovnih podataka o građi genoma fitoplazmi i *A. laidlawii* dat je u Tabeli 2 (Kube i sar., 2012).

Tabela 2. Opšti pregled četiri genoma fitoplazmi i *Acholeplasma laidlawii* sekvenciranih u celosti (Kube i sar., 2012)

	'Ca. P. asteris' soj OY-M	'Ca. P. asteris' soj AYWB	'Ca. P. australiense' soj Rp-A	'Ca. P. mali' soj AT	<i>Acholeplasma laidlawii</i> soj PG-8A
Organizacija hromozoma	Kružni	Kružni	Kružni	Linearni	Kružni
Veličina hromozoma	853 092	706 569	879 959	601 943	1 496 992
G+C sadržaj (%)	27.76	26.89	27.42	21.39	31.93
G+C % protein-kodirajućih gena	29.09	28.54	28.72	22.58	32.23
Broj protein-kodirajućih gena <sup>1,2</sup>	752	776	684(155)	481(16)	1 380(11)
Protein-kodirajući geni (%) <sup>1</sup>	73.1	73.7	64.1	76.3	90.7
Srednja veličina ORF-a	829	776	825	955	984
rRNK operoni	2	2	2	2	2
tRNK	32	31	35	32	34
Pristupni broj	AP006628.2	CP000061.1	AM422018.1	CU469464.1	CP000896.1
Broj elemenata sličnih plazmidima	2	4	1	0	/

<sup>1</sup>- bez pseudo gena; <sup>2</sup>- broj anotiranih pseudo gena je dat u zagradama

Iz Tabele 2 se može videti da se fitoplazme razlikuju od *A. laidlawii* po manjoj veličini genoma, manjem broju gena koji kodiraju proteine i nešto nižem G+C procentu. Ipak, ne treba zaboraviti na činjenicu da su ovde poređene samo fitoplazme iz tri grupe fitoplazmi, tako da je veliki broj ostalih grupa fitoplazmi izostavljen iz ove analize.

### 1.1.3. Klasifikacija

Kao bakterije bez ćelijskog zida, fitoplazme se zajedno sa mikoplazmama, spiroplazmama i ostalim parazitima životinja, svrstavaju u klasu *Mollicutes*. Jedinствена klasifikacija klase *Mollicutes* na nivou razdela gde pripada, još uvek nije opšte prihvaćena na svetskom nivou. Na osnovu sekvenci 16S rRNK jasno je da postoji tesna veza između molikuta i određenih gram pozitivnih bakterija razdela *Firmicutes*, ali ipak na osnovu ostalih jedinstvenih karakteristika pripadnika klase *Mollicutes*, Murray je 1984. godine predložio da se do tada podrazdeo *Tenericutes*, koji je bio u okviru razdela *Firmicutes*, podigne na nivo posebnog razdela. Ovaj predlog je prihvaćen 1988. godine od strane Međunarodnog komiteta za sistematiku bakterija-potkomitet za taksonomiju *Mollicutes*. Međutim, nisu svi prihvatili ovu odluku tako da u izdanjima knjige Prokarioti i izdanju TOBA (Taxonomic Outline of Bacteria and Archea) koji se zasniva samo na filogeniji gena za 16S rRNK, molikute se objašnjavaju kao *Firmicutes* sa niskim G+C sadržajem i svrstavaju se u razdeo *Firmicutes* (Garrity i sar., 2007). Paradoks je da u najskorijem izdanju Ribosomal Database Project-a *Tenericutes* postoji kao poseban razdeo (Cole i sar., 2009).

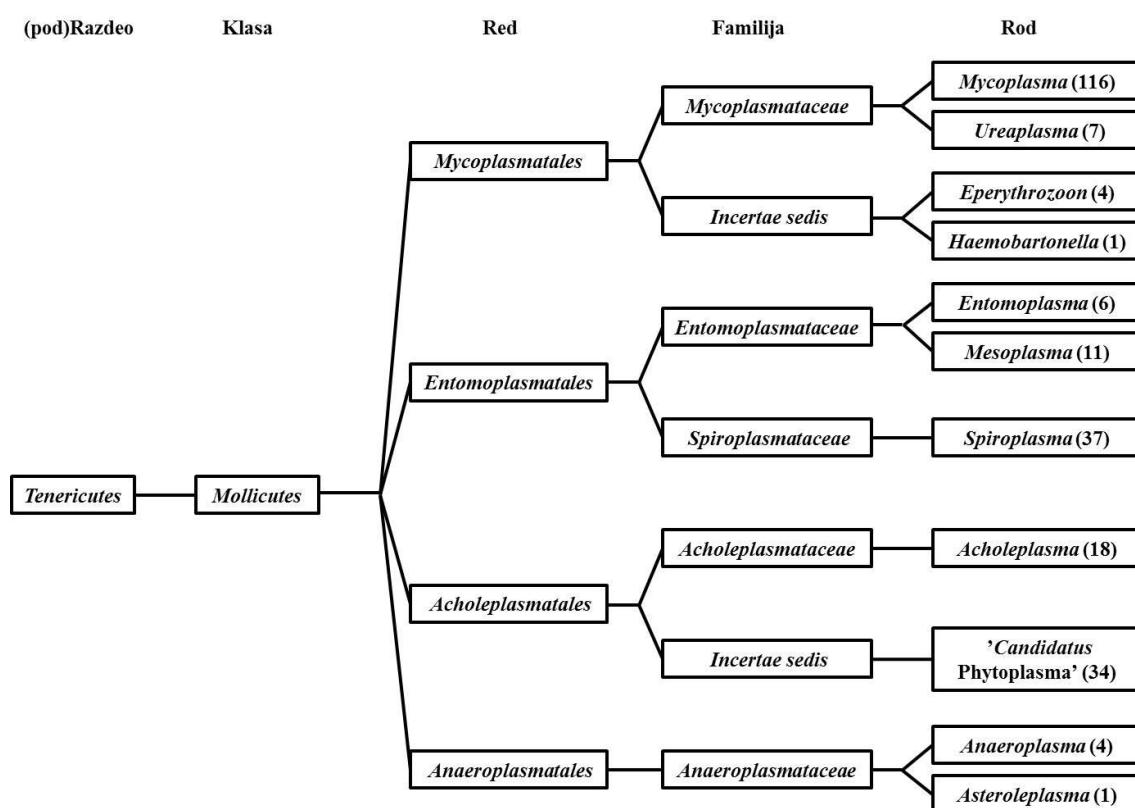
U Bergy-jevom priručniku klasa *Mollicutes* je odvojena u razdeo *Tenericutes* na osnovu njihovog nedostatka čvrstog ćelijskog zida i analize snažno podržanih alternativnih univerzalnih filogenetskih markera, kao što su subjedinica B RNK polimeraze, šaperon GroEL, nekoliko različitih amino-acil tRNK sintetaza kao i ATP-azna subjedinica F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (Ludwig i Schleifer, 2005; Ludwig i sar., 2009; Brown, 2012).

Kao dokaz da su fitoplazme deo klase *Mollicutes*, i da kao i ostali članovi ove klase imaju genom sa veoma niskim procentom G+C parova, pomoću metode centrifugiranja uzoraka sa cezijum hloridom (CsCl) izolovana je DNK fitoplazmi i procenjeno je da se procenat G+C parova genoma fitoplazmi kreće od 23% do 26.2% (Kirkpatrick i sar., 1987; Kollar i Seemüller, 1989).

Dugo vremena se nije znalo tačno mesto fitoplazmi u okviru klase *Mollicutes*, pa su bile svrstavane kao poseban član ove klase bez određenog taksonomskog nivoa. Tokom vremena je eksperimentima pokazano da je membrana fitoplazmi slična membrani aholeplazmi koje nemaju potrebu za sterolom, a ne onoj kod mikoplazmi kojima je sterol neophodan kao što se ranije mislilo (Lim i Sears, 1991, 1992; Lim i

sar., 1992). Takođe je utvrđeno da ove molikute koriste UGA kao STOP kodon, a ne kao kodon za ugradnju triptofana kao što je slučaj kod rodova *Spiroplasma* i *Mycoplasma*. Nakon intenzivnih istraživanja došlo se do zaključka da su fitoplazme filogenetski najbliže rodu *Acholeplasma* sa kojim i dele neke od karakteristika (UGA kao STOP kodon, nedostatak holesterola u membrani) i da su njihovi preci verovatno bili prokarioti slični aholeplazmama, koji su naseljavali insekte. Spekuliše se da su se fitoplazme od aholeplazmi odvojile u vreme pojave angiospermi – pre oko 140 do 210 miliona godina (Aoki i sar., 2004). Maniloff (2000) je čak, koristeći sekvencu 16S rDNK kao molekularni sat, procenio da tačno vreme odvajanja iznosi pre 180 miliona godina.

Iako je, takođe, filogenetskom analizom sekvenci 16S rDNK proučavanih aholeplazmi pokazano da one formiraju dve grane, od kojih je jedna sestrinska linija fitoplazmi, fitoplazmama je zbog nemogućnosti gajenja na hranljivim podlogama dodeljena familija *Incertae sedis* (IRPCM, 2004). Zbog toga se red *Acholeplasmatales* sastoji od dve familije *Acholeplasmataceae* i *Incertae sedis* (Shema 1).



Shema 1. Klasifikacija fitoplazmi (Brown i sar., 2012, dopunjeno)

Sa evolucione tačke gledišta, preci klase *Mollicutes* su se rano podelili na dve grane nazvane AAA (*Asteroleplasma*, *Acholeplasma* i *Anaeroplasmata*) i SEM (*Spiroplasma*, *Entomoplasmata* i *Mycoplasma*) i obe su podlegle nezavisnoj redukciji veličine genoma. Fitoplazme su tokom evolucije od pretka iz grupe *Bacillus/Clostridium* u procesu redukcije izgubile tri četvrtine i više svog genoma. Pretpostavlja se da im se genom smanjio na veličinu 500-700 kb, a potom je u nekim sojevima došlo do duplikacija, pa se genom povećao na 1000-1400 kb. Tokom reduktivne evolucije fitoplazme su izgubile mnoge gene važne za funkcionisanje osnovnog (bazalnog) metabolizma, ali su zadržale set gena neophodan za opstanak u floemu i kolonizaciju tela vektora (Firrao i sar., 2007).

#### 1.1.4. 'Candidatus Phytoplasma' rod i podela na 16Sr grupe

Pošto fitoplazme nije moguće gajiti *in vitro* na hranljivim podlogama, one su do skoro klasifikovane isključivo na osnovu simptoma koje izazivaju, biljaka domaćina koje parazitiraju, kao i vektora koji ih prenose (Freitag, 1964; Golino i sar., 1989; Errampalli i sar., 1991). Međutim, u novije vreme, sa razvojem molekularnih metoda, njihova klasifikacija se zasniva prvenstveno na RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata) analizi PCR-om (Polymerase Chain Reaction - lančana reakcija polimeraze) umnoženog gena za ribozomalnu ribonukleinsku kiselinu (16S rRNK). Takođe su izučavani i korišćeni drugi delovi genoma kao što su to *secY* gen, geni ribozomalnih proteina (*rpl22*, *rpl15*, *rps3*, *rps19*) i gen faktora elongacije (*tuf* gen) (Lee i sar., 1998b; Marcone i sar., 2000; Lee i sar., 2004a, 2004b, 2006).

Naime, razvojem monoklonalnih i poliklonalnih antitela, kao i kloniranih DNK proba tokom 80-tih i 90-tih godina prošlog veka, fitoplazme su prvenstveno odvojene u nekoliko genetički različitih klastera (Kirkpatrick i sar., 1987; Chen i sar., 1994; Ko i Lin, 1994). Na osnovu filogenetske studije sekvenci 16S rRNK i ribozomalnog proteina Lim i Sears (1989, 1992) su po prvi put predstavili fitoplazmu žutila aстера kao novog člana klase *Mollicutes*. Utvrđena filogenija je otvorila mogućnost identifikacije i klasifikacije ovih biljnih patogena na osnovu RFLP analize PCR-om umnoženog gena za 16S rRNK uz pomoć većeg broja restrikcionih enzima (Lee i sar., 1993; Schneider i



sar., 1993). Na osnovu opširne RFLP analize 16S rDNK i kombinacijama profila dobijenih sa 17 restrikcioni enzima, fitoplazme su odvojene prvenstveno u 10 grupa i 15 podgrupa (Lee i sar., 1993) da bi vremenom taj broj rastao (Lee i sar., 1998b, 2000). Razvojem servera *iPhyClassifier* koji na osnovu unete sekvence 16S rDNK pravi virtualne RFLP profile, upoređuje ih sa svojom bazom podataka i dodeljuje određenu grupu i podgrupu, fitoplazme su danas podeljene u 32 grupe i 114 podgrupa (Wei i sar., 2008; Zhao i sar., 2009). Međutim, ni ovaj broj nije konačan jer se još uvek objavljuju novi radovi u kojima su prikazane nove grupe ili podgrupe fitoplazmi. Nova podgrupa se dodeljuje nepoznatom soju fitoplazme ako on poseduje određeni broj restrikcioni mesta različitih od svih do sada opisanih sojeva date grupe. Osnova ovog sistema leži u visoko konzervativnoj prirodi 16S rDNK tako da su dizajnirani univerzalni prajmeri koji mogu umnožiti ovaj region kod bilo koje fitoplazme iz bilo koje biljke ili vektora (Lee i sar., 2010). Međutim, za precizniju diferencijaciju srodnih ali različitih sojeva fitoplazmi, kao pripadnika različitih podgrupa unutar većih grupa, korišćeni su manje konzervativni geni, kao što je na primer gen za ribozomalni protein (Gundersen i sar., 1994a; Yoshikada i sar., 1994).

Tabela 3. Pojedine 16Sr grupe i do sada opisane/potencijalne '*Candidatus* Phytoplasma' vrste (Zhao i sar., 2010, dopunjeno)

Ime 16Sr grupe	Trivijalni naziv grupe	Takson	Broj podgrupa
16SrI	Aster yellows grupa	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i> '	12
16SrII	Peanut witches' - broom grupa	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma australasiae</i> '	12
16SrIII	X-disease grupa	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' *	20
16SrIV	Coconut lethal yellowing grupa	' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> ' * ' <i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> ' *	7
16SrV	Elm yellows grupa	' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma vitis</i> ' * ' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma balanitae</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma rubi</i> '	8
16SrVI	Clover proliferation grupa	' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i> '	9
16SrVII	Ash yellows grupa	' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '	3
16SrVIII	Loofah witches' - broom grupa	' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> ' *	1
16SrIX	Pigeon pea witches' - broom grupa	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '	4

Tabela 3 (nastavak). Pojedine 16Sr grupe i do sada opisane/potencijalne 'Candidatus Phytoplasma' vrste (Zhao i sar., 2010, dopunjeno)

Ime 16Sr grupe	Trivijalni naziv grupe	Takson	Broj podgrupa
16SrX	Apple proliferation grupa	'Ca. Phytoplasma mali' 'Ca. Phytoplasma pyri' 'Ca. Phytoplasma prunorum' 'Ca. Phytoplasma spartii' 'Ca. Phytoplasma allocasuarinae'	6
16SrXI	Rice yellow dwarf grupa	'Ca. Phytoplasma oryzae'	3
16SrXII	Stolbur grupa	'Ca. Phytoplasma solani' * 'Ca. Phytoplasma australiense' 'Ca. Phytoplasma japonicum' 'Ca. Phytoplasma fragariae' 'Ca. Phytoplasma convolvuli'	8
16SrXIII	Mexican periwinkle virescence grupa	Nedefinisana	2
16SrXIV	Bermudagrass white leaf grupa	'Ca. Phytoplasma cynodotis'	1
16SrXV	Hibiscus witches'- broom grupa	'Ca. Phytoplasma brasiliense'	1
16SrXVI	Sugarcane yellow leaf syndrome grupa	'Ca. Phytoplasma graminis'	1
16SrXVII	Papaya bunchy top grupa	'Ca. Phytoplasma caricae'	1
16SrXVIII	American potato purple top wilt grupa	'Ca. Phytoplasma americanum'	1
16SrXIX	Japanese chestnut witches'- broom grupa	'Ca. Phytoplasma castaneae'	1
16SrXX	Buckthorn witches'- broom grupa	'Ca. Phytoplasma rhamnii'	1
16SrXXI	Pine shoot proliferation grupa	'Ca. Phytoplasma pini'	1
16SrXXII	Nigerian coconut lethal decline (LDN) grupa	'Ca. Phytoplasma cocosnigeriae' *	1
16SrXXIII	Buckland Valley grapevine yellows grupa	Nedefinisana	1
16SrXXIV	Sorghum bunchy shoot grupa	Nedefinisana	1
16SrXXV	Weeping tea tree witches'- broom grupa	Nedefinisana	1
16SrXXVI	Mauritius sugarcane yellows D3T1 grupa	Nedefinisana	1
16SrXXVII	Mauritius sugarcane yellows D3T2 grupa	Nedefinisana	1
16SrXXVIII	Havana derbid phytoplasma grupa	Nedefinisana	1
16SrXXIX	Cassia witches'- broom grupa	'Ca. Phytoplasma omanense'	1
16SrXXX	Salt cedar witches'- broom grupa	'Ca. Phytoplasma tamaricis'	1
16SrXXXI	Soybean stunt grupa	'Ca. Phytoplasma costaricanum'	1
16SrXXXII	Madagascar periwinkle virescence and phyllody grupa	'Ca. Phytoplasma malaysianum'	1

\*- potencijalne 'Candidatus Phytoplasma' vrste

Pošto se u sistematici bakterija koriste geni za rRNK kao validni geni koji mogu predstaviti pravu genealogiju organizma (Woese, 2000), tako je i podela fitoplazmi na 16Sr grupe na osnovu RFLP profila u skladu sa filogenetskom analizom sekvenci 16S rDNK (Lee i sar., 1998b). Zbog toga su Gundersen i sar. (1994b) predložili da svaka grupa treba da predstavlja najmanje jednu vrstu fitoplazmi.

Fenotipske karakteristike bazirane na fiziološkim i biohemijskim osobinama, koje se koriste u klasifikaciji kultivisanih mikroorganizama, nisu uključene u klasifikaciju fitoplazmi zbog nemogućnosti njihovog gajenja na hranljivim podlogama. Da bi rešili ovu prepreku, „International Research Program for Comparative Mycoplasmaology“ (IRPCM), Phytoplasma/Spiroplasma radni tim je u dogovoru sa „International Committee of Systematic Bacteriology Subcommittee for the Taxonomy of Mollicutes“ 2004. godine usvojio taksonomsko pravilo za nekultivisane mikroorganizme i predložio novi rod '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*' (IRPCM, 2004). Da bi izbegao nomenklaturnu konfuziju, ovaj radni tim je doneo određena pravila po kojima opis nove '*Ca. Phytoplasma*' vrste treba da se odnosi na jednu jedinstvenu sekvencu gena za 16S rRNK dužu od 1200 bp i da ima manje od 97.5% sličnosti sa bilo kojom prethodno opisanom '*Ca. Phytoplasma*' vrstom, osim ako opisivana fitoplazma jasno ne predstavlja novu ekološki odvojenu populaciju (IRPCM, 2004; Firrao i sar., 2005). Nova vrsta bi trebalo takođe pored sekvence jedinstvene za fitoplazme (koja se nalazi na mestu jednog od univerzalnih prajmera) da poseduje još minimum jednu jedinstvenu sekvencu karakterističnu samo za tu vrstu, a naziv nove vrste može biti dat u odnosu na mesto ili domaćina u kom je prvi put detektovana. Soj čija sekvencu 16S rDNK je poslužila za opisivanje te vrste naziva se „referentni soj“ dok se svi ostali sojevi, koji se manje ili više razlikuju od referentnog, nazivaju „srodnim sojevima“. Do sada je zvanično opisano 34 '*Ca. Phytoplasma*' vrsta a postoji još 15 potencijalnih vrsta kod kojih se sekvencu 16S rDNK razlikuje više od 97.5% od svih prethodno opisanih ili poseduju jedinstvene biološke karakteristike, ali još uvek nisu zvanično opisane (IRPCM, 2004; Zhao i sar., 2010, dopunjeno). U Tabeli 3 je dat pregled postojećih 16Sr grupa i podgrupa kao i njihova povezanost i broj '*Ca. Phytoplasma*' vrsta (Zhao i sar., 2010, dopunjeno).

Ipak, dobro je poznata činjenica da je filogenija koja se zasniva na samo jednom visoko konzervativnom genu, kao što je 16S rDNK, veoma ograničena, pogotovo kada

je u pitanju definisanje podgrupa i razlika u sojevima unutar podgrupa, tako da se novi pristup konstruisanja filogenetskih stabala kombinovanjem sekvenci različitih gena, koji se sada primenjuje za većinu drugih organizama, pokazao kao mnogo efikasniji i informativniji (**Hodgetts i Dickinson, 2010**).

### 1.1.5. Detekcija fitoplazmi

Od otkrića fitoplazmi pa do danas, naučnici su koristili različite tehnike u njihovoj detekciji. Posmatranje tanjih ili debljih preseka biljnih delova obolelih biljaka pod elektronskim mikroskopom, bojenje posebnim DNK-specifičnim bojama, serološke probe sa antigenima specifičnim za fitoplazme su neke od prvih tehnika koje su bile razvijene za detekciju fitoplazmi (**Schneider, 1977; Braun i Sinclair, 1979; Hiruki i Rocha, 1986; D'Agostino, 1991; Milne i sar., 1995; Musetti i sar., 2002**). Nakon uspešnog kloniranja molekula DNK 80-tih godina prošlog veka (**Kirkpatrick i sar., 1987**) tehnike koje su se zasnivale na DNK probama, kao što su nasumično kloniranje DNK ili komplementarne RNK, su široko razvijane i korišćene (**Davis i sar., 1988; Bertaccini i sar., 1990, 1993; Kuan i Su, 1998**). Sa razvojem molekularnih metoda i sakupljanjem novih znanja o fitoplazmama, ustanovljeni su protokoli za detekciju fitoplazmi korišćenjem PCR metode koja se pokazala kao najuspešnija i koja se i danas koristi (**Chen i sar., 1993; Bertin i sar., 2004**).

U cilju definisanja evolutivnih odnosa među različitim sojevima fitoplazmi sekvenciran je ribozomalni operon (**Lim i Sears, 1989**). Potom su identifikovani prajmeri na različitim pozicijama ovog operona sa ciljem umnožavanja fragmenata specifičnih za fitoplazme kod zaraženih biljaka i vektora (**Lee i sar., 1993; Gundersen i sar., 1994b; Gundersen i Lee, 1996**). Poređenjem sekvenci 16S rRNK gena kao i 16S-23S rDNK intergenskog regiona dizajnirani su prajmeri specifični za određene grupe fitoplazmi da bi se omogućila brža karakterizacija patogena (**Rhode i sar., 1993; Firrao i sar., 1994; Lee i sar., 1994; Smart i sar., 1996**). Geni ribozomalnih proteina su takođe bili među prvima na osnovu kojih su dizajnirani univerzalni i za grupu specifični prajmeri (**Lim i Sears, 1991; Jomantiene i sar., 1998; Lee i sar., 1998b; Bertaccini i Martini, 1999**). Osim ribozomalnog operona i gena za ribozomalne proteine, naučnici su sekvencionirali i druge gene kao što su *tuf* gen, gen koji kodira

enzim nitroreduktazu, gen za girazu i dizajnirali su prajmere za njihovo umnožavanje (Schneider i sar., 1997; Jarausch i sar., 1998; Chuang i Lin, 2000). Najveće ograničenje još bržeg razvoja savremenih molekularnih metoda je izolacija adekvatne količine DNK fitoplazmi iz biljnog materijala zbog njihove neravnomerne distribucije u biljci, kao i njihove ukupne količine. Zbog toga se prilikom ekstrakcije pristupa metodama obogaćivanja DNK (jedna od njih je samo ekstrakcija DNK iz nerava zeljastih delova ili floema odrvenelih delova) (Firrao i sar., 2007). Poslednjih godina najčešće korišćena metoda za detekciju fitoplazmi je PCR/nested-PCR/RFLP metoda konzervativnog gena za 16S rRNK, koja se pokazala kao veoma brza i pouzdana metoda primenjiva na velikom broju uzoraka (Lee i sar., 1998b; Bertaccini, 2007).

Zbog razlika u osetljivosti biljaka domaćina i vektora na različite fitoplazme, selekcionni pritisak nametnut od strane insekta i/ili biljke domaćina je tokom vremena olakšao evoluciju i/ili izolaciju specifičnih populacija fitoplazmi. Nedostatak detekcije i karakterizacije fitoplazmi zasnovan na 16S rDNK je što on nije u mogućnosti da razlikuje srodne ali ekološki različite sojeve, tako da je neophodna upotreba dodatnih molekularnih markera u rutinskoj klasifikaciji fitoplazmi. Višegenski sistem klasifikacije i identifikacije fitoplazmi, koji ulazi u upotrebu poslednjih godina, trebalo bi da obezbedi nove molekularne kriterijume za bolje razdvajanje vrsta i sojeva fitoplazmi (Lee i sar., 2010).

Precizna identifikacija i karakterizacija fitoplazmi povezanih sa biljkom domaćinom i vektorom je važna zbog daljeg izučavanja epidemiologije bolesti izazvanih fitoplazmama kao i ekologije fitoplazmi. Znanje o ekologiji i epidemiologiji fitoplazmi ima važnu ulogu u daljem izučavanju mogućih mera zaštite i sprečavanju novih epidemija bolesti koje one prouzrokuju (Lee i sar., 1998a).

## **1.2. OPŠTE OSOBINE I ZNAČAJ *groEL*, *tuf*, *rp* I *secY* GENA**

### **1.2.1. Molekularni šaperoni i gen za veliku subjedinicu šaperonina (*groEL* gen)**

Savijanje proteina u smislu zauzimanja krajnje trodimenzionalne (3D) konformacije u *in vitro* uslovima je proces koji se obavlja sam po sebi jer je informacija o 3D strukturi proteina sadržana u primarnoj aminokiselinskoj sekvenci. Sa druge

strane, savijanje proteina u *in vivo* uslovima predstavlja biološki problem iz više razloga. Naime, zbog prirode samog procesa translacije svi bočni ostaci koji treba da interaguju da bi došlo do uspostavljanja krajnje 3D strukture proteina, nisu prisutni sve dok ne dođe do terminacije procesa translacije, pa samim tim i savijanje proteina nije moguće sve do terminacije translacije. Takođe, hidrofobni regioni, koji se inače u 3D strukturi nalaze sakriveni u unutrašnjosti proteina, tokom translacije nisu zaštićeni od uticaja faktora spoljašnje sredine, što povećava tendenciju stvaranja nepoželjnih veza. Još jednu prepreku pravilnom savijanju predstavlja priroda citoplazme koja je bogata raznim jedinjenjima uključujući i proteine, a opšte je poznato da visoka koncentracija proteina značajno povećava stvaranje međumolekularnih veza između nesavijenih proteina i ostalih prisutnih u njihovoj okolini. Zbog svega ovoga proces savijanja proteina je u ćeliji potpomognut proteinima koji se nazivaju molekularni pratioci (šaperoni) (Anfinsen, 1973; Ellis, 1990).

Molekularni šaperoni su grupa strukturno različitih proteina koji imaju zajedničku sposobnost interagovanja sa drugim proteinima koji se nalaze u nenativnom obliku (koji još nisu zauzeli 3D konformaciju). Oni imaju esencijalnu ulogu u pravilnom savijanju proteina jer prepoznaju nenativne proteine sa kojima se selektivno i nekovalentno vezuju stvarajući stabilne komplekse i samim tim sprečavajući njihovo pogrešno savijanje kao i agregaciju tokom savijanja. Važno je istaći da molekularni šaperoni samo prolazno interaguju sa svojim supstratima i da nisu prisutni u njihovoj krajnjoj 3D konformaciji (Ellis, 1990). Pomaganje pravilnog savijanja drugih proteina može biti postignuto ili putem aktivnog ATP zavisnog mehanizma ili putem pasivnog ATP nezavisnog mehanizma. Pored ove osnovne uloge, molekularni šaperoni su uključeni u mnoge procese u ćeliji kao što su metabolizam, rast, diferencijacija i programirana ćelijska smrt putem savijanja proteina odgovornih za ove procese, a potpomažu i procese transporta i degradacije drugih proteina unutar ćelije. Oni takođe utiču i na aktivaciju enzima i receptora. Zbog svega ovoga molekularni šaperoni su sveprisutni proteini i u ćeliji ih ima u izobilju (Ranson i sar., 1998; Ranford i sar., 2000).

Mnogi od molekularnih šaperona su prvenstveno bili identifikovani kao proteini toplotnog šoka pošto se njihova koncentracija značajno povećava u ćeliji nakon stresa izazvanog povišenom temperaturom. Pošto su proteini toplotnog šoka kategorisani

prema njihovoj molekularnoj masi izraženoj u kDa (npr. Hsp100, Hsp90, Hsp60, Hsp10), stoga su mnogi molekularni šaperoni poznatiji po ovoj nomenklaturi (**Lee i Tsai, 2005**).

Proteini toplotnog stresa (Hsps, heat-shock proteins) spadaju u grupu visoko konzervativnih proteina, a glavna fiziološka uloga im je održavanje homeostaze proteina. U većini ćelija ovi proteini čine 1-2% ukupnih proteina čak i pre izloženosti ćelije nekom tipu stresa, što govori o važnoj ulozi ovih proteina u biologiji i fiziologiji ćelija. Njihova uloga se prvenstveno odnosi na regulisanje savijanja i odvijanja drugih proteina. Pošto su ovi proteini prvi put identifikovani na osnovu njihove povišene sinteze nakon izloženosti ćelije visokim temperaturama, tako su i dobili ime - proteini toplotnog stresa. Kasnije je nedvosmisleno utvrđeno da njihova sinteza može biti indukovana i u uslovima različitih vrsta stresa, a neki od ovih proteina se mogu detektovati u visokoj koncentraciji i u situacijama koje nisu stresne (**Stephanou i Latchman, 2011**). Odgovor ćelije na stres je evolutivno stari, sveprisutni i ključni mehanizam neophodan za preživljavanje ćelije. Ova činjenica je sadržana u konzervativnosti peptidne sekvence molekularnih šaperona kroz sve žive organizme (**Ranford i sar., 2000**). Ova dvostruka uloga Hsp proteina, u normalnim ćelijama i ćelijama pod stresom, zahteva postojanje kompleksnih regulatornih procesa koji omogućavaju da dođe do tačne ekspresije gena (**Stephanou i Latchman, 2011**).

Do danas je 15 različitih grupa proteina klasifikovano kao molekularni šaperoni (Tabela 4). Mnogi istraživači širom sveta su se bavili, i danas se bave, proučavanjem mehanizama delovanja ovih proteina, ali je jedna podgrupa dobila najveću pažnju a to su šaperonini. Šaperonini su podeljeni u dve familije proteina - familije šaperonina 10 i 60 i jedan od prvih identifikovanih molekularnih šaperona je protein mase 60 kDa koji je nazvan šaperonin 60 (Cpn60). Ova podgrupa je posebno privukla pažnju na sebe zbog otkrića da imaju dodatno svojstvo a to je da deluju i kao signalni molekuli između susednih ćelija (**Ranford i sar., 2000**).

Tabela 4. Do sada otkrivene familije šaperona i njihova uloga (**Ranford i sar., 2000**)

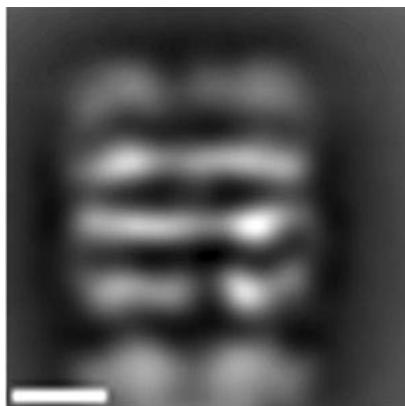
Familija	Naziv	Uloga šaperona
Šaperonin 10	Cpn10, Hsp10, ko-šaperonin, faktor rane trudnoće, GroES	Ko-šaperonin šaperonina 60, učestvuje u sklapanju proteina vezanih za šaperonin 60
Mali proteini toplotnog šoka	Hsps	Raznovrsna klasa proteina; funkcija šaperona je nezavisna od ATP-a; vezuju nezavršene proteine
Hsp40	DnaJ srodni proteini	Ko-šaperoni koji regulišu aktivnost proteina Hsp70; neki mogu samostalno vezivati za sebe nezavršene proteine
Šaperonin 60	Cpn60, Hsp60, Hsp65, GroEL	ATP-zavisno sklapanje ili ponovo sklapanje približno 15-30% ukupnih proteina ćelije
Hsp70	Hsp70	Sprečava agregaciju rasklopljenih proteina; rastavlja multimerne proteinske komplekse; učestvuje u prenosu proteina; reguliše odgovor ćelije na toplotni šok
Hsp90	Hsp90	Posebna uloga u regulisanju signalnog transdukcionog puta, preko delovanja na pojedine kinaze i steroidne receptore; mogućnost uobičajene aktivnosti šaperona
Hsp100	Clp	Rastavlja proteinske oligomere i agregate
Hsp110	Hsp110	U visokom stepenu je homologan sa familijom Hsp70; malo se zna o njegovoj ulozi

### 1.2.1.1. Šaperonini

Šaperonini su najbolje okarakterisana i izučena grupa molekularnih šaperona a uključuju potklase GroE i TCP-1 (T-kompleks polipeptid 1) za koje je karakteristično da su to kompleksi sastavljeni iz dva prstena koji vezuju odvijene proteine u svojoj centralnoj šupljini i posreduju u njihovom pravilnom savijanju putem višestrukih procesa ATP-zavisnog otpuštanja i ponovnog vezivanja (**Hartl i Martin, 1995**). Potklasu GroE (šaperonini Grupe I) čine šaperonin 60 (Cpn60, Hsp60, GroEL) i njegov kofaktor šaperonin 10 (Cpn10, Hsp10, GroES). Šaperonini ove potklase se mogu naći kod eubakterija, u mitohondrijama i hloroplastima, za razliku od TCP-1 šaperonina (šaperonini Grupe II) koji su prisutni kod arheobakterija i u citosolu eukariota. Razlike u strukturi proteina između ove dve potklase su u regionu vezivanja proteina supstrata (**Ranson i sar., 1998**). Do danas najintenzivnije proučavan molekularni šaperon je GroEL koji je zajedno sa GroES proteinom, neophodan za pravilno savijanje mnogih proteina u ćeliji, bilo pod normalnim ili stresnim uslovima. Delecija *groE* operona kod *Escherichia coli* je letalna za bakteriju, a postojanje oba proteina, i GroEL i GroES, je esencijalno za preživljavanje ćelije u bilo kojim uslovima spoljašnje sredine. Istraživanjima je utvrđeno da pod normalnim uslovima za rast ćelije, GroEL pomaže savijanje 10-15% proteina pri čemu se ovaj procenat povećava i do 30% u uslovima toplotnog stresa (**Horwich i sar., 1993; Ranford i sar., 2000**).



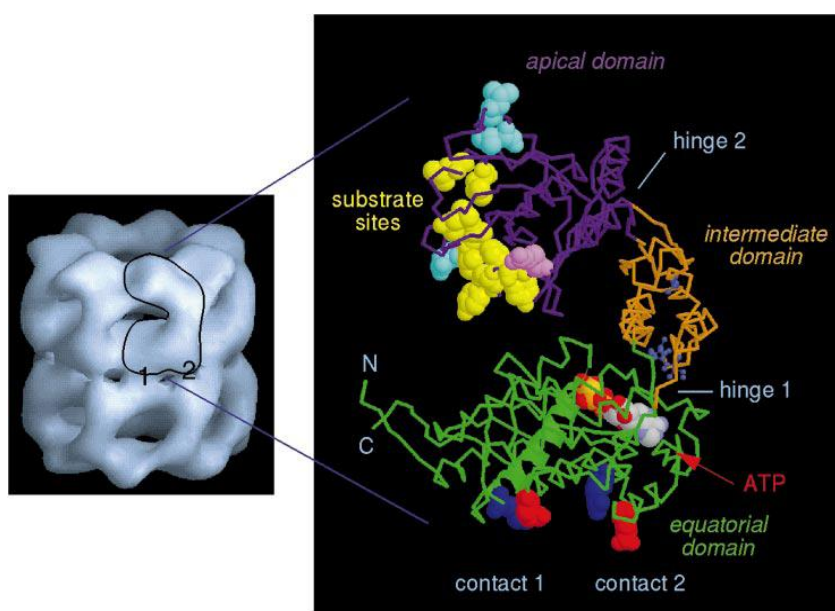
Šaperonin 60 je GroEL oligomer i ima oblik šupljeg cilindra (bureta, kaveza) koji je sastavljen od dva heptamerna prstena međusobno okrenuta „leđima“, odnosno donji prsten je okrenut kao u ogledalu u odnosu na gornji, pri čemu su prstenovi međusobno povezani preko dva kontaktna mesta iz oba prstena. Ovakvom strukturom se stvara velika centralna šupljina u koju ulazi supstrat i sa kojom uspostavlja kontakt putem hidrofobnih veza (Slika 3). Da bi mogao da vrši svoju funkciju, GroEL oligomer se povezuje sa GroES oligomerom, jednostrukim heptamernim prstenom oblika kupole (Xu i sar., 1997).



Slika 3. Izgled GroEL oligomera posmatran pod elektronskim mikroskopom. Bar je dužine 50 Å (Katayama i sar., 2008)

Istraživanje kristalne strukture GroEL subjedinica je pokazalo da je svaka subjedinica podeljena u tri jasno odvojena domena (Shema 2):

- 1) **ekvatorijalni domen** - sastavljen od ostataka aminokiselina 6-133 i 409-523; sadrži mesto za vezivanje ATP-a kao i kontaktna mesta za međusobno vezivanje prstenova;
- 2) **apikalni domen** - sastavljen od ostataka aminokiselina 191-376; u njemu se nalaze mesta vezivanja supstrata i vezivanja GroES subjedinice;
- 3) **intermedijerni domen** - sastavljen od ostataka aminokiselina 134-190 i 377-408; povezuje prethodna dva domena. Intermedijarni domen deluje kao zglobov jer u njemu dolazi do konformacionih promena kada se ATP veže za ekvatorijalni domen, dozvoljavajući tako alosteričke pokrete apikalnog domena (Hartl i Martin, 1995; Ranford i sar., 2000).



Shema 2. Prikaz domena, mesta vezivanja supstrata, kontaktnih mesta i mesta vezivanja ATP-a jedne subjedinice GroEL proteina (**Ranson i sar., 1998**)

Kombinacijom kinetičkih i kristalografskih studija, kao i uz pomoć elektro krio mikroskopskih snimaka različitih stanja intermedijernog domena, otkriven je niz rotacija zgloba koje reorijentišu mesta vezivanja polipeptida i dovode do velikih konformacionih promena u šaperoninskom kompleksu (**Ranson i sar., 1998**). Naime, novonastala promena zgloba dovodi do promene stanja površine supstrata, kojom se on vezuje za GroEL, a te promene podrazumevaju promenu stanja iz hidrofobnog u hidrofilno stanje i obrnuto (**Ranford i sar., 2000**).

Oligomer GroEL se može naći u dva stanja – T stanje u kom ima visok afinitet za vezivanje proteina supstrata i nizak afinitet za vezivanje molekula ATP-a i R stanje u kome je situacija obrnuta. U srži mehanizma savijanja proteina leži jednostavna promena stanja vezivanja supstrata za GroEL iz snažno vezanog u stanje oslobađanja pri čemu vezivanje ATP-a za GroEL dovodi do oslobađanja supstrata. Nakon njegovog oslobađanja, intermolekularne interakcije između izloženih hidrofobnih mesta supstrata i mesta vezivanja supstrata na GroEL proteinu, mogu biti zamenjene intramolekularnim interakcijama, tj. može doći do ukopavanja hidrofobnih mesta unutar supstrata i pravilnog savijanja proteina ili daljeg pogrešnog savijanja. Ako se supstrat savije pravilno, on se neće ponovo vezati za šaperonin i uslediće hidroliza ATP-a koja će

vratiti ceo sistem u stanje T spremno za vezivanje novog supstrata. Ako dođe do pogrešnog savijanja supstrata, ciklus se ponavlja sve dok se protein ne savije pravilno i ne oslobodi od GroEL oligomera (**Ranson i sar., 1998**).

### **1.2.1.2. Mehanizam delovanja GroEL-GroES kompleksa na savijanje proteina supstrata**

U pogledu konformacionih promena zgloba utvrđeno je da kada je površina supstrata u hidrofobnom stanju, on može da se veže za GroEL i tako dolazi do sprečavanja stvaranja pogrešnih veza sa ostalim proteinima pri čemu ove veze na kraju mogu dovesti do pogrešnog savijanja supstrata. Kada se ATP veže za GroEL, zglob se otvori, dolazi do promene površine supstrata i ona postaje hidrofilna, a protein se otpušta. Takođe kada je ATP vezan za GroEL, GroES se vezuje za njega formirajući poklopac na vrhu jedne strane GroEL oligomera prouzrokujući tako povećavanje centralne šupljine čime se potpomaže proces savijanja proteina supstrata (**Ranford i sar., 2000**).

Kofaktor GroES je takođe u obliku heptamernog prstena koji se vezuje za jedan kraj GroEL oligomera u prisustvu adenin nukleotida. Posедуje strukturu  $\beta$  cilindra i formira poklopac koji zatvara otvoren apikalni domen GroEL oligomera (Shema 3). Vezivanje GroES prstena je brzo u prisustvu ATP-a, a sporo u prisustvu ADP-a. Deo GroES nazvan pokretna petlja, koju čine aminokiseline 17-32, izdužuje se naniže i spolja formirajući kontakt sa nekoliko hidrofobnih ostataka na GroEL-u na bivšim mestima vezivanja supstrata, koja su okrenuta ka vrhu apikalnog domena. U najvećem broju slučajeva jedan GroES prsten se vezuje za jedan kraj GroEL oligomera stvarajući tako negativan efekat na suprotni GroEL prsten smanjujući njegov afinitet za vezivanje drugog GroES prstena. Formiranje GroEL-GroES kompleksa dovodi do pomeranja na spolja apikalnog domena GroEL subjedinica prstena za koji je vezan GroES. Zbog ovog pomeranja dolazi do uvećavanja centralne šupljine ovog prstena, koja dostiže visinu i širinu od 70 Å. Otvor suprotnog prstena se u isto vreme proširuje, ali u mnogo manjem stepenu. Na ovaj način vezivanjem GroES kape supstrat se oslobađa u unutrašnjost uvećane i zatvorene *cis* šupljine maksimalne veličine oko 8 nm. Najveći poznati protein supstrat koji koristi ovaj sistem je velika subjedinica bakterijskog Rubisco proteina

veliĉine 52 kDa, pa je verovatno da je ovo gornja granica veliĉine supstrata odreĊena veliĉinom *cis* centralne űupljine GroEL oligomera. Izuzetak od ove gornje granice je GroES homolog bakteriofaga T4, Gp31, koji je neophodan za sklapanje proteina Gp23 veliĉine 56 kDa, a to je moguće zato űto Gp31 ima duűu pokretnu petlju i űiri unutraűnji prostor űto dovodi do uvećavanja *cis* űupljine (**Hartl i Martin, 1995; Ranson i sar., 1998**).

Vezivanjem GroES subjedinice suprotan *trans* prsten postaje bliűi. Hidroliza ATP-a i formiranje ADP/GroES vezanog stanja dovodi do rotacije *trans* ekvatorijalnog domena ĉime se „priteűe“ kontakt izmeĊu prstenova na mestu Ala-109. Posledica ovog pomeranja je prekidanje kontakata izmeĊu susednih *trans* ekvatorijalnih domena, űto dovodi do proűirenja celog *trans* prstena. Proűireni i neűto manje uvrnuti apikalni domeni *trans* prstena sada pruűaju novo akceptorsko stanje za supstrat (**Ranson i sar., 2006**). Akceptorsko stanje je otvorena *trans* űupljina GroEL-GroES-ADP kompleksa. Nakon jednog kruga vezivanja i hidrolize ATP-a oko polovina supstrata ĉe zavrűiti u *cis* űupljini gde je zaűtićena od proteolize i agregacije (**Ranson i sar., 1998**).

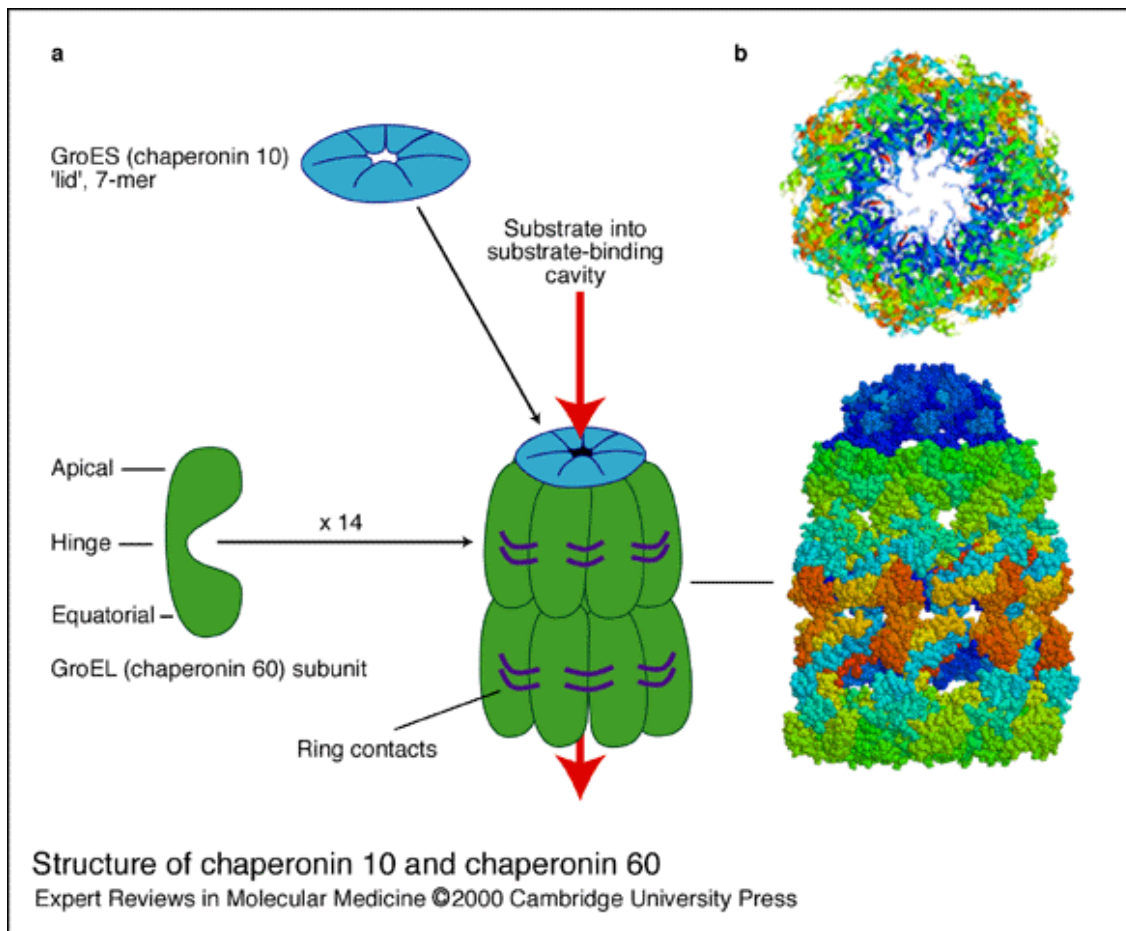
Odvijeni protein se vezuje za centralnu űupljinu GroEL prstena za koji nije vezan GroES poklopac. Ovo vezivanje supstrata pospeűuje disocijaciju GroES poklopca vezanog za suprotan prsten tako űto stimuliűe hidrolizu ATP-a suprotnog prstena i uzrokujući preureĊivanje u GroEL-GroES kompleksu, koji olakűavaju disocijaciju snaűno vezanog ADP-a i GroES poklopca. Nakon vezivanja ATP-a, GroES se ponovo vezuje za onaj prsten GroEL oligomera za koji je vezan supstrat (**Hartl i Martin, 1995; Ranson i sar, 2001**).

Predloűena su dva modela delovanja GroEL oligomera na savijanje proteina a takoĊe je i utvrĊeno da se u zavisnosti od supstrata oba modela deűavaju u realnosti. Prvi model pretpostavlja da supstrat interaguje sa GroEL hidrofobnim ostacima kroz mnogobrojne cikluse hidrolize ATP-a pri ĉemu dolazi do vezivanja i otpuűtanja GroES poklopca. UtvrĊeno je da se deűava oko 2-5 ciklusa vezivanja i otpuűtanja GroES subjedinice u minuti na temperaturi od 25°C. Ovim modelom se sugeriuűe da se nativno stanje proteina postiűe u ponovljenim procesima savijanja i strukturnih promena supstrata. U ovom modelu do savijanja proteina dolazi unutar űupljine GroEL oligomera. Suprotno ovom modelu, drugi model pretpostavlja da je osnovna funkcija

GroEL oligomera da odvije nepravilno savijen intermedijerni stupanj supstrata i da ga potom izbaci u citoplazmu sa svakim krugom hidrolize ATP-a ostavljajući tako da se supstrat spontano sam od sebe savije. Ovim modelom do savijanja proteina dolazi preko niza skokova supstrata između različitih GroEL molekula sve dok se ne postigne pravilno savijanje (**Hartl i Martin, 1995; Mayhew i sar., 1996**).

Ceo proces savijanja proteina uz pomoć GroEL-GroES kompleksa se može prikazati u nekoliko koraka (**Mayhew i sar., 1996**):

1. Odvijeni polipeptid se unutar GroEL prstena koji je u *trans* konformacionom obliku inicijalno vezuje za GroEL.
2. Ovim se olakšava disocijacija GroES prstena vezanog za suprotni *cis* prsten.
3. GroES se ponovo vezuje zajedno sa ATP-om za bilo koji GroEL prsten. Zbog toga supstrat koji je vezan za *cis* prsten GroEL oligomera se premešta unutar GroEL šupljine i jedan njegov deo se savija u nativni oblik ili u stanje iz kog sledi pravilno savijanje.
4. Kooperativnom hidrolizom sedam ATP molekula iz *cis* prstena GroEL oligomera stabilizuje se vezivanje GroES poklopca.
5. Podstaknut hidrolizom ATP-a iz drugog prstena GroEL oligomera, GroES se potom disocira a savijen protein (ili protein u intermedijernom stanju iz kog sledi pravilno savijanje) izlazi iz GroEL kaveza.
6. Nekompletno ili pogrešno savijeni protein se ponovo snažno vezuje što dovodi do njegovog odvijanja i strukturnog preuređivanja. Ponovo vezivanje GroES poklopca pokreće još jedan krug procesa savijanja. Ovi ciklusi se nastavljaju kontinuirano sve dok se protein ne savije pravilno.



Shema 3. Prikaz GroE kompleksa (Ranford i sar., 2000)

Proučavanjem kristalne strukture oligomera, kao i uticaja različitih mutacija na mehanizam delovanja GroEL-GroES kompleksa, utvrđeno je postojanje nekoliko aminokiselina (AK) na određenim mestima u proteinu, neophodnih za pravilno funkcionisanje ovog kompleksa. Kristalna struktura GroEL oligomera je otkrila par sonih mostova koji povezuju subjedinice jednog prstena sa subjedinicama susednog suprotno orijentisanog prstena. Mutacije na ovim kontaktnim mestima (Arg-452 u Glu, Glu-461 u Ala, Ser-463 u Ala i Val-464 u Ala) sprečavaju asocijaciju prstenova i dovode do nastajanja SR (single ring) mutanata čiji se GroEL oligomer sastoji od samo jednog prstena. Ovi mutanti i dalje mogu da vezuju i da hidrolizuju ATP kao i da vezuju supstrat i GroES, ali ne mogu da otpuštaju GroES. U nedostatku alosteričkog signala vezivanjem ATP-a za drugi GroEL prsten, GroES ostaje snažno vezan za GroEL. Ovim

se objašnjava zašto GroEL ima dva prstena – oslobađanje GroES poklopca uz pomoć *cis* prstena je omogućeno nekim promenama u *trans* prstenu (**Ranson i sar., 1998**).

Kristalna struktura GroEL-GroES-ADP kompleksa je otkrila neočekivanu inserciju Asp-398 u mesto vezivanja nukleotida putem rotacije intermedijarnog domena nadole. Mutant kod koga je Asp-398 zamenjen sa Ala može da vezuje ATP, ali ga hidrolizuje izuzetno sporo (poluvreme iznosi 20 minuta umesto 20 sekundi) (**Ranson i sar., 1998**).

Kinetičke i stukturne studije GroEL mutanta Arg-197 u Ala su pomogle razjašnjavanju mehanizma oslobađanja supstrata i delovanje ATP-a. Ostaci aminokiseline Arg-197 se nalaze u apikalnom domenu i ona stvara soni most sa Glu-386 koji se nalazi u intermedijernom domenu susedne subjedinice. Raskidanjem ovih sonih veza mutacijama, odnosno promenom AK na mestu 197, nastaje funkcionalni GroEL oligomer, ali sa nešto izmenjenim kinetičkim svojstvima. Ova promena kinetičkih osobina je odgovorna za vezivanje ATP-a za jedan, a potom i drugi prsten u određenoj koncentraciji ATP-a (**Ranson i sar., 1998**).

### 1.2.1.3. Proučavanje šaperonina kod molikuta i drugih bakterija

Mnogi autori su koristili *groEL* gen kao molekularni marker za bolju tipizaciju i identifikaciju vrsta (*Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus*) (**Goh i sar., 1996**; **Satheesh, 2002**; **Karenlampi, 2004**) kao i diferencijaciju srodnih vrsta ili karakterizaciju različitih serotipova (kod *Streptococcus suis*) (**Brousseau i sar., 2001**). Takođe je korišćen za detekciju patogena kod pacijenata (*Bartonella* spp.) (**Diederer i sar., 2007**) ili tačnu identifikaciju vrste izazivača određenog oboljenja (identifikacija *Burkholderia pseudomallei* i *B. thailandensis*) (**Woo i sar., 2002**). Posmatrajući problem tačne identifikacije patogena, **Yushan i sar. (2010)** su dizajnirali par univerzalnih prajmera koji mogu da umnože 600 bp *groEL* gena kod patogenih bakterija.

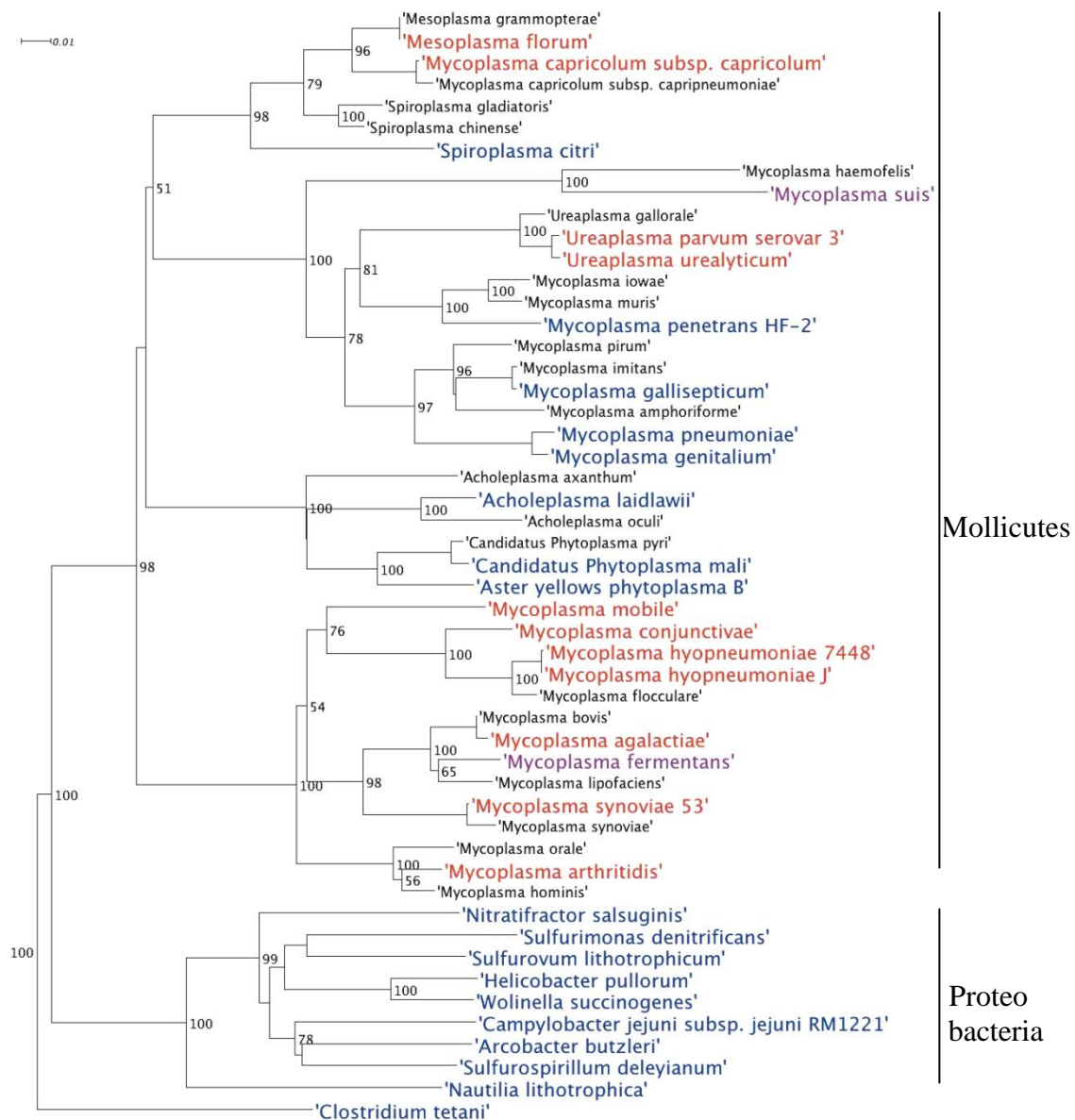
Protein toplotnog stresa i šaperon GroEL su prisutni kod skoro svih bakterija, dok su GroEL homologe prisutni u živim organizmima u plastidima, hloroplastima i mitohondrijama. Smatra se da je GroEL jedini šaperon koji je esencijalan za rast bakterije *E. coli* (**Fayet i sar., 1989**). Takođe je pokazano da su GroEL homologe

neophodni za rast drugih bakterija kao što su *Bacillus subtilis* (Li i Wong, 1992; Kobayashi i sar., 2003), *Rhodobacter sphaeroides* (Lee i sar., 1997), *Streptomyces albus* G (Servant i sar., 1993), *Rhizobium leguminosarum* (Rodríguez-Quiñones i sar., 2005) i *Mycobacterium tuberculosis* (Hu i sar., 2008).

Iako se smatra da bi esencijalni geni, kao što je *groEL*, trebalo da budu održani u genomu, utvrđeno je da je GroEL izgubljen kod mnogih vrsta molikuta tokom njihove reduktivne evolucije od gram-pozitivnih predaka (Slika 4) (Wong i Houry, 2004). Međutim, u svim drugim bakterijskim genomima do sada sekvenciranim u celosti, *groEL* gen je prisutan (Clark i Tillier, 2010).

Pretpostavlja se da razlog ovog gubitka kod nekih vrsta mikoplazmi leži u činjenici da GroEL izaziva snažan imunski odgovor kod domaćina, a *Mycoplasma* vrste koriste mnoge načine da ga smanje. Takođe, ove vrste imaju spor rast koji utiče na fluks proteina dok prolaze kroz GroEL sistem. Možda najvažnija činjenica jeste da su mikoplazme izgubile mnoge proteine kojima je neophodan GroEL oligomer za pravilno funkcionisanje. Mikoplazme se od ostalih bakterija razlikuju i po tome što je mutagenезom transpozona pokazano da GroEL nije esencijalan za vrste *M. genitalium* i *M. pneumoniae* i da ne dolazi do njegove povećane sinteze nakon toplotnog stresa. Ovaj nedostatak odgovora GroEL proteina na toplotni stres može nastati usled prisustva drugog regulatornog sistema za toplotni šok koji je pronađen kod *Mycoplasma* vrsta a to je HrcA-CIRCE sistem.





Slika 4. Prikaz prisutnosti/odsutnosti *groEL* gena kod molikuta i proteobakterija pomoću filogenetskog stabla konstruisanog na osnovu sekvenci 16S rRNK. Plava boja označava potvrđeno prisustvo, ljubičasta označava da postoje dokazi o prisustvu, ali nije još dokazano, crvena označava odsustvo gena, a crna boja označava da još uvek ne postoje podaci o ovom genu (Clark i Tillier, 2010)

Kod šest vrsta mikoplazmi (*M. agalactiae*, *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae* i *M. genitalium*) koje su izazivači različitih oboljena stoke, laboratorijskih životinja i ljudi i kod kojih je *groEL* gen prisutan, on je intenzivnije proučavan. Poređenjem njegovih sekvenci svih šest vrsta mikoplazmi utvrđeno je da sve osim *M. genitalium* imaju homologiju sekvenci između 98 i 99.9%, a

u poređenju sa *M. genitalium*, koja ima jako mali genom od 570 kb i kod koje nedostaje reparacioni DNK sistem tako da podleže intenzivnom mutacionom pritisku na trećoj poziciji svakog kodona, sličnost je iznosila između 76.5 i 77.7%. U odnosu na *B. subtilis*, *Clostridium perfringens* i *E. coli* sličnost je iznosila između 49.2 i 59.7% što govori o visokoj konzervativnosti ovog gena tokom evolucije. Zanimljivo je da je sličnost na nivou predviđene AK sekvence iznosila između 90.4 i 99.9% između svih poređenih mikoplazmi, uključujući i *M. genitalium*, dok je sa drugim gore pomenutim bakterijama iznosila između 53.2 i 60.8%. Još interesantniji je podatak da je u poređenju sa AK sekvencom *hsp60* kod eukariotskih organizama sličnost iznosila između 50 i 65% (Scherm i sar., 2002).

Poređenjem genoma četiri fitoplazme sekvencirane u celosti uočeno je da sve četiri poseduju osnovni set gena toplotnog šoka i šaperona koji se sastoji od Hsp70 familije (*dnaK*, *grpE*), GroE familije (*groEL*, *groES*), šaperon *dnaJ* i faktor aktivacije (ST17) koji se vezuje za agregirane proteine. Faktor aktivacije jedino nije identifikovan kod 'Ca. P. mali' dok ga poseduju ostale tri fitoplazme (Kube i sar., 2012).

### 1.2.2. Gen faktora elongacije kod fitoplazmi

Gen koji kodira Tu faktor elongacije (EF-Tu), *tuf* gen, takođe je visoko konzervativan gen koji ima centralnu ulogu u procesu translacije i koji je često korišćen u filogenetskoj analizi drugih bakterija. On se u genomu fitoplazmi nalazi u jednoj kopiji i često se koristi u njihovoj diferencijaciji i klasifikaciji. Schneider i sar. (1997) su dizajnirali prajmere koji mogu da umnože ovaj gen kod većine grupa fitoplazmi čime je pokazano da ovaj gen predstavlja potencijalni marker za klasifikaciju fitoplazmi. Naime uz pomoć par restrikcionih enzima moguće je identifikovati različite grupe i podgrupe fitoplazmi (Lee i sar., 2010). Iako se pokazalo da je njegova sposobnost razlikovanja evolutivno udaljenih linija fitoplazmi nešto manja nego kod 16S rDNK (Schneider i sar., 1997; Marccone i sar., 2000), u nekim slučajevima se pokazalo da je ovaj gen veoma koristan u diferencijaciji bliskih sojeva različitih ekoloških karakteristika (Langer i Maixner, 2004).

Zbog nemogućnosti dizajniranja univerzalnih prajmera koji bi umnožavali *tuf* gen kod svih grupa fitoplazmi, ovaj gen se za sada koristi pri diferencijaciji podgrupa

unutar 16Sr grupa, naročito grupa 16SrI i 16SrXII (**Marcone i sar., 2000; Streten i Gibb, 2005**).

### 1.2.3. Geni ribozomalnih proteina kod fitoplazmi

Geni ribozomalnih proteina se nalaze u okviru većeg *rp* operona koji se sastoji od najmanje 21 gena u svim do sada u potpunosti sekvenciranim fitoplazmama. Literaturni podaci pokazuju da je redosled ovih gena u principu isti a on izgleda ovako:

*rpsJ* (koji kodira ribozomalni protein S10), *rplC* (L3), *rplD* (L4), *rplW* (L23), *rplB* (L2), *rpsS* (S19), *rplV* (L22), *rpsC* (S3), *rplP* (L16), *rpmC* (L29), *rpsQ* (S17), *rplN* (L14), *rplX* (L24), *rplE* (L5), *rpsN* (S14), *rpsH* (S8), *rplF* (L6), *rplR* (L18), *rpsE* (S5), *rpmD* (L30) i *rplO* (L15).

Na osnovu sekvenci dela *rp* operona fitoplazme iz *Oenothera* biljke, dobijene pomoću proba napravljenih na osnovu *rp* operona vrste *Mycoplasma capricolum*, dizajnirani su prvi prajmeri rpF1 i rpR1 za koje se pokazalo da u osnovi mogu da umnože gene *rplV*, *rpsC* i deo *rplP* kod *Acholeplasma laidlawii*. Potom su usledile dalje studije i dizajnirano je više pari prajmera, kako polu-univerzalnih tako i specifičnih, koji mogu umnožiti ovaj i druge delove *rp* operona kod većeg broja grupa fitoplazmi (**Hodgetts i Dickinson, 2010**).

Analizom RFLP profila PCR-om umnoženih delova *rp* operona pomoću dizajniranih prajmera, a u kombinaciji sa već postojećom 16S rDNK klasifikacijom, fitoplazmama su dodeljene nove 16Sr-rp podgrupe (**Lee i sar., 1998b**). Naime, geni koji kodiraju ribozomalne proteine su pokazali veću varijabilnost od 16S rDNK i veću informativnost u smislu filogenije, tako da povećavaju rezolucionu moć pri razdvajanju filogenetski srodnih sojeva (**Lee i sar., 2010**). Prvenstveno su studije u okviru grupa 16SrI i 16SrV pokazale da je analizom *rp* sekvenci moguće identifikovati ne samo grupe i podgrupe kao i na nivou 16S rDNK, već je moguće identifikovati i nove linije/podgrupe što nije bilo moguće uz pomoć samog 16S rDNK (**Lee i sar., 2004a; Martini i sar., 2007**). Ovi podaci su potvrđeni i činjenicom da je većina novih linija imala biološki različite osobine od ostalih pripadnika te (pod)grupe. Srednja vrednost varijabilnosti sekvenci između ove dve grupe na nivou *rp* gena se kretala između 50.4% i 83.5% za razliku od 16S rDNK gde je ona iznosila između 85% i 96.9%, čime je

pokazano da su *rp* geni bolji molekularni markeri za diferencijaciju srodnih sojeva fitoplazmi (Lee i sar., 2010).

#### 1.2.4. Sec sistem

Sec sistem je opšti sistem za izlučivanje proteina iz ćelije i univerzalan je za Eubacteria, Archaea i eukariote, a odgovoran je za transport tek sintetisanih proteina pre nego što zauzmu krajnju konformaciju. Sec sistem čine subjedinice SecY/SecE/SecG koje formiraju poru u ćelijskoj membrani, SecA subjedinica koja se nalazi u citoplazmi i ima ulogu u hidrolizi ATP-a i SecB šaperon koji se vezuje za SecA i tako upućuje sekretujući protein na poru. Sec sistem takođe može da ima i subjedinice SecD, SecF, YajC i YidC koje olakšavaju proces izlučivanja (Mori i Ito, 2001; Tseng i sar., 2009).

Proučavanjem četiri za sada jedina genoma fitoplazmi sekvencirana u potpunosti ('*Ca. Phytoplasma asteris*' sojevi AYWB i OY-M, '*Ca. Phytoplasma australiense*' i '*Ca. Phytoplasma mali*') utvrđeno je da se Sec sistem fitoplazmi sastoji od gena *secA*, *secY*, *secE* i *yidC* koji kodiraju istoimene proteine (Oshima i sar., 2004; Bai i sar., 2006; Kube i sar., 2008; Tran-Nguyen i sar., 2008). Od prisutnih gena sec sistema, geni *secY* i *secA* se široko koriste kao molekularni markeri korisni za finiju diferencijaciju sojeva fitoplazmi.

Na osnovu tehnike kretanja po genomu (genome walking) identifikovani su klonovi fitoplazmi koji su obuhvatali 3' kraj *rplO* gena, ceo *secY* gen zajedno sa susednim *map* (methionine aminopeptidase) genom i 5' kraj *infA* gena koji kodira inicijacioni faktor If-1 (Arnaud i sar., 2007). Na osnovu ovih sekvenci dizajnirani su prajmeri za umnožavanje *secY* gena prvenstveno kod grupa 16SrI i 16SrV. Pokazalo se da je kod ove dve grupe fitoplazmi varijabilnost sekvenci *secY* gena slična varijabilnosti gena ribozomalnih proteina i da je srednja vrednost iznosila od 57.4% do 76%. Takođe je utvrđeno da su podgrupe izdvojene na osnovu RFLP profila ovog gena u skladu sa podgrupama odvojenim na osnovu RFLP profila *rp* gena (Lee i sar., 2004a, 2004b, 2006; Martini i sar., 2007). Bez obzira na sličnost *secY* i *rp* gena, *secY* gen se ipak pokazao informativnijim jer je izraženija njegova sposobnost razdvajanja srodnih sojeva.

### 1.3. 'Candidatus Phytoplasma asteris' VRSTA

Ova visoko heterogena i široko rasprostranjena grupa fitoplazmi se povezuje sa bolestima koje izaziva kod preko 80 biljnih vrsta, a eksperimentalno je dokazano da je može preneti preko 30 vrsta vektora na više od 200 biljaka (Kunkel, 1926; Brcák, 1979; Tsai, 1979; McCoy i sar., 1989). Aster yellows (AY) fitoplazma koja napada *Callistephus chinensis* je bila rasprostranjena u istočnom delu SAD-a na početku XX veka i prvenstveno se prenosila pomoću cikade *Macrostes quadrilineatus*. Ova fitoplazma je kasnije nazvana Eastern aster yellows da bi se razlikovala od druge AY fitoplazme koja izaziva bolest na celeru u Kaliforniji i koja je kasnije nazvana Western aster yellows. Western aster yellows se prenosi pomoću većeg broja vektora i izaziva drugačije simptome na obolelim biljkama od Eastern aster yellows fitoplazme. Danas se zna da su ove dve fitoplazme povezane sa fitoplazmama koje pripadaju grupi 16SrI a podgrupama A (Eastern) i B (Western). Sojevi unutar AY grupe imaju više od 97% sličnosti njihovih 16S rRNK sekvenci, međutim uočljive su značajne genetičke varijacije kao i činjenica da članovi ove grupe zauzimaju različite ekološke niše. Zbog toga se pretpostavlja da se ova heterogena grupa fitoplazmi sastoji od više od jedne vrste koja je za nju za sada definisana a to je 'Candidatus Phytoplasma asteris' vrsta. Danas se ova grupa sastoji od 15 podgrupa a one su 16SrI-A, B, C, D, E, F, H, K, L, M, N, O, P, Q i R (Lee i sar., 2004b). Članovi podgrupe 16SrI-G su reklasifikovani u odvojenu grupu 16SrXII, podgrupu 16SrXII-A, nazvanu Stolbur grupa i kojoj odgovara još uvek zvanično neopisana 'Candidatus Phytoplasma solani' vrsta. Članovi podgrupe 16SrI-J su takođe reklasifikovani u novu grupu 16SrXIV, podgrupu 16SrXIV-B (Lee i sar., 1998b).

Podgrupa 16SrI-B predstavlja najveću i najrasprostranjeniju podgrupu dok su prema dosadašnjim podacima podgrupe 16SrI-L i I-M ograničene samo na Evropski kontinent. Eksperimentalno je potvrđeno da se fitoplazme iz podgrupa I-A i I-B mogu preneti vektorima na 191 biljnu vrstu koje spadaju u 42 familije. Neki vektori mogu prenositi fitoplazme iz podgrupa I-A, I-B i I-C, a glavni vektori AY fitoplazmi su cikade *Macrostes* spp., *Euscelis* spp., *Scaphytopius* spp. i *Aphrodes* spp. (Lee i sar., 2004b).

Iz literature je poznato da je u nekoliko vrsta iz roda *Populus*, uključujući i vrstu *Populus nigra* L. 'Italica', u Bugarskoj, Holandiji, Francuskoj, Nemačkoj i u skorije

vreme i u Hrvatskoj detektovano prisustvo fitoplazmi (Atanasoff, 1973; Van der Meer, 1980, 1981; Sharma i Cousin, 1986; Seemüller i Lederer, 1988; Šeruga i sar., 2003). Tada je dokazano PCR-RFLP metodom da detektovana fitoplazma u topoli u Francuskoj i Nemačkoj pripada vrsti '*Ca. P. asteris*' (Maurer i sar., 1994; Cousin, 1998). Prema literaturi prisustvo fitoplazmi u topoli je prvenstveno povezano sa pojavom veštičjih metli, ali dolazi i do pojave manje karakterističnih simptoma kao što je smanjenje veličine listova, žutilo i manji broj listova, kržljavost i odumiranje cele biljke (Sharma i Cousin, 1986; Cousin, 1996; Berges i sar., 1997). Šeruga i sar. (2003) su u Hrvatskoj u biljkama topole detektovali fitoplazme kojima su na osnovu PCR-RFLP metode 16S rRNK gena dodelili novu podgrupu 16SrI-P, a na osnovu *rp* gena dodelili su im novu *rpI-O* podgrupu.

Tipični simptomi koje prouzrokuju AY fitoplazme su pojava virescencije i filodija, promene na cvetovima, žutilo i uspravan rast listova, izduživanje i etiolacija internodija, intenzivno grananje vršnih izdanaka, pojava veštičjih metli i zakrčljali rast biljke. Još neki od simptoma koje mogu izazvati su kovrdžanje, uvijanje i smanjenje veličine listova, kao i slaba obojenost cvetova (Lee i sar., 2004b).

Za referentni soj vrste '*Ca. Phytoplasma asteris*' uzet je soj OAY (=MIAY) izolovan iz floema biljke *Oenothera hookeri* (Lee i sar., 2004b).

#### 1.4. STOLBUR FITOPLAZME

Stolbur fitoplazme pripadaju Stolbur grupi (16SrXII) koja se sastoji od dve podgrupe: vrsta '*Ca. P. australiense*' (podgrupa 16SrXII-B) opisana je od strane Davis i sar. (1997) i njen tipičan pripadnik je Australian grapevine yellows fitoplazma, a druga je još uvek neopisana vrsta '*Ca. P. solani*' (podgrupa 16SrXII-A) kojoj i pripadaju Stolbur fitoplazme. Referentni soj Stolbur fitoplazmi je soj STOL koji je poreklom sa ljute papričice iz Srbije i čija se sekvenca 16S rDNK nalazi u NCBI Banci gena pod pristupnim brojem AF248959 (IRPCM, 2004). Stolbur fitoplazme su detektovane u mnogim biljnim vrstama od kojih su neke ekonomski značajne kao što su celer, paradajz, paprika, kukuruz, krompir, duvan, šargarepa, peršun, šećerna repa, grašak, breskva i mnoge druge (Martinović i Bjegović, 1950; Richard-Molard i sar., 1995; Viczián i sar., 1998; Del Serrone i sar., 2001; Paltrinieri i sar., 2006; Duduk i

**Bertaccini, 2006; Carraro i sar., 2008; Jović i sar., 2011; Zwolńska i sar., 2012).** Ova grupa fitoplazmi je najčešće proučavana na vinovoj lozi na kojoj se može naći i druga fitoplazma iz grupe 16SrV koja je u našoj zemlji još uvek na listi karantinskih patogena (**Daire i sar., 1997; Clair i sar., 2003; Langer i Maixner, 2004**). Smatraju se uglavnom biljnim patogenima Evropskih i Mediteranskih predela mada su pronađene i u drugim delovima sveta (**Garnier, 2000**). Simptomi koje Stolbur fitoplazme izazivaju najčešće su proliferacija izdanaka, hloroza, crvenilo i žutilo listova, kao i promene na cvetu (**Fialová i sar., 2009; Jović i sar., 2011; Zwolńska i sar., 2012**).

Nekoliko vrsta insekata iz familija *Cixiidae*, *Delphacidae* i *Derbidae*, kao i vrsta psilida *Bactericera trigonica* su dokazani vektori Stolbur fitoplazmi. Poznato je takođe da vektor *Hyalesthes obsoletus*, koji je utvrđeni vektor Stolbur fitoplazmi i u Srbiji (**Aleksić i sar., 1967**), prenosi Stolbur fitoplazme na vinovu lozu koja je njihov krajnji domaćin, što znači da se sa nje one ne mogu dalje preneti na druge biljke jer iz nje vektori ne mogu da usvoje fitoplazme (**Weintraub i Beanland, 2006**).

Genetička varijabilnost zasnovana na RFLP analizi 16S rDNK je niska unutar Stolbur podgrupe u poređenju sa drugim grupama, kao na primer sa AY grupom, što pokazuje da je Stolbur grupa veoma homogena. Sama RFLP analiza 16S rDNK nije pokazala nikakve razlike među sojevima poreklom sa različitih domaćina (**Marcone i sar., 1996, 2000**). Pored 16S rDNK koji se koristi u klasifikaciji svih fitoplazmi, kod Stolbur fitoplazmi su proučavani i drugi geni kao što su geni ribozomalnih proteina, *secY* gen i gen faktora elongacije (*tuf* gen) (**Schneider i sar., 1997; Langer i Maixner, 2004; Martini i sar., 2007**). Zbog svoje veće varijabilnosti u odnosu na 16S rDNK, ovi geni su pogodniji za diferencijaciju i klasifikaciju srodnih fitoplazmi. U odnosu na *tuf* gen pronađena je i korelacija između pripadnika određene *tuf* podgrupe, kojih ima ukupno tri, i različitih biljaka domaćina. Tako je podgrupa (tip) *tuf* type I pronađena samo kod sojeva poreklom sa koprive (*Urtica dioica*), *tuf* type II povezan samo sa sojevima poreklom sa poponca (*Convolvulus arvensis*) i divljeg ladoleža (*Calystegia sepium*), a *tuf* type III samo sa divljeg ladoleža i on je najređi. Sva tri tipa su detektovana kako u vinovoj lozi (*Vitis vinifera*) tako i u vektoru *H. obsoletus*. S obzirom na to da populacija vektora sa koprive i poponca pokazuje razlike u pogledu načina ishrane i vremena neophodnog za završavanje životnog ciklusa i ostavljanje potomstva, može se postaviti hipoteza da u polju postoje različiti prirodni ciklusi zaražavanja

vinove loze. U Nemačkoj i verovatno Francuskoj predominantan ciklus bolesti je sistem *C. arvensis-H. obsoletus-V. vinifera* dok je u Italiji važniji drugi sistem *U. dioica-H. obsoletus-V. vinifera* (**Langer i Maixner, 2004**).



## **2. CILJEVI RADA**

Osnovni cilj planiranih istraživanja jeste utvrđivanje pogodnosti *groEL* gena da detektuje varijabilnost srodnih fitoplazmi u okviru brojne i heterogene 16SrI ribozomalne grupe fitoplazmi (*'Ca. Phytoplasma asteris'*) i Stolbur fitoplazmi i mogućnost njegovog korišćenja kao dodatnog molekularnog markera za diferencijaciju ovih fitoplazmi. Ovi rezultati će doprineti boljem razumevanju fitoplazmi i stvoriti novu mogućnost za njihovu jasnu i jednostavnu diferencijaciju. To će, s obzirom na njihov širok krug domaćina i veliki broj vektora, doprineti rasvetljavanju njihove epidemiologije što je prvi korak u merama kontrole bolesti koje one prouzrokuju.

Realizacija ovih ciljeva izvršena je kroz nekoliko zadataka:

1. Uzorkovanje biljnog materijala poreklom iz Srbije, izolacija DNK, detekcija i identifikacija AY i Stolbur fitoplazmi iz sakupljenih uzoraka.
2. Dizajniranje specifičnih prajmera za umnožavanje *groEL* gena kod fitoplazmi srodnih *'Ca. Phytoplasma asteris'* (Aster yellows fitoplazmi-AY) i Stolbur fitoplazmi kao i utvrđivanje protokola za njihovo korišćenje.
3. Primena prethodno utvrđenog protokola za umnožavanje *groEL* gena kod sakupljenih uzoraka i kod uzoraka AY fitoplazmi iz kolekcije.
4. Umnožavanje *tuf*, *rp* i *secY* gena kod AY fitoplazmi, odnosno *tuf* gena kod Stolbur fitoplazmi prema protokolima iz literature.
5. Analiza dobijenih amplikona 16S rDNK, *groEL*, *tuf*, *rp* i *secY* gena putem RFLP metode uz upotrebu različitih restrikcionih enzima, kao i analiza sekvenci ovih amplikona odabranih reprezentativnih sojeva.
6. Analiza filogenetskih stabala konstruisanih na osnovu sekvenci 16S rDNK, *groEL* gena i združenih sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. UZORKOVANJE I IZOLACIJA DNK**

##### **3.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala**

U periodu od 2009. do 2011. godine sa teritorije Beograda i okoline sakupljeni su uzorci biljaka sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi kao što su žutilo, virescencija, pojava filodija i veštičjih metli, smanjenje veličine listova i odumiranje biljke. Takođe je u Beogradu u ulici Gospodara Vučića uočena biljka crne topole (*Populus nigra* L. 'Italica') sa simptomima žutila i smanjenom veličinom listova, kao i prisustvom veštičjih metli (Slika 12 sa strane 56). S obzirom na to da su uočeni simptomi u skladu sa literaturnim podacima o simptomima na biljkama topole u kojima su detektovane AY fitoplazme, grane i listovi ove biljke topole su uzorkovani. Kao što se može primetiti sa Slike 12, cela biljka sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi se osušila nakon samo 15 dana od uzorkovanja. Iz centralnih lisnih nerava i lisnih peteljki sakupljenih uzoraka listova i grana urađena je izolacija DNK po nešto izmenjenoj metodi **Doyle i Doyle (1990)**.

Pored sakupljenih uzoraka u analizu su uključeni sojevi fitoplazmi različitih podgrupa u okviru grupe 16SrI koji su održavani u biljci *Vinca major* ili koji su bili dostupni u obliku već ekstrahovane DNK, a deo su kolekcije fitoplazmi održavanih u mikropropagaciji u Italiji - Phytoplasmology Laboratory, Plant Pathology, DiSTA - *Alma Mater Studiorum* - University of Bologna (**Bertaccini, 2010**). Pored tek uzorkovanih i uzoraka iz kolekcije, korišćeni su i sojevi MBSColumbia, ca2006/1, ca2006/5 i ca2006/9 koji su bili dostupni kao već ekstrahovana DNK iz prirodno zaraženih biljaka (**Duduk i sar., 2008a, 2008c**).

##### **3.1.2. Izolacija DNK iz biljnog materijala**

U avanu je, uz dodatak tečnog azota, homogenizovano do finog praha 0.5 g centralnih lisnih nerava i lisnih peteljki po svakom uzorku. U dobijeni homogenizat je zatim dodato 3.5 ml 3% CTAB ekstrakcionog pufera (Prilog A). Iz avana je potom u mikrotube zapremine 1.5 ml preneseno po 750 µl dobijene suspenzije i inkubirano u

vodenom kupatilu na 65°C u trajanju od 20 minuta, pri čemu su mikrotube invertovane na svakih 5 minuta. Nakon inkubacije, u mikrotube je dodato po 750 µl hloroforma (trihlormetan, CHCl<sub>3</sub>), mikrotube su vorteksovane a potom centrifugirane 15 minuta pri brzini od 13000 rpm i na temperaturi od 4°C. Centrifugiranjem je sadržaj mikrotuba odvojen na dve faze – gornju vodenu fazu u kojoj se nalaze nukleinske kiseline i donju u kojoj se nalazi hloroform sa rastvorenim proteinima i ostatak biljnog materijala. U narednom koraku je gornja vodena faza (supernatant) pažljivo prebačena u novu mikrotubu i u nju je dodato po 750 µl ohlađenog izopropanola (IPA, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH) nakon čega su mikrotube inkubirane na -20 °C u trajanju od 10 minuta, a potom centrifugirane kao u prethodnom koraku. Nakon centrifugiranja tečna faza je pažljivo odbačena, a u talog je dodato 200 µl ohlađenog 70% etanola (EtOH, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH). Mikrotube su potom centrifugirane 10 minuta pri brzini od 13000 rpm i na temperaturi od 4°C nakon čega je etanol pažljivo odliven, a mikrotube sa istaloženom DNK ostavljene otvorene na sobnoj temperaturi dok nije ispario ostatak etanola. Na kraju je dobijena DNK resuspendovana sa 75 µl TE pufera (Prilog A) i čuvana u frižideru na 4°C.

### 3.2. DIZAJNIRANJE PRAJMERA ZA UMNOŽAVANJE *groEL* GENA

#### 3.2.1. Aster yellows fitoplazme

Za umnožavanje *groEL* gena dizajnirani su prajmeri pomoću programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a korišćenjem sekvence Marguerite yellows fitoplazme (AB242235) i poređenjem sa nekoliko javno dostupnih sekvenci iz NCBI (National Center of Biotechnology Information) Banke gena (Tabela 5) kao i sekvenci četiri genoma sekvencirana u potpunosti. Pomenute sekvence su sadržale *groES* (gen za malu subjedinicu molekularnog šaperona), *groEL* (gen za veliku subjedinicu molekularnog šaperona), *amp/imp* (gen za antigenski/imunodominantni membranski protein) i *nadE* (gen za glutamin zavisnu NAD(+) sintetazu) gene osim kod 'Ca. P. mali' soj AT i 'Ca. P. australiense' koji su sadržali samo *groES* i *groEL* gene jer ove fitoplazme imaju drugačiji raspored gena od fitoplazmi srodnih 'Ca. P. asteris'. Njihovim poravnanjem pomoću programa MEGA5 (Tamura i sar., 2011) bilo je

moгуće odrediti regione koji omogućavaju dizajniranje prajmera specifičnih za umnožavanje *groEL* gena kod AY fitoplazmi.

Tabela 5. Sekvence javno dostupne u NCBI Banci gena korišćene pri dizajniranju prajmera za umnožavanje *groEL* gena kod fitoplazmi srodnih '*Ca. P. asteris*'

Naziv fitoplazme	Dostupni geni (dužina fragmenta u bp)	Pristupni broj
Potato purple top	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 374)	AB167357
Onion yellows	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 722)	AB124806
Onion yellows	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 630)	AB124807
Onion yellows	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 622)	AB124808
Mulberry dwarf	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 616)	AB124809
Paulownia witches'-broom	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 675)	AB124810
Phytoplasma sp. AYBG	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 634)	AB124811
Eggplant dwarf	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 671)	AB242231
Tomato yellows	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 722)	AB242232
Lettuce yellows	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 712)	AB242233
Iceland poppy yellows	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 722)	AB242234
Marguerite yellows	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 722)	AB242235
Sumac witches'-broom	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 720)	AB242236
Porcelain vine witches'-broom	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>nadE</i> (3 720)	AB242237
Aster yellows witches'-broom AYWB	<i>groES, groEL, imp</i> i <i>nadE</i> (4 974)	CP000061 *c(621635.. 626608)
Onion yellows OY-M	<i>groES, groEL, amp</i> i <i>hypop</i> (4 104)	AP006628 *(142019.. 146122)
' <i>Ca. P. mali</i> ' AT	<i>groES</i> i <i>groEL</i> (2 052)	CU469464 *(236678.. 238729)
' <i>Ca. P. australiense</i> '	<i>groES</i> i <i>groEL</i> (1 963)	AM422018 *(774690.. 776652)

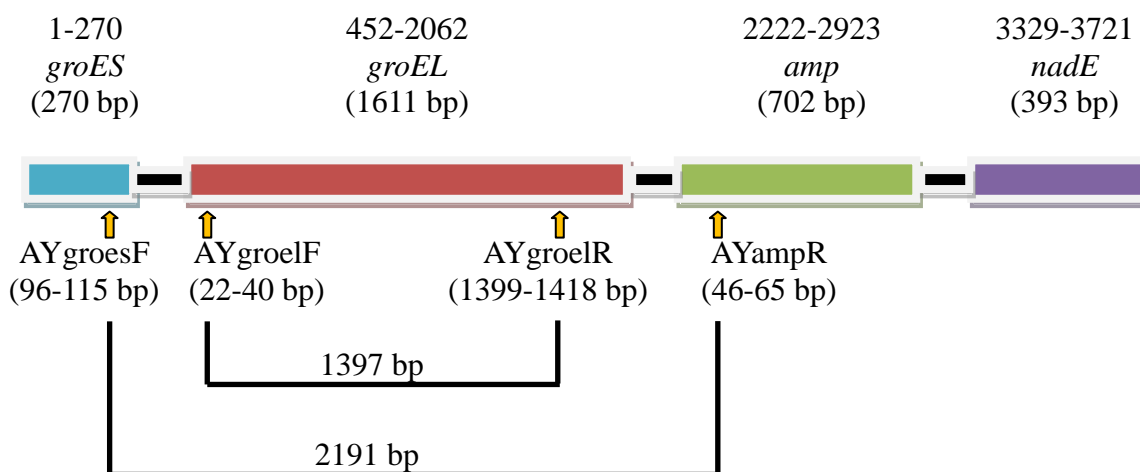
*hypop*- hypothetical protein; \*- u zagradi su date pozicije ovog regiona u genomu; c- complement, pozicija na komplementarnom lancu

Od ponuđenih prajmera koje je program dao, odabrana su dva uzvodna i dva nizvodna prajmera koja su odgovarala našim kriterijumima i dati su im nazivi u zavisnosti od gena u kome su se nalazili.

Prvi uzvodni prajmer dužine 20 bp je nazvan AYgroesF jer se nalazi u *groES* genu od 96 bp do 115 bp od početka sekvence ovog gena kod Marguerite yellows fitoplazme (AB242235) koja je i korišćena kao matrica za dizajniranje prajmera. Drugi uzvodni prajmer, AYgroelF, se nalazi u *groEL* genu, kao što mu i sam naziv naglašava,

od 22 bp do 40 bp od početka *groEL* gena i dužine je 19 bp. Jedan od nizvodnih prajmera se nalazi takođe u *groEL* genu i nazvan je AYgroelR a pozicioniran je pred kraj ovog gena, tačnije od 1399 bp do 1418 bp (sam gen je dužine 1611 bp) i dugačak je 20 bp. Da bi bio obuhvaćen ceo *groEL* gen, poslednji odabrani nizvodni prajmer se nalazi u *amp* genu, nazvan je AYampR i obuhvata sekvencu od 46 bp do 65 bp od početka ovog gena kod Marguerite yellows fitoplazme a dužine je takođe 20 bp kao i prethodni nizvodni prajmer (Shema 4). Sva četiri odabrana prajmera imaju temperaturu topljenja između 50°C i 55°C. Sekvence dizajniranih prajmera su date u Tabeli 6.

Marguerite yellows fitoplazma (AB242235)



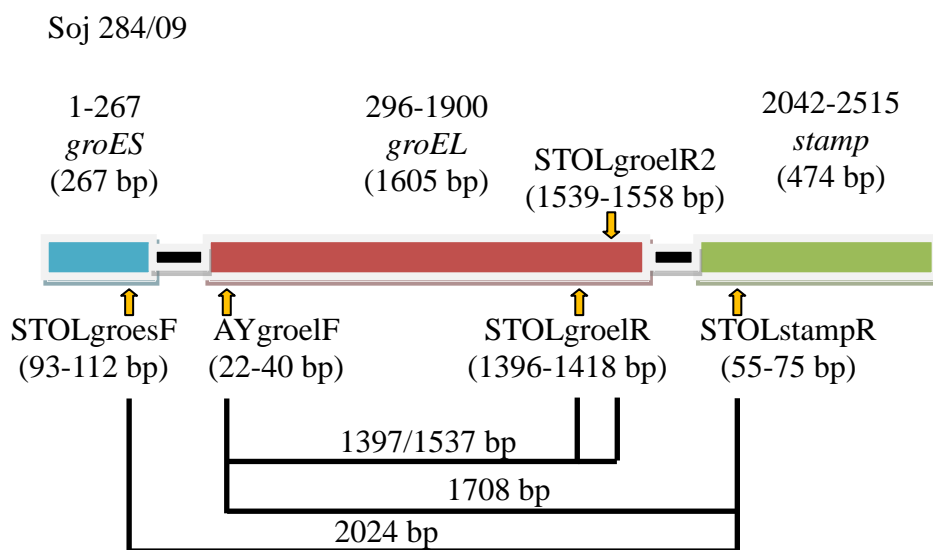
Shema 4. Prikaz pozicija i dužine dizajniranih prajmera, dužine očekivanih PCR produkata kao i raspored i dužina *groES*, *groEL*, *amp* i *nadE* gena kod AY fitoplazmi

### 3.2.2. Stolbur fitoplazme

Među dostupnim draft sekvencama genoma dva soja Stolbur fitoplazmi poreklom iz Srbije (saradnja sa dr Michael Kube-om iz Berlina, Nemačka; **Siewert i sar., 2012**), soja 284/09 iz duvana i soja 231/09 iz peršuna, nalazile su se i sekvence gena *groES*, *groEL* i *stamp* (analog *amp* gena kod AY fitoplazmi). Na osnovu poravnatih ovih sekvenci kao i sekvenci ovog regiona kod četiri fitoplazme sekvencirane u celosti, pronađeni su regioni specifični za Stolbur fitoplazme i u tim regionima su za njih ručno dizajnirani prajmeri. Uz pomoć softvera Oligo Calc dostupnog na internetu (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

određene su dužina i sekvenca prajmera kod kojih temperatura hibridizacije iznosi 55°C zbog mogućnosti korišćenja istog ciklusa kao i za umnožavanje *groEL* gena kod AY fitoplazmi. Na ovaj način je dizajniran jedan uzvodni i tri nizvodna prajmera.

Prajmeri su nazvani kao i kod AY fitoplazmi u odnosu na gen u kome se nalaze, pa je tako uzvodni prajmer dužine 20 bp koji se nalazi u *groES* genu (od 93 do 112 bp od početka ovog gena) nazvan STOLgroesF, dva nizvodna prajmera koja se nalaze u *groEL* genu su nazvana STOLgroelR i STOLgroelR2 (od 1396 do 1418 bp, odnosno od 1539 do 1558 bp od početka *groEL* gena), a dužine su 23 bp odnosno 20 bp i treći nizvodni prajmer koji se nalazi u *stamp* genu nazvan je STOLstampR (od 55 do 75 bp od početka *stamp* gena) i dužine je 21 bp (Shema 5). Uzvodni prajmer dizajniran za AY fitoplazme, AYgroelF, ima sekvencu koja se razlikuje u samo dva nukleotida od istog regiona kod Stolbur fitoplazmi, pa je i ovaj prajmer korišćen za umnožavanje *groEL* gena kod Stolbur fitoplazmi. Sva četiri dizajnirana prajmera imaju temperaturu topljenja oko 55°C. Sekvence dizajniranih prajmera su date u Tabeli 6.



Shema 5. Prikaz pozicija i dužine dizajniranih prajmera, dužine očekivanih PCR produkata kao i raspored i dužina *groES*, *groEL* i *stamp* gena kod Stolbur fitoplazmi

### 3.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

Za detekciju i identifikaciju fitoplazmi korišćen je par univerzalnih prajmera P1/P7 (Tabela 6) u direktnoj PCR reakciji koji umnožava fragment veličine oko 1800 bp a obuhvata skoro celu 16S rDNK, intergenski region 16S-23S rDNK u kome se nalazi i gen za tRNK za ugradnju izoleucina (tRNK<sup>Ile</sup>) i 5' početak 23S rDNK (**Deng i Hiruki, 1991; Schneider i sar., 1995**). U sledećoj (*nested*) reakciji, dobijeni P1/P7 produkti su razblaženi vodom u odnosu 1:30 i kao takvi su u količini od 1 µl korišćeni kao osnova za umnožavanje fragmenta veličine oko 1245 bp koji obuhvata samo 16S rDNK. U *nested* reakciji je korišćen drugi par takođe univerzalnih prajmera R16F2n/R16R2 (Tabela 6) (**Lee i sar., 1993; Gundersen i Lee, 1996**). Uslovi u kojima su se odvijale obe PCR reakcije su predstavljeni na Shemi 6 kao ciklus 1.

Za uspešno umnožavanje *groEL* gena kod svih sojeva AY fitoplazmi pomoću dizajniranih prajmera je standardizovan PCR protokol. Nekolicina sojeva je prvenstveno korišćena kao kontrola pri određivanju protokola. Različitim kombinacijama sva četiri dizajnirana prajmera na različitim temperaturama hibridizacije koja se kretala od 50 do 57°C i sa različitom količinom MgCl<sub>2</sub> (dodavanjem 0.5 ili 0.75 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> po uzorku čime je dobijena krajnja količina MgCl<sub>2</sub> u PCR reakcionoj smeši od 2.5 odnosno 2.75 mM) u reakcionoj smeši, dobijani su rezultati koji su omogućili određivanje konačnog optimalnog protokola. Ustanovljeno je da se za umnožavanje *groEL* gena kod AY fitoplazmi koristi par prajmera AYgroelF/R u direktnoj PCR reakciji ili u drugoj (*nested*) PCR reakciji nakon AYgroesF/AYampR para prajmera u uslovima predstavljenim na Shemi 6 kao ciklus 2 i to sa koncentracijom MgCl<sub>2</sub> od 2 mM. Očekivana veličina AYgroelF/R amplikona je oko 1400 bp.

Prajmeri za umnožavanje *groEL* gena kod Stolbur fitoplazmi su dizajnirani tako da se mogu koristiti pri istim uslovima ciklusa kao i prajmeri za umnožavanje ovog gena kod AY fitoplazmi (Shema 6, ciklus 2). Par prajmera koji se koristi u direktnoj PCR reakciji je STOLgroesF/STOLstampR pri čemu je očekivana veličina fragmenta oko 2000 bp, nakon čega se može primeniti par prajmera AYgroelF/STOLgroelR2 u drugoj PCR reakciji (veličina fragmenta je oko 1500 bp).

Za umnožavanje elongacionog faktora Tu, *tuf* gena kod AY fitoplazmi, korišćen je par prajmera fTufAy/rTufAy (Tabela 6) koji je specifičan za AY i Stolbur grupu

fitoplazmi i koji umnožava fragment ovog gena veličine 940 bp (**Schneider i sar., 1997**). Kod Stolbur fitoplazmi ovaj gen je umnožavan sa istim parom prajmera u direktnoj PCR reakciji ili u *nested* nakon primene Tuf1f/Tuf1r para prajmera. Uslovi u kojima su se odvijale PCR reakcije su predstavljeni na Shemi 6 kao ciklus 3.

Za umnožavanje ribozomalnog operona kod AY fitoplazmi korišćen je rpL2F3 uzvodni prajmer (Tabela 6) koji se nalazi u genu *rplB* (*rpl2*) i koji je dizajniran na osnovu sekvenci AY fitoplazmi, a kao nizvodni prajmer je korišćen rp(I)R1A prajmer (Tabela 6) koji se nalazi na samom kraju *rpsC* (*rps3*) gena. Produkt umnožavanja uz pomoć ovog para prajmera je fragment veličine oko 1600 bp koji obuhvata *rplB* (*rpl2*), *rpsS* (*rps19*), *rplV* (*rpl22*) i *rpsC* (*rps3*) gene. Uslovi u kojima se odvijala PCR reakcija su predstavljeni na Shemi 6 kao ciklus 2.

Za umnožavanje *secY* gena kod AY fitoplazmi korišćeni su prajmeri AYsecYF1/AYsecYR1 (Tabela 6) koji daju produkt veličine oko 1400 bp a obuhvataju ceo *secY* gen. Uslovi u kojima se odvijala PCR reakcija su predstavljeni na Shemi 6 kao ciklus 2.

Sve PCR reakcije su obavljane u reakcionoj smeši zapremine 25 µl koja se sastojala od 12.5 µl 2xPCR Master mix-a (koji sadrži PCR reakcioni pufer sa 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 U/µl *Taq* DNA polimeraze i po 0.4 mM svakog nukleotida) (MBI Fermentas, Litvanija), 10.5 µl bidestilovane i sterilisane vode, 0.5 µl svakog prajmera koncentracije 20 pmol/µl (finalne koncentracije 0.4 µM) i 1 µl izolovane ukupne DNK razblažene u odnosu 1:100 (otprilike 20 ng). Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša sastavljena od svih reagenasa potrebnih za umnožavanje DNK, ali bez dodate DNK. Reakcije su izvedene u Thermocycler-u (Eppendorf Mastercycler) upotrebom odgovarajućeg ciklusa.



Tabela 6. Sekvence svih korišćenih prajmera

Prajmer	Sekvenca prajmera u 5'-3' smeru	Literatura
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	Deng i Hiruki, 1991
P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	Schneider i sar., 1995
R16F2n	GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG	Gundersen i Lee, 1996
R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G	Lee i sar., 1993
Tuf1f	CAA GTT GGT GTT CCA AA	Schneider i sar., 1997
Tuf1r	GTT GTC ACC TGC TTG AGC	Schneider i sar., 1997
fTufAy	GCT AAA AGT AGA GCT TAT GA	Schneider i sar., 1997
rTufAy	CGT TGT CAC CTG GCA TTA CC	Schneider i sar., 1997
AYsecYF1	CAG CCA TTT TAG CAG TTG GTG G	Lee i sar., 2006
AYsecYR1	CAG AAG CTT GAG TGC CTT TAC C	Lee i sar., 2006
rpL2F3	WCC TTG GGG YAA AAA AGC TC	Martini i sar., 2007
rp(I)R1A	GTT CTT TTT GGC ATT AAC AT	Lee i sar., 2003
AYgroesF	ATC AGA AAA AGA AAA ATC CT	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi
AYgroelF	GGC AAA GAA GCA AGA AAA G	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi
AYgroelR	TTT AAG GGT TGT AAA AGT TG	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi
AYampR	GCA ACA GCA GCA AAT AAA AC	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi
STOLgroesF	AGC TGA AAA AGA AAA ATC TT	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi
STOLgroelR	TTC AAT TTT TGG TTT AAT TGT TG	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi
STOLgroelR2	CAA CAG CAG CTT CGG TCG TA	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi
STOLstampR	AGC AAA CAA ACT AAC AAA AGC	Dizajnirani u ovoj doktorskoj tezi

	Ciklus 1	Ciklus 2	Ciklus 3
Inicijalna denaturacija	94°C 1min	94°C 1min	
Denaturacija DNK	94°C 1min	94°C 1min	95°C 30sec
Aniling prajmera	50°C 2min	55°C 2min	45°C 30sec
Elongacija	72°C 3min	72°C 3min	72°C 1min
Finalna elongacija	72°C 7min	72°C 7min	

Shema 6. Prikaz različitih PCR ciklusa korišćenih za umnožavanje 16S rRNK, *groEL*, *tuf*, *rp* i *secY* gena

### 3.3.1. Multipleks PCR

Za istovremenu detekciju i identifikaciju AY i Stolbur fitoplazmi u jednoj reakciji uveden je multipleks PCR za umnožavanje *groEL* gena kod ove dve grupe fitoplazmi.

Od ukupno osam dizajniranih prajmera za umnožavanje *groEL* gena kod AY i Stolbur fitoplazmi, odabrana su tri prajmera za multipleks PCR reakciju i to su AYgroelF, AYgroelR i STOLstampR. PCR reakcija je takođe obavljena u reakcionoj smeši zapremine 25 µl koja se sastojala od 12.5 µl 2xPCR Master mix-a, 10.5 µl bidestilovane i sterilisane vode, 0.5 µl AYgroelF prajmera i po 0.25 µl prajmera AYgroelR i STOLstampR (svi prajmeri su koncentracije 20 pmol/µl) i 1 µl izolovane ukupne DNK razblažene u odnosu 1:100. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša sastavljena od svih reagenasa potrebnih za umnožavanje DNK ali bez dodate DNK.

Ciklus u kome se odvijala PCR reakcija se sastoji od inicijalne denaturacije na 94°C u trajanju od 1 minuta, 35 ciklusa u kojima je denaturacija na 94°C u trajanju od 30 sekundi, hibridizacija prajmera na 52°C u trajanju od 15 sekundi i elongacija na 72°C u trajanju od 2 minuta i 30 sekundi, nakon svih 35 ciklusa finalna elongacija je na 72°C u trajanju od 5 minuta.

### 3.3.2. Vizuelizacija produkata PCR reakcije

Vizuelizacija fragmenata dobijenih PCR reakcijom urađena je u 1% agaroznom gelu uronjenom u 1xTBE pufer (Prilog A) pri naponu od 100 V. Gel zapremine 25 ml je pripreman tako što je u 0.25 g agaroze dodato 25 ml 1xTBE pufera a potom je smeša zagrejana do ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Gel je potom razlivan u kalup u koji je postavljen češalj i ostavljen na sobnoj temperaturi da se ohladi i stegne. Nakon toga je izvađen češalj a kalup sa gelom postavljen u kadicu za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine 100, Serva) i naliven 1xTBE pufer do količine dovoljne da gel bude u potpunosti uronjen u pufer. U bunarčiće gela su nalivani uzorci (4 µl) prethodno pomešani sa bojom (1 µl 6x Loading Dye, MBI Fermentas, Litvanija). Kao marker u gelovima je korišćen 1kb marker (MBI Fermentas, Litvanija) čiji su fragmenti veličina (od vrha) 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500

i 250 bp. Produkti iz gela su potom obojeni u 0.1% rastvoru etidijum bromida u trajanju od 10 minuta, a vizuelizacija je obavljena posmatranjem na UV transiluminatoru. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava fragmenata očekivane veličine, određene poređenjem sa markerom.

### 3.4. ANALIZA POLIMORFIZMA DUŽINE RESTRIKCIONIH FRAGMENTA (RFLP ANALIZA)

Za identifikaciju AY fitoplazmi na osnovu 16S rDNK, produkti PCR reakcije umnoženi pomoću R16F2n/R16R2 para prajmera su digerirani restrikcionim enzimima *TruII* (*MseI*), *HhaI*, *RsaI* i *Tsp509I* (*TasI*). Restrikcioni enzim *TruII* daje ukupno dva profila i koristi se za razlikovanje podgrupe 16SrI-C od svih ostalih podgrupa, enzim *HhaI* takođe daje dva profila gde podgrupe 16SrI-B, I-M i I-L imaju isti profil a sve ostale podgrupe drugi. Kombinacijom ova dva enzima moguće je razlikovati podgrupe 16SrI-A, I-B i I-C (**Lee i sar., 1998b**). Enzim *RsaI* se koristi za razlikovanje podgrupe 16SrI-F od svih ostalih (**Marcone i sar., 2000**), a *Tsp509I* za razlikovanje podgrupe 16SrI-P od svih ostalih (pronađen na osnovu virtuelnog RFLP profila).

Za identifikaciju Stolbur fitoplazmi korišćen je *TruII* restrikcioni enzim na R16F2n/R16R2 amplikone. Na ovaj način se dobija specifičan RFLP profil koji ove fitoplazme jasno odvađa od ostalih grupa fitoplazmi. Takođe je korišćen *MboII* enzim za dokazivanje postojanja razlika između dva 16S rRNK operona kod soja 99/10.

Analiza AYgroelF/AYgroelR amplikona je urađena pomoću *TruII*, *AluI* i *TaqI* restrikcionih enzima, a analiza STOLgroesF/STOLstampR amplikona je urađena pomoću *AluI* i *TruII* restrikcionih enzima.

Analiza f/rTufAy amplikona kod AY fitoplazmi je urađena pomoću *MboI* (*Sau3AI*) (**Marcone i sar., 2000**), *Tsp509I* i *TruII* restrikcionih enzima, dok je kod Stolbur fitoplazmi ovaj amplikon analiziran pomoću enzima *HpaII*. Analiza rpL2F3/rp(D)R1A amplikona kod AY fitoplazmi je urađena pomoću restrikcionih enzima *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I*, dok je analiza amplikona dobijenih AYsecYF1/AYsecYR1 parom prajmera urađena korišćenjem *Tsp509I* i *TruII* restrikcionih enzima.

Sve reakcije RFLP analize su se odvijale u reakcionoj smeši koja se po uzorku sastojala od 9.75 µl destilovane vode, 2.5 jedinice (U) određenog restrikcionog enzima, 2 µl odgovarajućeg pufera koji je dobijen uz svaki restrikcioni enzim i, u zavisnosti od količine umnoženog amplikona, od 3 do 7 µl PCR produkta (što je oko 100-200 ng). Reakcione smeše su inkubirane tokom noći na temperaturi od 65°C za restrikcione enzime *TaqI*, *TruI* i *Tsp509I*, odnosno na 37°C za *AluI*, *HhaI*, *MboI*, *MboII*, *HpaII* i *RsaI* (Tabela 7).

Razdvajanje i vizuelizacija produkata digestije urađena je elektroforetskim razdvajanjem u 1% ili 2% agaroznom gelu za restrikcione enzime *HpaII*, *HhaI*, *RsaI* i *MboI*, odnosno u 6% ili 8% poliakrilamidnom gelu za restrikcione enzime *TaqI*, *AluI*, *MboII*, *Tsp509I* i *TruI*. Gelovi uronjeni u 1xTBE pufer su podvrgnuti elektroforetskom razdvajanju pri naponu od 100V za agarozni gel, 120V za poliakrilamidni gel sa 10 bunarčića zapremine 5 ml, odnosno 130 V za poliakrilamidni gel sa 14 bunarčića zapremine 25 ml. Agarozni gel je pripreman kao i za vizuelizaciju PCR produkata, pri čemu je pravljeno 35 ml gela. Za 2% agarozni gel je sipano 0.7 g agaroze u 35 ml 1xTBE pufera, umesto 0.35 g koliko je sipano za 1% gel. Poliakrilamidni gel je pripreman tako što je u bidestilovanu vodu dodat 10xTBE pufer, akrilamid/bisakrilamid (Sigma-Aldrich, Nemačka), APS i TEMED (Acros Organics, SAD). Količine hemikalija neophodnih za pravljenje ovog gela date su u Prilogu B. Gel je naliven između dva stakla, a zatim je uronjen češalj i gel ostavljen 30 minuta da polimerizuje na sobnoj temperaturi i zaštićen od direktne sunčeve svetlosti. Nakon polimerizacije gel je pričvršćen za aparat za vertikalnu elektroforezu (Mini PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell, BioRad ili Cole-Parmer 28570-05), komora gela je nalivena sa 1xTBE puferom i bunarčići su očišćeni. Pre nanošenja uzoraka u bunarčiće, kompletan digerirani produkt svakog uzorka pomešan je sa bojom za nalivanje (6x Loading Dye, MBI Fermentas, Litvanija). Kao marker je korišćen 100 bp marker (MBI Fermentas, Litvanija) čiji su fragmenti veličina od vrha 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 i 100 bp, kao i marker PhiX174 *HaeIII* digeriran (MBI Fermentas, Litvanija) čiji su fragmenti veličina od vrha 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 i 72 bp. Gel je obojen potapanjem u 0.05% rastvor etidijum bromida u trajanju od 30 minuta, a vizuelizacija produkata obavljena je posmatranjem na UV transiluminatoru.

Tabela 7. Pregled korišćenih restrikcionih enzima, njihove osnovne osobine, restrikciona mesta i analizirani ampliconi

Restrikcioni enzim	Restrikciono mesto	Izošizomeri	Temperatura inkubacije	Analiziran gen
<i>TaqI</i>	5'.....T <sup>^</sup> CGA.....3' 3'.....AGC <sup>^</sup> T.....5'	<i>TthHB8I</i>	65°C	<i>groEL</i>
<i>Tsp509I</i>	5'..... <sup>^</sup> AATT.....3' 3'.....TTAA <sup>^</sup> .....5'	<i>TasI</i>	65°C	16S rDNK, <i>tuf</i> , <i>rp</i> , <i>secY</i>
<i>TruI</i>	5'.....T <sup>^</sup> TAA.....3' 3'.....AAT <sup>^</sup> T.....5'	<i>MseI</i> , <i>Tru9I</i>	65°C	16S rDNK, <i>groEL</i> , <i>tuf</i> , <i>secY</i>
<i>HhaI</i>	5'.....GCG <sup>^</sup> C.....3' 3'.....C <sup>^</sup> GCG.....5'	<i>HinPII</i>	37°C	16S rDNK, <i>rp</i>
<i>RsaI</i>	5'.....GT <sup>^</sup> AC.....3' 3'.....CA <sup>^</sup> TG.....5'	<i>AfaI</i> , <i>Csp6I</i> , <i>RsaMI</i>	37°C	16S rDNK
<i>HpaII</i>	5'.....C <sup>^</sup> CGG.....3' 3'.....GGC <sup>^</sup> C.....5'	<i>MspI</i> , <i>BsiSI</i> , <i>HapII</i>	37°C	<i>tuf</i>
<i>AluI</i>	5'.....AG <sup>^</sup> CT.....3' 3'.....TC <sup>^</sup> GA.....5'	<i>AluBI</i>	37°C	<i>groEL</i> , <i>rp</i>
<i>MboI</i>	5'..... <sup>^</sup> GATC.....3' 3'.....CTAG <sup>^</sup> .....5'	<i>DpnI</i> , <i>DpnII</i> i <i>Sau3AI</i>	37°C	<i>tuf</i>
<i>MboII</i>	5'...GAAGA(N) <sub>8</sub> <sup>^</sup> ...3' 3'...CTTCT(N) <sub>7</sub> <sup>^</sup> ...5'	/	37°C	16S rDNK

### 3.5. SEKVENCIRANJE I FILOGENETSKA ANALIZA

Pre sekvenciranja odabrani PCR produkti su prečišćeni pomoću mi-PCR Purification Kit-a (Metabion International, Nemačka), a prečišćavanje je urađeno po uputstvu proizvođača. Nakon prečišćavanja ampliconi su direktno poslani na uslužno sekvenciranje u Macrogen Inc. (Koreja).

Ampliconi dobijeni P1/P7 parom prajmera su sekvencirani u oba smera pomoću dva uzvodna prajmera, P1 i R16F2n, i jednog reverznog prajmera P7 na automatskom kapilarnom sekvenatoru.

Radi tačnije filogenetske analize sekvenciran je ceo *groEL* gen koji se nalazi u okviru dužeg amplicona dobijenog umnožavanjem LA-PCR-om (long and accurate) koristeći LA Taq DNK polimerazu (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) a pomoću prajmera ES-1/Nad-2. Ovi ampliconi su sekvencirani direktno sa 11 prajmera: ES-1, ES-2, EL-1, EL-3, EL-F1w, Amp.N1, Amp-3, Amp-C1, Nad-1, Nad-2 i Nad-3 (Kakizawa i sar., 2006).

Nukleotidne sekvence su određene korišćenjem metode terminacije didezoksinukleotid lanca pomoću automatskog DNK sekvenatora (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Japan, Tokio, Japan).

Pored P1/P7 amplikona i celog *groEL* gena, takođe su sekvencirani f/rTufAy, rpL2F3/rp(D)R1A i AYsecYF1/AYsecYR1 amplikoni odabranih sojeva a čije sekvence nisu već prethodno bile javno dostupne. Sva tri navedena amplikona su sekvencirana u oba smera sa po jednim uzvodnim i jednim nizvodnim prajmerom koji su i korišćeni za njihovo umnožavanje.

Dobijene sekvence su analizirane i obrađene pomoću programa Pregap4 verzija 1.5 koji se nalazi u okviru Staden paketa, a zatim je u okviru Gap4 programa iz istog paketa određena konsenzus sekvenca. Sve dobijene konsenzus sekvence su deponovane u NCBI Banku gena, gde im je i dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number). Pristupni brojevi svih korišćenih sekvenci 16S rRNK, *groEL*, *tuf*, *rp* i *secY* gena, kako novodobijenih tako i onih prethodno deponovanih u Banci gena, su navedeni u delu 'Rezultati' u Tabelama 8, 9, 12, 14, 16 i 18.

Za proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti na osnovu analiziranih sekvenci kao i za filogenetske analize upotrebljen je softverski paket MEGA5 (**Tamura i sar., 2011**).

Filogenetska analiza je urađena na osnovu sekvenci AY fitoplazmi 16S rRNK gena sa jedne i *groEL* gena sa druge strane. Ovi rezultati su poređeni sa filogenetskom analizom združenih sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena kod AY fitoplazmi. Filogenetska stabla 16S rDNK i *groEL* sekvenci su rekonstruisana na osnovu 31 soja fitoplazmi (29 sojeva AY fitoplazmi među kojima su i sojevi AYWB i OY-M, a uključene su i sekvence druge dve fitoplazme sekvencirane u celosti - '*Ca. P. australiense*' i '*Ca. P. mali*'), dok je u analizi kao spoljna grupa korišćena sekvenca ovih gena kod *Acholeplasma laidlawii* soj PG-8A. Filogenetsko stablo ostala tri analizirana gena je rekonstruisano na osnovu sekvenci 11 odabranih sojeva AY fitoplazmi, pored kojih su takođe u analizu uključene sekvence sve četiri fitoplazme sekvencirane u celosti. Kao spoljna grupa je i ovaj put korišćena sekvenca ovih gena kod *A. laidlawii*.

Sva tri filogenetska stabla su rekonstruisana korišćenjem Maximum Parsimony metode i analize stabilnosti (bootstrap analize) sa 1000 ponavljanja pri čemu su sva prazna mesta (gapovi) uzimana u obzir pri rekonstrukciji (opcija 'use all sites').

## 4. REZULTATI

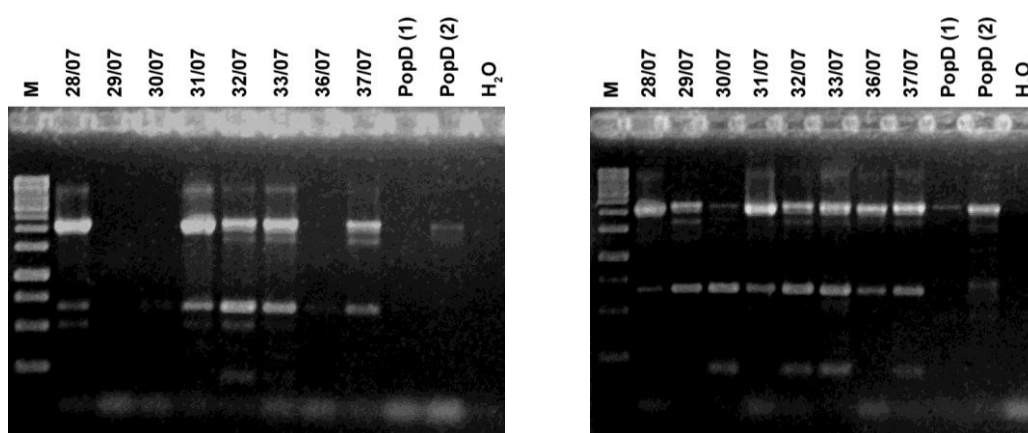
### 4.1. ODREĐIVANJE PROTOKOLA ZA UMNOŽAVANJE *groEL* GENA KOD ASTER YELLOWS FITOPLAZMI

Radi provere dizajniranih prajmera, određivanja tačnog protokola za njihovo korišćenje, kao i uspešnog umnožavanja *groEL* gena, odabrano je osam sojeva prethodno identifikovanih fitoplazmi a izolovanih iz šargarepe poreklom iz Srbije (Duduk i sar., 2008a) i soj PopD poreklom sa topole (videti odeljak 3.2.1.). Primenjene su različite kombinacije dva uzvodna i dva nizvodna prajmera, PCR reakcione smeše su sadržale 2, 2.5 ili 2.75 mM MgCl<sub>2</sub>, a takođe su primenjivane i različite temperature hibridizacije koje su se kretale između 50 i 57°C. Kao osnovni protokol u kome su menjane temperature hibridizacije, korišćen je ciklus za umnožavanje 16S rDNK.

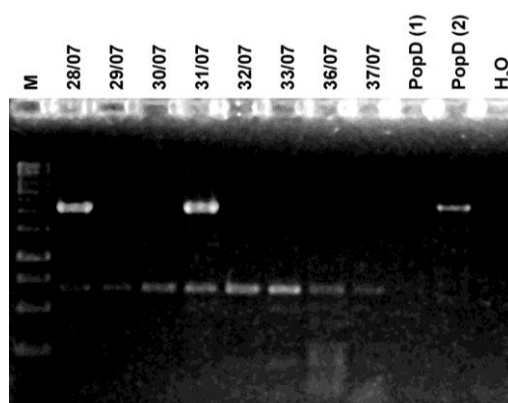
Primenom para prajmera AYgroesF i AYampR na temperaturi hibridizacije od 50°C i koncentracijom MgCl<sub>2</sub> od 2 i 2.5 mM, umnoženi su fragmenti veličine oko 2000 bp što i odgovara predviđenoj veličini ovog fragmenta u odnosu na sekvencu Marguerite yellows fitoplazme na osnovu koje su i dizajnirani prajmeri (Slika 5). Međutim, pored ovog fragmenta umnožen je i fragment dužine oko 600 bp kao i drugi nespecifični fragmenti koji mogu biti poreklom od simbiotskih bakterija iz izolovanog materijala, od hloroplasta ili same biljke. U reakcijama gde je koncentracija MgCl<sub>2</sub> iznosila 2.5 mM uspešno je umnožen *groEL* gen kod svih 10 ispitivanih uzoraka, za razliku od reakcija sa 2 mM MgCl<sub>2</sub> gde se umnožilo šest od 10 ispitivanih uzoraka (Slika 5).

Da bi se proverila mogućnost umnožavanja ovog fragmenta kod svih ispitivanih sojeva samo sa koncentracijom MgCl<sub>2</sub> koja se nalazila u PCR Master Mix-u (odnosno u koncentraciji od 2 mM), kao i mogućnost da ne dođe do umnožavanja nespecifičnih fragmenata, u sledećoj PCR reakciji temperatura hibridizacije je podignuta za jedan stepen i iznosila je 51°C a MgCl<sub>2</sub> nije dodat (Slika 6).



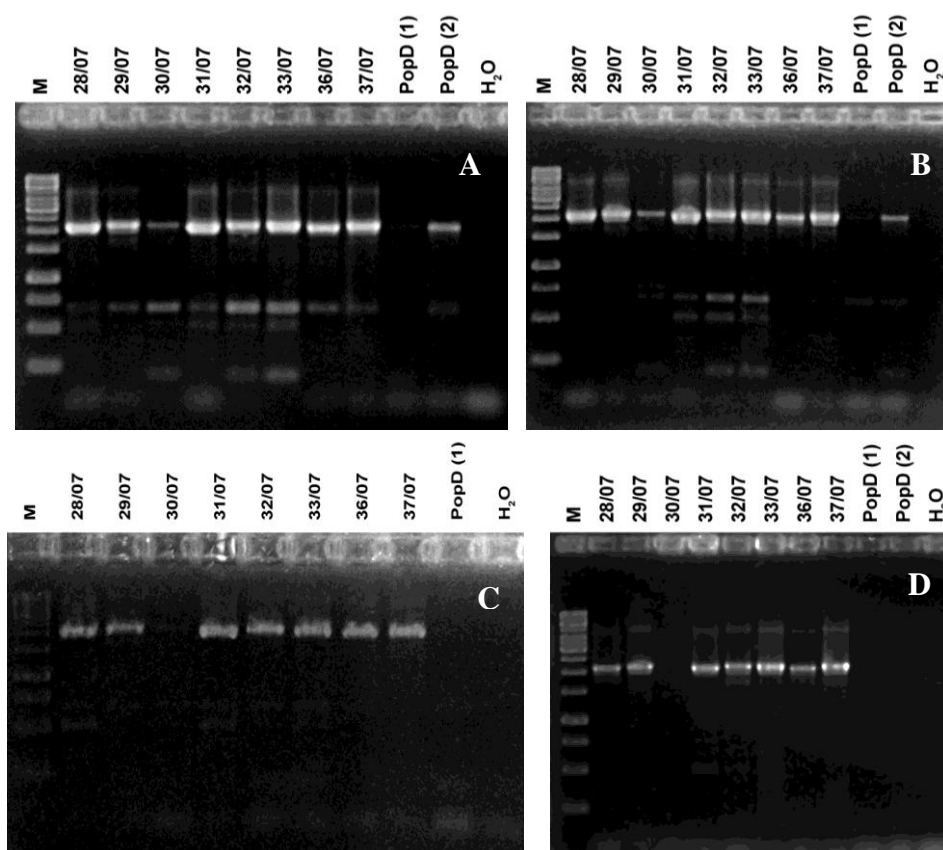


Slika 5. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroesF/AYampR sa koncentracijom  $MgCl_2$  od 2 mM (levo) i 2.5 mM (desno) na temperaturi hibridizacije od 50°C. Svi sojevi su iz šargarepe (**Duduk i sar., 2008a**) osim soja PopD koji je iz topole. Brojevi (1) i (2) kod soja PopD označavaju broj ekstrakcije. M, molekularni marker 1kb, veličine fragmenata u bp od vrha su: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 i 250.



Slika 6. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroesF/AYampR sa koncentracijom  $MgCl_2$  od 2 mM na temperaturi hibridizacije od 51°C. Oznake uzoraka i marker su kao na Slici 5.

Iz Slike 6 se uočava da povećanjem temperature hibridizacije za jedan stepen ne dolazi do umnožavanja nespecifičnih fragmenata osim onog veličine oko 600 bp, što govori da se povećanjem temperature povećava specifičnost prajmera. Međutim, od 10 testiranih uzoraka, kod samo tri su se pojavili željeni amplikoni za razliku od prethodne reakcije u kojoj je koncentracija  $MgCl_2$  iznosila 2.5 mM i gde su se svi umnožili. Iz tog razloga je u sledećim PCR reakcijama koncentracija  $MgCl_2$  iznosila 2.5 mM, a temperatura hibridizacije je povećavana do 55°C za po jedan stepen (Slika 7).



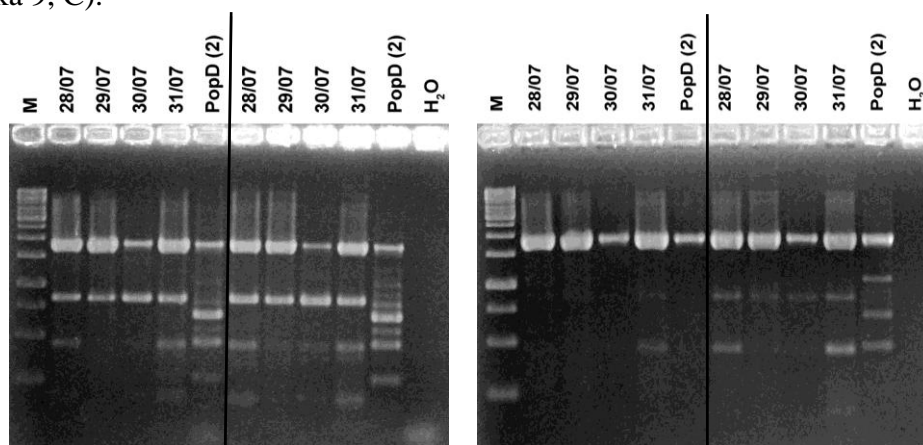
Slika 7. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroesF/AYampR sa koncentracijom  $MgCl_2$  od 2.5 mM na temperaturi hibridizacije od A - 52°C, B - 53°C, C - 54°C i D - 55°C. Oznake uzoraka i marker su kao na Slici 5.

Poređenjem dobijenih gelova uočen je postepen gubitak svih nespecifičnih fragmenata sa porastom temperature hibridizacije, tako da se temperatura od 55°C pokazala kao najbolja za rad sa ovim parom prajmera.

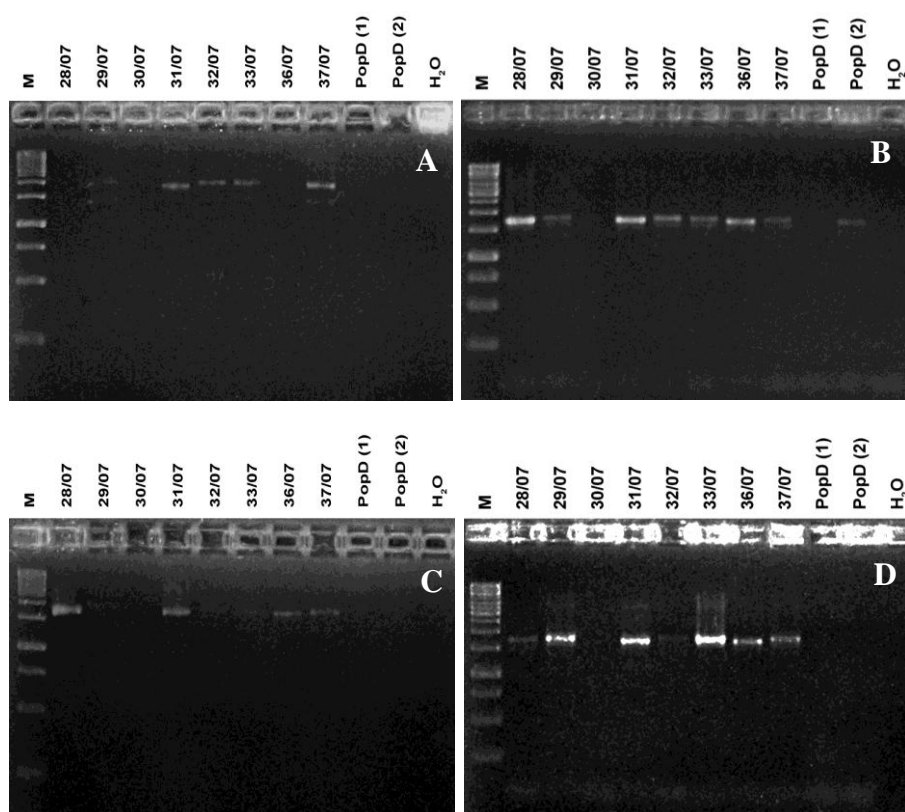
Pošto se upotrebom para prajmera AYgroesF/AYampR na temperaturi hibridizacije od 55°C dobija najčistije umnožavanje ovog amplikona sa jedne strane, ali se od 10 testiranih uzoraka na ovaj način umnožilo svega sedam, ispitivana je mogućnost upotrebe ostalih dizajniranih prajmera u različitim kombinacijama. Uspešne kombinacije ostalih prajmera bi se kasnije mogle primeniti u *semi-nested* ili *nested* reakcijama, a sa ciljem umnožavanja svih testiranih uzoraka.

Tako su PCR reakcije sa parom prajmera AYgroelF/AYampR i AYgroesF/AYgroelR izvedene na dve krajnje temperature anilinga (50 i 55°C) i sa koncentracijom  $MgCl_2$  od 2 i 2.5 mM (Slike 8 i 9). Takođe je izvedena i

AYgroesF/AYgroelR PCR reakcija sa još većom količinom  $MgCl_2$  koja je iznosila 2.75 mM (Slika 9, C).

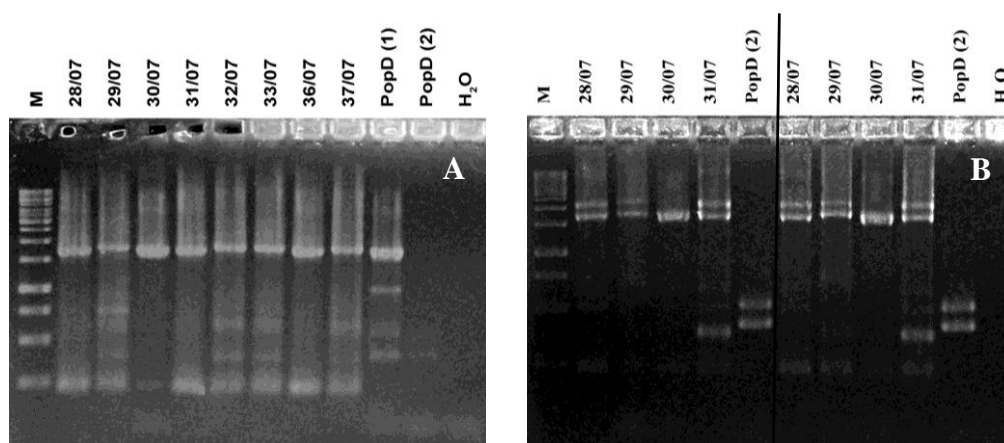


Slika 8. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroelF/AYampR na temperaturi hibridizacije od 50°C (levo) i 55°C (desno). U oba gela PCR reakcije prikazane u linijama 2-6 su izvedene u koncentraciji  $MgCl_2$  od 2 mM dok su linije od 7-12 izvedene u koncentraciji od 2.5 mM  $MgCl_2$ . Oznake uzoraka i marker su kao na Slici 5.



Slika 9. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroesF/AYgroelR na temperaturi hibridizacije od 50°C sa 2 mM  $MgCl_2$  (A), sa 2.5 mM  $MgCl_2$  (B) i sa 2.75 mM  $MgCl_2$  (C), kao i na temperaturi hibridizacije od 55°C sa 2.5 mM  $MgCl_2$  (D). Oznake uzoraka i marker su kao na Slici 5.

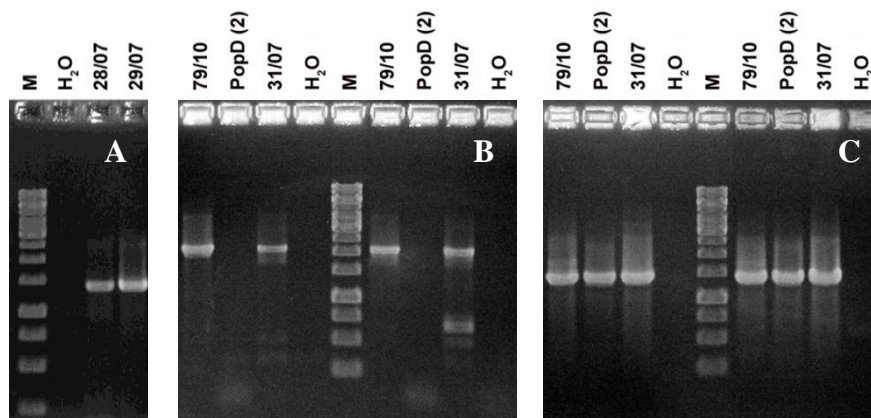
Pošto je u svim PCR reakcijama izvedenim sa parom prajmera AYgroelF/AYampR, nezavisno od temperature hibridizacije i prisutne količine MgCl<sub>2</sub>, došlo do umnožavanja dodatnih nespecifičnih fragmenata, za razliku od para prajmera AYgroesF/AYgroelR koji je imao mali broj slabo umnoženih dodatnih fragmenata i to samo na temperaturi hibridizacije od 50°C u reakcijama sa 2 mM MgCl<sub>2</sub>, izvedene su dve *semi-nested* reakcije sa parom prajmera AYgroesF/AYgroelR. Prva je bila na temperaturi hibridizacije od 50°C sa 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, a druga je bila na temperaturi hibridizacije od 57°C sa 2 i 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Kao uzorak za obe *semi-nested* reakcije uzeti su amplikoni AYgroesF/AYampR dobijeni iz PCR reakcije izvedene na temperaturi hibridizacije od 54°C sa 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Slika 10).



Slika 10. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroesF/AYgroelR u *semi-nested* reakciji nakon PCR reakcije sa AYgroesF/AYampR koja je u direktnom PCR-u izvedena na temperaturi hibridizacije od 54 °C i sa 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Temperature hibridizacije *semi-nested* reakcija su iznosile A - 50°C sa 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> i B - 57°C gde su PCR reakcije prikazane u linijama 2-6 izvedene sa 2 mM MgCl<sub>2</sub> dok su linije od 7-12 izvedene sa 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Oznake uzoraka i marker su kao na Slici 5.

Poslednja kombinacija prajmera AYgroelF/AYgroelR je izvedena na temperaturi hibridizacije od 55°C, jer su sve prethodne reakcije sa drugim kombinacijama prajmera davale najbolje rezultate na ovoj temperaturi. PCR reakciona smeša je bila sa 2 mM MgCl<sub>2</sub> da bi se video osnovni kapacitet i mogućnost ovih prajmera (Slika 11, A). Pošto je umnožavanje bilo veoma uspešno (bez umnožavanja dodatnih nespecifičnih fragmenata kao i jakim amplikonima željene veličine od oko 1400 bp), urađen je *nested* PCR na temperaturi hibridizacije od 55°C sa 2 mM MgCl<sub>2</sub> na

amplikone AYgroesF/AYampR koji su dobijeni u direktnoj PCR reakciji na temperaturama hibridizacije od 50 i 55°C takođe sa 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Slika 11, B i C).



Slika 11. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima A - AYgroelF/AYgroelR na temperaturi hibridizacije od 55°C sa 2 mM MgCl<sub>2</sub>, B - AYgroesF/AYampR sa 2 mM MgCl<sub>2</sub> na temperaturi hibridizacije od 55°C u linijama 1-4 i 50°C u linijama 6-9 i C - AYgroelF/AYgroelR na temperaturi hibridizacije od 55°C sa 2 mM MgCl<sub>2</sub> dobijene u *nested* reakciji na amplikone iz reakcije prikazane na gelu B. Oznake uzoraka i marker su kao na Slici 5.

Poređenjem svih dobijenih rezultata četiri tipa amplikona, AYgroesF/AYampR, AYgroesF/AYgroelR, AYgroelF/AYampR i AYgroelF/AYgroelR, na različitim temperaturama hibridizacije i sa različitom koncentracijom MgCl<sub>2</sub> u PCR reakcionim smešama, uočeno je da su sva četiri dizajnirana prajmera rezultirala umnožavanjem željenog regiona, ali je najbolje rezultate dala kombinacija prajmera AYgroelF/AYgroelR na temperaturi hibridizacije od 55°C sa 2 mM MgCl<sub>2</sub>, koja se po potrebi može koristiti i kao *nested* PCR reakcija nakon direktne AYgroesF/AYampR PCR reakcije izvedene u identičnim uslovima. Stoga su za dalje istraživanje varijabilnosti *groEL* gena RFLP metodom korišćeni AYgroelF/AYgroelR amplikoni dobijeni pod navedenim uslovima.

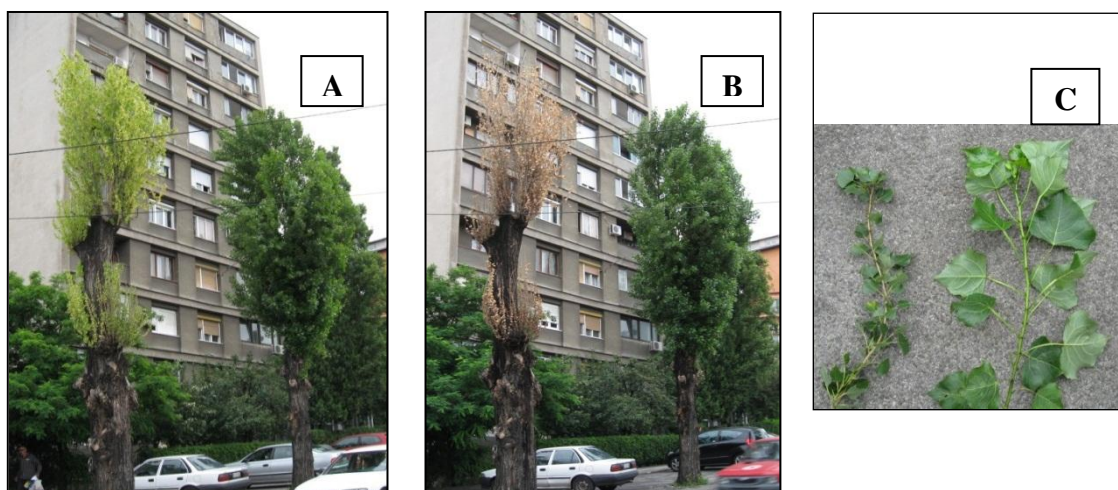
#### 4.2. DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA ASTER YELLOWS FITOPLAZMI - REFERENTNIH SOJEVA I SOJEVA IZ SRBIJE

U istraživanje su uključena ukupno 34 soja Aster yellows fitoplazmi iz kolekcije i iz Srbije. Sojevi iz kolekcije, kojih ima ukupno 23, prethodno su preneti na test biljku

*Catharanthus roseus* iz različitih domaćina poreklom iz 10 zemalja širom sveta (Tabela 8). Od sojeva poreklom iz Srbije u analizu su uključena tri prethodno opisana soja iz šargarepe (**Duduk i sar., 2009**), kao i osam sojeva čija je DNK izolovana tokom ove doktorske teze, a poreklom su sa topole i vinke.

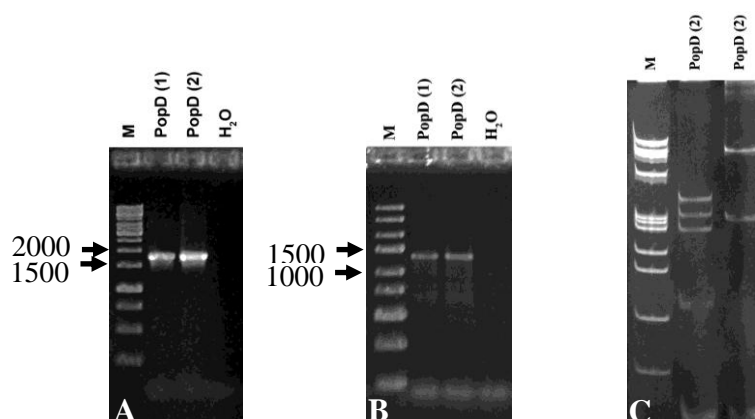
#### 4.2.1. Soj PopD

Iz uzorkovanog biljnog materijala biljke topole iz Beograda sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi (Slika 12) je urađena izolacija DNK a potom i detekcija fitoplazmi. Nakon vizuelizacije produkata direktne PCR reakcije upotrebom P1/P7 univerzalnih prajmera uočen je fragment veličine oko 1800 bp, a nakon *nested* upotrebom R16F2n/R16R2 univerzalnih prajmera fragment veličine oko 1200 bp, što odgovara očekivanim veličinama ovih amplikona (Slika 13, A i B). Zbog simptoma odumiranja cele biljke ovaj soj je nazvan PopD (populus decline).



Slika 12. A i B - Fotografije zdrave biljke topole (desno) i sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi (levo); A - 06.06.2009. godine i B - 22.06.2009. godine; C - Izgled grane sa listovima zdrave topole (desno) i sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi (levo)

Nakon detekcije fitoplazmi urađena je identifikacija RFLP metodom pomoću enzima *TruI* i *HhaI* primenjenih na amplikon R16F2n/R16R2 (Slika 13, C). Na osnovu poredenja dobijenih profila sa podacima iz literature, detektovana fitoplazma je klasifikovana kao pripadnik AY grupe (16SrI).



Slika 13. A i B - Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima P1/P7 (A) i R16F2n/R16R2 (B) uzorka topole. Brojevi (1) i (2) označavaju broj ekstrakcije. M (A), molekularni marker 1kb, veličine fragmenata u bp od vrha su: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 i 250; M (B), molekularni marker Express DNA Ladder, veličine fragmenata u bp od vrha su: 5000, 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300 i 100; C - Prikaz digeriranih amplikona R16F2n/R16R2 topole pomoću restriktivnih enzima *TruI* (linija 1) i *HhaI* (linija 2) razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu. M, marker PhiX174 (*HaeIII* digeriran), veličine fragmenata u bp od vrha su: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 i 72.

Podgrupa 16SrI-P prvi put je opisana 2003. godine (Šeruga i sar., 2003) kada je i data sekvenca P1/P7 regiona ove fitoplazme (pristupni broj AF503568). Pošto su svi do sada detektovani pripadnici podgrupe I-P poreklom sa topole, tako je radi preciznog određivanja podgrupe soja PopD dobijeni P1/P7 amplikon prečišćen i sekvenciran sa dva uzvodna prajmera, P1 i R16F2n, i jednim nizvodnim prajmerom, P7. Nakon obrade sekvenci dobijena je konsenzus sekvenca soja PopD dužine 1494 bp koja je poređena sa svim 16S rDNK sekvencama dostupnim u NCBI Banci gena korišćenjem programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvenca PopD soja je pokazala 100% homologije sa gore pomenutim sojem Aster yellows fitoplazme iz Hrvatske (AF503568), podgrupa I-P. Rezultat je potvrđen i korišćenjem online aplikacije iPhyClassifier (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) koja generiše *in silico* gelove i koja je kao rezultat dala da soj PopD ima 99.1% sličnosti sa referentnim sojem AY fitoplazmi M30790, kao i da je određenje PopD soja da je pripadnik podgrupe 16SrI-P jer je pokazao koeficijent sličnosti virtuelnih RFLP profila 1.00 sa referentnim sojem ove podgrupe, a to je gore već pomenuti soj iz Hrvatske. Sekvenca 16S rDNK soja PopD je deponovana u NCBI Banci

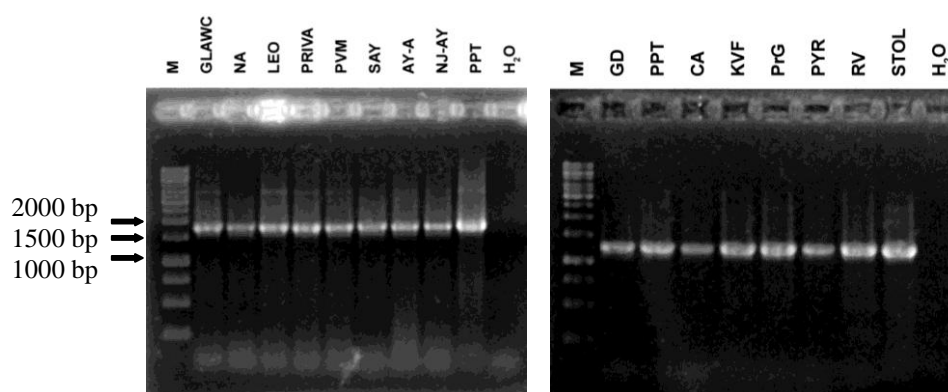


gena pod pristupnim brojem prikazanim u Tabeli 8. Zbog svega navedenog, soj PopD je uključen u dalja ispitivanja zajedno sa ostalim referentnim sojevima AY fitoplazmi kao predstavnik ribozomalne podgrupe 16SrI-P.

#### 4.2.2. Sojevi Aster yellows fitoplazmi iz kolekcije i iz šargarepe

Da bi se potvrdili podaci preuzeti iz literature o pripadnosti određenoj podgrupi unutar grupe 16SrI sojeva iz kolekcije i tri soja izolovana iz šargarepe, a i odredila podgrupa kod četiri soja takođe iz kolekcije koji se prvi put koriste u analizi (o kojima nema literaturnih podataka), umnožena je 16S rDNK u direktnoj PCR reakciji prajmerima P1/P7, a potom je ova reakcija praćena *nested* PCR reakcijom sa prajmerima R16F2n/R16R2. Pored sojeva koji pripadaju AY grupi, u analizu su uključena i dva soja, STOL i 'Ca. P. japonicum', koji pripadaju grupi 16SrXII evolutivno srodnoj sa AY fitoplazmama. Ova dva soja su uključena u analizu radi kasnije potvrde specifičnosti dizajniranih prajmera za umnožavanje *groEL* gena.

Svih 26 testiranih sojeva, osim negativne kontrole, uspešno je umnoženo, što je potvrđeno prisustvom fragmenta odgovarajuće veličine od oko 1800 bp u direktnoj, odnosno 1200 bp u *nested* PCR reakciji. Na Slici 14 su radi lakše preglednosti prikazani produkti ovih PCR reakcija kod samo nekoliko testiranih sojeva.

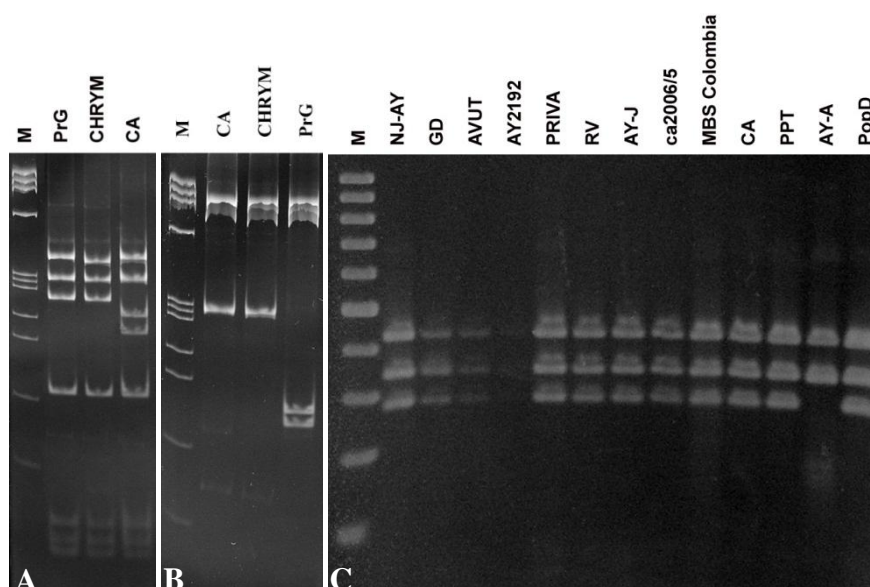


Slika 14. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima P1/P7 (levo) i R16F2n/R16R2 (desno). Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 1kb, pogledati Sliku 13.

Pošto se kao standardna metoda identifikacije fitoplazmi koristi RFLP metoda na amplikone R16F2n/R16R2 uz pomoć 17 restrikcionih enzima za sve grupe i



podgrupe fitoplazmi, a s obzirom na to da su ispitivani izolati pripadnici samo 16SrI grupe, primenjena su samo tri restrikciona enzima *TruII*, *HhaI* i *RsaI* uz pomoć kojih je moguće razlikovati podgrupe 16SrI-A, I-B, I-C i I-F. Sve razlike koje postoje između podgrupe 16SrI-B i podgrupa 16SrI-M i I-L se u literaturi pripisuju postojanju razlika između dva operona 16S rDNK gena (intergenskoj heterogenosti) kod podgrupa 16SrI-M i I-L tako da oni imaju RFLP profile identične profilima podgrupe 16SrI-B osim kada se primene *HinfI* i *HaeIII* restrikcioni enzimi (Marcone i sar., 2000). S obzirom na to da su tri soja iz podgrupa 16SrI-M i I-L koja se koriste u ovoj analizi referentni sojevi ovih podgrupa čuvani u kolekciji, kao i da postoje njihove 16S rDNK sekvence, analiza sa *HinfI* i *HaeIII* restrikcijom nije urađena. Na Slici 15 su prikazani samo odabrani sojevi koji predstavljaju određene grupe RFLP profila, a ostali sojevi su imali profil koji je bio identičan nekom od prikazanih profila.



Slika 15. Prikaz digeriranih amplikona R16F2n/R16R2 pomoću restrikcioni enzima *TruII* (A), *HhaI* (B) i *RsaI* (C) razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu (A i B) i 2% agaroznom gelu (C). A i B - M, marker PhiX174 (videti Sliku 13 sa strane 56). C - M, marker 100 bp, veličine fragmenata u bp od vrha su: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 i 100. Oznake sojeva su date u Tabeli 8.

Nakon primene *TruII* restrikcionog enzima svi sojevi osim sojeva CA, PPT, KVF i LEO su imali identičan profil kao sojevi PrG i CHRYM, dok su četiri gore pomenuta soja imala profil identičan profilu soja CA (Slika 15, A). Poređenjem profila dobijenih nakon primene restrikcionog enzima *HhaI*, uočeno je da sojevi AVUT,

AY2192, PRIVA, AY-W, DIV, PYR, RV, GLAWC, NA, SAY, ca2006/9, AY-27, AY-J, ca2006/5 i MBSColumbia imaju međusobno identične profile kao soj PrG sa Slike 15, B, dok ostali sojevi imaju drugi tip profila koji odgovara profilu sojeva CA i CHRYM sa iste slike. Nakon primene *RsaI* restriktionog enzima uočeno je da samo soj AY-A ima specifičan RFLP profil koji se razlikuje od svih ostalih. Prema dobijenim podacima primenom RFLP metode sa ova tri restriktiona enzima, a poređenjem sa literaturnim podacima o izgledu RFLP profila kada se primene ovi restriktioni enzimi, sojevi CHRYM, NJ-AY, PVM, ca2006/1 i GD su identifikovani kao pripadnici podgrupe 16SrI-A, sojevi AVUT, AY2192, PRIVA, AY-W, DIV, PrG, PYR, RV, GLAWC, NA, SAY, ca2006/9, AY-27, AY-J, ca2006/5 i MBSColumbia su identifikovani kao pripadnici podgrupe 16SrI-B, sojevi CA, PPT, KVF i LEO kao pripadnici podgrupe 16SrI-C, a soj AY-A kao pripadnik podgrupe 16SrI-F (Tabela 8). Na ovaj način je potvrđeno da su dobijeni rezultati u skladu sa literaturnim podacima.

Radi kompletnije analize 16S rDNK, P1/P7 amplikoni sojeva kod kojih ne postoje javno dostupne sekvence ovog gena su prečišćene i sekvencirane, a nakon obrade su deponovane u NCBI Banku gena (Tabela 8).

Tabela 8. Oznake svih testiranih sojeva, njihovi osnovni epidemiološki podaci, pripadnost 16SrI podgrupi i njihovi pristupni brojevi 16S rDNK

Oznaka soja	Domaćin	Bolest koju izaziva	Zemlja porekla	16SrI podgrupa (Literatura)	Pristupni broj 16S rDNA (*)
CHRYM	Hziantema ( <i>Chrysanthemum frutescens</i> )	Chrysanthemum yellows	Nemačka	A (Marcone i sar., 2000)	AY265214 (1527)
ca2006/1	Šargarepa ( <i>Daucus carota</i> )	Carrot yellows	Srbija	A (Duduk i sar., 2009)	EU215424 (1720)
PVM	Bokvica jelenja ( <i>Plantago coronopus</i> )	Plantago virescence	Nemačka	A (Bertaccini i sar., 2000)	AY265216 (1525)
NJ-AY	Aster	New Jersey aster yellows	Nju Džerzi, SAD	A (Lee i sar., 1993)	HM590622 <sup>#</sup> (1504)
GD (GD1)	Dren ( <i>Cornus racemosa</i> )	Grey dogwood stunt	Njujork, SAD	A (Lee i sar., 2004b)	DQ112021 (1529)
AVUT	Lepa kata ( <i>Callistephus chinensis</i> )	Aster yellows	Nemačka	M (Marcone i sar., 2000)	AY265209 (1527)

Tabela 8 (nastavak). Oznake svih testiranih sojeva, njihovi osnovni epidemiološki podaci, pripadnost 16SrI podgrupa i njihovi pristupni brojevi 16S rDNK

Oznaka soja	Domaćin	Bolest koju izaziva	Zemlja porekla	16SrI podgrupa (Literatura)	Pristupni broj 16S rDNA (*)
AY2192	Lepa kata ( <i>Callistephus chinensis</i> )	Aster yellows	Nemačka	L (Marcone i sar., 2000)	AY180957 (1527)
PRIVA	Jagorčevina ( <i>Primula spp.</i> )	Primrose virescence	Nemačka	L (Marcone i sar., 2000)	AY265210 (1525)
AY-W	Aster	American aster yellows	Florida, SAD	B (Bertaccini i sar., 2000)	HM590617 <sup>#</sup> (1740)
DIV	Divlja rukola ( <i>Diplotaxis erucoides</i> )	Diplotaxis virescence	Španija	B (Bertaccini i sar., 2000)	HM590618 <sup>#</sup> (1705)
PrG	Jagorčevina ( <i>Primula spp.</i> )	Primula green yellows	Velika Britanija	B (Ovaj doktorat)	HM590623 <sup>#</sup> (1730)
PYR	Breskva ( <i>Prunus persica</i> )	Peach yellows	Italija	B (Ovaj doktorat)	HM590624 <sup>#</sup> (1591)
RV	Uljana repica ( <i>Brassica napus</i> )	Oilseed rape virescence	Francuska	B (Bertaccini i sar., 2000)	HM590625 <sup>#</sup> (1655)
GLAWC	Gladiola ( <i>Gladiolus spp.</i> )	Gladiolus witches'-broom	Holandija	B (Bertaccini i sar., 2000)	HM590619 <sup>#</sup> (1739)
NA	Nepoznat	Periwinkle virescence	Italija	B (Ovaj doktorat)	HM590621 <sup>#</sup> (1760)
SAY	Celer ( <i>Apium graveolens</i> )	Aster yellows	Kalifornija, SAD	B (Bertaccini i sar., 2000)	AF222063 (1830)
ca2006/9	Šargarepa ( <i>Daucus carota</i> )	Carrot yellows	Srbija	B (Duduk i sar., 2009)	EU215426 (1735)
AY-27	Aster	Aster yellows	Kanada	B (Lee i sar., 1993)	HM467127 <sup>#</sup> (1738)
AY-J	Vinka ( <i>Vinca minor</i> )	Aster yellows	Francuska	B (Ovaj doktorat)	HM590616 <sup>#</sup> (1688)
ca2006/5	Šargarepa ( <i>Daucus carota</i> )	Carrot yellows	Srbija	B (Duduk i sar., 2009)	EU215425 (1829) GQ175789 (1829)
MBSColumbia	Kukuruz ( <i>Zea mays</i> )	Maize bushy stunt	Kolumbija	B (Duduk i sar., 2008c)	HQ530152 <sup>#</sup> (1482)
CA	Šargarepa ( <i>Daucus carota</i> )	Carrot yellows	Italija	C (Bertaccini i sar., 2000)	HM448473 <sup>#</sup> (1797)
LEO	Lavlji zub ( <i>Leontodon hispidus</i> )	Leontodon yellows	Italija	C (Bertaccini i sar., 2000)	HM590620 <sup>#</sup> (1563)
KVF	Detelina ( <i>Trifolium spp.</i> )	Clover phyllody	Francuska	C (Marcone i sar., 2000)	HQ530150 <sup>#</sup> (1501)

Tabela 8 (nastavak). Oznake svih testiranih sojeva, njihovi osnovni epidemiološki podaci, pripadnost 16SrI podgrupa i njihovi pristupni brojevi 16S rDNK

Oznaka soja	Domaćin	Bolest koju izaziva	Zemlja porekla	16SrI podgrupa (Literatura)	Pristupni broj 16S rDNA (*)
PPT	Krompir ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Potato purple top	Francuska	C (Marcone i sar., 2000)	HQ530151 <sup>#</sup> (1548)
AY-A (ACLR-AY)	Kajsija ( <i>Prunus armeniaca</i> )	Apricot chlorotic leafroll	Španija	F (Lee i sar., 2004b)	AY265211 (1525)
PopD	Topola ( <i>Populus nigra</i> )	Populus decline	Srbija	P (Ovaj doktorat)	HM590626 <sup>#</sup> (1494)
79/10	Vinka ( <i>Vinca minor</i> )	/	Srbija (Kalemegdan)	C (Ovaj doktorat)	/
92/10	Topola ( <i>Populus nigra</i> )	/	Srbija (Indija)	P (Ovaj doktorat)	/
205/10	Vinka ( <i>Vinca minor</i> )	/	Srbija (Kalemegdan)	C (Ovaj doktorat)	/
84/11	Vinka ( <i>Vinca minor</i> )	/	Srbija (Tašmajdan)	B (Ovaj doktorat)	/
87/11	Vinka ( <i>Vinca minor</i> )	/	Srbija (Kalemegdan)	B (Ovaj doktorat)	/
90/11	Vinka ( <i>Vinca minor</i> )	/	Srbija (Kalemegdan)	B (Ovaj doktorat)	/
91/11	Vinka ( <i>Vinca minor</i> )	/	Srbija (Kalemegdan)	B (Ovaj doktorat)	/

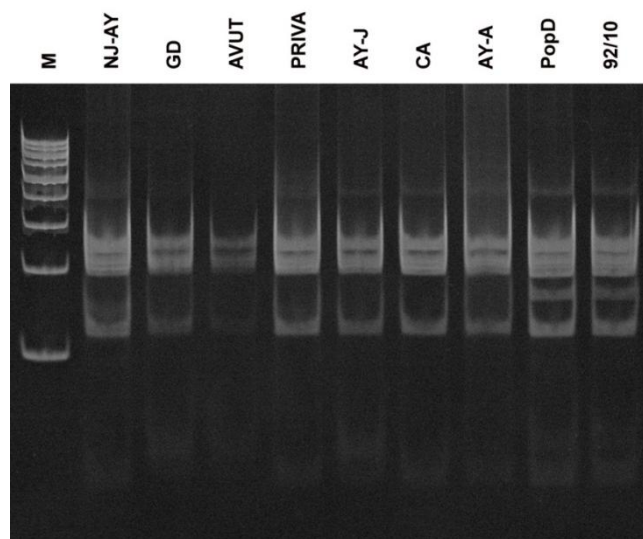
\*- dužina sekvence u bp; <sup>#</sup> - sekvence dobijene kao rezultat ove doktorske teze

#### 4.2.3. Ostali sojevi Aster yellows fitoplazmi iz Srbije

Uzorci sa simptomima žutila listova, virescencije i pojave filodija sakupljeni u Beogradu i okolini tokom 2010. i 2011. godine su podvrgnuti izolaciji DNK, a potom je urađena prethodno opisana detekcija i identifikacija (identična kao za referentne sojeve) primenom P1/P7 i R16F2n/R2 prajmera, a potom RFLP analizom sa *TruII*, *HhaI* i *RsaI* restrikcionim enzimima. Iz šest simptomatičnih biljaka vinki su izolovani sojevi 79/10, 205/10, 84/11, 87/11, 90/11 i 91/11, dok je iz topole iz okoline Beograda izolovan soj 92/10 (Tabela 8).

Pošto primenom *TruII*, *HhaI* i *RsaI* restrikcionih enzima nije moguće razlikovati podgrupu 16SrI-P od ostalih podgrupa, a s obzirom na to da je dokazano da je soj PopD, koji je takođe poreklom iz topole, pripadnik ove podgrupe, urađen je virtuelni RFLP u programu pDRAW32 na osnovu 16S rDNK sekvence soja PopD i generisani su *in silico* gelovi da bi se pronašao restrikcioni enzim koji jasno odvađa pripadnike ove podgrupe

od ostalih. *In silico* analiza je pokazala da upotrebom *Tsp509I* restrikcionog enzima na R16F2n/R2 amplikon sve podgrupe osim 16SrI-P daju jedan isti profil koji se jasno razlikuje od profila pripadnika 16SrI-P podgrupe. Zbog toga su R16F2n/R2 amplikoni odabranih sojeva koji pripadaju svim podgrupama, kao i dva soja poreklom iz topole, PopD i 92/10, digerirani i sa enzimom *Tsp509I* (Slika 16).



Slika 16. Prikaz digeriranih amplikona R16F2n/R2 pomoću restrikcionog enzima *Tsp509I* razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59).

Analizom dobijenih profila sa sva četiri restrikciona enzima utvrđeno je da sojevi 84/11, 87/11, 90/11 i 91/11 pripadaju podgrupi 16SrI-B, sojevi 79/10 i 205/10 pripadaju podgrupi 16SrI-C, dok soj 92/10 poreklom sa topole pripada podgrupi 16SrI-P kao i soj PopD koji je takođe sa topole (Tabela 8).

Pošto je podgrupa 16SrI-P novoopisana i još uvek nedovoljno ispitana podgrupa, P1/P7 amplikon soja 92/10 je prečišćen i sekvenciran. Dobijena sekvenca dužine 1465 bp je poređena sa sekvencom soja PopD i uočeno je postojanje jednog varijabilnog mesta. Soj PopD, kao i referentni soj podgrupe I-P iz banke gena, na mestu 992 od početka P1 regiona imaju T, dok se kod soja 92/10 na ovom nukleotidnom mestu nalazi C. Takođe je urađena i *in silico* analiza upotrebom online servera iPhyClassifier kojom je utvrđeno da sekvenca 16S rDNK soja 92/10 ima 99.2% sličnosti sa referentnim sojem

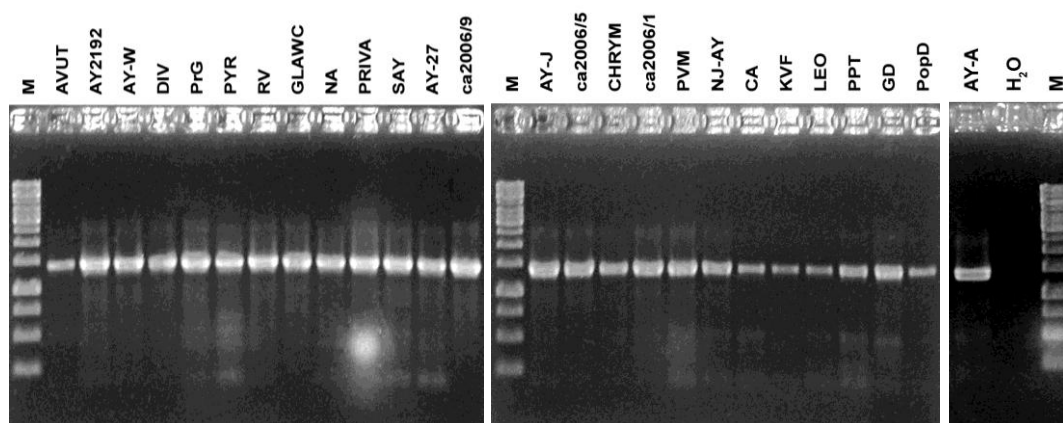
AY fitoplazmi (M30790) i da ima koeficijent sličnosti virtuelnih RFLP profila 1.00 sa referentnim sojem podgrupe I-P iz Hrvatske (AF503568).

### 4.3. ANALIZA *groEL* GENA KOD ASTER YELLOWS FITOPLAZMI

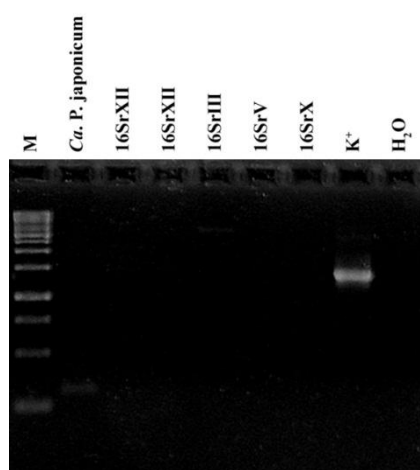
#### 4.3.1. Sojevi Aster yellows fitoplazmi iz kolekcije i iz šargarepe

Kod svih 27 identifikovanih referentnih AY sojeva je umnožen i analiziran *groEL* gen upotrebom para prajmera AYgroelF/R u direktnoj PCR reakciji ili u *nested* PCR reakciji nakon direktne gde je upotrebljen AYgroesF/AYampR par prajmera. Radi utvrđivanja specifičnosti dizajniranih prajmera u analizu su takođe uključeni soj '*Ca. P. japonicum*' i dva soja Stolbur fitoplazmi (16SrXII) koji su bliski AY fitoplazmama, kao i pripadnici grupa 16SrIII, 16SrV i 16SrX koji su detektovani i identifikovani u ranijim istraživanjima.

Kod svih 27 sojeva AY fitoplazmi je uspešno umnožen željeni amplikon veličine od oko 1400 bp, dok kod ostalih testiranih sojeva koji ne pripadaju 16SrI grupi ili nije došlo do umnožavanja ili je došlo do nespecifičnog umnožavanja fragmenta veličine 300 bp ili 4000 bp (Slike 17 i 18). U svim PCR reakcijama u uzorku negativne kontrole takođe nije došlo do umnožavanja.



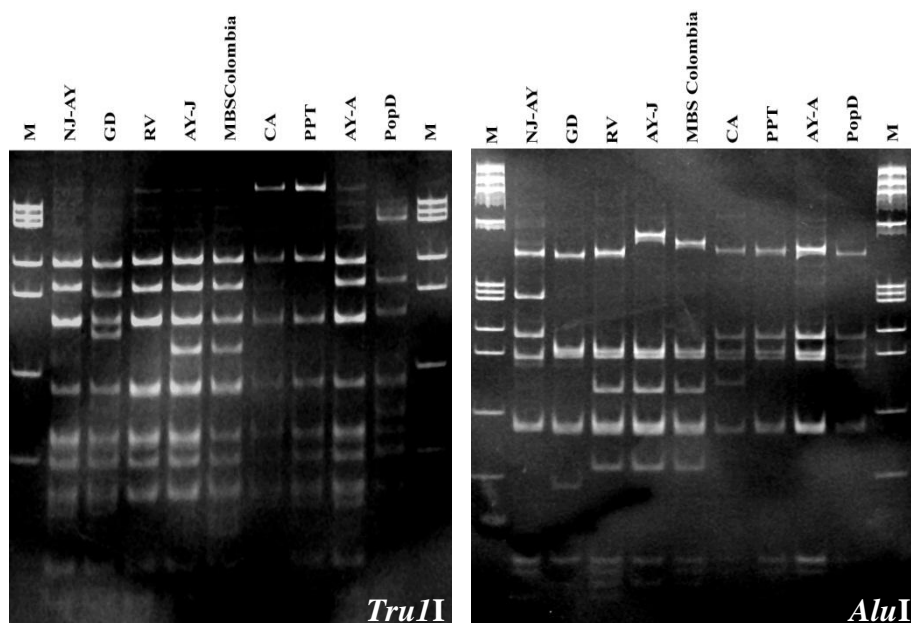
Slika 17. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroelF/R referentnih sojeva dobijenih u direktnoj PCR reakciji. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 56).



Slika 18. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroelF/R sojeva drugih 16Sr grupa dobijenih u direktnoj PCR reakciji. Kao pozitivna kontrola je upotrebljen AY soj ca2006/1. M, marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 56).

Nakon uspešnog umnožavanja *groEL* gena kod svih ispitivanih uzoraka, urađena je RFLP analiza pomoću tri restrikciona enzima *TaqI*, *TruII* i *AluI* (Slika 19). Pošto je genom fitoplazmi bogat A/T parovima kao i regionima koji se sastoje samo od A i T nukleotida a enzim *TruII* prepoznaje TTAA sekvencu kao restrikciono mesto, onda bi ovaj restrikcioni enzim trebalo da bude najbolji pokazatelj varijabilnosti ispitivanog regiona i stoga je uključen u analizu.

Prema dobijenim rezultatima je utvrđeno da upotrebom restrikcionog enzima *TaqI* amplikoni ostaju nedigerirani tj. da ovaj region ne poseduje *TaqI* restrikciono mesto. Stoga slika gela sa produktima digestije ovog restrikcionog enzima nije prikazana. Analizom ostalih dobijenih profila utvrđeno je da se pomoću *TruII* restrikcionog enzima može jasno razlikovati šest različitih profila, dok se upotrebom *AluI* restrikcionog enzima uočava osam različitih profila. Na osnovu kombinacije dobijenih profila upotrebom ova dva restrikciona enzima moguće je identifikovati devet *groELI* podgrupa (Slika 19).



Slika 19. Prikaz digeriranih amplikona AYgroelF/R pomoću restrikcioni enzima *TruII* i *AluI* razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker PhiX174 (videti Sliku 13 sa strane 57), s tim što na gelu *TruII* nisu prikazana četiri gornja fragmenta.

Pošto su sojevi CHRYM, ca2006/1, PVM i NJ-AY upotrebom oba restrikciona enzima imali međusobno identične profile a različite od ostalih profila (Slika 19, profil soja NJ-AY), ovim sojevima je dodeljena podgrupa groELI-I. Soj GD koji pripada podgrupi 16SrI-A, kao i prethodna četiri soja, u analizi *groEL* gena pokazao je jasne razlike. Naime, nakon digestije *TruII* i *AluI* restrikcioni enzimima, soj GD je imao jedinstvene profile karakteristične samo za njega (Slika 19). Zbog toga je ovom soju dodeljena podgrupa groELI-II. Sojevi AVUT, AY2192 i PRIVA su imali međusobno identične profile nakon digestije sa oba upotrebljena restrikciona enzima ali i identične sa sojevima AY-W, DIV, PrG, PYR, RV, GLAWC, NA, SAY, ca2006/9 i AY-27 (Slika 19, profil soja RV) koji svi pripadaju podgrupi 16SrI-B. Iz tog razloga je ovih 13 sojeva svrstano u podgrupu groELI-III. Sojevi AY-J i ca2006/5, koji su takođe pripadnici 16SrI-B podgrupe, imali su međusobno identične *TruII* i *AluI* profile, ali različite od ostalih pripadnika 16SrI-B podgrupe (Slika 19, profil soja AY-J), tako da je ovim sojevima dodeljena podgrupa groELI-IV. Soj MBSColombia, takođe pripadnik 16SrI-B podgrupe, imao je *TruII* profil skoro identičan kao prethodna dva soja (jedva vidljiva razlika postoji u obliku dodatnog benda veličine oko 40 bp), ali je zato imao jedinstven



*AluI* profil (Slika 19) zbog čega je kao rezultat kolektivnih RFLP profila odvojen u posebnu podgrupu groELI-V. Četiri soja koja pripadaju podgrupi 16SrI-C (CA, LEO, KVF i PPT) su imala međusobno identične *TruII* RFLP profile a različite od ostalih sojeva (Slika 19, *TruII* gel, profil sojeva CA i PPT), međutim analizom *AluI* RFLP profila ova četiri soja su pokazala dva tipa profila. Sojevi CA i LEO su sa jedne strane imali međusobno identične *AluI* profile, kao što su i sojevi PPT i KVF sa druge strane imali drugi tip međusobno identičnih *AluI* profila (Slika 19, *AluI* gel, sojevi CA i PPT). Zbog ovoga je sojevima CA i LEO dodeljena podgrupa groELI-VI, a sojevima PPT i KVF podgrupa groELI-VII. Soj AY-A koji je pripadnik podgrupe 16SrI-F je imao *TruII* RFLP profil identičan profilu pripadnika podgrupe 16SrI-A (Slika 19, *TruII* gel, profili sojeva NJ-AY i AY-A), međutim *AluI* RFLP profil je imao skoro identičan profilu sojeva PPT i KVF (podgrupa 16SrI-C) pri čemu je kod soja AY-A najviši bend veličine oko 450 bp i on je nešto viši nego kod pripadnika 16SrI-C (Slika 19, *AluI* gel, profili sojeva PPT i AY-A). Bez obzira što ovaj soj ne poseduje profile karakteristične samo za njega kao što to imaju pripadnici ostalih podgrupa, ovaj soj je na osnovu kolektivnih profila koji se poklapaju sa profilima iz dve različite podgrupe (16SrI-A i 16SrI-C) odvojen u posebnu podgrupu, a to je podgrupa groELI-VIII. Soj PopD (16SrI-P) je imao i *TruII* i *AluI* RFLP profile koji su se razlikovali od svih ostalih profila (Slika 19) tako da je njemu dodeljena posebna podgrupa groELI-IX (Tabela 9).

Nakon analize AYgroelF/R amplikona RFLP metodom, DNK referentnih izolata je poslata na sekvenciranje, a dobijene i obrađene sekvence *groEL* gena su deponovane u NCBI Banku gena pod pristupnim brojevima prikazanim u Tabeli 9.

Tabela 9. Podela sojeva na osnovu RFLP profila AYgroelF/R amplikona sa *TruII* i *AluI* restrikcionim enzimima u groELI podgrupe i pristupni brojevi *groEL* sekvenci

Oznaka soja	Pristupni broj <i>groEL</i> gena	Dužina sekvence u bp	RFLP profili AYgroelF/R amplikona		Dodeljena <i>groEL</i> podgrupa (groELI-)
			<i>TruII</i>	<i>AluI</i>	
<b>CHRYM</b>	AB599692 <sup>#</sup>	1611	3	3	I
<b>ca2006/1</b>	AB599708 <sup>#</sup>	1611	3	3	
<b>PVM</b>	AB599706 <sup>#</sup>	1611	3	3	
<b>NJ-AY</b>	AB599703 <sup>#</sup>	1611	3	3	
<b>GD</b>	AB599694 <sup>#</sup>	1611	5	6	II
<b>AVUT</b>	AB599686 <sup>#</sup>	1611	1	1	III
<b>AY2192</b>	AB599687 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>PRIVA</b>	AB599705 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>AY-W</b>	AB599691 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>DIV</b>	AB599693 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>PrG</b>	AB599696 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>PYR</b>	AB599697 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>RV</b>	AB599698 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>GLAWC</b>	AB599700 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>NA</b>	AB599702 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>SAY</b>	AB599707 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>ca2006/9</b>	AB599709 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>AY-27</b>	AB599688 <sup>#</sup>	1611	1	1	
<b>AY-J</b>	AB599689 <sup>#</sup>	1611	2	2	
<b>ca2006/5</b>	AB599711 <sup>#</sup>	1611	2	2	
<b>MBSColombia</b>	AB599712 <sup>#</sup>	1611	2*	8	V
<b>CA</b>	AB599690 <sup>#</sup>	1611	4	4	VI
<b>LEO</b>	AB599701 <sup>#</sup>	1611	4	4	
<b>KVF</b>	AB599695 <sup>#</sup>	1611	4	5	VII
<b>PPT</b>	AB599704 <sup>#</sup>	1611	4	5	
<b>AY-A</b>	AB599699 <sup>#</sup>	1611	3	5*	VIII
<b>PopD</b>	AB599710 <sup>#</sup>	1611	6	7	IX
<b>79/10</b>	/		4	5	VII
<b>205/10</b>	/		4	5	VII
<b>92/10</b>	/		6	7	IX
<b>84/11</b>	/		1	1	III
<b>87/11</b>	/		1	1	III
<b>90/11</b>	/		1	1	III
<b>91/11</b>	/		1	1	III

<sup>#</sup>- sekvence dobijene kao rezultat ove doktorske teze; \*- postoji slabo vidljiva razlika u profilu

Upotrebom *TruII* i *AluI* restrikcionih enzima na dobijene AYgroelF/R amplikone i analizom dobijenih RFLP profila, podgrupe 16SrI-A i I-C su dalje diferencirane u dve groELI podgrupe, 16SrI-B je dalje diferencirana u tri groELI podgrupe, dok podgrupe

16SrI-M i I-L nisu pokazale nikakve međusobne razlike u odnosu na jedan deo podgrupe 16SrI-B (Tabela 10). Podgrupe 16SrI-F i I-P razlikuju se od ostalih i na nivou *groEL* gena kao i na nivou 16S rDNK.

Tabela 10. Kratak pregled podele na groELI podgrupe u odnosu na 16SrI podgrupe na osnovu restrikcionih enzima *TruII* i *AluI*

<b>16SrI-</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b><i>TruII</i></b>	3	5	1	1	1	2	2	4	4	3	6
<b><i>AluI</i></b>	3	6	1	1	1	2	8	4	5	5	7
<b>groELI-</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>

Nakon dobijanja sekvenci urađena je Blast analiza pri čemu su dobijene sekvence poređene sa svim dostupnim sekvencama iz NCBI Banke gena, uključujući i sekvence četiri genoma fitoplazmi kompletno sekvenciranih ('*Ca. P. asteris*' sojevi AYWB (16SrI-A) i OY-M (16SrI-B), '*Ca. P. australiense*' (16SrXII-B) i '*Ca. P. mali*' soj AT (16SrV)), kao i sekvencu njima filogenetski srodne molikute *Acholeplasma laidlawii*, soj PG-8A. Pošto je BLAST analizom pokazano da imaju od 69% do 100% sličnosti sa sekvencama *groEL* gena pet gore pomenutih kompletno sekvenciranih genoma, na ovaj način je urađena potvrda identifikacije dobijenih sekvenci (Tabela 11).

Iz Tabele 11 se uočava da postoji jasna razlika soja GD u odnosu na ostale pripadnike podgrupe 16SrI-A u procentu sličnosti sekvence *groEL* gena. Dok svi ostali članovi ove podgrupe imaju 99% sličnosti sa sojem AYWB (koji je pripadnik podgrupe 16SrI-A), soj GD ima 98% sličnosti sa njim. Ovaj soj se izdvaja i po vrednosti procenta sličnosti sa sojem OY-M (koji je pripadnik podgrupe 16SrI-B) koji iznosi takođe 98% dok ostali pripadnici podgrupe 16SrI-A imaju 97% sličnosti sa sojem OY-M. Takođe se iz tabele uočava i da postoji velika razlika u sekvenci *groEL* gena soja PopD u odnosu na sve ostale sekvence jer maksimalna vrednost sličnosti ovog soja sa oba soja '*Ca. P. asteris*' iznosi 95% dok kod svih ostalih testiranih sojeva ona minimalno iznosi 97%.

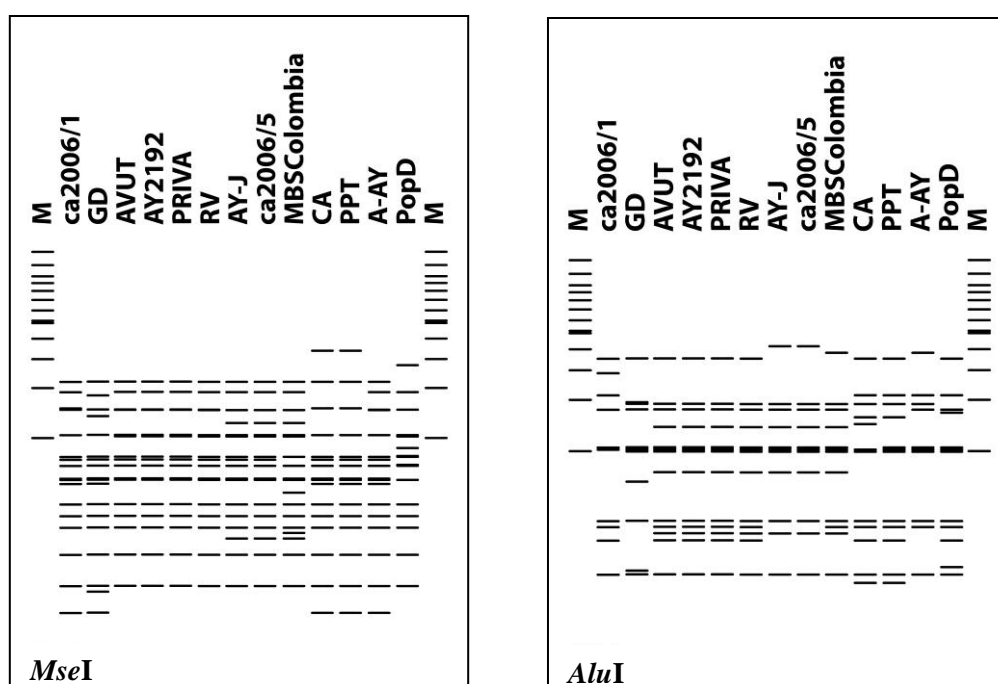
Tabela 11. Procenat sličnosti sekvenci testiranih sojeva sa sekvencama *groEL* gena pet kompletno sekvenciranih genoma (fitoplazme i *Acholeplasma laidlawii*)

Oznaka soja	' <i>Ca. P. asteris</i> ' AYWB (CP000061) %	' <i>Ca. P. asteris</i> ' OY-M (AP006628) %	' <i>Ca. P.</i> <i>australiense</i> ' (AM422018) %	' <i>Ca. P. mali</i> ' (CU469464) %	<i>Acholeplasma</i> <i>laidlawii</i> (CP000896) %
CHRYM	99	97	80	76	69
ca2006/1	99	97	80	76	69
PVM	99	97	80	76	69
NJ-AY	100	97	80	76	69
GD	98	98	80	77	69
AVUT	97	99	80	77	69
AY2192	97	99	80	77	69
PRIVA	97	99	80	77	69
AY-W	97	99	80	77	69
DIV	97	99	80	77	69
PrG	97	99	80	77	69
PYR	97	99	80	77	69
RV	97	99	80	77	69
GLAWC	97	99	80	77	69
NA	97	99	80	77	69
SAY	97	99	80	77	69
ca2006/9	97	99	80	77	69
AY-27	97	99	80	77	69
AY-J	97	99	80	77	69
ca2006/5	97	99	80	77	69
MBSColombia	97	99	80	77	69
CA	98	98	80	76	69
LEO	98	98	80	76	69
PPT	98	98	80	76	69
KVF	98	98	80	76	69
AY-A	98	97	80	76	69
PopD	94	95	81	81	69

Radi provere dobijenih realnih RFLP profila i podele na *groEL*I podgrupe u odnosu na njih, urađena je *in silico* analiza na osnovu dobijenih sekvenci referentnih sojeva i generisani su virtuelni RFLP profili sa *MseI* (*TruII*) i *AluI* restrikcijom enzima u programu pDRAW32 (Slika 20). Takođe su u ovom programu napravljene restrikcione mape ostalih 15 enzima koji se upotrebljavaju pri identifikaciji svih fitoplazmi, kao i onih koji se upotrebljavaju pri analizi *tuf*, *rp* i *secY* gena po literaturnim podacima.

Na osnovu napravljenih restrikcijom mapa ukupno 19 enzima (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MboII*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *Tsp509I* i *TaqI*) uočeno je da restrikcijom enzimi *BamHI*, *BstUI*, *EcoRI*,

*HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *SspI* i *TaqI* nemaju nijedno restrikciono mesto, a da *BfaI*, *DraI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaI*, *MboI* i *MboII* imaju između 0 i 4 restrikciona mesta u zavisnosti od soja i enzima. Enzimi sa većim brojem restrikcionih mesta su *RsaI* (od 5 do 8), *AluI* (od 10 do 13), *MseI* (od 17 do 22) i *Tsp509I* (od 25 do 28). Od ova poslednja četiri enzima, *AluI*, *MseI* i *Tsp509I* enzimi su se pokazali kao najinformativniji, međutim enzim *Tsp509I* ima veliki broj fragmenata veličine od 5 do 136 bp, pa u realnom gelu razlike ne bi bile vidljive.

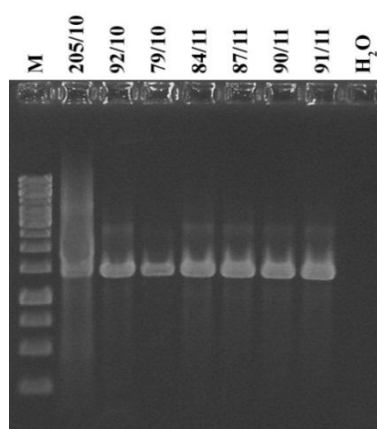


Slika 20. Prikaz dobijenih virtuelnih RFLP profila amplicona AYgroelF/R digeriranih pomoću *MseI* (*TruII*) i *AluI* restrikcioničkih enzima razdvojenih u 2% gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker NEB 100bp, veličine fragmenata u bp od vrha su: 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 517, 500, 400, 300, 200 i 100.

Na osnovu generisanih *AluI* i *MseI* (*TruII*) RFLP profila potvrđeno je da postoji devet groELI podgrupa i da kod soja MBSColumbia u *TruII* RFLP profilu postoji bend veličine 47 bp koji je slabo uočljiv u realnom RFLP profilu, kao i da postoji razlika u *AluI* RFLP profilima između soja AY-A i sojeva KVF i PPT gde je najviši bend veličine 381 bp odnosno 351 bp.

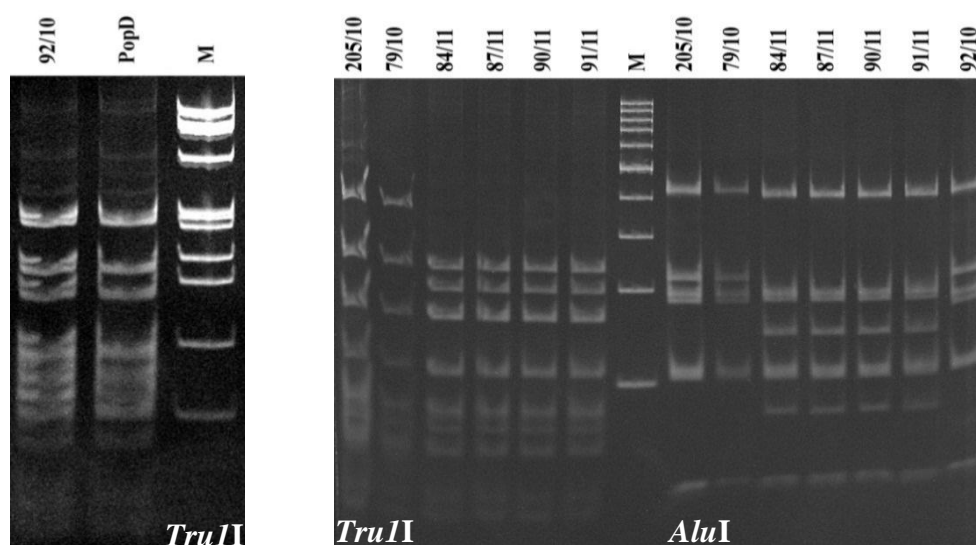
#### 4.3.2. Ostali sojevi Aster yellows fitoplazmi poreklom iz Srbije

Nakon definisanja metode na referentnim uzorcima, *groEL* gen je analiziran kod novodetektovanih sojeva AY fitoplazmi iz Srbije. Po već definisanom protokolu koristeći AYgroesF/AYampR prajmere u direktnoj PCR reakciji koju je pratila *nested* PCR reakcija sa AYgroelF/R prajmerima, uspešno je umnožen *groEL* gen kod sedam sojeva fitoplazmi izolovanih iz biljaka vinke i topole poreklom iz Srbije (Slika 21). Nakon PCR reakcije urađena je analiza dobijenih amplikona RFLP metodom sa *TruII* i *AluI* restrikcionim enzimima (Slika 22).



Slika 21. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYgroelF/R dobijenih u direktnoj (sojevi 79/10, 84/11, 87/11, 90/11 i 91/11) ili *nested* (sojevi 205/10 i 92/10) PCR reakciji. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 57).

Soj 92/10 se po svojim *TruII* i *AluI* RFLP profilima nije razlikovao od soja PopD, koji je pripadnik podgrupe 16SrI-P, tako da je on klasifikovan kao pripadnik podgrupe groELI-IX. Sojevi 79/10 i 205/10 (podgrupa 16SrI-C) su imali *TruII* RFLP profil 4, a *AluI* RFLP profil 5 kao i sojevi KVF i PPT, pa su ova dva soja definisana kao pripadnici podgrupe groELI-VII. Sojevi 84/11, 87/11, 90/11 i 91/11 (podgrupa 16SrI-B) su imali *TruII* i *AluI* RFLP profil 1 kao i većina referentnih sojeva iz ove podgrupe, i stoga su ova četiri soja definisana kao pripadnici podgrupe groELI-III (Slika 22, Tabela 9).



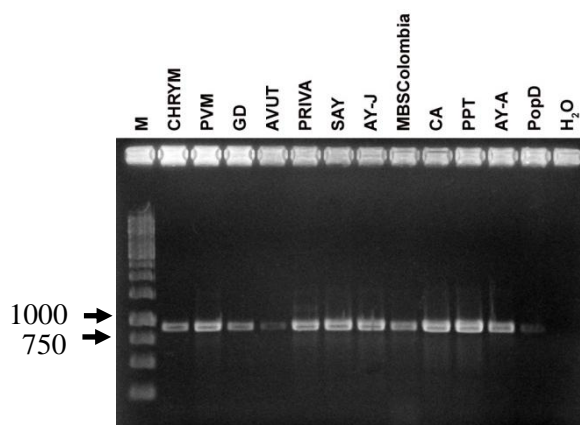
Slika 22. Prikaz digeriranih amplikona AYgroelF/R pomoću restrikcioni enzima *TruII* i *AluI* razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M (levo), marker PhiX174 (videti Sliku 13 sa strane 57); M (desno), marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59).

#### 4.4. ANALIZA OSTALIH GENA KOD ASTER YELLOWS FITOPLAZMI

Radi određivanja nivoa diferencijacije *groEL* gena, urađena je analiza *tuf*, *rp* i *secY* gena koji se po literaturnim podacima već koriste kao dodatni molekularni markeri za diferencijaciju fitoplazmi, a potom su upoređeni dobijeni podaci. Analiza ovih gena je urađena kod 22 odabrana soja od 34 testirana soja (kako referentnih tako i soja poreklom iz Srbije). Sojevi su odabrani tako da predstavljaju po jednu groELI podgrupu kao i da pripadaju svakoj od testiranih 16SrI podgrupa. Tako su u analizu *tuf*, *rp* i *secY* gena uključeni sojevi CHRYM, ca2006/1, PVM, NJ-AY, GD, AVUT, AY2192, PRIVA, PrG, RV, SAY, ca2006/9, AY-J, ca2006/5, MBSColumbia, CA, LEO, KVF, PPT, AY-A, PopD i 92/10.

##### 4.4.1. Analiza *tuf* gena kod Aster yellows fitoplazmi

Kod sva 34 testirana soja uspešno je umnožen *tuf* gen (gen faktora elongacije EF-Tu) u direktnoj PCR reakciji korišćenjem prajmera f/rTufAy jer je došlo do umnožavanja fragmenta veličine oko 950 bp što odgovara literaturnim podacima (Slika 23).



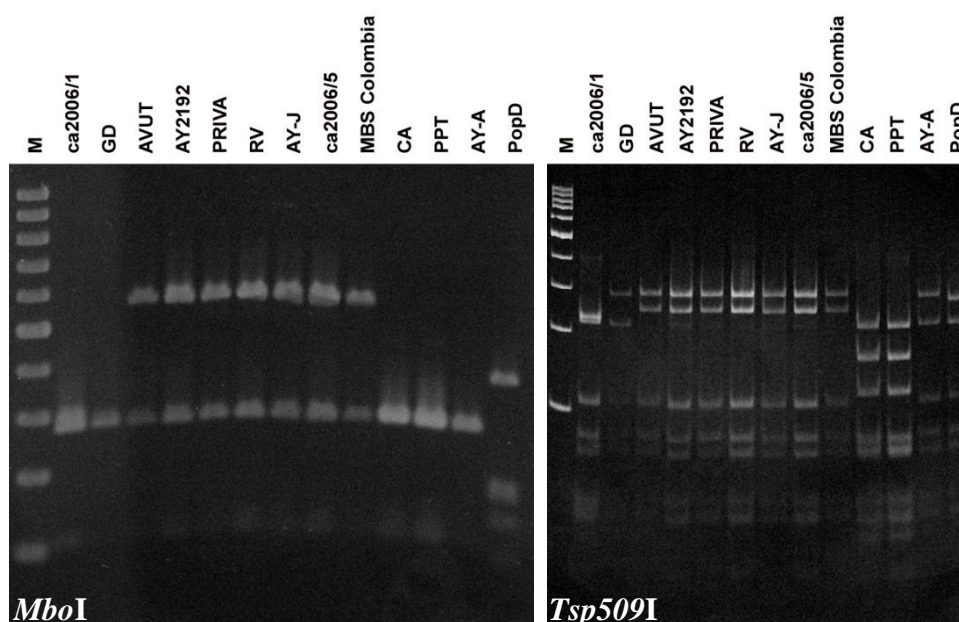
Slika 23. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima *f/rTufAy* dobijenih u direktnoj PCR reakciji. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 57).

Nakon uspešnog umnožavanja kod svih sojeva, dobijeni fragmenti 22 odabrana soja su analizirani RFLP metodom koristeći *MboI*, *Tsp509I* i *TruII* restrikcione enzime (Slike 24 i 25). Enzim *MboI* je odabran na osnovu literaturnih podataka (enzim *MboI* je izošizomer enzima *Sau3AI* već korišćenog za diferencijaciju drugih sojeva AY fitoplazmi na osnovu *f/rTufAy* amplikona, **Marcone i sar., 2000**), dok su enzimi *Tsp509I* i *TruII* odabrani na osnovu *in silico* analize (odrađene u pDRAW32 programu) javno dostupnih sekvenci *tuf* gena sedam sojeva korišćenih u ovom doktoratu (Tabela 12).

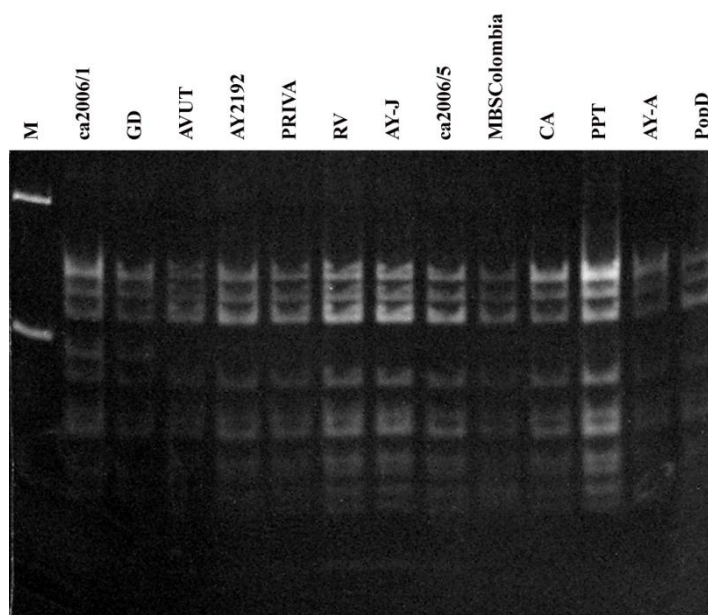
Analizom dobijenih RFLP profila uočava se da se upotrebom *MboI* i *Tsp509I* restrikcionih enzima razlikuju četiri tipa, a upotrebom *TruII* dva tipa profila. Kao i kod analize *groEL* gena, soj GD se po dobijenim *tuf* RFLP profilima razlikuje od ostalih pripadnika podgrupe 16SrI-A bilo upotrebom *MboI* bilo *Tsp509I* restrikcionog enzima, pri čemu je *Tsp509I* RFLP profil ovog soja identičan RFLP profilima sojeva AY-A i PopD. Sa druge strane, pripadnici podgrupa 16SrI-M, I-L i I-B imaju identične RFLP profile nakon upotrebe bilo kog od tri navedena enzima. Svi pripadnici podgrupe 16SrI-C imaju međusobno identične *MboI*, *Tsp509I* i *TruII* RFLP profile, dok je sojeve AY-A i PopD moguće međusobno razlikovati upotrebom *MboI* enzima što nije moguće pomoću enzima *Tsp509I* (Slika 24). S obzirom na to da sojevi GD i AY-A imaju identične *MboI* i *Tsp509I* RFLP profile, uvođenjem restrikcionog enzima *TruII* moguće je razlikovati ova dva soja jer upotrebom ovog enzima svi pripadnici podgrupe 16SrI-A



imaju isti profil koji se razlikuje od drugog profila koji imaju svi ostali testirani sojevi koji su pripadnici podgrupa 16SrI-B, I-C, I-F i I-P (Slika 25).



Slika 24. Prikaz digeriranih amplicona *f/rTufAy* pomoću restriktionih enzima *MboI* razdvojenih u 2% agaroznom gelu (levo) i *Tsp509I* u 6% poliakrilamidnom gelu (desno). Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59).



Slika 25. Prikaz digeriranih amplicona *f/rTufAy* pomoću restriktionog enzima *TruII* razdvojenih u 6% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 100 bp, veličine fragmenata od vrha su 200 i 100 bp.

Kada se uporede svi dobijeni RFLP profili, moguće je testirane sojeve klasifikovati u šest tufI podgrupa. Tako su sojevi CHRYM, ca2006/1, PVM i NJ-AY klasifikovani kao propadnici podgrupe tufI-A, soj GD kao pripadnik tufI-M, sojevi AVUT, AY2192, PRIVA, PrG, RV, SAY, ca2006/9, AY-J, ca2006/5 i MBSColombia kao pripadnici podgrupe tufI-B, sojevi CA, LEO, KVF i PPT kao pripadnici podgrupe tufI-C, soj AY-A kao pripadnik podgrupe tufI-E, a sojevi PopD i 92/10 kao pripadnici podgrupe tufI-O (Tabela 12). Ovim je pokazano da su novodobijeni rezultati u skladu sa rezultatima preuzetim iz literature.

Tabela 12. Podela sojeva na osnovu RFLP profila f/rTufAy amprikona sa *MboI*, *Tsp509I* i *TruII* restrikcijom i pristupni brojevi *tuf* sekvenci

Oznaka soja	Pristupni broj sekvence <i>tuf</i> gena	Dužina sekvence u bp	Literaturni podaci o podeli na podgrupe u odnosu na <i>tuf</i> gen	RFLP profili f/rTufAy amprikona			Podela na <i>tuf</i> podgrupu (tufI-)
				<i>MboI</i>	<i>Tsp509I</i>	<i>TruII</i>	
CHRYM	/	/	A	a	a	a	A
ca2006/1	/	/	A	a	a	a	
PVM	AJ271321	1083	A	a	a	a	
NJ-AY	/	/	A	a	a	a	
GD	KC354601 <sup>#</sup>	899	/	c	d	a	M
AVUT	AJ271307	1083	B	b	b	b	B
AY2192	AJ271306	1083	B	b	b	b	
PRIVA	AJ271320	1083	B	b	b	b	
PrG	/	/	/	b	b	b	
RV	/	/	B	b	b	b	
SAY	AJ271323	1083	B	b	b	b	
ca2006/9	KC354602 <sup>#</sup>	902	B	b	b	b	
AY-J	/	/	/	b	b	b	
ca2006/5	KC354603 <sup>#</sup>	902	B	b	b	b	
MBSColombia	KC354604 <sup>#</sup>	902	B	b	b	b	
CA	KC354605 <sup>#</sup>	902	/	c	c	b	C
LEO	/	/	/	c	c	b	
KVF	AJ271317	1083	C	c	c	b	
PPT	/	/	C	c	c	b	
AY-A	AJ271308	1083	E	c	d	b	E
PopD	KC354606 <sup>#</sup>	906	/	g	d	b	O
92/10	/	/	/	g	d	b	

<sup>#</sup>- sekvence dobijene kao rezultat ove doktorske teze

Upotrebom *MboI*, *Tsp509I* i *TruII* restrikcionih enzima na dobijene *f/rTufAy* amplikone i analizom dobijenih RFLP profila, podgrupa 16SrI-A je dalje diferencirana u dve *tufI* podgrupe, dok podgrupe 16SrI-B, I-M i I-L nisu pokazale nikakve međusobne razlike, što je potvrđeno poređenjem njihovih *tuf* sekvenci. Podgrupe 16SrI-C, I-F i I-P se razlikuju od ostalih podgrupa i na nivou *tuf* gena, kao i na nivou 16S rDNK (Tabela 13).

Tabela 13. Kratak pregled podele na *tufI* podgrupe u odnosu na 16SrI podgrupe na osnovu *MboI*, *Tsp509I* i *TruII* restrikcionih enzima

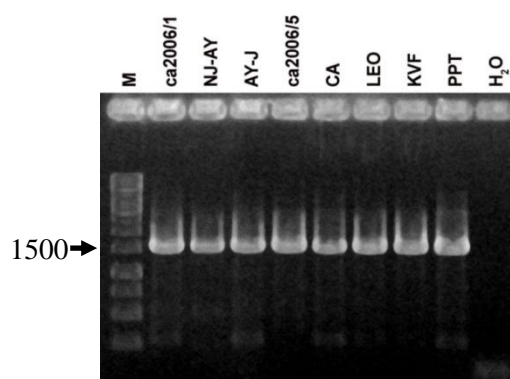
16SrI-	A	A	B	M	L	C	F	P
<i>MboI</i>	a	c	b	b	b	c	c	g
<i>Tsp509I</i>	a	d	b	b	b	c	d	d
<i>TruII</i>	a	a	b	b	b	b	b	b
<i>tufI</i> -	A	M	B	B	B	C	E	O

Radi potvrde rezultata dobijenih RFLP metodom i tačnije filogenetske analize, *f/rTufAy* amplikoni sojeva GD, ca2006/9, ca2006/5, MBSColumbia, CA i PopD su prečišćeni i poslani na sekvenciranje. Nakon obrade sekvenci one su deponovane u NCBI Banku gena pod pristupnim brojevima prikazanim u Tabeli 12.

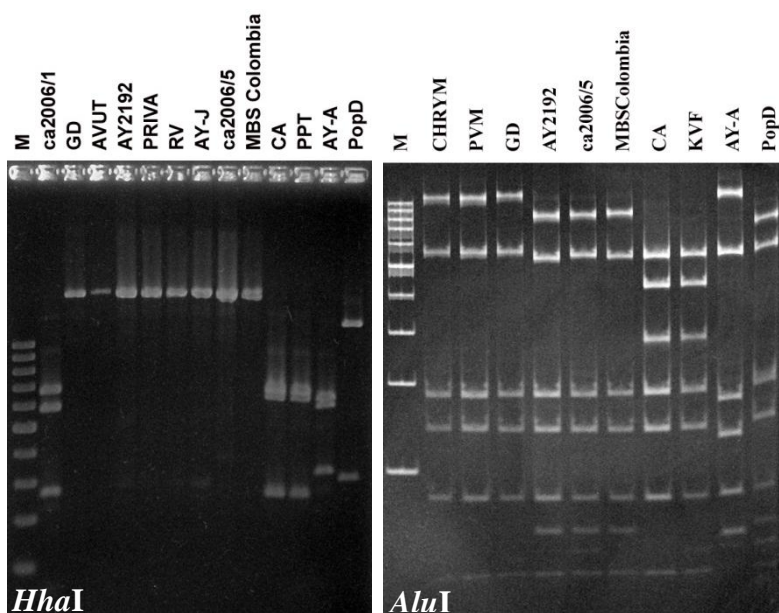
#### 4.4.2. Analiza *rp* gena kod Aster yellows fitoplazmi

Nakon upotrebe *rpL2F3/rp(I)R1A* para prajmera u direktnoj PCR reakciji, kod sva 34 testirana soja došlo je do umnožavanja fragmenta veličine oko 1600 bp, što odgovara očekivanoj veličini ovog amplikona (Slika 26). Na ovaj način su umnoženi sledeći geni: 3' deo *rplB*, ceo *rpsS*, *rplV* i skoro ceo *rpsC*.

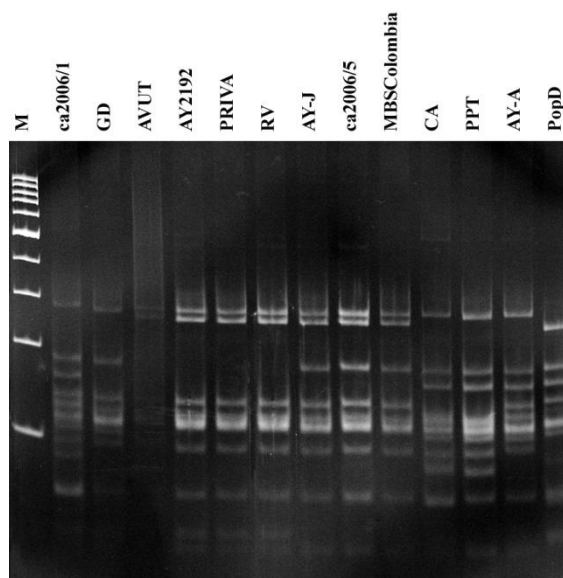
Primenom RFLP metode na 22 odabrana soja pomoću *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* restrikcionih enzima na dobijene *rpL2F3/rp(I)R1A* amplikone (Slike 27 i 28) moguće je razlikovati sedam *rpI* podgrupa (Tabela 14). Ovi enzimi su odabrani na osnovu podataka iz literature i *in silico* analize (odrađene u pDRAW32 programu) javno dostupnih sekvenci *rp* gena osam sojeva korišćenih u ovom doktoratu (Tabela 14).



Slika 26. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima rpL2F3/rp(I)R1A dobijenih u direktnoj PCR reakciji. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 57).



Slika 27. Prikaz digeriranih amplikona rpL2F3/rp(I)R1A pomoću restrikcionih enzima *HhaI* razdvojenih u 1% agaroznom gelu (levo) i *AluI* u 6% poliakrilamidnom gelu (desno). Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59).



Slika 28. Prikaz digeriranih amplikona rpL2F3/rp(I)R1A pomoću restrikcionog enzima *Tsp509I* razdvojenih u 6% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59).

Upotrebom *HhaI* i *AluI* restrikcionih enzima na rpL2F3/rp(I)R1A amplikone razlikuje se po pet tipova profila, dok se upotrebom *Tsp509I* razlikuje sedam. Analizom dobijenih RFLP profila uočava se da je sa jedne strane moguće razlikovati soj GD od ostalih koji su pripadnici 16SrI-A podgrupe upotrebom *HhaI* i *Tsp509I* restrikcionih enzima, što nije moguće upotrebom *AluI* enzima. Upotrebom *Tsp509I* restrikcionog enzima moguće je razlikovati sojeve ca2006/5, AY-J i MBSColumbia od ostalih pripadnika podgrupe I-B, dok sa druge strane nije moguće razlikovati podgrupe 16SrI-M, I-L od ostalih sojeva podgrupe I-B jer imaju identične *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* restrikcione profile. Podgrupe 16SrI-C, I-F i I-P razlikuju se od ostalih upotrebom sva tri restrikciona enzima kao i na nivou 16S rDNK. Na osnovu ovih podataka sojevi CHRYM, ca2006/1, PVM i NJ-AY su klasifikovani kao pripadnici podgrupe rpI-A, dok je soj GD klasifikovan kao pripadnik podgrupe rpI-M. Sojevi AVUT, AY2192, PRIVA, PrG, RV, SAY i ca2006/9 koji su pripadnici 16SrI-M, I-L i I-B podgrupa su klasifikovani kao podgrupa rpI-B, dok su sojevi AY-J, ca2006/5 i MBSColumbia koji takođe pripadaju podgrupi I-B klasifikovani kao podgrupa rpI-L. Svi sojevi iz podgrupe 16SrI-C nisu se razlikovali ni u jednom od upotrebljenih restrikcionih enzima, pa su svi klasifikovani kao podgrupa rpI-C. Soj AY-A je imao jedinstvene *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* restrikcione profile i klasifikovan je kao rpI-N. Sojevi PopD i 92/10 koji su pripadnici

podgrupe 16SrI-P su imali međusobno identične profile koji su se jasno razlikovali od svih ostalih profila primenom sva tri restrikciona enzima, pa su klasifikovani kao podgrupa rpI-O (Tabela 14).

Upotrebom *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* restrikcioni enzima na dobijene rpL2F3/rp(I)R1A amplikone i analizom dobijenih RFLP profila razlikuje se ukupno sedam rpI podgrupa, pri čemu su podgrupe 16SrI-A i I-B dalje diferencirane u dve rpI podgrupe, dok podgrupe 16SrI-M i I-L nisu pokazale nikakve razlike u odnosu na jedan deo podgrupe I-B (Tabela 15). Podgrupe 16SrI-C, I-F i I-P se razlikuju od ostalih podgrupa i na nivou *rp* gena kao i na nivou 16S rDNK.

Tabela 14. Podela sojeva na osnovu RFLP profila rpL2F3/rp(I)R1A amplikona sa *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* restrikcioni enzimima i pristupni brojevi *rp* sekvenci

Oznaka soja	Pristupni broj sekvence <i>rp</i> gena	Dužina sekvence u bp	Literaturni podaci o podeli na podgrupe u odnosu na <i>rp</i> gen	RFLP profili f/rTufAy amplikona			Podela na <i>rp</i> podgrupu (rpI-)
				<i>HhaI</i>	<i>AluI</i>	<i>Tsp509I</i>	
CHRYM	/	/	A	a	a	a	A
ca2006/1	EU215428	1137	A	a	a	a	
PVM	AY264867	1174	A	a	a	a	
NJ-AY	/	/	A	a	a	a	
GD	AY264864	1174	M	b	a	f	M
AVUT	AY264855	1174	B	b	b	b	B
AY2192	AY183708	1240	B	b	b	b	
PRIVA	/	/	B	b	b	b	
PrG	/	/	/	b	b	b	
RV	/	/	/	b	b	b	
SAY	/	/	B	b	b	b	
ca2006/9	EU215430	1132	B	b	b	b	
AY-J	/	/	/	b	b	g	L
ca2006/5	EU215429	1123	/	b	b	g	
MBSColombia	AY264858	1174	L	b	b	g	
CA	KC354607 <sup>#</sup>	1458	/	c	c	c	C
LEO	/	/	/	c	c	c	
KVF	KC354608 <sup>#</sup>	1458	/	c	c	c	
PPT	/	/	/	c	c	c	
AY-A	AY264866	1174	N	d	d	d	N
PopD	KC354609 <sup>#</sup>	1454	/	e	e	e	O
92/10	/	/	/	e	e	e	

<sup>#</sup>- sekvence dobijene kao rezultat ove doktorske teze

Tabela 15. Kratak pregled podele na rpl podgrupe u odnosu na 16SrI podgrupu na osnovu *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* restrikcionih enzima

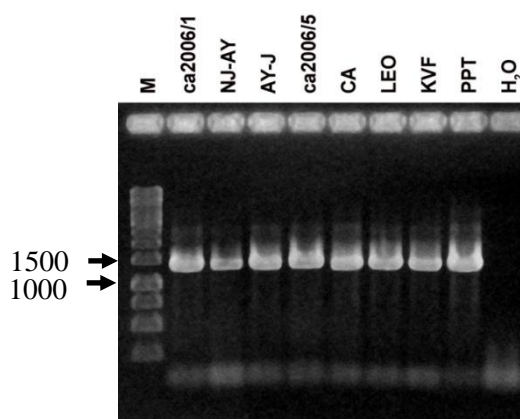
16SrI-	A	A	B	B	M	L	C	F	P
<i>HhaI</i>	a	b	b	b	b	b	c	d	e
<i>AluI</i>	a	a	b	b	b	b	c	d	e
<i>Tsp509I</i>	a	f	b	g	b	b	c	d	e
rpl-	A	M	B	L	B	B	C	N	O

Radi potvrde rezultata dobijenih RFLP metodom i tačnije filogenetske analize, rpl2F3/rp(I)R1A amplikoni sojeva CA, KVF i PopD su prečišćeni i poslani na sekvenciranje. Nakon dobijanja i obrade sekvenci one su deponovane u NCBI Banku gena pod pristupnim brojevima prikazanim u Tabeli 14.

#### 4.4.3. Analiza *secY* gena kod Aster yellows fitoplazmi

Gen *secY* je nakon direktne PCR reakcije sa AYsecYF1/R1 parom prajmera umnožen kod sva 34 testirana soja jer je došlo do pojave fragmenata veličine oko 1400 bp (Slika 29) što je i očekivana veličina ovog regiona. Jedino su se kod sojeva PopD i 92/10 pojavili i slabo vidljivi dodatno umnoženi nespecifični fragmenti veličine oko 1200 bp koji su se nalazili neposredno ispod željenog fragmenta.

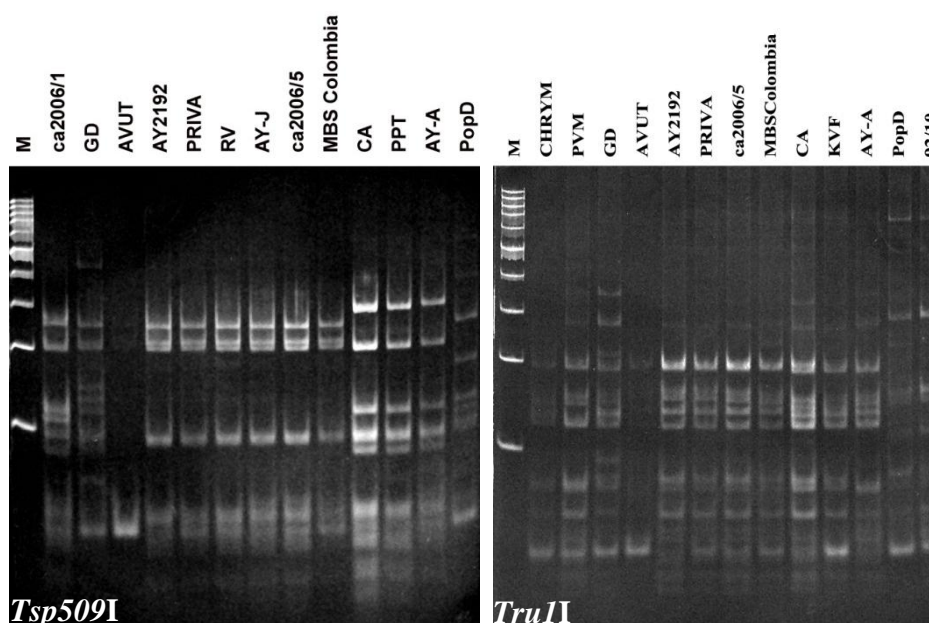
Nakon RFLP analize AYsecYF1/R1 amplikona 22 odabrana soja pomoću *Tsp509I* i *TruI* restrikcionih enzima (Slika 30), testirani sojevi su podeljeni u sedam *secYI* podgrupa (Tabela 16). Ovi enzimi su odabrani za analizu nakon generisanja virtuelnih RFLP profila pomoću javno dostupnih sekvenci *secY* gena osam sojeva korišćenih u ovoj doktorskoj tezi (Tabela 16).



Slika 29. Prikaz amplicona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima AYsecYF1/R1 dobijenih u direktnoj PCR reakciji. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 57).

Upotrebom oba restrikciona enzima, *Tsp509I* i *TruII*, na AYsecYF1/R1 amplicone moguće je razlikovati soj GD od ostalih sojeva koji su pripadnici 16SrI-A podgrupe, dok upotrebom ovih enzima nije moguće razlikovati pripadnike podgrupa 16SrI-M i I-L od pripadnika 16SrI-B. Međutim, poređenjem dobijenih *Tsp509I* restrikcioničkih profila uočava se razlika između soja MBSColumbia i ostalih pripadnika kako podgrupa 16SrI-M i I-L tako i 16SrI-B podgrupe. Pripadnike podgrupe 16SrI-F je moguće razlikovati od pripadnika drugih podgrupa upotrebom *TruII* restrikcionog enzima, dok to nije moguće upotrebom *Tsp509I* restrikcionog enzima pošto pripadnici ove podgrupe imaju identičan *Tsp509I* restrikcionički profil kao i pripadnici podgrupe 16SrI-C. Upotrebom bilo kog od ova dva restrikciona enzima moguće je razlikovati pripadnike podgrupe 16SrI-P od svih ostalih sojeva jer imaju vidljivo drugačije RFLP profile.





Slika 30. Prikaz digeriranih amplikona AYsecYF1/R1 pomoću restrikcioni enzima *Tsp509I* i *TruII* razdvojenih u 6% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 8. M, marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59).

Na osnovu ovih podataka sojevi CHRYM, ca2006/1, PVM i NJ-AY su klasifikovani kao pripadnici podgrupe secYI-A, dok je soj GD klasifikovan kao pripadnik podgrupe secYI-M. Sojevi AVUT, AY2192, PRIVA, PrG, RV, SAY, ca2006/9, AY-J i ca2006/5 koji su pripadnici 16SrI-M, I-L i I-B podgrupa su klasifikovani kao podgrupa secYI-B, dok je soj MBSColombia (16SrI-B) klasifikovan kao podgrupa secYI-L. Svi sojevi iz podgrupe 16SrI-C su klasifikovani kao podgrupa secYI-C, dok je soj AY-A klasifikovan kao secYI-N. Sojevi PopD i 92/10 su imali međusobno identične profile a različite od svih ostalih pa su klasifikovani kao podgrupa secYI-O (Tabela 16).

Upotrebom *Tsp509I* i *TruII* restrikcioni enzima na dobijene AYsecYF1/R1 amplikone i analizom dobijenih RFLP profila, podgrupe 16SrI-A i I-B su dalje diferencirane u po dve secYI podgrupe, dok podgrupe 16SrI-M i I-L nisu pokazale nikakve međusobne razlike u odnosu na jedan deo podgrupe 16SrI-B (Tabela 17). Podgrupe 16SrI-C, I-F i I-P se razlikuju od ostalih i na nivou *secY* gena kao i na nivou 16S rDNK.

Tabela 16. Podela sojeva na osnovu RFLP profila AYsecYF1/R1 amplikona sa *Tsp509I* i *TruII* restrikcionim enzimima i pristupni brojevi *secY* sekvenci

Oznaka soja	Pristupni broj sekvence <i>secY</i> gena	Dužina sekvence u bp	Literaturni podaci o podeli na podgrupe u odnosu na <i>secY</i> gen	RFLP profili AYsecYF1/R1 amplikona		Podela na <i>secY</i> podgrupu ( <i>secYI</i> -)
				<i>Tsp509I</i>	<i>TruII</i>	
CHRYM	AY803170	1358	A	a	a	A
ca2006/1	/	/	/	a	a	
PVM	AY803185	1358	A	a	a	
NJ-AY	GU004345	2833	/	a	a	
GD	AY803171	1358	M	f	h	M
AVUT	AY803168	1358	B	b	b*	B
AY2192	AY803167	1358	B	b	b	
PRIVA	/	/	/	b	b	
PrG	/	/	/	b	b	
RV	/	/	/	b	b	
SAY	/	/	/	b	b	
ca2006/9	KC354610 <sup>#</sup>	1287	/	b	b	
AY-J	/	/	/	b	b	
ca2006/5	KC354611 <sup>#</sup>	1287	/	b	b	
MBSColombia	AY803175 GU004341	1358 2833	L	g	b*	L
CA	KC354612 <sup>#</sup>	1276	/	c	c*	C
LEO	/	/	/	c	c	
KVF	KC354613 <sup>#</sup>	1273	/	c	c	
PPT	/	/	/	c	c	
AY-A	AY803166	1358	N	c*	f**	N
PopD	KC354614 <sup>#</sup>	995	/	e	g	O
92/10	/	/	/	e	g	

<sup>#</sup>- sekvence dobijene kao rezultat ove doktorske teze; \*- profil potvrđen u virtuelnoj RFLP analizi; \*\*- postoji slabo vidljiva razlika u profilu koja je potvrđena u virtuelnoj RFLP analizi

Radi potvrde rezultata dobijenih RFLP metodom i tačnije filogenetske analize, AYsecYF1/R1 amplikoni sojeva ca2006/5, ca2006/9, CA, KVF i PopD su prečišćeni i poslani na sekvenciranje. Nakon dobijanja i obrade sekvenci one su deponovane u NCBI Banku gena pod pristupnim brojevima prikazanim u Tabeli 16.

Tabela 17. Kratak pregled podele na *secYI* podgrupe u odnosu na 16SrI podgrupe na osnovu *Tsp509I* i *TruII* restrikcionih enzima

16SrI-	A	A	B	B	M	L	C	F	P
<i>Tsp509I</i>	a	f	b	g	b	b	c	c	e
<i>TruII</i>	a	h	b	b	b	b	c	f	g
<i>secYI</i> -	A	M	B	G	B	B	C	N	O

#### 4.5. STOLBUR FITOPLAZME

##### 4.5.1. Detekcija i identifikacija Stolbur fitoplazmi

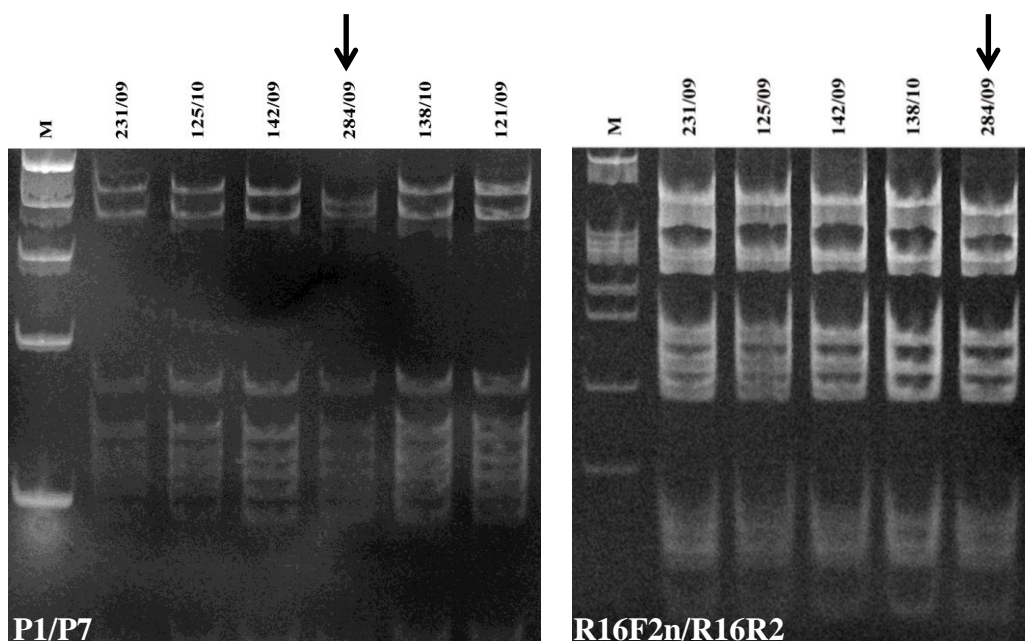
Tokom 2009, 2010. i 2011. godine u Srbiji su uzorkovane biljke iz devet biljnih vrsta sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi. Nakon izolacije DNK i detekcije fitoplazmi uz pomoć P1/P7, odnosno R16F2n/R16R2 para prajmera u direktnoj ili *nested* PCR reakciji, u 116 uzoraka je dokazano prisustvo fitoplazmi pojavom fragmenta veličine 1800 bp odnosno 1200 bp (Tabela 18).

Nakon RFLP analize pomoću *TruII* restrikcionog enzima na R16F2n/R16R2 amplikone, dobijeni su profili koji poređenjem sa podacima iz literature klasifikuju sve detektovane fitoplazme kao pripadnike 16SrXII grupe odnosno kao Stolbur fitoplazme. Svi detektovani sojevi su imali identičan *TruII* RFLP profil, osim soja 284/09 poreklom sa duvana čiji se profil nešto razlikovao od ostalih kako nakon digestije P1/P7, tako i nakon digestije R16F2n/R16R2 amplikona (Slika 31).

Da bi se potvrdilo postojanje ove razlike soja 284/09, ponovo je urađena izolacija DNK iz istog uzorka, umnožen 16S rRNK gen prajmerima P1/P7, a dobijeni amplikon digeriran *TruII* restrikcionim enzimom. Novodobijeni restrikcioni profil se i ovog puta razlikovao od svih ostalih, a bio je identičan sa prethodno dobijenim profilom ovog soja.

Da bi se proverio stepen varijabilnosti 16S rRNK gena kod Stolbur fitoplazmi, odabrano je 10 sojeva čiji su P1/P7 amplikoni prečišćeni i sekvencirani (Tabela 18). Među odabranim sojevima se nalazio i soj 284/09. Nakon obrade dobijenih sekvenci, njihovog poravnanja i međusobnog poređenja, uočeno je da su sekvence 16S rDNK identične kod svih osim kod soja 284/09, kao i da soj 99/10, poreklom sa ljute papričice,

ima jedno nukleotidno mesto koje može biti pokazatelj postojanja razlika između dva operona 16S rDNK.

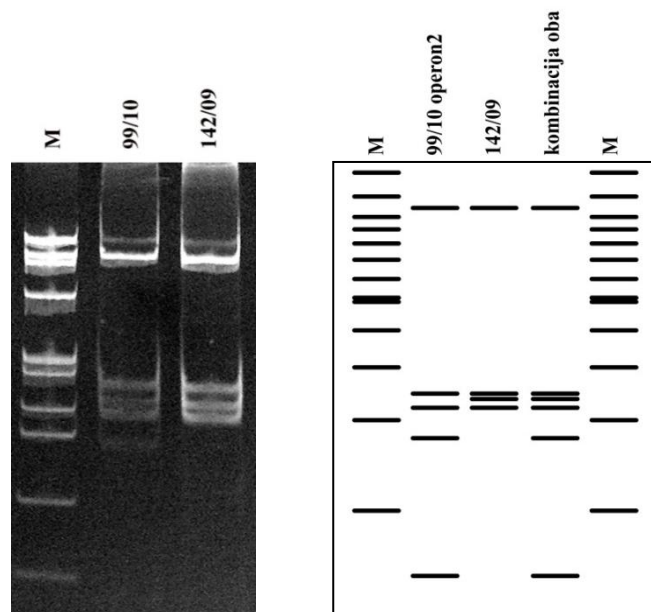


Slika 31. Prikaz digeriranih amplikona P1/P7 (levo) i R16F2n/R16R2 (desno) pomoću restriktionog enzima *TruII* razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su date u Tabeli 18. M (levo), marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59); M (desno), marker PhiX174 (videti Sliku 13 sa strane 57).

Naime, u poređenim sekvencama (gde je prvi nukleotid onaj posle prajmera P1 koji je isečen i isključen iz analize) kod soja 284/09 se na nukleotidnom mestu 196 nalazi A dok se kod svih ostalih tu nalazi nukleotid G. Postojanjem nukleotida A na ovom mestu dobija se novo restriktiono mesto za enzim *TruII* (jer su prethodna tri nukleotida TTA) što je u skladu sa dobijenim *TruII* RFLP profilima.

Kod soja 99/10 se u istim poređenim sekvencama na nukleotidnom mestu 161 nalaze i nukleotid T, kao i kod svih ostalih, ali i nukleotid C. Postojanjem nukleotida C na ovom mestu dobija se novo restriktiono mesto za enzim *MboII*. Zbog toga je urađena RFLP analiza P1/P7 amplikona sa *MboII* restriktionim enzimom da bi se potvrdilo ili odbacilo postojanje ove razlike (Slika 32). Pošto se nakon digestije dobio nešto drugačiji profil kod soja 99/10 nego kod soja 142/09 sa čijim RFLP profilom je i poređen, urađena je virtuelna analiza 16S rDNK mogućih sekvenci dva operona soja 99/10 u pDRAW32 programu. Napravljen je virtuelni *MboII* RFLP profil mogućeg

operona2 kod soja 99/10 i operona1 koji odgovara sekvenci 16S rDNK ostalih sojeva Stolbur fitoplazmi. Potom su ova dva dobijena profila spojena u jedan zajednički (Slika 32) da bi se dobila moguća slika realnog RFLP profila. Poređenjem dobijenog realnog RFLP profila kod soja 99/10 i virtuelnog nastalog kombinacijom moguća dva operona, vidi se da su dobijeni profili identični što potvrđuje da kod soja 99/10 postoji realna razlika između dva 16S rDNK operona.



Slika 32. Prikaz digeriranih amplicona P1/P7 pomoću restrikcionog enzima *MboII* razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu (levo) i u 2% virtuelnom gelu (desno). Oznake sojeva su date u Tabeli 18. M (levo), marker PhiX174 (videti Sliku 13 sa strane 57); M (desno), marker NEB 100 bp (videti Sliku 20 sa strane 71).

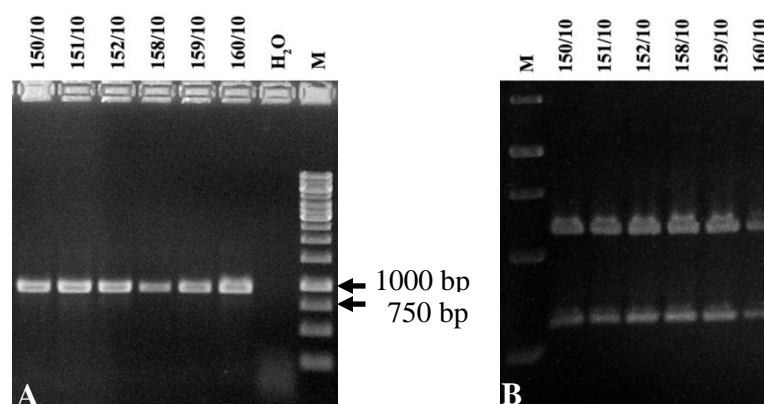
Oba varijabilna nukleotidna mesta, i kod soja 284/09 i kod soja 99/10, nalaze se u okviru R16F2n/R16R2 regiona, jer on počinje od 119. nukleotidnog mesta a varijabilna mesta su na 196. nukleotidnom mestu za soj 284/09, odnosno 161. za soj 99/10.

Od 10 sekvenciranih sojeva sekvence osam sojeva su deponovane u NCBI Banci gena pod pristupnim brojevima prikazanim u Tabeli 18 sa strane 90.

#### 4.5.2. Analiza *tuf* gena kod Stolbur fitoplazmi

Za umnožavanje *tuf* gena kod Stolbur fitoplazmi korišćen je isti par prajmera kao i za umnožavanje ovog regiona kod AY fitoplazmi, *f/rTufAy*. Uzorci koji se nisu umnožili u direktnoj PCR reakciji sa *f/rTufAy* parom prajmera podvrgnuti su *nested* PCR reakciji sa ovim parom prajmera pri čemu je tada u direktnoj PCR reakciji korišćen par prajmera *f/rTuf1*. Nakon upotrebe *f/rTufAy* para prajmera, bilo u direktnoj ili u *nested* PCR reakciji, na svih 116 uzoraka pozitivnih na prisustvo Stolbur fitoplazmi, kod 103 uzorka je došlo do pojave fragmenta veličine oko 950 bp (Slika 33, A) što je i očekivana veličina ovog regiona kod Stolbur fitoplazmi.

Na pozitivne *f/rTufAy* amplikone je urađena RFLP analiza upotrebom *HpaII* restriktionog enzima koji je prema literaturnim podacima pokazatelj varijabilnosti ovog regiona (Langer i Maixner, 2004). Nakon vizuelizacije produkata digestije, a poređenjem sa podacima iz literature, utvrđeno je da svi testirani sojevi imaju identičan *HpaII* RFLP profil koji se podudara sa profilom pripadnika *tuf* type II podgrupe (Slika 33, B).



Slika 33. Prikaz A - amplikona umnoženih prajmerima *f/rTufAy* dobijenih u direktnoj PCR reakciji i B - digeriranih amplikona *f/rTufAy* pomoću restriktionog enzima *HpaII*, vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu. Svi prikazani sojevi su poreklom sa duvana iz Bavaništa. M (levo), marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 57); M (desno), marker 100 bp (videti Sliku 15 sa strane 59, pri čemu je ovde na slici prikazano samo pet donjih fragmenata).

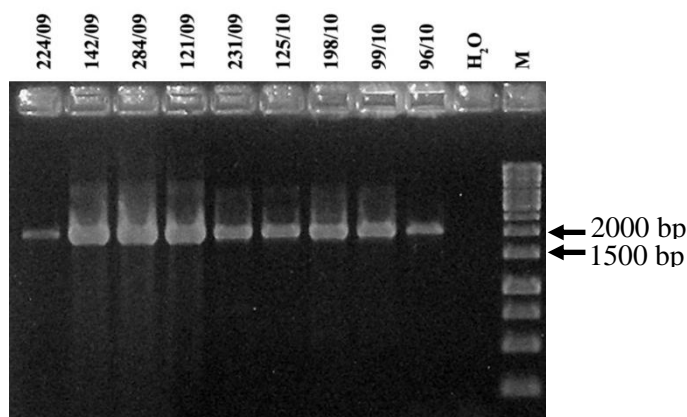
#### 4.5.3. Analiza *groEL* gena kod Stolbur fitoplazmi

Radi provere dizajniranih prajmera i pronalaženja najboljeg ciklusa za njih, urađena je preliminarna analiza upotrebom tri soja Stolbur fitoplazmi. Kod njih je

urađena PCR reakcija upotrebom STOLgroesF/STOLstampR para prajmera korišćenjem istog ciklusa kao za umnožavanje ovog regiona kod AY fitoplazmi. Nakon vizuelizacije PCR produkata uočeni su fragmenti veličine oko 2000 bp kod svih testiranih uzoraka, što odgovara veličini očekivanog fragmenta od 2024 bp. Takođe je uočeno da nije došlo do umnožavanja dodatnih nespecifičnih fragmenata, kao i da je došlo do jakog umnožavanja očekivanog fragmenta (bendovi su bili dobro vidljivi). Iz tog razloga je ovaj ciklus odabran kao najbolji za umnožavanje *groEL* gena kod Stolbur fitoplazmi kada se koriste prajmeri STOLgroesF/STOLstampR.

Od 116 pozitivnih uzoraka za dalju analizu *groEL* gena je odabrano 39 uzoraka iz Srbije sa različitih domaćina. Pošto su svi sojevi iz Srbije klasifikovani kao tuf type II podgrupa, a radi kompletnije slike o *groEL* genu kod Stolbur fitoplazmi, u analizu su uključena i dva soja Stolbur fitoplazmi iz Hrvatske poreklom sa vinove loze kao kontrolni sojevi Stolbur fitoplazmi tuf type I podgrupe (Tabela 18).

Od 41 testiranog uzorka, kod 40 uzoraka je došlo do umnožavanja očekivanog fragmenta veličine oko 2000 bp i ni ovaj put ni kod jednog uzorka nije uočeno prisustvo dodatno umnoženih fragmenata (Slika 34).



Slika 34. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima STOLgroesF/STOLstampR. Oznake sojeva su date u Tabeli 18. M, marker 1kb (videti Sliku 13 sa strane 57).

Da bi se potvrdila specifičnost dizajniranih prajmera, urađena je i PCR reakcija sa STOLgroesF/STOLstampR prajmerima na uzorke koji pripadaju drugim grupama fitoplazmi, kako onih filogenetski srodnih Stolbur fitoplazmama, tako i onih koje su udaljene. Testirano je pet uzorka sa vrste *Convolvulus arvensis* od kojih je u tri

detektovana vrsta '*Ca. P. convolvuli*', a u druga dva vrsta '*Ca. P. cynodontis*'; dva uzorka poreklom sa vrste *Cynodon dactylon* u kojima je takođe detektovana '*Ca. P. cynodontis*'; sojevi koji pripadaju AY fitoplazmama iz podgrupa I-A, I-B, I-C i I-P, kao i po dva uzorka u kojima su detektovane fitoplazme iz grupa 16SrX i 16SrV. Kao pozitivna kontrola je korišćen već pozitivan uzorak Stolbur fitoplazme poreklom sa šargarepe. Nakon vizuelizacije svi uzorci su bili negativni osim pozitivne kontrole, čime je dokazana specifičnost dizajniranih prajmera (Slika 35, A).

Tabela 18. Osnovni podaci o analiziranim Stolbur sojevima i pristupni brojevi sekvenci 16S rDNK i *groEL* gena

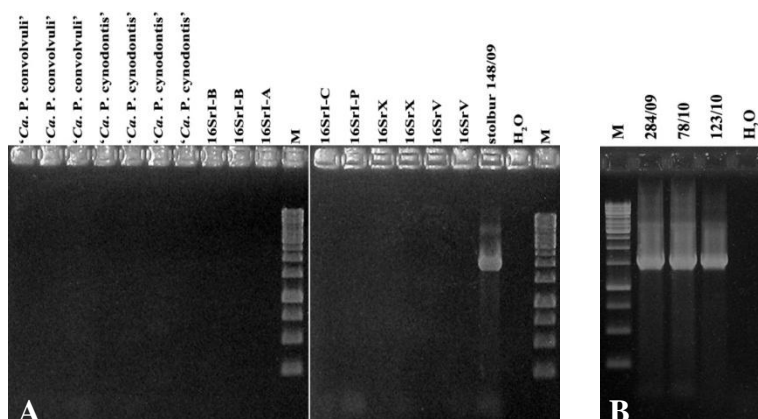
Domaćin	Lokalitet	Broj <i>groEL</i> testiranih/ pozitivnih uzoraka	Pristupni brojevi sekvenciranih sojeva		
			soj	16SrDNK (*)	<i>groEL</i> (*)
Duvan	Ečka	3/3	<b>142/09</b> <b>284/09</b>	JQ730739 (1707) JQ730740 (1706)	KC417486 <sup>#</sup> (1958) FO393427
	Bavanište	2/2	<b>159/10</b>	/	KC417488 <sup>#</sup> (1954)
	Indija	1/1	/	/	/
Šargarepa	Begeč	2/2	/	/	/
Ljuta papričica	Begeč	4/4	<b>96/10</b>	/	KC417487 <sup>#</sup> (1956)
			<b>99/10</b>	KC417485 <sup>#</sup> (1700)	KC417490 <sup>#</sup> (1907)
Paprika	Pirot	2/2	/	/	/
Kukuruz	Perlez	1/1	<b>121/09</b>	JQ730750 (1735)	/
Vinova loza	Radmilovac	2/2	/	/	/
	Bela Crkva	3/3	<b>138/10</b>	/ (1709)	/
	Krčedin	1/1	/	/	/
	Aleksandrovac	5/5	<b>125/10</b>	JQ730745 (1712)	KC417489 <sup>#</sup> (1955)
	Hrvatska	2/2	<b>SB1</b> <b>21OS</b>	/	KC477428/(1958) KC477429/(1953)
Vinka	Beograd	8/8	<b>198/10</b>	JQ730743 (1645)	/
			<b>204/10</b>	/ (1687)	/
Peršun	Pančevo	3/3	<b>231/09</b>	JQ730741 (1707)	FO393428
Valerijana	Pančevo	1/1	<b>224/09</b>	JQ730742 (1690)	/
<b>UKUPNO</b>		<b>41/41</b>	/	<b>10</b>	<b>9</b>

\*- dužina sekvence u bp; <sup>#</sup> - sekvence dobijene kao rezultat ove doktorske teze

Radi mogućnosti korišćenja druge PCR reakcije, na jedini negativan STOLgroesF/STOLstampR uzorak Stolbur fitoplazmi, soj 123/10 poreklom sa vinove loze iz Aleksandrovca i na još dva pozitivna uzorka, urađena je druga (*nested*) PCR



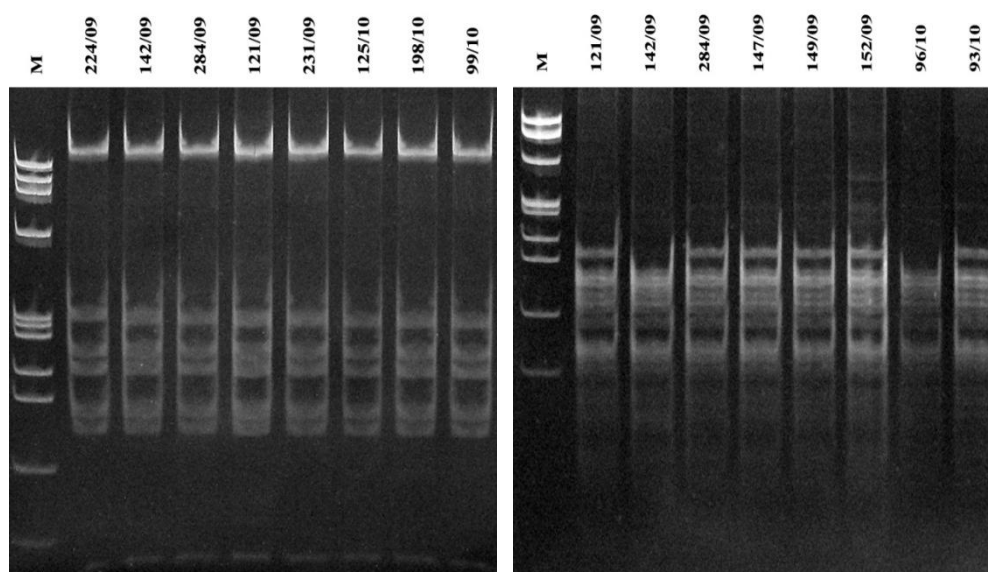
reakcija sa AYgroelF/STOLgroelR2 parom prajmera korišćenjem istog ciklusa kao i u direktnoj reakciji. Pošto se sekvenca prajmera AYgroelF razlikuje u samo dva nukleotida u odnosu na sekvencu regiona gde se ovaj prajmer nalazi kod Stolbur fitoplazmi, onda je on odabran za upotrebu u *nested* reakciji i kod Stolbur fitoplazmi. Nakon vizuelizacije uočeni su fragmenti veličine oko 1500 bp, što i odgovara očekivanoj veličini ovog fragmenta (Slika 35, B).



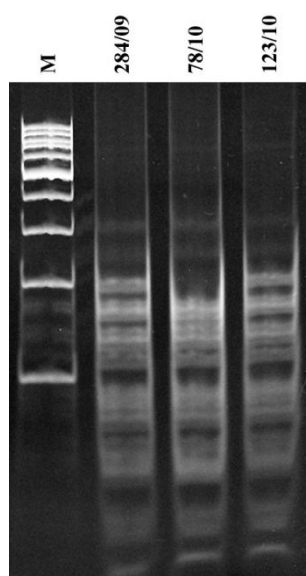
Slika 35. Prikaz amplikona vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu umnoženih prajmerima A - STOLgroesF/STOLstampR i B - AYgroelF/STOLgroelR2 u drugoj (*nested*) PCR reakciji nakon STOLgroesF/STOLstampR reakcije. Uzorak 78/10 je poreklom sa vinke iz Ečke, ostali uzorci su ili dati u Tabeli 18 ili objašnjeni u tekstu. M, marker 1kb (videti Sliku 13 sa strane 57).

Nakon uspešnog umnožavanja *groEL* gena kod svih ispitivanih Stolbur uzoraka, urađena je RFLP analiza pomoću restrikcionih enzima *TruII* i *AluI* kao i kod AY fitoplazmi (Slike 36 i 37). Svi testirani sojevi (ukupno 41) imali su međusobno identične *AluI* RFLP profile, za razliku od *TruII* RFLP profila gde su uočena dva tipa profila (Slika 36).

Od sva 41 testirana soja, 26 je imalo *TruII* RFLP profil 1 (Slika 36, desno, profil sojeva 121/09, 284/09, 147/09, 149/09, 152/09 i 93/10), a 15 profil 2 (Slika 36, desno, profil sojeva 142/09 i 96/10). Sojevi poreklom sa kukuruza i sa valerijane, kao i svi sojevi sa peršuna i šargarepe su imali profil 1, svi testirani sojevi poreklom sa paprike su imali profil 2, dok su se kod sojeva sa duvana, ljute papričice, vinke i vinove loze mogla naći oba profila (Tabela 19).



Slika 36. Prikaz digeriranih amplicona STOLgroesF/STOLstampR pomoću restrikcionih enzima *AluI* (levo) i *TruII* (desno) razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu. Oznaka soja, domaćin, lokalitet: 147/09, vinka, Beograd; 149/09, peršun, Pančevo; 152/09, šargarepa, Begeč; 93/10, vinova loza, Krčedin; ostale oznake sojeva su date u Tabeli 18. M, marker PhiX174 (videti Sliku 13 sa strane 57).



Slika 37. Prikaz digeriranih amplicona AYgroelF/STOLgroelR2 pomoću restrikcionog enzima *TruII* razdvojenih u 8% poliakrilamidnom gelu. Oznake sojeva su kao na Slici 35, B. M, marker 1 kb (videti Sliku 13 sa strane 57).

Tabela 19. Prikaz broja uzoraka određenog *TruII* RFLP profila u odnosu na domaćina

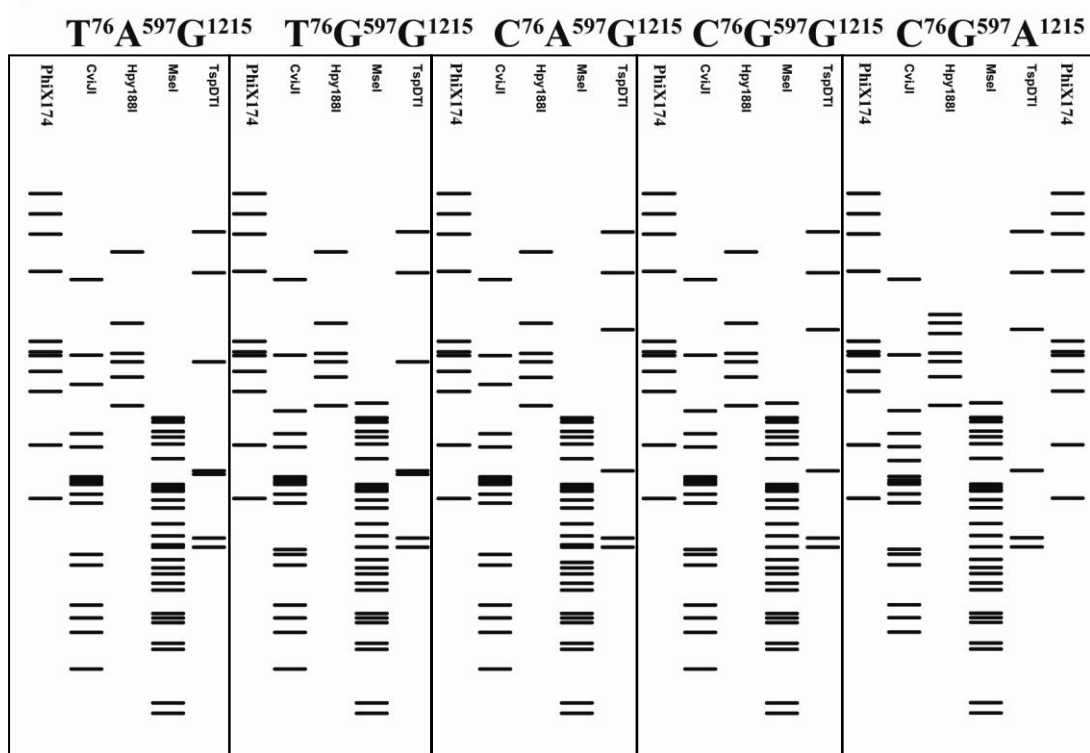
Domaćin	<i>TruII</i> RFLP profil 1	<i>TruII</i> RFLP profil 2
Duvan	3	3
Šargarepa	2	0
Ljuta papričica	1	3
Paprika	0	2
Kukuruz	1	0
Vinova loza	11	2
Vinka	4	5
Peršun	3	0
Valerijana	1	0
<b>UKUPNO</b>	<b>26</b>	<b>15</b>

Od 41 testiranog soja kod koga je uspješno umnožen *groEL* gen, osam je odabrano za sekvenciranje. Među odabranim sojevima su se nalazili oni koji su imali kako *TruII* RFLP profil 1 tako i *TruII* RFLP profil 2, kao i dva soja iz Hrvatske.

Nakon dobijanja i obrade sekvenci, one su deponovane u NCBI Banci gena pod pristupnim brojevima prikazanim u Tabeli 18. Analizom dobijenih sekvenci dužina od 1953 do 1958 bp utvrđeno je da postoje tri varijabilna mesta na pozicijama 76, 597 i 1215 od početka *STOLgroesF* sekvence. Prvo varijabilno mesto 76 se nalazi u okviru *groES* gena i na ovoj poziciji se nalazi nukleotid T ili C, ali ova razlika u nukleotidu ne rezultuje u promeni predviđene AK. Druga dva varijabilna mesta se nalaze u okviru *groEL* gena i na njima se nalazi ili nukleotid A ili G i oni rezultuju u promeni predviđene AK. Na osnovu ova tri varijabilna mesta možemo razlikovati ukupno pet različitih genotipova i to su  $T^{76}A^{597}G^{1215}$ ,  $T^{76}G^{597}G^{1215}$ ,  $C^{76}A^{597}G^{1215}$ ,  $C^{76}G^{597}G^{1215}$  i  $C^{76}G^{597}A^{1215}$ . Nakon urađene *in silico* analize u programu pDRAW32 utvrđeno je da se ovih pet genotipova može međusobno razlikovati upotrebom četiri restrikciona enzima - *CviII*, *HpyI88I*, *MseI* i *TspDTI* (Slika 38).

Genotip  $T^{76}A^{597}G^{1215}$  imaju sojevi 142/09 izolovan iz duvana i 96/10 iz ljute papričice,  $T^{76}G^{597}G^{1215}$  imaju sojevi 284/09 iz duvana i 231/09 iz peršuna,  $C^{76}A^{597}G^{1215}$  ima 159/10 iz duvana,  $C^{76}G^{597}G^{1215}$  ima soj 125/10 izolovan iz vinove loze, a genotip  $C^{76}G^{597}A^{1215}$  imaju dva soja iz Hrvatske iz vinove loze i pripadnici podgrupe tuf type I. Sekvenca soja 99/10 iz ljute papričice je nešto kraća od ostalih (nedostaje oko 50 bp od početka fragmenta), tako da se ne zna da li on ima genotip  $T^{76}A^{597}G^{1215}$  ili  $C^{76}A^{597}G^{1215}$ .

Virtuelnim RFLP gelovima je potvrđeno da je pomoću *TruII* (*MseI*) restriktionog enzima moguće razlikovati dve grupe fitoplazmi kao i da se ova razlika nalazi unutar *groEL* gena, pa je moguće koristiti *TruII* enzim i na AYgroelF/STOLgroelR2 amplikonima. Takođe je utvrđeno da se pomoću enzima *Hpy188I* mogu razlikovati tuf type I sojevi od tuf type II sojeva na osnovu STOLgroesF/STOLstampR amplikona.

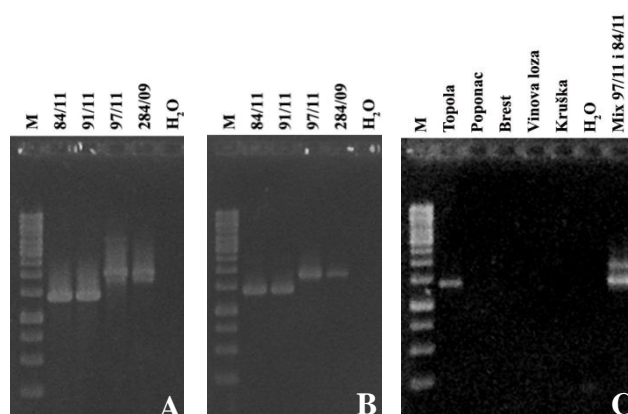


Slika 38. Prikaz virtuelno digeriranih amplikona STOLgroesF/STOLstampR pomoću restriktionih enzima *CviJI*, *Hpy188I*, *MseI* i *TspDTI* razdvojenih u 2% gelu pet postojećih genotipova. Veličine fragmenata PhiX174 markera od vrha su: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 i 72.

#### 4.6. MULTIPLEKS PCR

Pošto je na nekim biljnim vrstama moguće detektovati i AY i Stolbur fitoplazme, kao na primer kod šargarepe, vinke, peršuna, celera i pošto su prajmeri za umnožavanje *groEL* gena kako kod AY fitoplazmi tako i kod Stolbur fitoplazmi dizajnirani tako da koriste isti ciklus, proverena je mogućnost korišćenja multipleks PCR reakcije za detekciju ili AY ili Stolbur fitoplazmi, kao i mogućnost detektovanja

mešane infekcije ove dve grupe u istom uzorku. Za preliminarna istraživanja su odabrana po dva soja AY i Stolbur fitoplazmi. Nakon upotrebe AYgroelF/R i STOLgroes/STOLstampR parova prajmera u PCR reakciji na temperaturi hibridizacije od 55°C nije došlo do umnožavanja, međutim kada je temperatura spuštena na 50°C, došlo je do umnožavanja fragmenata kod sva četiri ispitivana uzorka. Kod uzoraka AY fitoplazmi došlo je do umnožavanja fragmenta veličine oko 1400 bp, što je i očekivana veličina, međutim kod uzoraka Stolbur fitoplazmi je pored umnožavanja očekivanog fragmenta veličine oko 2000 bp, došlo do pojave još jednog veličine oko 1900 bp (Slika 39, A). Pošto je pokazano da prajmer AYgroelF može da se upotrebljava za umnožavanje *groEL* gena, kako kod AY fitoplazmi tako i kod Stolbur fitoplazmi i pošto je pojavom dodatnog benda veličine 1900 bp pokazano da može da se koristi i u kombinaciji sa prajmerom STOLstampR, u sledećoj PCR reakciji su upotrebljeni samo prajmeri AYgroelF, AYgroelR i STOLstampR.



Slika 39. Prikaz produkata multipleks PCR reakcije vizuelizovanih u 1% agaroznom gelu A - na 55°C sa četiri prajmera; B i C - na 52°C sa tri prajmera; sojevi 84/11 i 91/11 su sojevi AY fitoplazmi poreklom sa vinke, dok su 97/11 i 284/09 sojevi Stolbur fitoplazmi poreklom sa vinke odnosno duvana; sojevi sa slike C su nepoznati sojevi prethodno detektovanih fitoplazmi (videti u tekstu); M, marker 1kb (videti Sliku 13 sa strane 57).

Da bi se skratilo vreme trajanja ciklusa, vreme denaturacije i hibridizacije je skraćeno, a temperatura hibridizacije podignuta na 52°C. Pošto se prajmer AYgroelF koristi kao jedini uzvodni prajmer, u reakciji je upotrebljena dupla količina ovog prajmera u odnosu na druga dva nizvodna prajmera. Na ovaj način je došlo samo do umnožavanja željenih fragmenata veličine oko 1400 i 1900 bp kod AY, odnosno Stolbur fitoplazmi (Slika 39, B). Da bi se potvrdila specifičnost i mogućnost upotrebe

multipleks PCR reakcije u uzorcima sa mešanom infekcijom, ova metoda je primenjena na uzorke fitoplazmi poreklom sa topole (16SrI-P), poponca ('*Ca. P. convolvuli*'), bresta (16SrV), vinove loze (16SrV) i kruške (16SrX) uzorkovane i analizirane tokom 2012. godine, kao i na uzorak u kome se nalazilo po 1 $\mu$ l 100 puta razređene DNK sojeva 97/11 (AY fitoplazma) i 84/11 (Stolbur fitoplazma). Nakon multipleks PCR reakcije, do pojave fragmenta veličine oko 1400 bp je došlo samo kod uzorka topole, dok je kod uzorka sa mešanom DNK došlo do pojave oba fragmenta 1400 i 1900 bp (Slika 39, C). Na ovaj način je potvrđena specifičnost multipleks PCR reakcije za detektovanje samo AY i Stolbur fitoplazmi, kako u pojedinačnim tako i u mešanim infekcijama.

#### 4.7. ANALIZA SEKVENCI I FILOGENETSKA ANALIZA

##### 4.7.1. Analiza sekvenci *groEL* gena kod Aster yellows fitoplazmi

Međusobnim poređenjem sekvenci *groEL* gena 27 testiranih sojeva AY fitoplazmi kod kojih je sekvenciran ovaj region, kao i sekvenci dva soja AY fitoplazmi sekvenciranih u celosti, AYWB koji pripada podgrupi 16SrI-A i OY-M koji pripada podgrupi I-B, utvrđeno je da dužina celog *groEL* gena kod AY fitoplazmi iznosi 1611 bp. Takođe je uočeno da postoje ukupno 144 varijabilna mesta (što znači da je u proseku svako 11. mesto varijabilno) od kojih 55 rezultuje u promeni predviđene AK, dok je 89 sinonimno. Uočeno je još da kod svih sinonimnih mesta do promene nukleotida dolazi na trećoj kodonskoj poziciji. Kada se nukleotidna sekvenca prevede u AK niz dobija se protein dužine 536 AK kod koga se uočava da postoji ukupno 50 AK razlike među proučavanim sojevima.

Posmatranjem podgrupa pojedinačno, uočava se da je podgrupa 16SrI-A najvarijabilnija jer ima ukupno 33 varijabilna mesta od kojih je 19 sinonimno. Međutim, kada se iz analize izuzme soj GD koji se razlikuje po RFLP profilima od ostalih pripadnika I-A podgrupe i kome je dodeljena posebna *groELI* podgrupa, ostaju samo tri varijabilna mesta koja rezultuju u promeni predviđene AK. Sojevi koji pripadaju podgrupi I-B imaju ukupno osam varijabilnih mesta, pri čemu je isti broj sinonimnih i nesinonimnih mesta. Sekvence sojeva podgrupe I-C se međusobno razlikuju u samo

jednom nukleotidu koji ne rezultuje u promeni predviđene AK tako da im je AK sekvenca identična.

Kada se sekvenca *groEL* gena kod AY fitoplazmi uporedi sa sekvencom kod vrste *Escherichia coli* kod koje je protein GroEL najproučavaniji, uočava se da je GroEL protein kod *E. coli* nešto veći jer je dužine 548 AK za razliku od AY fitoplazmi kod kojih je on 536 AK dug. Poređenjem sa AK sekvencom *E. coli*, moguće je kod AY fitoplazmi odrediti gde počinje i gde završava svaki od tri strukturna domena.

Tako kod AY fitoplazmi ekvatorijalni domen čine AK 5 do 132 kao i 406 do 521 u kome se uočava pet konzervativnih regiona sa samo par mesta razlike u odnosu na *E. coli*, pri čemu su promenjene AK istog polariteta. Ovi konzervativni regioni u okviru ekvatorijalnog domena se nalaze od AK 26 do 41, od 51 do 61, od 67 do 96, od 406 do 417 i od 490 do 516.

Apikalni domen čine AK od 189 do 373, i ovde se uočava konzervativni domen koji se nalazi od AK 189 do 294. Treći domen je intermedijerni domen i njega čine AK 133 do 188 kao i 374 do 405. U intermedijernom domenu se uočavaju konzervativni regioni koji se nalaze od AK 156 do 177 i od 362 do 405.

Po literaturnim podacima u okviru GroEL proteina postoje mesta koja imaju određenu ulogu tokom procesa savijanja proteina i eksperimentalno je utvrđeno da promenom AK na tim mestima neka od funkcija proteina se gubi. Međutim kod GroEL proteina AY fitoplazmi postoje određena odstupanja u tim mestima. Tako se na AK mestu '452' kod AY fitoplazmi umesto arginina (R) nalazi tirozin (Y) i nigde u blizini se ne nalazi arginin, a ove dve AK se razlikuju međusobno po polaritetu. Međutim, na mestu '461' umesto glutaminske kiseline (E) nalazi se serin (S) kod svih sojeva osim kod soja PopD kod koga je tu alanin (A), a na mestu '463' se umesto serina (S) nalazi asparaginska kiselina (D). Na mestu '464' se nalazi valin (V), a na mestu '398' se nalazi asparaginska kiselina (D) što pokazuju i literaturni podaci. Na mestu '197', odnosno '386' se umesto arginina (R) nalazi lizin (K), odnosno umesto glutaminske kiseline (E) nalazi se asparaginska (D). Za ova dva mesta je značajno da čak iako se ne nalazi ista AK, nju je zamenila AK čiji je bočni lanac istog karaktera. Naime, i arginin i lizin su bazne AK (sa pozitivno naelektrisanim bočnim lancima) dok su i glutaminska i asparaginska kiselina kisele AK (sa negativno naelektrisanim bočnim lancima).

Kada se poredi veličina GroEL proteina kod AY fitoplazmi sa veličinom ovog proteina kod mikoplazmi kod kojih postoji GroEL, kao i sa veličinom kod vrsta *Spiroplasma citri*, *Acholeplasma laidlawii* i *Bacillus subtilis* (Tabela 20), uočava se da AY fitoplazme imaju jedan od najmanjih GroEL proteina pri čemu je od njih manji jedino GroEL protein kod *M. gallisepticum*, kao i da je identične veličine sa GroEL proteinom kod *A. laidlawii*.

Tabela 20. Veličina *groEL* gena i proteina kod AY fitoplazmi, mikoplazmi koje ga imaju, *Acholeplasma laidlawii*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*

Vrsta (soj)	veličina u bp	veličina u AK	Reference
<i>E. coli</i> (K12)	1647	548	Blattner i sar., 1997
<i>M. penetrans</i> (HF-2)	1638	545	Sasaki i sar., 2002
<i>B. subtilis</i> (168)	1635	544	Kunst i sar., 1997
<i>M. genitalium</i> (G37), <i>M. pneumoniae</i> (FH)	1632	543	Glass i sar., 2006 Krishnakumar i sar., 2010
<i>Spiroplasma citri</i> (GII3)	1614	537	Carle i sar., 2010
<i>A. laidlawii</i> (PG-8A) i AY fitoplazme	1611	536	Lazarev i sar., 2011 -
<i>M. gallisepticum</i> (R, high)	1605	534	Szczepanek i sar., 2010

#### 4.7.2. Analiza sekvenci *groEL* gena kod Stolbur fitoplazmi

Ceo protein GroEL kod Stolbur fitoplazmi je dužine 534 AK (gen je dužine 1605 bp) i u njemu se kod svih Stolbur fitoplazmi nalaze samo dva varijabilna mesta koja rezultuju u promeni predviđene AK. Ono što se uočava je da se na AK mestu 338 kod svih sojeva iz Srbije koji pripadaju tuf type II podgrupi tu nalazi alanin (A) dok se kod sojeva iz Hrvatske, koji predstavljaju tuf type I fitoplazme, nalazi treonin (T).

Kod Stolbur fitoplazmi u GroEL proteinu ekvatorijalni domen čine AK od 5 do 132 i od 406 do 521, apikalni domen čine AK od 189 do 373, a intermedijerni domen čine AK od 133 do 188 i od 374 do 405. Kao i kod AY fitoplazmi i kod Stolbur fitoplazmi se na AK mestu '452' umesto arginina (R) nalazi tirozin (Y) i nigde u blizini se ne nalazi arginin, a takođe se na mestima '197' i '386' umesto arginina (R), odnosno glutaminske kiseline (E) nalaze lizin (K), odnosno asparaginska kiselina (D) čiji su bočni lanci istih karaktera. I kod Stolbur fitoplazmi se zadržala AK D<sup>398</sup>. Za razliku od AY fitoplazmi, kod Stolbur fitoplazmi se na mestu '461' umesto glutaminske kiseline (E) nalazi asparaginska kiselina (D), pri čemu su obe AK kisele, na mestu '463' se nalazi



histidin (H) umesto serina (S), pri čemu ove aminokiseline imaju različito naelektrisane bočne lance (histidin je bazna AK, dok je serin AK sa polarnom bočnom grupom koja omogućava formiranje vodoničnih veza), a na mestu '464' izoleucin (I) umesto valina (V) pri čemu je njegov bočni lanac nepolaran kao i kod valina.

U Tabeli 21 prikazano je koje se aminokiseline nalaze na ovih sedam pozicija kod AY i Stolbur fitoplazmi u odnosu na '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. australiense*', mikoplazme koje imaju *groE* operon, *A. laidlawii*, *B. subtilis* i *E. coli*. Iz tabele se uočava da je najkonzervativnije mesto D<sup>398</sup>, da se kod *A. laidlawii* nalaze AK iste kao kod fitoplazmi, kao i da se *M. penetrans* razlikuje od ostale tri posmatrane vrste mikoplazmi.

Tabela 21. Prikaz aminokiselina koje se po literaturnim podacima nalaze na mestima odgovornim za funkcionisanje GroEL proteina kod AY i Stolbur fitoplazmi, '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. australiense*', mikoplazmi koje imaju *groE* operon, *A. laidlawii*, *B. subtilis* i *E. coli*.

	'452'	'461'	'463'	'464'	'398'	'197'	'386'
<i>E.coli</i>	R	E	S	V	D	R	E
<i>B. subtilis</i>	R	E	S	V	D	R	E
<i>M. penetrans</i>	S	D	G	V	D	R	E
<i>M. genitalium</i>	R	D	K	I	D	G	E
<i>M. galisepticum</i>	R	N	K	I	D	G	E
<i>M. pneumoniae</i>	R	N	K	V	D	G	E
<i>A. laidlawii</i>	Y	D	D	I	D	K	E
' <i>Ca. P. mali</i> '	Y	D	H	V	D	K	E
' <i>Ca. P. australiense</i> '	Y	D	H	I	D	K	D
' <i>Ca. P. solani</i> '*	Y	D	H	I	D	K	D
' <i>Ca. P. asteris</i> '	Y	S/A**	D	V	D	K	D

\*- vrsta još nije zvanično opisana; \*\*- A se nalazi samo kod soja PopD dok ostale testirane AY fitoplazme imaju S

Pošto je iz draft sekvenci dva soja Stolbur fitoplazmi dobijena sekvenca celog *groES*, *groEL* i *stamp* gena, moguće je ceo ovaj region Stolbur fitoplazmi porediti sa sve četiri fitoplazme sekvencirane u celosti kao i sa *A. laidlawii* i ostalim mikoplazmama koje poseduju ovaj region (Tabela 22 sa strane 103).

Iz Tabele 22 uočava se da između poređenih vrsta fitoplazmi i mikoplazmi kao i *A. laidlawii* postoje velike razlike u dužini introna, kako između *groES* i *groEL* gena,

tako i između *groEL* gena i narednog gena. Takođe se uočava da postoji razlika u orijentaciji *groE* operona, kao i da se različiti geni nalaze nakon njega, čak i kod pripadnika fitoplazmi. Što se tiče veličine samih proteina, veličina GroES proteina je varijabilnija u odnosu na GroEL, pri čemu se najmanji GroES nalazi kod *A. laidlawii* dok je najmanji GroEL kod Stolbur fitoplazmi. Sa druge strane najveći GroES se nalazi kod *M. pneumoniae* dok je najveći GroEL kod *M. penetrans*.

#### **4.7.3. Analiza sekvenci 16S rRNK, *tuf*, *rp* i *secY* gena kod Aster yellows fitoplazmi**

Gen za 16S ribozomalnu RNK je kod AY fitoplazmi dužine 1535 bp i ima 51 varijabilno mesto što znači da je u proseku svako 30. mesto polimorfno. Kod nekih sojeva se u sekvenci 16S rRNK nalaze delecije/insercije, dužine jednog nukleotida, u odnosu na sekvence ostalih sojeva što može biti i rezultat pojave grešaka u procesu čitanja hromatograma i pri obradi sekvenci. Kod tri soja, ca2006/5, AYWB i OY-M, sekvencirani su 16S rRNK geni u okviru oba operona i kod sva tri soja se uočava postojanje razlika između dva operona. Tako se kod soja ca2006/5 uočava šest različitih nukleotidnih mesta, kod soja OY-M tri, a kod soja AYWB dva.

Dužina *tuf* gena kod AY fitoplazmi iznosi 1185 bp odnosno 394 AK. Kod 16 fitoplazmi kod kojih je poređena sekvenca *tuf* gena, nalazi se 121 varijabilno mesto (što znači da je u proseku svako 10. mesto polimorfno) od kojih je 79 sinonimno, a preostale 42 nesinonimne mutacije rezultuju u promeni 32 AK. Od 121 varijabilnog mesta, 62 su bila prisutna samo jednom ("singleton polimorfna mesta") i odnose se na individualne razlike nekog od sojeva, što čini oko 50% ukupnih polimorfnih mesta.

Geni ribozomalnih proteina se kod fitoplazmi nalaze u okviru većih operona, pa tako i rpl2F3/rp(I)R1A amplikon koji je sekvenciran obuhvata četiri *rp* gena - *rplB*, *rpsS*, *rplV* i *rpsC*. Ceo ovaj region dužine 1531 bp ima ukupno 132 varijabilna mesta (što znači da je u proseku svako 11. mesto polimorfno) od kojih se nijedno ne nalazi u intronu, već su sva unutar gena za ribozomalne proteine. Tako se osam nalazi u *rplB* genu koji je dužine 89 bp (pet je sinonimno), 17 je unutar *rpsS* gena dužine 282 bp (od kojih je 13 sinonimno), 26 je unutar *rplV* gena dužine 390 bp (16 je sinonimno), a 81 je u *rpsC* genu koji je dug 756 bp (od kojih je 44 sinonimno). Zanimljivo je da soj OY-M

jedini ima deleciju od četiri bp unutar introna između *rpsS* i *rplV*, kao i da se u regionu preklapanja *rplV* i *rpsC* gena ne nalazi ni jedno varijabilno mesto kod svih posmatranih sekvenci. Što se tiče nesinonimnih mutacija one kod *rplB* i *rpsS* rezultuju u promeni tri predviđene AK, dok kod *rplV* i *rpsC* rezultuju u promeni devet odnosno 29 predviđenih AK. Pošto se geni *rplV* i *rpsC* preklapaju, START kodon za *rpsC* gen je GTG, a okvir čitanja za ovaj gen je pomeren za jedno mesto unapred u odnosu na okvir čitanja kod *rplV* gena.

Kod gena *secY* uočava se najveća varijabilnost sekvenci, gde je u proseku svaki šesti nukleotid varijabilan jer se u prvih 361 bp nalazi 60 varijabilnih mesta. Sva varijabilna mesta ukupno rezultuju u promeni 87 predviđenih AK. Takođe je uočeno da jedino soj PopD ima delecije unutar *secY* gena, pa kada se ovaj soj isključi iz analize, onda se dobijaju 54 mesta sa različitom predviđenom AK. To znači da više od 1/3 varijabilnih mesta *secY* gena pripada soju PopD. Zanimljivo je da je jedino kod soja AY-A START kodon GTG dok je kod svih ostalih on ATG.

Kada se porede dužine ovih gena i *groE* operona kod tri vrste fitoplazmi sekvencirane u potpunosti, Stolbur fitoplazmi, *A. laidlawii* i mikoplazmi koje poseduju *groE* operon, uočava se da je *tuf* gen najkonzervativniji što se tiče varijabilnosti veličine gena, jer njegova standardna devijacija iznosi 4.5 bp na nivou svih posmatranih vrsta (Tabela 22). Nakon *tuf* gena slede *rplB* i *groEL* geni čija standardna devijacija iznosi 16.5 bp. Najvarijabilniji geni u odnosu na dužinu su geni *rplV* sa standardnom devijacijom od 345 bp i *secY* sa 136.5 bp. Standardna devijacija za dužinu gena kod 16S rRNK gena iznosi 40.5 bp, što ga svrstava među srednje varijabilne gene zajedno sa *rpsS* (24 bp), *rpsC* (48 bp) i *groES* (45 bp) genima.

Ako posmatramo dužinu gena samo u okviru navedenih fitoplazmi (Tabela 22), situacija je nešto drugačija. Najkonzervativniji je gen *rpsS* čija standardna devijacija iznosi 0 bp, a potom slede geni *tuf* i *groEL* sa standardnom devijacijom od 3 bp. Najvarijabilniji je *groES* gen čija standardna devijacija dužine gena iznosi 31.5 bp.

Iz Tabele 22 se takođe uočava da su kod fitoplazmi u globalu srednje vrednosti dužina posmatranih gena manje nego kod mikoplazmi, pri čemu je i sam opseg dužina posmatranih gena kod fitoplazmi među nižim vrednostima u odnosu na opseg kod mikoplazmi. Tako je i srednja vrednost dužine *groEL* gena kod fitoplazmi 1608 bp a

kreće se u opsegu od 1605 do 1611 bp, dok je kod mikoplazmi ona 1621.5 bp, pri čemu većina mikoplazmi ima dužinu *groEL* gena između 1632 i 1638 bp. Dužina *groES* gena kod fitoplazmi je 295.5 bp, dok kod mikoplazmi ona iznosi 312 bp.

Ako posmatramo dužinu ovih gena kod vrste *A. laidlawii* u odnosu na fitoplazme i mikoplazme, uočava se da je njena dužina gena približnija dužini kod fitoplazmi nego kod mikoplazmi, pa je tako i dužina *groEL* gena kod *A. laidlawii* 1611 bp, kao i kod većine fitoplazmi, a *groES* gena 261 bp, pri čemu je to i najmanja dužina ovog gena kod svih posmatranih vrsta.

Tabela 22. Dužina i orijentacija 16S rDNK, *tuf*, *secY*, *groES*, *groEL* gena i gena ribozomalnih proteina, kao i dužina introna u *rp* i *groE* operonu kod fitoplazmi, mikoplazmi koje poseduju *groE* operon i *A. laidlawii*

gen /vrsta	16S rRNK	o.	tuf	o.	rplB	ITS	rpsS	ITS	rplV	ITS	rpsC	o.	secY	o.	groES	ITS	groEL	ITS	(st)amp /imp	o.
' <i>Ca. P. asteris</i> ' AYWB	1535	+/+	1185	-	831	12	282	20	390	-17	759	-	1242	-	270	125	1611	157	495	-
' <i>Ca. P. asteris</i> ' OY-M	1535	+/-	1185	+	831	12	282	16	390	-17	759	+	1242	+	270	191	1611	157	702	+
' <i>Ca. P. solani</i> '*	1535 <sup>§</sup>	/	1185	/	831	13	282	20	384	-17	726	/	1224	/	267	28	1605	141	474	/
' <i>Ca. P. australiense</i> '	1533	-/-	1185	-	831	13	282	20	369	-17	753	-	1248	-	327	25	1611	319	447	+
' <i>Ca. P. mali</i> '	1521	+/+	1179	+	843	15	282	17	396	-17	738	+	1245	+	264	177	1611	726	/( <i>nrdF</i> )	+
<i>A. laidlawii</i>	1506	+	1188	+	831	12	279	12	336	7	771	+	1299	+	261	25	1611	154	/( <i>hypo</i> )	-
<i>M. genitalium</i>	1519	+	1185	+	858	-1	264	2	435	2	807	+	1428	+	333	12	1632	16	/(leucyl aminop eptidase )	-
<i>M. penetrans</i>	1454	-	1185	+	840	57	234	17	1026	22	/ rplP	-	1422	-	273	29	1638	59	/ dUTPas e	+
<i>M. gallisepticum</i>	1505	+	1185	+	852	20	264	10	435	2	792	+	1497	+	294	-1	1605	102	/( <i>msrB</i> )	-
<i>M. pneumoniae</i>	1516	+	1185	-	864	-1	264	1	480	1	822	+	1434	+	351	2	1632	13	/( <i>pepA</i> )	-
Srednja vrednost dužine gena kod fitoplazmi (**)	1528 (7)		1162 (3)		837 (6)		282 (0)		382.5 (13.5)		742.5 (16.5)		1236 (12)		295.5 (31.5)		1608 (3)			
Srednja vrednost dužine gena kod mikoplazmi (**)	1486.5 (32.5)		1185 (0)		852 (12)		249 (15)		730.5 (295.5)		807 (15)		1459.5 (37.5)		312 (39)		1621.5 (16.5)			

o.- orijentacija gena/operona; \*- vrsta još nije zvanično opisana; <sup>§</sup>- pretpostavljena veličina na osnovu poređenja sa sekvencom AY fitoplazmi; \*\*.- standardna devijacija

#### 4.7.4. Filogenetska analiza sekvenci 16S rDNK, *groEL*, *tuf*, *rp* i *secY* gena

Da bi se odredila genetička sličnost i evolutivna bliskost proučavanih sojeva, izračunata je veličina nukleotidnih razlika proučavanih gena izražena genetičkom udaljenošću (p-distance), a potom je rekonstruisano filogenetsko stablo. Filogenetska stabla su generisana pomoću Maximum Parsimony metode upotrebom programa MEGA5.

Uporednom analizom sekvenci 16S rRNK i *groEL* gena utvrđeno je da srednja vrednost procenta međusobne identičnosti svih sojeva AY fitoplazmi iznosi 99.5% odnosno 98.1% za ova dva gena, pri čemu je njen opseg za 16S rRNK od 98.7 do 100%, a za *groEL* gen od 93.7 do 100%. Najveća razlika u sekvencama iskazana najmanjim procentom identičnosti je uočena između sojeva CHRYM (16SrI-A) i PopD (16SrI-P), kako za 16S rRNK gen tako i za *groEL* gen (Tabela 23). Vrednosti identičnosti sekvenci među testiranim sojevima AY fitoplazmi kao i sojeva '*Ca. P. australiense*', '*Ca. P. mali*' i *A. laidlawii* su prikazane u Tabeli 23 pri čemu su, zbog preglednijeg prikaza, izostavljeni sojevi koji su imali identičnost i 16S rDNK i *groEL* gena od 99.9 i 100%.

Najveća identičnost sekvenci unutar podgrupe je uočena kod sojeva iz podgrupe 16SrI-C kako za 16S rRNK gen tako i za *groEL* gen čija srednja vrednost procene evolucione divergencije unutar grupe iznosi 0, dok je ova vrednost najveća kod pripadnika podgrupe 16SrI-A gde ona iznosi 0.004 (16S rRNK), odnosno 0.007 (*groEL* gen). Ova vrednost kod pripadnika podgrupe 16SrI-B iznosi 0.002 za 16S rRNK odnosno 0.001 za *groEL* gen. Kada se poredi identičnost 16S rRNK sekvenci između 16SrI podgrupa, uočava se da je najveća razlika između pripadnika podgrupe 16SrI-P i podgrupa 16SrI-C i I-F i čija srednja vrednost iznosi 98.8%, dok je najmanja između podgrupa I-A i I-B kao i između podgrupe I-B i podgrupa I-C i I-F i ona iznosi 99.4%. U odnosu na *groEL* gen ove vrednosti su nešto drugačije, pa je tako najmanja vrednost između podgrupa 16SrI-P i I-A i iznosi 93.9%, a najveća između I-A i I-C i iznosi 97.7% (Tabela 24).

Tabela 23. Vrednosti identičnosti sekvenci 16S rRNK i *groEL* gena između testiranih sojeva AY fitoplazmi (uključujući i sojeve AYWB i OY-M) i vrsta '*Ca. P. australiense*', '*Ca. P. mali*' i *A. laidlawii*

16S rRNK <i>groEL</i> **	Soj	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	CHRYM (I-A)		0.997	0.996	0.995	0.991	0.991	0.992	0.991	0.991	0.991	0.992	0.992	0.991	0.992	0.989	0.987	0.997	0.991	0.961	0.916	0.861	
2	ca2006/1 (I-A)	0.999 0.998		0.999	0.997	0.995	0.994	0.995	0.993	0.994	0.993	0.995	0.995	0.994	0.995	0.991	0.990	0.999	0.994	0.963	0.917	0.861	
3	PVM (I-A)	0.999 0.996	0.998 0.994		0.997	0.993	0.993	0.994	0.993	0.993	0.993	0.994	0.994	0.993	0.994	0.991	0.989	0.999	0.993	0.963	0.918	0.864	
4	NJ-AY (I-A)	0.999 0.996	0.999 0.998	0.999 0.996		0.992	0.992	0.993	0.993	0.992	0.991	0.993	0.993	0.992	0.993	0.989	0.988	0.998	0.992	0.961	0.917	0.862	
5	GD (I-A)	0.980 0.977	0.980 0.979	0.980 0.977	0.981 0.981		0.995	0.996	0.994	0.995	0.994	0.995	0.996	0.993	0.994	0.992	0.990	0.994	0.995	0.963	0.920	0.865	
6	AY-W (I-B)	0.969 0.968	0.970 0.969	0.969 0.968	0.971 0.971	0.978 0.977		0.999	0.998	0.999	0.999	0.997	0.998	0.995	0.995	0.993	0.990	0.994	1.000	0.965	0.920	0.864	
7	DIV (I-B)	0.969 0.966	0.970 0.968	0.969 0.966	0.971 0.969	0.978 0.975	0.999 0.998		0.997	0.998	0.999	0.997	0.999	0.995	0.995	0.994	0.991	0.995	0.999	0.966	0.921	0.865	
8	PYR (I-B)	0.970 0.968	0.971 0.969	0.970 0.968	0.971 0.971	0.979 0.977	0.999 1	0.999 0.998		0.998	0.997	0.996	0.997	0.994	0.994	0.993	0.990	0.993	0.998	0.965	0.920	0.866	
9	NA (I-B)	0.970 0.968	0.971 0.969	0.970 0.968	0.971 0.971	0.979 0.977	0.999 1	0.999 0.998	1 1		0.998	0.997	0.998	0.995	0.995	0.993	0.990	0.994	0.999	0.966	0.921	0.867	
10	SAY (I-B)	0.970 0.968	0.971 0.969	0.970 0.968	0.971 0.971	0.979 0.977	0.999 1	0.999 0.998	1 1	1 1		0.996	0.997	0.994	0.994	0.993	0.990	0.993	0.999	0.966	0.921	0.867	
11	ca2006/5* (I-B)	0.968 0.964	0.969 0.966	0.968 0.964	0.969 0.967	0.977 0.973	0.998 0.996	0.998 0.994	0.998 0.996	0.998 0.996	0.998 0.996		0.998	0.994	0.994	0.993	0.991	0.995	0.997	0.967	0.921	0.869	
12	MBSCol. (I-B)	0.968 0.962	0.969 0.964	0.968 0.962	0.969 0.966	0.977 0.971	0.998 0.994	0.998 0.992	0.998 0.994	0.998 0.994	0.998 0.994	0.999 0.998		0.995	0.995	0.994	0.993	0.995	0.998	0.966	0.921	0.866	
13	LEO (I-C)	0.976 0.968	0.975 0.966	0.976 0.968	0.976 0.968	0.981 0.971	0.975 0.962	0.975 0.960	0.975 0.962	0.975 0.962	0.975 0.962	0.973 0.958	0.973 0.956		1.000	0.992	0.988	0.994	0.995	0.968	0.925	0.869	
14	PPT (I-C)	0.976 0.968	0.976 0.966	0.976 0.968	0.976 0.968	0.982 0.971	0.975 0.962	0.975 0.96	0.976 0.962	0.976 0.962	0.976 0.962	0.974 0.958	0.974 0.956	0.999 1		0.992	0.988	0.995	0.995	0.967	0.924	0.868	
15	AY-A (I-F)	0.973 0.975	0.974 0.977	0.973 0.975	0.974 0.979	0.978 0.973	0.971 0.966	0.971 0.964	0.972 0.966	0.972 0.966	0.972 0.966	0.972 0.964	0.970 0.962	0.970 0.962	0.975 0.966	0.975 0.966		0.988	0.991	0.993	0.965	0.922	0.868
16	PopD (I-P)	0.937 0.946	0.938 0.948	0.937 0.946	0.939 0.950	0.946 0.958	0.947 0.962	0.947 0.96	0.948 0.962	0.948 0.962	0.948 0.962	0.948 0.960	0.946 0.958	0.946 0.952	0.944 0.952	0.945 0.952	0.942 0.948		0.990	0.990	0.960	0.918	0.863
17	AYWB* (I-A)	0.999 0.996	0.999 0.998	0.999 0.996	1 1	0.981 0.981	0.971 0.971	0.971 0.969	0.971 0.971	0.971 0.971	0.971 0.971	0.971 0.967	0.969 0.966	0.969 0.966	0.976 0.968	0.976 0.968	0.974 0.979	0.939 0.950		0.994	0.964	0.918	0.864
18	OY-M* (I-B)	0.971 0.968	0.971 0.969	0.971 0.968	0.972 0.971	0.980 0.977	0.999 1	0.999 0.998	0.999 1	0.999 1	0.999 1	0.999 0.996	0.998 0.994	0.998 0.962	0.976 0.962	0.977 0.962	0.973 0.966	0.948 0.962	0.972 0.971		0.965	0.920	0.866
19	Ca_P_austra liense*	0.747 0.766	0.746 0.766	0.747 0.766	0.747 0.769	0.747 0.759	0.746 0.761	0.745 0.759	0.746 0.761	0.746 0.761	0.746 0.761	0.747 0.758	0.744 0.756	0.743 0.756	0.743 0.756	0.741 0.761	0.751 0.774	0.747 0.769	0.746 0.761		0.914	0.862	
20	Ca_P_mali*	0.683 0.645	0.682 0.645	0.683 0.645	0.683 0.648	0.690 0.642	0.685 0.651	0.685 0.648	0.686 0.651	0.686 0.651	0.686 0.651	0.686 0.650	0.688 0.650	0.686 0.651	0.682 0.637	0.682 0.637	0.685 0.648	0.689 0.651	0.683 0.648	0.686 0.651	0.666 0.659		0.866
21	A_laidlawii*	0.520 0.578	0.520 0.578	0.520 0.578	0.522 0.581	0.531 0.575	0.537 0.578	0.537 0.575	0.536 0.578	0.537 0.578	0.537 0.578	0.537 0.577	0.537 0.578	0.537 0.578	0.526 0.584	0.528 0.584	0.525 0.575	0.514 0.578	0.522 0.581	0.536 0.578	0.510 0.565	0.541 0.596	

\*- za računanje identičnosti je uzeta sekvenca jednog od dva međusobno različita i javno dostupna operona; \*\*- u gornjem redu se nalazi vrednost identičnosti nukleotidnih, a u donjem aminokiselinskih sekvenci *groEL* gena

Kada se nukleotidna sekvenca *groEL* gena prevede u aminokiselinsku sekvencu koristeći "bacterial plastid" genetički kod, uočava se da je srednja vrednost identičnosti sekvenci AY sojeva 97.8%, a kreće se od 94.6% između soja PopD (16SrI-P) i soja CHRYM i PVM (16SrI-A) do 100% između nekih sojeva podgrupe 16SrI-B. Najveća identičnost sekvenci unutar grupe izražena kao vrednost srednje evolucione divergencije ustanovljena je kod pripadnika podgrupe 16SrI-C i iznosi 0, dok je najmanja opet kod pripadnika podgrupe 16SrI-A gde iznosi 0.009. Ova vrednost kod podgrupe 16SrI-B je ista i na nivou nukleotidne i na nivou aminokiselinske sekvence i iznosi 0.002. Srednja vrednost identičnosti sekvenci između 16SrI podgrupa je najmanja između I-P i I-F i iznosi 94.8%, a najveća je između I-F i I-A gde iznosi 97.7% (Tabela 24).

Tabela 24. Vrednosti identičnosti sekvenci 16S rRNK i *groEL* gena između 16SrI podgrupa, '*Ca. P. australiense*', '*Ca. P. mali*' i *A. laidlawii*

16S rRNK <i>groEL</i> *	16SrI podgrupa	1	2	3	4	5	6	7	8
1	I-A		0.994	0.993	0.990	0.989	0.964	0.918	0.863
2	I-B	0.972 0.970		0.994	0.994	0.991	0.967	0.921	0.867
3	I-C	0.977 0.968	0.975 0.961		0.991	0.988	0.968	0.925	0.870
4	I-F	0.974 0.977	0.971 0.965	0.975 0.966		0.988	0.966	0.922	0.868
5	I-P	0.939 0.949	0.947 0.961	0.945 0.952	0.942 0.948		0.961	0.918	0.863
6	' <i>Ca. P. australiense</i> '	0.746 0.761	0.747 0.766	0.743 0.756	0.741 0.761	0.751 0.774		0.916	0.864
7	' <i>Ca. P. mali</i> '	0.686 0.651	0.684 0.646	0.682 0.637	0.685 0.648	0.689 0.651	0.666 0.659		0.866
8	<i>A. laidlawii</i>	0.537 0.577	0.522 0.578	0.527 0.584	0.525 0.575	0.514 0.578	0.510 0.565	0.541 0.596	

\*- u gornjem redu se nalazi vrednost identičnosti nukleotidnih, a u donjem aminokiselinskih sekvenci *groEL* gena

Procenat identičnosti aminokiselinskih sekvenci *groEL* gena između AY fitoplazmi, Stolbur fitoplazmi, '*Ca. P. australiense*' i '*Ca. P. mali*' kreće se između 64.1 i 84.8%. Njima najbliža je *A. laidlawii* sa kojom pomenute fitoplazme dele 56.8-59.4%



identičnosti, za razliku od mikoplazmi sa kojima dele između 7.4 i 21%, vrste *B. subtilis* sa kojom dele 29.1-36.3% i vrste *E. coli* sa kojom dele 18.5-21%. Sa druge strane, procenat identičnosti aminokiselinskih sekvenci *groEL* gena između četiri vrste mikoplazmi koje poseduju *groE* operon kreće se od 6.8 do 83.8%.

Poređenjem vrednosti identičnosti sekvenci između dva operona 16S rRNK gena sojeva ca2006/5, AYWB, OY-M, '*Ca. P. australiense*', '*Ca. P. mali*' i *A. laidlawii* kod kojih su sekvencirana oba operona, uočava se da kod soja ca2006/5 postoji najveća razlika između dva operona jer je njihova vrednost identičnosti sekvenci 99.6%, dok se kod ostalih sojeva ona kreće od 99.8 do 100% (Tabela 25). Kada se poredi razlika vrednosti identičnosti sekvenci svakog od operona u odnosu na sekvence 16S rDNK svih ostalih testiranih sojeva, ona se uglavnom kreće od 0 do 0.2%, osim kod soja ca2006/5 kod koga ona ide čak i do 0.4% (operon A ima identičnost od 100%, dok operon B ima identičnost od 99.6% sa sojem AY-J).

Analizom sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena kod 14 do 16 sojeva (u zavisnosti od gena) kod kojih su sekvencirani ovi geni, utvrđeno je da srednja vrednost procenta međusobne identičnosti svih sojeva AY fitoplazmi za *tuf* gen iznosi 97.2% (opseg je od 93 do 99.9%), za *rp* gen 97.4% (opseg je od 93.2 do 100%), a za *secY* gen iznosi 94.8% (opseg je od 84 do 100%). Najnižu vrednost procenta sličnosti sekvenci ima soj PopD sa nekim od sojeva iz podgrupe 16SrI-A kod *rp* i *secY* gen, odnosno sa sojem ca2006/5 (16SrI-B) kod *tuf* gena.

Zanimljivo je da soj ca2006/9 koji je poreklom sa šargerepe iz Srbije i koji pripada podgrupi 16SrI-B ima 100% identičnost sekvenci *rp* i *secY* gena sa sojem AV2192 (16SrI-L) poreklom sa lepe kate (*Callistephus chinensis*) iz Nemačke i 99.9% identičnosti sekvence *tuf* gena sa sojem PRIVA (takođe 16SrI-L) poreklom sa jagorčevine (*Primula* sp.) iz Nemačke, a u odnosu na sekvencu *groEL* gena ima 100% identičnosti i sa sojem AV2192 i sa sojem PRIVA. U odnosu na 16S rDNK, soj ca2006/9 ima 99.9% identičnosti sekvenci sa dva gore navedena soja. Sa druge strane, soj ca2006/9 ima 99.8% identičnosti sekvenci *groEL* gena, 99.7% identičnosti 16S rRNK i *tuf* gena, 99.6% identičnosti *rp* gena i 99.4% identičnosti *secY* gena sa sojem ca2006/5 koji je takođe poreklom sa šargarepe iz Srbije i koji pripada podgrupi 16SrI-B.

Tabela 25. Vrednosti identičnosti sekvenci 16S rRNK gena dva operona sojeva kod kojih su oba operona sekvencirana i testiranih Aster yellows fitoplazmi

	CHRYM	ca2006/1	PVM	NJ-AY	GDI	AVUT	AV2192	PRVC	AY-W	DIV	PRG	PYR	RV	GLAWC	NA	ca2006/9	SAY	AY-27	AY-J
AYWB r01/r04	0.997	0.999	0.999	0.998	0.994	0.995	0.995	0.995	0.994	0.995	0.995	0.993	0.995	0.995	0.994	0.994	0.993	0.995	0.995
	0.995	0.998	0.997	0.998	0.993	0.994	0.994	0.994	0.993	0.993	0.994	0.992	0.993	0.993	0.993	0.993	0.992	0.993	0.993
OY-M r01/r06	0.991	0.994	0.993	0.992	0.995	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	0.997
	0.993	0.995	0.995	0.993	0.996	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	1.000	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.998
'Ca. P. australiense' r01/r02	0.961	0.963	0.963	0.961	0.963	0.968	0.968	0.968	0.965	0.966	0.967	0.965	0.966	0.966	0.966	0.965	0.966	0.966	0.966
	0.963	0.965	0.965	0.964	0.965	0.970	0.970	0.970	0.967	0.968	0.969	0.967	0.968	0.968	0.968	0.967	0.968	0.968	0.968
'Ca. P. mali' R0001/R0017	0.916	0.917	0.918	0.917	0.920	0.923	0.924	0.923	0.920	0.921	0.921	0.920	0.922	0.921	0.921	0.920	0.921	0.920	0.919
	0.916	0.917	0.918	0.917	0.920	0.923	0.924	0.923	0.920	0.921	0.921	0.920	0.922	0.921	0.921	0.920	0.921	0.920	0.919
A. laidlawii 0067/1147	0.861	0.861	0.864	0.862	0.865	0.869	0.869	0.869	0.864	0.865	0.866	0.866	0.868	0.865	0.867	0.864	0.867	0.865	0.866
	0.861	0.861	0.864	0.862	0.865	0.869	0.869	0.869	0.864	0.865	0.866	0.866	0.868	0.865	0.867	0.864	0.867	0.865	0.866
ca2006/5 A/B	0.992	0.995	0.994	0.993	0.995	0.998	0.998	0.998	0.997	0.997	0.998	0.996	0.997	0.997	0.997	0.997	0.996	0.997	1.000
	0.991	0.993	0.993	0.991	0.994	0.998	0.998	0.998	0.997	0.997	0.998	0.996	0.997	0.997	0.997	0.997	0.996	0.997	0.996
	ca2006/5 A	ca2006/5 B	MBSColombia	CA	LEO	KVF	PPT	ACLR-AY	PopD	AYWB r01	AYWB r04	OY-M r01	OY-M r06	'Ca. P. australiense' r01	'Ca. P. australiense' r02	'Ca. P. mali' R0001	'Ca. P. mali' R0017	A. laidlawii 0067	A. laidlawii 1147
AYWB r01/r04	0.995	0.993	0.995	0.993	0.994	0.993	0.995	0.991	0.990	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	0.993	0.992	0.993	0.991	0.993	0.992	0.993	0.990	0.988	0.999	/	/	/	/	/	/	/	/	/
OY-M r01/r06	0.997	0.997	0.998	0.993	0.995	0.994	0.995	0.993	0.990	0.994	0.993	/	/	/	/	/	/	/	/
	0.998	0.998	0.999	0.995	0.996	0.995	0.996	0.995	0.992	0.995	0.994	0.998	/	/	/	/	/	/	/
'Ca. P. australiense' r01/r02	0.967	0.966	0.966	0.967	0.968	0.966	0.967	0.965	0.960	0.964	0.962	0.965	0.967	/	/	/	/	/	/
	0.969	0.968	0.968	0.969	0.970	0.969	0.970	0.967	0.962	0.966	0.964	0.967	0.969	0.998	/	/	/	/	/
'Ca. P. mali' R0001	0.921	0.921	0.921	0.924	0.925	0.927	0.924	0.922	0.918	0.918	0.917	0.920	0.921	0.914	0.917	/	/	/	/
	0.921	0.921	0.921	0.924	0.925	0.927	0.924	0.922	0.918	0.918	0.917	0.920	0.921	0.914	0.917	1.000	/	/	/
A. laidlawii 0067/1147	0.869	0.867	0.866	0.869	0.869	0.875	0.868	0.868	0.863	0.864	0.865	0.866	0.868	0.862	0.865	0.866	0.866	/	/
	0.869	0.867	0.866	0.869	0.869	0.875	0.868	0.868	0.863	0.864	0.865	0.866	0.868	0.862	0.865	0.866	0.866	1.000	/
ca2006/5 A/B	/	/	0.998	0.993	0.994	0.993	0.994	0.993	0.991	0.995	0.993	0.997	0.998	0.967	0.969	0.921	0.921	0.869	0.869
	0.996	/	0.999	0.993	0.994	0.993	0.994	0.993	0.991	0.993	0.992	0.997	0.998	0.966	0.968	0.921	0.921	0.867	0.867

Od pripadnika podgrupe 16SrI-P u NCBI Banci gena se nalaze tri sekvence *tuf* gena (JN005713 (842 bp), JN005714 (842 bp) i JN005717 (841 bp)) i četiri sekvence *rp* gena (JN005718 (1240 bp), JN005719 (1240 bp), JN005722 (1240 bp) i JN005723 (1240 bp)). Sve sekvence su od sojeva izolovanih iz topole iz Hrvatske. Soj PopD ima 99.8-99.9% identičnosti nukleotidnih i 100% aminokiselinskih sekvenci *tuf* gena, odnosno 99.7-99.8% nukleotidnih i 99.5-100% aminokiselinskih sekvenci *rp* gena sa navedenim sekvencama.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci skoro celog 16S rRNK gena u okviru AY fitoplazmi pokazuje jasno odvajanje sojeva podgrupe I-C u zaseban klaster sa visokom vrednošću stabilnosti (bootstrap vrednost) od 93%, kao i odvajanje sojeva podgrupe I-A, osim soja GD, u zaseban klaster sa još većom vrednošću stabilnosti od 95% (Slika 40). Jasno se uočava i odvajanje sojeva ACLR-AY (AY-A) i PopD koji predstavljaju podgrupe 16SrI-F i I-P u zasebne linije. Međutim, njihovo mesto u filogenetskom stablu nije jasno određeno pošto su njihove vrednosti stabilnosti jako niske, odnosno manje su od 50%, pa nisu prikazane na stablu. Sojevi koji pripadaju podgrupama I-M i I-L se nalaze među članovima podgrupe I-B, ali ni njihovo mesto nije jasno definisano s obzirom na to da je vrednost stabilnosti manja od 50%. Međutim, ono što se uočava na ovom filogenetskom stablu jeste da se u okviru klastera podgrupe I-B jedan od 16S rDNK operona soja ca2006/5 nalazi u zasebnom klasteru zajedno sa sojem AY-J, pri čemu je vrednost stabilnosti visoka i iznosi 90%. Drugi operon soja ca2006/5 se nalazi u klasteru zajedno sa sojevima MBSColombia (16SrI-B) i sojem PopD (16SrI-P) međutim vrednost stabilnosti je ispod 50%.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu celog *groEL* gena ima u osnovi istu topologiju kao i stablo 16S rRNK, s tim što je ovde došlo još i do izdvajanja novih klastera unutar podgrupa 16SrI-A, I-B i I-C (Slika 41). Naime, soj GD se pojavljuje odvojeno od ostalih sojeva iz podgrupe 16SrI-A, kao što i sojevi MBSColombia, AY-J i ca2006/5 formiraju zaseban klaster unutar podgrupe 16SrI-B (vrednost stabilnosti je 85%), pri čemu sojevi AY-J i ca2006/5 grupišu zajedno u odnosu na MBSColombia sa vrednošću stabilnosti od 73%. Unutar podgrupe 16SrI-C se uočavaju dva klastera koja se sastoje od sojeva CA i LEO (vrednost stabilnosti od 70%) odnosno KVF i PPT. Sa druge strane sojevi AVUT, AY2192 i PRIVA koji pripadaju podgrupama 16SrI-M i I-L se nalaze u jednom klasteru zajedno sa ostalim sojevima iz podgrupe 16SrI-B koji ceo

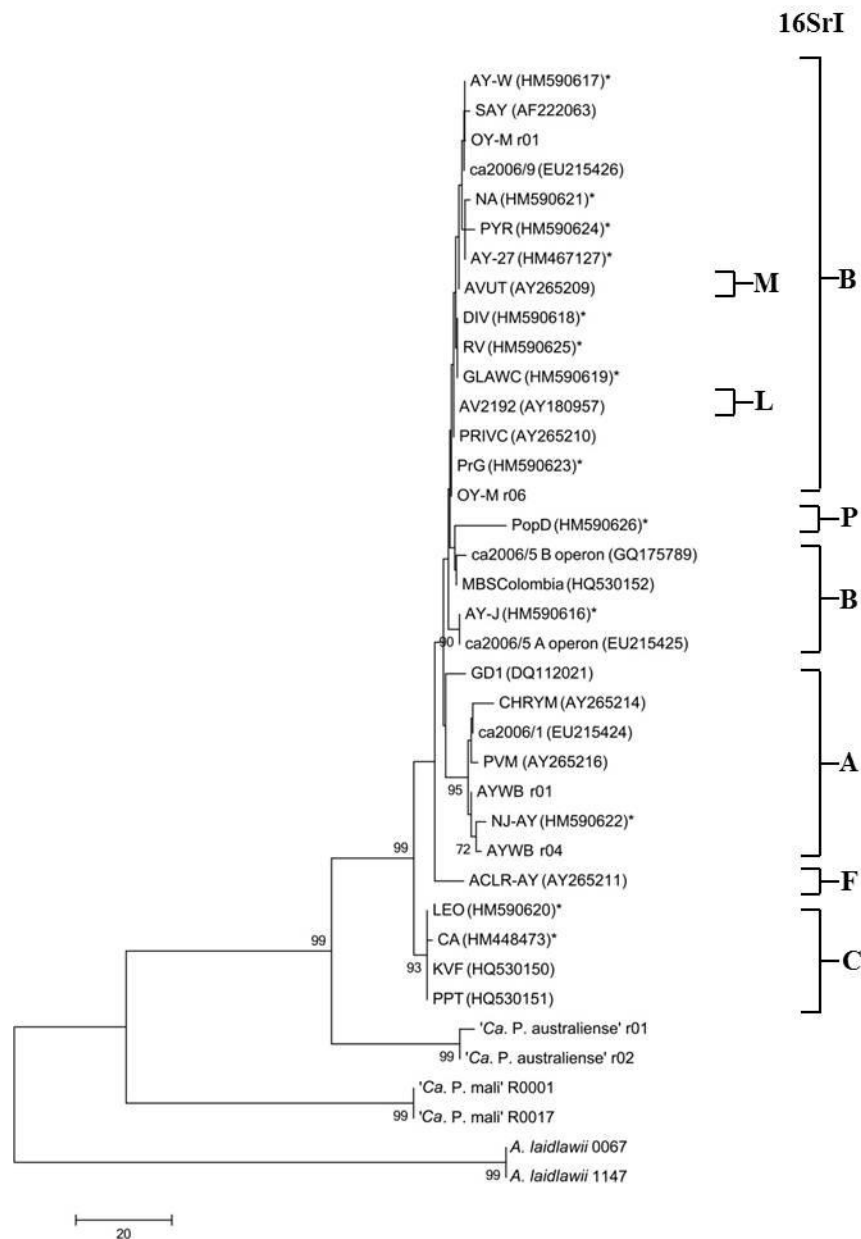
ima vrednost stabilnosti od 99%. Soj AY-A, pripadnik podgrupe 16SrI-F, nalazi se kao zasebna grana između soja GD i ostalih sojeva iz podgrupe 16SrI-A, međutim vrednost stabilnosti je manja od 50%, pa vrednost nije prikazana na slici. Soj PopD (16SrI-P) čini potpuno odvojenu granu od svih ostalih sojeva, pri čemu vrednost stabilnosti za grupisanje ostalih sojeva u jedan klaster iznosi 99%. Što se tiče međusobnog odnosa podgrupa, na filogenetskom stablu se jasno uočavaju tri grupacije sojeva - jednu čine grupisani sojevi iz podgrupa 16SrI-A, I-F i I-C, drugu čine sojevi iz podgrupe 16SrI-B, i treći je soj PopD koji je odvojen u zasebnu liniju.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu aminokiselinskih sekvenci *groEL* gena (podatak nije prikazan) je pokazalo identično grupisanje sojeva u klaster kao i kod stabla rekonstruisanog na osnovu nukleotidnih sekvenci, osim kod sojeva podgrupe 16SrI-C koji su se svi nalazili u jednom nepodeljenom klasteru. To je iz razloga što se nukleotidne sekvence ovih sojeva razlikuju u jednom nukleotidu koji ne utiče na promenu aminokiselinskog sastava, tako da je identičnost njihove aminokiselinske sekvence 100%, pa samim tim nema ni podele u dva klastera na osnovu aminokiselinske sekvence.

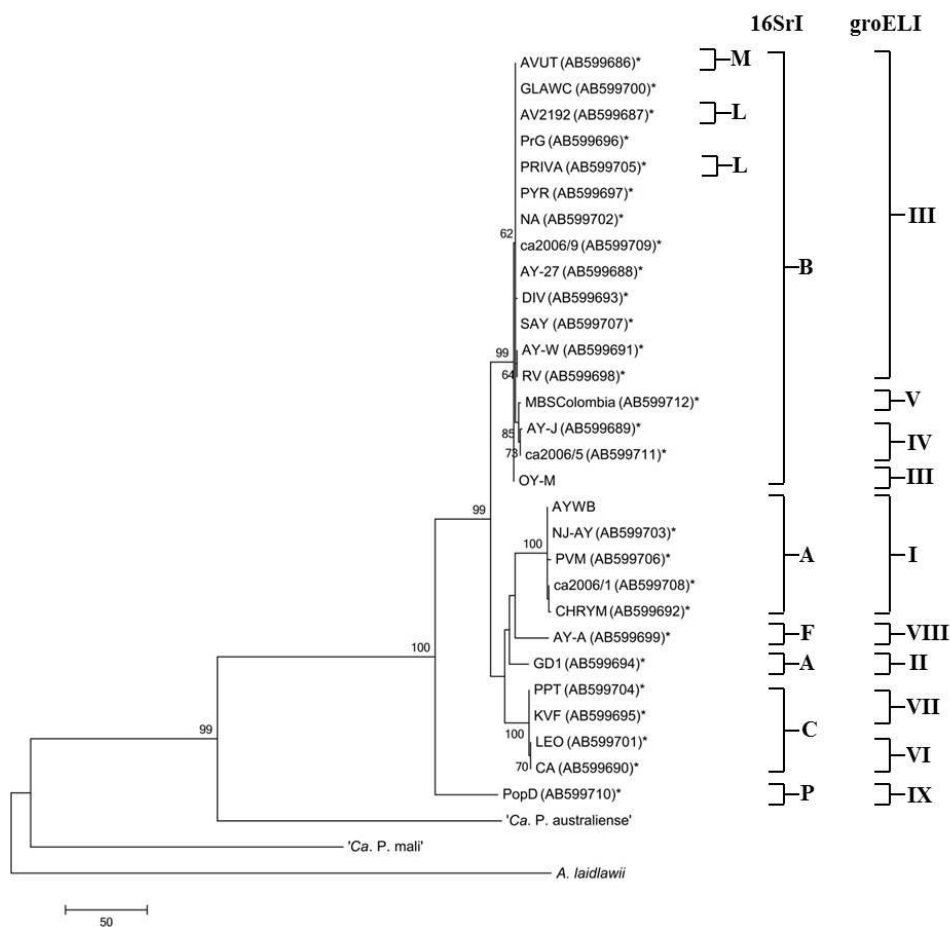
Devet zasebnih linija koje se uočavaju na filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu sekvenci *groEL* gena, u skladu su sa podelom na *groELI* podgrupe, napravljenu na osnovu RFLP analize.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu združenih sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena ima identičnu topologiju kao i stablo rekonstruisano na osnovu *groEL* gena (Slika 42). Na ovom filogenetskom stablu se uočava jasno odvajanje šest linija sa visokim vrednostima stabilnosti. Sojevi koji pripadaju podgrupama 16SrI-B, I-M i I-L se nalaze u klasteru čija vrednost stabilnosti iznosi 100% i u okviru koga se odvaja još jedan klaster koga čine sojevi MBSColombia i ca2006/5 sa vrednošću stabilnosti od 99%. Pripadnici podgrupa I-A (osim soja GD) i I-C se takođe nalaze u zasebnim klasterima sa vrednošću stabilnosti od 100%. Ono što se uočava na ovom rekonstruisanom filogenetskom stablu je da se soj GD jasno odvojio u zasebnu liniju u odnosu na ostale članove podgrupe I-A, kao i da se sojevi iz podgrupa I-A, I-F i I-C nalaze grupisani zajedno, u odnosu na sojeve podgrupe I-B, sa vrednošću stabilnosti od 95%. Soj PopD

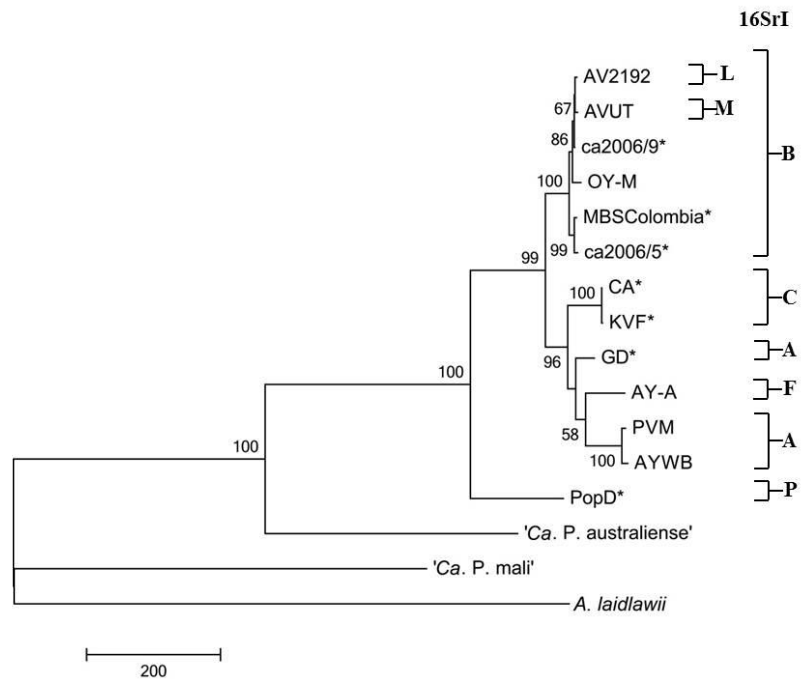
(16SrI-P) se nalazi u zasebnoj liniji odvojenoj od svih ostalih sojeva AY fitoplazmi koji se nalaze grupisani zajedno sa vrednošću stabilnosti od 100%.



Slika 40. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci skoro celog 16S rRNK gena korišćenjem Maximum Parsimony metode i analize stabilnosti sa 1000 ponavljanja. Sekvenca *A. laidlawii* upotrebljena je kao spoljna grupa sa svrhom da ukoreni stablo. Na filogenetskom stablu su prikazane samo vrednosti stabilnosti veće od 50%, a pripadnost soja određenoj podgrupi prikazana je sa desne strane stabla. Sojevi označeni zvezdicom su oni kod kojih je sekvenca dobijena u ovom doktoratu.



Slika 41. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci celog *groEL* gena korišćenjem Maximum Parsimony metode i analize stabilnosti sa 1000 ponavljanja. Sekvenca *A. laidlawii* upotrebljena je kao spoljna grupa sa svrhom da ukoreni stablo. Na filogenetskom stablu su prikazane samo vrednosti stabilnosti veće od 50%, a pripadnost soja određenoj podgrupi, kako 16SrI- tako i groELI-, prikazana je sa desne strane stabla. Sojevi označeni zvezdicom su oni kod kojih je sekvenca dobijena u ovom doktoratu.



Slika 42. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena korišćenjem Maximum Parsimony metode i analize stabilnosti sa 1000 ponavljanja. Sekvenca *A. laidlawii* upotrebljena je kao spoljna grupa sa svrhom da ukoreni stablo. Na filogenetskom stablu su prikazane samo vrednosti stabilnosti veće od 50%, a pripadnost soja određenoj 16SrI podgrupi prikazana je sa desne strane stabla. Sojevi označeni zvezdicom su oni kod kojih je neka od sekvenci ova tri gena dobijena u ovom doktoratu.

## 5. DISKUSIJA

Od kada su identifikovane (**Doi i sar., 1967**), fitoplazme su vremenom sve intenzivnije proučavane i utvrđeno je da su one patogeni mnogobrojnih biljnih vrsta kod kojih izazivaju različita oboljenja, a u nekim slučajevima su izazivači ozbiljnih epidemija ekonomski važnih biljaka. Pošto fitoplazme još uvek nisu uspešno odgajene u *in vitro* uslovima, njihova identifikacija kao i klasifikacija se uglavnom bazira na molekularnim tehnikama kao što je PCR koji je obično praćen RFLP metodom (**Lee i sar., 1998b; Bertaccini, 2007**). Upotreba molekularnih metoda koje su se intenzivno razvile tokom poslednje decenije, pokazala se kao precizniji i pouzdaniji metod od kriterijuma biološke prirode koji su se dugo upotrebljavali pri detekciji i identifikaciji fitoplazmi. Najčešće upotrebljavan visokokonzervativan gen za 16S rRNK se pokazao kao odličan molekularni marker za klasifikaciju fitoplazmi na nivou 16Sr grupa (**Lee i sar., 2000**). Međutim, zbog njegove visoke konzervativnosti sekvenci, kao i ne tako retke pojave razlika među 16S rDNK operonima u okviru jedinke, ovaj gen nije toliko informativan marker pri identifikaciji i diferencijaciji srodnih sojeva ili sojeva koji imaju različita biološka i ekološka svojstva. Da bi se omogućio brži i bolji razvoj mera kontrole bolesti, neophodno je znati odnos između raznih sojeva fitoplazmi i njihovih jedinstvenih ekoloških niša. Često ove sojeve nije moguće razlikovati analizom sekvenci 16S rDNK, pa se javlja potreba za razvojem dodatnih molekularnih markera za finiju diferencijaciju srodnih sojeva fitoplazmi. Iz ovih razloga, pri identifikaciji i klasifikaciji sojeva fitoplazmi neophodno je uključiti dodatne jedinstvene biološke karakteristike (vrsta vektora i biljke domaćina) kao i dodatne molekularne markere (**Lee i sar., 2010**).

Do danas su kao dodatni molekularni markeri upotrebljavani manje ili više konzervativni geni kao što je gen faktora elongacije (*tuf* gen), gen koji pripada opštem sistemu za sekreciju proteina (*secY* gen) i geni ribozomalnih proteina (*rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC* i *rplP*) (**Schneider i sar., 1997; Marcone i sar., 2000; Langer i Maixner, 2004; Lee i sar., 2004a, 2004b; Martini i sar., 2007; Lee i sar., 2010**).

Gen koji kodira veliku subjedinicu šaperonina, *groEL* gen, spada u grupu sveprisutnih i konzervativnih gena koji je od strane mnogih autora upotrebljavan kao



molekularni marker za identifikaciju i bolju tipizaciju vrsta (Goh i sar., 1996; Satheesh i sar., 2002; Woo i sar., 2002; Karenlampi i sar., 2004). Takođe je proučavan i kod šest vrsta mikoplazmi, pri čemu je utvrđeno da postoji visoka homologija sekvenci ovog gena među proučavanim vrstama (Scherm i sar., 2002).

U ovoj doktorskoj tezi je, uz upotrebu prajmera P1/P7, kod svih testiranih sojeva AY fitoplazmi iz kolekcije i iz Srbije uspešno umnožen 16S rRNK gen čime je potvrđeno postojanje ciljne DNK, DNK fitoplazmi. Na sve testirane sojeve je potom primenjena *nested* PCR reakcija uz upotrebu prajmera R16F2n/R16R2, a na dobijene amplikone je primenjena RFLP metoda upotrebom restrikcionih enzima *HhaI*, *TruII*, *RsaI* i *Tsp509I*. Na ovaj način su svi testirani sojevi klasifikovani kao pripadnici AY fitoplazmi (16SrI ribozomalna grupa), podgrupa 16SrI-A, I-B, I-C, I-F ili I-P.

Upotrebom novodizajniranih prajmera AYgroelF/R kod svih testiranih sojeva AY fitoplazmi je uspešno umnožen skoro ceo *groEL* gen (dužina dobijenog fragmenta iznosi oko 1.4 kb), dok kod sojeva koji pripadaju drugim ribozomalnim grupama nije došlo do umnožavanja ovog fragmenta. Na ovaj način je potvrđena specifičnost novodizajniranih prajmera. Dobijeni fragmenti su podvrgnuti RFLP analizi pomoću restrikcionih enzima *TaqI*, *TruII* i *AluI* što je rezultiralo dobijanjem šest (*TruII*), odnosno osam (*AluI*) različitih restrikcionih profila. Na osnovu dobijenih profila svi sojevi AY fitoplazmi su na osnovu *groEL* gena klasifikovani u devet groELI podgrupa (I-IX), dok su na osnovu 16S rDNK klasifikovani u pet 16SrI podgrupa.

Od osam sojeva AY fitoplazmi izolovanih iz biljaka topole i vinke poreklom iz Srbije, a na osnovu PCR-RFLP metode 16S rDNK, četiri su identifikovana kao pripadnici podgrupe 16SrI-B (84/11, 87/11, 90/11 i 91/11-svi su poreklom sa vinke), dva kao pripadnici podgrupe 16SrI-C (79/10 i 205/10-takođe poreklom sa vinke) i dva kao pripadnici podgrupe 16SrI-P (PopD i 92/10-oba poreklom sa topole). Analizom *groEL* gena je utvrđeno da četiri soja iz podgrupe I-B pripadaju podgrupi groELI-III kao i većina referentnih sojeva iz ove 16SrI podgrupe, a dva soja iz podgrupe I-C pripadaju podgrupi groELI-VII kao i referentni sojevi KVF i PPT koji su oba poreklom iz Francuske. Preostala dva soja poreklom sa topole iz Srbije koji su pripadnici podgrupe I-P su analizom *groEL* gena klasifikovani kao pripadnici podgrupe groELI-IX, pri čemu su ova dva soja jedini pripadnici ove groELI podgrupe.

S obzirom na to da se soj ca2006/5 (I-B) iz Srbije nalazi u okviru podgrupe groELI-IV zajedno sa sojem AY-J (takođe I-B) koji je poreklom iz Francuske, pri čemu su ova dva soja jedini pripadnici ove groELI podgrupe, kao i da sojevi 79/10 i 205/10 (I-C, iz Srbije) pripadaju podgrupi groELI-VII zajedno sa sojevima KVF i PPT (I-C, iz Francuske), nameće se pitanje međusobnog odnosa sojeva iz Srbije i Francuske (filogenetskih, bioloških, epidemioloških karakteristika i dr.). Odgovor na ovo pitanje može biti dat u nekim budućim istraživanjima pri analizi većeg broja sojeva iz ove dve zemlje, kao i analizom AY fitoplazmi u vektorima.

Upotrebom f/rTufAy, rpL2F3/rp(I)R1A i AYsecYF1/R1 prajmera, koji se koriste za umnožavanje *tuf*, dela *rp* operona i *secY* gena, kod svih testiranih sojeva AY fitoplazmi došlo je do umnožavanja fragmenata očekivanih veličina. Primenom *MboI*, *Tsp509I* i *TruII* restrikcionih enzima na f/rTufAy amplikone, *HhaI*, *AluI* i *Tsp509I* restrikcionih enzima na rpL2F3/rp(I)R1A amplikone, odnosno *Tsp509I* i *TruII* restrikcionih enzima na AYsecYF1/R1 amplikone, testirani sojevi AY fitoplazmi su klasifikovani u šest tufI i po sedam rpI i secYI podgrupa.

Poređenjem dobijenih rezultata *groEL*, *tuf*, *rp* i *secY* gena na osnovu PCR-RFLP metode primenjene na sojeve AY fitoplazmi koji pripadaju podgrupama 16SrI-A, I-B, I-C, I-F i I-P, uočava se da je došlo do dalje diferencijacije podgrupe I-A u odnosu na sva četiri proučavana gena, kao i podgrupe I-B u odnosu na *groEL*, *rp* i *secY* gen. Naime, sojevi GD i MBSColombia su pokazali jasno odvajanje od ostalih pripadnika podgrupe I-A odnosno I-B, kao što su i sojevi AY-J i ca2006/5 pokazali međusobnu sličnost i povezanost sa sojem MBSColombia, a različitost od ostalih pripadnika podgrupe I-B. Pripadnici podgrupa I-L i I-M sa druge strane nisu pokazali nikakvu razliku u odnosu na pripadnike podgrupe I-B u odnosu na sva četiri proučavana gena. Proučavanjem *groEL* gena došlo je i do izdvajanja još jednog dela pripadnika podgrupe I-B, čime je ona diferencirana na tri nove groELI podgrupe, a takođe je došlo i do diferencijacije u okviru podgrupe I-C na dve groELI podgrupe, što nije bio slučaj pri proučavanju ostalih gena. Na ovaj način je na osnovu PCR-RFLP metode pokazano da je *groEL* gen informativniji u odnosu na 16S rRNK, *tuf*, *rp* i *secY* gen.

Podgrupa 16SrI-P je prvi put opisana od strane Šeruge i sar. (2003) kada je i utvrđeno da se ova podgrupa nalazi na biljkama topole a postavljena je hipoteza da je

ova podgrupa ili vezana za biljku domaćina ili za oblast Hrvatske u kojoj je i detektovana. Pronalaskom podgrupe I-P na dve biljke topole u Srbiji potvrđeno je da se ova podgrupa javlja na topoli. Na osnovu analize javno dostupnih sekvenci 16S rDNK sojeva AY fitoplazmi iz različitih podgrupa i podgrupe I-P i na osnovu generisanih virtuelnih RFLP profila, utvrđeno je da je upotrebom *Tsp509I* restrikcionog enzima na R16F2n/R16R2 amplikon moguće razlikovati pripadnike podgrupe I-P od ostalih podgrupa i na ovaj način ih identifikovati. Ovaj podatak je u skladu sa restrikcionom mapom koju su dali Šeruga i sar. (2003) na kojoj se vidi da podgrupa I-P ima jedno *Tsp509I* restrikciono mesto više u odnosu na ostale podgrupe. Pored 16S rDNK, isti autori su analizirali *rp* gen, pri čemu je članovima podgrupe 16SrI-P dodeljena podgrupa rpI-O, i *tuf* gen pri čemu nije određena tufI podgrupa. U ovoj doktorskoj tezi su pored tri gore pomenuta gena analizirani i *secY* i *groEL* geni podgrupe 16SrI-P a u odnosu na članove podgrupa I-A, I-B, I-C i po prvi put I-F. Članovima podgrupe 16SrI-P su pri tome dodeljene tufI-O i secYI-O podgrupe sledeći literaturne podatke o dodeli podgrupe i groELI-IX podgrupa. Takođe su sekvencirani amplikoni svih pet analiziranih gena soja PopD (16SrI-P) koji je poreklom iz Srbije, a sekvence su deponovane u NCBI Banku gena. Ove sekvence predstavljaju prve javno dostupne sekvence *secY* i *groEL* gena pripadnika podgrupe 16SrI-P.

Upotrebom P1/P7 i R16F2n/R16R2 prajmera u direktnoj ili *nested* PCR reakciji i primenom *TruII* restrikcionog enzima na dobijene R16F2n/R16R2 amplikone, u Srbiji je u periodu od 2009. do 2011. godine detektovano i identifikovano 116 sojeva Stolbur fitoplazmi poreklom sa devet biljnih vrsta. Svi sojevi su imali identične RFLP profile osim soja 284/09 poreklom sa duvana koji je pokazao manja odstupanja kada je digeriran sa *TruII* restrikcionim enzimom. Na osnovu sekvence 16S rDNK ovog soja potvrđeno je postojanje dodatnog *TruII* restrikcionog mesta. Takođe na osnovu sekvence 16S rDNK soja 99/10 poreklom sa ljute papričice je detektovano postojanje razlika između dva 16S rDNK operona kod ovog soja, pri čemu jedan operon poseduje dodatno *MboII* restrikciono mesto, a drugi ne. Ovaj podatak je potvrđen primenom RFLP metode pomoću *MboII* restrikcionog enzima na R16F2n/R16R2 amplikon pri čemu je došlo do pojave mešanih profila oba operona. Postojanje razlika u okviru R16F2n/R16R2 regiona koji obuhvata 1.2 kb 16S rDNK, a koje se nalaze u okviru nekog od restrikcionih mesta, kod sojeva 99/10 i 284/09 u odnosu na sve druge Stolbur

sojeve, je važno iz razloga što su sve grupe i skoro sve podgrupe fitoplazmi klasifikovane na osnovu postojanja razlika u ovom regionu koje rezultuju promenom RFLP profila. Sam sistem klasifikacije na osnovu RFLP profila je postavljen jer se smatra da su restrikciona mesta veoma konzervativna.

Kod 103 soja od svih 116 testiranih a prethodno detektovanih i identifikovanih sojeva Stolbur fitoplazmi, uspešno je umnožen *tuf* gen upotrebom f/rTufAy prajmera. Nakon primene *HpaII* restrikcionog enzima svi sojevi su identifikovani kao pripadnici *tuf* type II podgrupe.

Primenom novodizajniranih STOLgroesF/STOLstampR prajmera na 39 odabranih sojeva Stolbur fitoplazmi iz Srbije, kao i na dva soja Stolbur fitoplazmi iz Hrvatske koji pripadaju *tuf* type I podgrupi, uspešno je umnožen *groEL* gen kod svih testiranih sojeva osim jednog koji je takođe uspešno umnožen u *nested* reakciji primenom AYgroelF/STOLgroelR2 prajmera.

Analizom *groEL* gena kod Stolbur fitoplazmi pomoću novodizajniranih specifičnih prajmera, a upotrebom PCR-RFLP metode, utvrđeno je postojanje dve grupe Stolbur fitoplazmi koje se na nivou 16S rDNK ne mogu identifikovati. Analizom sekvenci *groE* operona utvrđeno je postojanje pet genotipova Stolbur fitoplazmi kao i postojanje razlika na nivou *groEL* gena između sojeva Stolbur fitoplazmi koji pripadaju različitim podgrupama na nivou *tuf* gena, pri čemu ove razlike takođe nije moguće detektovati na nivou 16S rDNK. Ovom metodom je pokazano da je gen za veliku subjedinicu šaperonina kod Stolbur fitoplazmi takođe informativniji, kao i kod AY fitoplazmi, kako u odnosu na 16S rDNK tako i u odnosu na *tuf* gen.

Kako se u nekim biljnim vrstama mogu naći i Stolbur i AY fitoplazme u odvojenim infekcijama, pri čemu razlika u tipovima simptoma koje ove dve grupe fitoplazmi izazivaju kod istih domaćina nije jasno uočljiva, upotreba multipleks PCR reakcija za umnožavanje *groEL* gena kod ovih grupa fitoplazmi igra značajnu ulogu u njihovoj identifikaciji. U samo jednom koraku PCR reakcije moguće je detektovati ili AY ili Stolbur fitoplazme, pa čak i obe ako se nađu u mešanoj infekciji. Na ovaj način se proces identifikacije ovih grupa fitoplazmi značajno ubrzava, pri čemu su i troškovi analize smanjeni. S obzirom na to da su AY i Stolbur fitoplazme srodne grupe fitoplazmi, svi do sada u literaturi opisani specifični prajmeri za umnožavanje 16S

rDNK, *tuf*, *rp* ili *secY* gena su manje ili više umnožavali ove gene kod obe grupe fitoplazmi. U ovoj doktorskoj tezi su prvi put dizajnirani prajmeri koji specifično umnožavaju samo jednu od ove dve grupe fitoplazmi, pa je samim tim i omogućena upotreba multipleks PCR reakcije pri njihovoj identifikaciji. Kako su prajmeri dizajnirani da se upotrebljavaju i u drugoj (*nested*) reakciji, moguće ih je upotrebljavati ne samo pri identifikaciji već i pri detekciji fitoplazmi.

Na osnovu podataka iz literature i poređenjem sa dobijenim bioinformatičkim podacima kod AY i Stolbur fitoplazmi, uočava se da postoje razlike u aminokiselinskom sastavu kod obe grupe fitoplazmi u odnosu na mesta u GroEL proteinu kod *E. coli* koja su po literaturnim podacima važna za obavljanje funkcije savijanja proteina. Naime aminokiseline R<sup>452</sup>, E<sup>461</sup>, S<sup>463</sup> i V<sup>464</sup> su po literaturnim podacima odgovorne za međusobno vezivanje prstenova kod *E. coli* (**Ranson i sar., 1998**). Kod AY fitoplazmi se na ovim mestima nalaze Y<sup>452</sup>, S<sup>461(459)</sup>, D<sup>463(462)</sup> i V<sup>464(463)</sup>, a kod Stolbur fitoplazmi Y<sup>452</sup>, D<sup>461(459)</sup>, H<sup>463(462)</sup> i I<sup>464(463)</sup>. Pitanje značaja promenjene AK na mestu 452, praktično zamene AK na mestima 461 (kod fitoplazmi je to mesto 459) i 463 (odnosno 462) kod AY fitoplazmi, odnosno promene AK na ovim mestima kod Stolbur fitoplazmi, ostaje otvoreno. Na osnovu karaktera bočnih lanaca AK može se spekulirati da kod AY fitoplazmi možda funkcija nije promenjena jer se kod *E. coli* na mestima 461 i 463 nalaze jedna neutralno polarna i jedna negativno naelektrisana (kisela) AK, što je i slučaj kod AY fitoplazmi. Odgovor na pitanje značaja zamene ovih aminokiselina, postojanja jedne AK više u ovom regionu i mogućnosti da se kod fitoplazmi tokom evolucije razvio nešto drugačiji način međusobnog vezivanja prstenova, najverovatnije će biti dat onda kada bude moguće ispitati funkcionisanje celog GroE sistema nakon njegove izolacije iz fitoplazmi, što je za sada praktično nemoguće zbog održavanja fitoplazmi isključivo unutar biljke domaćina. O značaju hidrolize ATP-a pri procesu savijanja proteina i očuvanju asparaginske kiseline na mestu 398 govori i činjenica da je kod AY i Stolbur fitoplazmi, kao i kod '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. australiense*', *A. laidlawii*, kod četiri vrste mikoplazmi kod kojih je dokazano da imaju *groE* operon i kod *B. subtilis* ova aminokiselina nepromenjena. Po literaturnim podacima Arg<sup>197</sup> iz apikalnog domena i Glu<sup>386</sup> iz intermedijernog domena zajedno stvaraju soni most u krajnjoj konformaciji velike subjedinice šaperonina, koji je odgovoran za vezivanje ATP-a za oba prstena (**Ranson i sar., 1998**). Kod AY i Stolbur

fitoplazmi se na ovim mestima nalaze lizin (K) i asparaginska kiselina (D), međutim ove aminokiseline imaju bočne lance istog karaktera kao i arginin (R) i glutaminska kiselina (E) koje su zamenile, odnosno i one su bazne/kisele. S obzirom na to da po literaturnim podacima soni most grade jedna bazna (npr. arginin) i jedna kisela (npr. glutaminska kiselina) aminokiselina (**Kumar i Nussinov, 2002**), kod AY i Stolbur fitoplazmi je u ovom smislu situacija nepromenjena. Zbog toga je moguće izvesti zaključak da, iako se na mestima 197 i 386 kod AY i Stolbur fitoplazmi ne nalaze očekivane aminokiseline, funkcija stvaranja sonog mosta između ove dve AK ostaje nepromenjena.

Uporednom analizom sekvenci 16S rDNK i *groEL* gena utvrđeno je da srednja vrednost procenta sličnosti za 16S rDNK iznosi 99.5% a kreće se od 98.7 do 99.6% između podgrupa, odnosno između 99.1 i 100% unutar podgrupa. Najmanja vrednost procenta sličnosti je uočena između podgrupe 16SrI-P i ostalih podgrupa. Sa druge strane, srednja vrednost procenta sličnosti nukleotidnih sekvenci *groEL* gena posmatranih sojeva AY fitoplazmi iznosi 98.1% a kreće se od 93.7 do 97.8% između podgrupa, odnosno od 98 do 100% unutar njih. I u odnosu na *groEL* gen najmanja sličnost se uočava između podgrupe 16SrI-P i ostalih podgrupa. Kada se sekvenca *groEL* gena prevede u aminokiselinsku sekvencu, uočava se da srednja vrednost procenta sličnosti tada iznosi 97.8% krećući se od 94.6 do 97.9% između podgrupa, odnosno od 97.7 do 100% unutar njih. Ovaj opseg se za soj PopD (16SrI-P) kreće od 94.6 do 96.2% sličnosti aminokiselinskih sekvenci prevedenog *groEL* gena.

Posmatrajući procenat sličnosti sekvenci unutar podgrupa utvrđeno je da se soj GD kao pripadnik podgrupe 16SrI-A najviše razlikuje od ostalih članova ove podgrupe nego bilo koji drugi soj unutar bilo koje druge podgrupe i na nivou 16S rDNK i na nivou *groEL* gena. Njegov procenat sličnosti sekvenci 16S rDNK se kreće od 99.1 do 99.5%, a *groEL* gena od 98 do 98.1% dok se u okviru drugih podgrupa unutargrupna sličnost kreće od 99.4 do 100% za 16S rDNK, odnosno od 99.7 do 100% za *groEL* gen.

Na osnovu ovih rezultata se vidi da *groEL* gen poseduje manju međugrupnu sličnost sekvenci nego 16S rDNK i stoga ima veću moć razdvajanja srodnih sojeva što je i potvrđeno filogenetskom analizom.

Analizom sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena jednog broja testiranih sojeva utvrđeno je da srednja vrednost procenta međusobne identičnosti sojeva AY fitoplazmi za *tuf* gen iznosi 97.2% a kreće se od 93 do 97.9% između podgrupa, za *rp* gen iznosi 97.4% pri čemu je opseg od 93.2 do 98.3% između podgrupa, a za *secY* gen iznosi 94.8% a kreće se od 84 do 97.2% između podgrupa. Najnižu vrednost procenta sličnosti sekvenci ima soj PopD sa nekim od sojeva iz podgrupe 16SrI-A ili sojem ca2006/5 iz podgrupe 16SrI-B, u odnosu na sva tri posmatrana gena.

Filogenetska analiza izvedena na osnovu nukleotidnih sekvenci *groEL* gena AY fitoplazmi je pokazala odvajanje istih linija kao i ona izvedena na osnovu aminokiselinske sekvence ovog gena, sa tom razlikom da su se unutar podgrupe 16SrI-C odvojile dve linije na nivou nukleotidnih sekvenci, što nije bio slučaj na nivou aminokiselinskih sekvenci. To je iz razloga što sojevi unutar podgrupe I-C imaju jednu nukleotidnu razliku koja ne rezultuje u promeni prevedene aminokiseline. Filogenetska stabla rekonstruisana na osnovu sekvenci *groEL* gena, 16S rRNK gena i združenih sekvenci *tuf*, dela *rp* operona i *secY* gena su imala u osnovi istu topologiju. Međutim, u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu nukleotidnih sekvenci *groEL* gena došlo je do dalje podele podgrupa 16SrI-A, I-B i I-C. Naime, soj GD (16SrI-A) se nalazi u zasebnoj liniji odvojenoj od ostalih članova podgrupe I-A, a soj MBSColumbia (16SrI-B) se nalazi u klasteru zajedno sa sojevima AY-J i ca2006/5 (takođe I-B) unutar podgrupe I-B. Sa druge strane sojevi iz podgrupa 16SrI-M i I-L se nalaze zajedno sa ostalim sojevima podgrupe I-B. Unutar podgrupe 16SrI-C sojevi CA i LEO grupisani su zajedno u odnosu na sojeve KVF i PPT. Soj AY-A (16SrI-F) se nalazi u zasebnoj liniji što je u skladu sa 16S rDNK, dok je soj PopD (16SrI-P) izdvojen u posebnu liniju odvojenu od svih ostalih sojeva. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu združenih sekvenci *tuf*, *rp* i *secY* gena ima identičnu topologiju kao i stablo rekonstruisano na osnovu *groEL* gena. Na ovom filogenetskom stablu se uočava jasno odvajanje šest linija sa visokim vrednostima butstrapa. I ovde se sojevi koji pripadaju podgrupama 16SrI-B, I-M i I-L nalaze u jednom klasteru u okviru koga se odvaja još jedan klaster koga čine sojevi MBSColumbia i ca2006/5, dok se pripadnici podgrupa I-A (osim soja GD) i I-C nalaze u zasebnim klasterima. Ono što se uočava na ovom rekonstruisanom filogenetskom stablu je da se i ovde soj GD jasno odvojio u zasebnu liniju u odnosu na ostale članove podgrupe I-A, kao i da se sojevi iz podgrupa I-A, I-F i

I-C nalaze grupisani zajedno, u odnosu na sojeve podgrupe I-B. I ovde se, kao i kod filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu nukleotidnih sekvenci *groEL* gena, soj PopD (16SrI-P) nalazi u zasebnoj liniji odvojenoj od svih ostalih sojeva AY fitoplazmi koji se nalaze grupisani zajedno.

Devet linija izdvojenih filogenetskom analizom sekvenci *groEL* gena su u skladu sa podelom sojeva na *groELI* podgrupe na osnovu njihovih RFLP profila. Na ovaj način je potvrđena dalja diferencijacija sojeva AY fitoplazmi izvedena upotrebom PCR-RFLP metode na umnožene amplikone veličine 1397 bp. I filogenetskom analizom i na osnovu RFLP profila *groEL* gena utvrđeno je da se soj GD razlikuje od ostalih članova podgrupe 16SrI-A što je i potvrđeno istim ovim analizama *tuf*, *rp* i *secY* gena.

Ovi rezultati pokazuju da je upotreba *groEL* gena i njegova analiza PCR-RFLP metodom pouzdana metoda kako za detekciju, tako i za identifikaciju sojeva AY fitoplazmi i to ne samo onih iz kolekcije, već i iz uzoraka uzetih iz prirode.



## 6. ZAKLJUČCI

- ☞ Za brži i bolji razvoj mera kontrole bolesti neophodno je znati odnos između raznih sojeva fitoplazmi i njihovih jedinstvenih ekoloških niša i stoga je pri identifikaciji i klasifikaciji sojeva fitoplazmi neophodno uključiti dodatne jedinstvene biološke karakteristike i to vrste vektora i biljke domaćina, kao i dodatne molekularne markere, s obzirom na to da ove sojeve često nije moguće razlikovati analizom sekvenci 16S rDNK.
- ☞ Dizajniranjem sedam specifičnih prajmera i njihovom primenom kod Aster yellows i Stolbur fitoplazmi, omogućeno je uspešno umnožavanje *groEL* gena kod ovih grupa fitoplazmi, kako upotrebom direktne tako i *nested* PCR reakcije.
- ☞ Primenom RFLP metode pomoću *TruI* i *AluI* restrikcionih enzima na dobijene amplikone *groEL* gena moguće je razlikovati srodne sojeve fitoplazmi, što nije moguće na nivou 16S rDNK. Svi testirani sojevi AY fitoplazmi se na osnovu *groEL* gena klasifikuju u devet groELI podgrupa u poređenju sa klasifikacijom na osnovu 16S rDNK gde su isti sojevi klasifikovani u pet 16SrI podgrupa.
- ☞ Analizom *tuf*, *rp* i *secY* gena testirani sojevi AY fitoplazmi su klasifikovani u šest *tufI* i po sedam *rpl* i *secYI* podgrupa pri čemu su analiziranim sojevima podgrupe 16SrI-P (dva soja sa topole poreklom iz Srbije) dodeljene podgrupe *tufI*-O i *secYI*-O.
- ☞ U Srbiji su detektovani novi sojevi AY fitoplazmi koji pripadaju podgrupama 16SrI-B, I-C i I-P. Analizom *groEL* gena ovih sojeva utvrđeno je da pripadaju podgrupama groELI-III, I-VII i I-IX.
- ☞ Analizom *groEL* gena sojeva Stolbur fitoplazmi detektovanih u Srbiji pokazano je da je gen za veliku subjedinicu šaperonina kod Stolbur fitoplazmi takođe informativniji, kao i kod AY fitoplazmi, kako u odnosu na 16S rDNK tako i u odnosu na *tuf* gen i utvrđeno je postojanje pet genotipova na nivou ovog gena.
- ☞ U aminokiselinskom sastavu GroEL proteina kod AY i Stolbur fitoplazmi postoje razlike u odnosu na mesta u GroEL proteinu kod *E. coli* koja su po literaturnim podacima važna za obavljanje funkcije savijanja proteina.

- ☞ Upotrebom multipleks PCR reakcije za umnožavanje *groEL* gena kod AY i Stolbur fitoplazmi moguće je u samo jednom koraku detektovati AY ili Stolbur fitoplazme, čak i obe ako se nađu u mešanoj infekciji. Kako su prajmeri dizajnirani da se upotrebljavaju i u drugoj (*nested*) reakciji, moguće je primeniti multipleks PCR metodu ne samo pri identifikaciji već i pri detekciji fitoplazmi.
- ☞ Filogenetska stabla rekonstruisana na osnovu sekvenci *groEL* gena, 16S rRNK gena i združenih sekvenci *tuf*, dela *rp* operona i *secY* gena imaju u osnovi istu topologiju, a devet linija izdvojenih filogenetskom analizom sekvenci *groEL* gena su u skladu sa podelom sojeva na groELI podgrupe na osnovu njihovih RFLP profila.
- ☞ *groEL* gen poseduje manju međugrupnu sličnost sekvenci nego 16S rDNK i stoga ima veću moć razdvajanja srodnih sojeva što je i potvrđeno filogenetskom analizom.
- ☞ Upotreba *groEL* gena i njegova analiza PCR-RFLP metodom je pouzdana metoda kako za detekciju tako i za identifikaciju sojeva i AY i Stolbur fitoplazmi, i to ne samo onih iz kolekcije već i iz uzoraka uzetih iz prirode.

## 7. LITERATURA

1. Aleksić, Ž., Šutić, D., i Aleksić, D. (1967): Ispitivanje intenziteta prenošenja stolbur virusa cikadom *Hyalesthes obsoletus* Sign. na neke biljke domačine. *Zaštita bilja*, 93-95: 67-73.
2. Anfinsen, C. B. (1973): Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181 (4096): 223–230.
3. Aoki, S., Uehara, K., Imafuku, M., Hasebe, M., and Ito, M. J. (2004): Phylogeny and divergence of basal angiosperms inferred from APETALA3- and PISTILLATA-like MADSbox genes. *Plant Research*, 117: 229-244.
4. Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E., and Foissac, X. (2007): Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (12): 4001-4010.
5. Atanasoff, D. (1973): Stammhexenbessen bei Ulmen und anderen Bäumen. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 9: 241–243.
6. Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., and 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.
7. Beanland, L., Hoy, C. W., Miller, S. A., and Nault, L. R. (1999): Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) transmission of Aster Yellows phytoplasma: Does gender matter? *Environmental Entomology*, 28: 1101-1106.
8. Beanland, L., Hoy, C. V., Miller, S. A., and Nault, L. R. (2000): Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93 (2): 271–276.
9. Berges, R., Cousin, M.-T., Roux, J., Mäurer, R., Seemüller, E. (1997): Detection of phytoplasma infections in declining *Populus nigra* 'Italica' trees and molecular differentiation of the aster yellows phytoplasmas identified in various *Populus* species. *European Journal of Forest Pathology*, 27 (1): 33–43.
10. Bertaccini, A., Davis, R. E., and Lee, I.-M. (1990): Distinctions among mycoplasma-like organisms (MLOs) in *Gladiolus*, *Ranunculus*, *Brassica*, and *Hydrangea* through detection with nonradioactive cloned DNA probes. *Phytopathologia Mediterranea*, 29: 107-113.
11. Bertaccini, A., Arzone, A., Alma, A., Bosco, D., and Vibio, M. (1993): Detection of mycoplasma-like organisms in *Scaphoideus titanus* Ball reared on flavescence dorée infected grapevine by dot hybridizations using DNA probes. *Phytopathologia Mediterranea*, 32: 20-24.

12. Bertaccini, A. and Martini, M. (1999): Ribosomal and nonribosomal primers for sensitive detection and identification of phytoplasmas. *Petria*, 9: 89-92.
13. Bertaccini, A., Carraro, L., Davies, D., Laimer da Câmara Machado, M., Martini, M., Paltrinieri, S., and Seemüller, E. (2000): Micropropagation of a collection of phytoplasma strains in periwinkle and other host plants. Congress of IOM, ACROS, Fukuoka, Japan, p. 101.
14. Bertaccini, A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12: 673-689.
15. Bertaccini, A. (2010):  
[http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=29&Itemid=5](http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5)
16. Bertin, S., Palermo, S., Marzachi, C., and Bosco, D. (2004): A comparison of molecular diagnostic procedures for the detection of aster yellows phytoplasmas (16Sr-I) in leafhopper vectors. *Phytoparasitica*, 32: 141-145.
17. Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997): The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, 277 (5331): 1453-62.
18. Bosco, D., Minucci, C., Boccardo, G., and Conti, M. (1997): Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83: 219-224.
19. Braun, E. J. and Sinclair, W. A. (1979): Phloem necrosis of elms: symptoms and histopathological observations in tolerant hosts. *Phytopathology*, 69: 354-358.
20. Brčák, J. (1979): Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. In: Leafhoppers and Plant Disease Agents. Eds: K. Maramorosch and K. F. Harris. Academic Press, New York, pp. 97-155.
21. Bressan, A., Girolami, V., and Boudon-Padieu, E. (2005): Reduced fitness of the leafhopper vector Scaphoideus titanus exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115: 83-290.
22. Brousseau, R., Hill, J. E., Préfontaine, G., Goh, S.-H., Harel, J., and Hemmingsen, S. M. (2001): *Streptococcus suis* Serotypes Characterized by Analysis of Chaperonin 60 Gene Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4828-4833.
23. Brown, D. R. (2012): Phylum XVI. Tenericutes Murray 1984a. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2<sup>nd</sup> ed., volume 4: The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*). Eds.: N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, W. Ludwig and W. B. Whitman. New York: Springer, pp. 567.

24. Brown, D. R., May, M., Bradbury, J. M., and Johansen, K.-E. (2012): Class I. Mollicutes Edward and Freundt 1967, 267<sup>AL</sup>. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2<sup>nd</sup> ed., volume 4: The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*). Eds.: N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, W. Ludwig and W. B. Whitman. New York: Springer, pp. 568-573.
25. Carle, P., Saillard, C., Carrere, N., Carrere, S., Duret, S., Eveillard, S., Gaurivaud, P., Gourgues, G., Gouzy, J., Salar, P., Verdin, E., Breton, M., Blanchard, A., Laigret, F., Bove, J. M., Renaudin, J., and Foissac, X. (2010): Partial chromosome sequence of *Spiroplasma citri* reveals extensive viral invasion and important gene decay. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (11): 3420-3426.
26. Carraro, L., Loi, N., and Ermacora, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 695-700.
27. Carraro, L., Ferrini, F., Martini, M., Ermacora, P., and Loi, N. (2008): A serious epidemic of stolbur on celery. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1): 131-135.
28. Chen, K., Guo, J. R., Wu, X., Loi, N., Carraro, L., Guo, Y. H., Chen, Y. D., Osler, R., Pearson, R., and Chen, T. A. (1993): Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and PCR for detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology*, 83: 915-22.
29. Chen, K. H., Redi, R. C., Loi, N., Maixner, M., and Chen, T. A. (1994): Identification and grouping of mycoplasma-like organisms associated with grapevine yellows and clover phyllody diseases based on immunological and molecular analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1905-1913.
30. Choi, Y. H., Tapias, E. C., Kim, H. K., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Verhoeven, J. T. J., Brzin, J., Zel, J., and Verpoorte, R. (2004): Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using 1H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology*, 135: 2398-2410.
31. Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., and Schulz, A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with hosts. *TRENDS in Plant Science*, 10 (11): 526-535.
32. Chuang, J. G. and Lin, C. P. (2000): Cloning of *gyrB* and *gyrA* genes of phytoplasma associated with peanut witches' broom. *Plant Pathology Bulletin*, 9 (4): 157-166.
33. Clair, D., Larrue, J., Aubert, G., Gillet, J., Cloquemin, G., and Boudon-Padieu, E. (2003): A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis*, 42 (3): 151-157.
34. Clark, G. W. and Tillier, E. R. M. (2010): Loss and gain of GroEL in the Mollicutes. *Biochemistry and Cell Biology*, 88 (2): 185-194.

35. Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M. (2009): The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37: (Database issue): D141-D145.
36. Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. A., and Oropeza, C. (2003) In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology*, 4 (2): 99–108.
37. Cousin, M.-T., Roux, J., Maurer, R., and Seemüller, E. (1996): Witches' broom: a phytoplasma disease of poplar. In: *Forest Trees and Palm Diseases and Control*. Eds: K. Maramorosch and S. P. Raychaudhuri. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Company, pp. 245–262.
38. Cousin, M.-T., Roux, J., Boudon-Padieu, E., Berges, R., Seemuller, E., and Hiruki, C. (1998): Use of Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) for Differentiating Phytoplasma Isolates Causing Witches' Broom Disease on *Populus nigra* cv *Italica* and Stolbur or Big Bud Symptoms on Tomato. *Journal of Phytopathology*, 146 (2-3): 97-102.
39. D'Agostino, G. G. A. (1991): Ultrastructural features of primula yellows mycoplasma-like organism (MLO) in cryosections of *Catharanthus roseus* leaves. *Journal of Structural Biology*, 107 (1): 56-64.
40. Daire, X., Clair, D., Reinert, W., and Boudon-Padieu, E. (1997): Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507–514.
41. D'Arcy, C. J. and Nault, L. R. (1982): Insect transmission of plant viruses and mycoplasma-like and rickettsialike organisms. *Plant Disease*, 66 (2): 99-104.
42. Davis, R. E., Lee, I.-M., Dally, E. L., Dewitt, N., and Douglas, S. M. (1988): Cloned nucleic acid hybridization probes in detection and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs). *Acta Horticulturae*, 234: 115-122.
43. Davis, R. E., Dally, E. L., Gundersen, D. E., Lee, I.-M., Habili, N. (1997): 'Candidatus Phytoplasma australiense', a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (2): 262-269.
44. Del Serrone, P., Marzachi, C., Bragaloni, M., and Galeffi, P. (2001): Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 137–142.
45. Deng, S. and Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53-61.
46. Diederer, B. M. W., Vermeulen, M. J., Verbakel, H., van der Zee, A., Bergmans, A., and Peeters, M. F. (2007): Evaluation of an internally controlled real-time polymerase chain reaction assay targeting the groEL gene for the detection of *Bartonella* spp. DNA in patients with suspected cat-scratch disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26: 629–633.

47. Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. (1967): Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annual of Phytopathological Society of Japan*, 33 (4): 259–266.
48. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *BRL Focus*, 12: 13-15.
49. Duduk, B. and Bertaccini, A. (2006): Corn with symptoms of reddening: New host of stolbur phytoplasma. *Plant Disease*, 90: 1313-1319.
50. Duduk, B., Perić, P., Marčić, D., Drobnjaković, T., Picciau, L., Alma, A., and Bertaccini, A. (2008a): Phytoplasmas in carrots: disease and potential vectors in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 61 (2): 327-331.
51. Duduk, B., Ivanović, M., Paltrinieri, S., and Bertaccini, A. (2008b): Phytoplasmas Infecting Fruit Trees in Serbia. *Acta Horticulturae*, 781.
52. Duduk B., Mejia, J. F., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Alvarez, E., Varo'n, F., and Bertaccini, A. (2008c): Molecular differentiation of phytoplasmas affecting corn in Colombia and Serbia. In Second International Phytoplasma Workshop, 22–26 September 2008, Havana, Cuba. <http://www.ipwgnet.org/doc/cuba-2008/workshop%20abstracts.doc>.
53. Duduk, B., Calari, A., Paltrinieri, S., Duduk, N., and Bertaccini, A. (2009): Multigene analysis for differentiation of aster yellows phytoplasmas infecting carrots in Serbia. *Annals of Applied Biology*, 154 (2): 219-229.
54. Ebbert, M. A. and Nault, L. R. (2001): Survival in Dalbulus leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100 (3): 311-324.
55. Ellis, R. J. (1990): The molecular chaperone concept. *Seminars in Cell Biology*, 1(1): 1-9.
56. Errampalli, D., Fletcher, J., and Claypool, P. L. (1991): Incidence of yellows in carrot and lettuce, and characterization of mycoplasma-like organism isolates in Oklahoma. *Plant Disease*, 75: 579-584.
57. Favali, M. A., Musetti, R., Benvenuti, S., Bianchi, A., and Pressacco, L. (2004): *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. *Protoplasma*, 223: 45-51.
58. Fayet, O., Ziegelhoffer, T., and Georgopoulos, C. (1989): The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *Journal of Bacteriology*, 171 (3): 1379–1385.
59. Fialová, R., Válová, P., Balakishiyeva, G., Danet, J.-L., Šafářová, D., Foissac, X. and Navrátil, 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.
60. Firrao, G., Gobbi, E., and Locci, R. L. (1994): Rapid diagnosis of apple proliferation mycoplasma-like organism using a polymerase chain reaction procedure. *Plant Pathology*, 43 (4): 669-674.

61. Firrao, G., Gibb, K., and Streten, C. (2005): Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus Phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology*, 87: 249-263.
62. Firrao, G., Garcia-Chapa, M., and Marzachi, C. (2007): Phytoplasmas: Genetics, Diagnosis and Relationships with the Plant and Insect Host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353-1375.
63. Freitag, J. H. (1964). Interaction and mutual suppression among three strains of aster yellows virus. *Virology*, 24: 401-413.
64. Garnier, M. (2000). The stolbur phytoplasma: an ubiquitous agent. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture France*, 86: 27-33.
65. Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J., and Tindall, B. J. (2007): Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea (Formerly the Taxonomic Outline of the Prokaryotes), Release 7.7, Part 11 - The Bacteria: Phyla *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Dictyoglomi*, *Gemmatomonadetes*, and *Lentisphaerae*. pp. 540-595 (<http://www.taxonomicoutline.org/>).
66. Glass, J. I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M. R., Maruf, M., Hutchison, C. A. III, Smith, H. O., and Venter, J. C. (2006): Essential genes of a minimal bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2): 425-430.
67. Goh, S. H., Potter, S., Wood, J. O., Hemmingsen, S. M., Reynolds, R. P., and Chow, A. W. (1996): HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (4): 818-823.
68. Golino, D. A., Oldfield, G. N., and Gumpf, D. J. (1989): Experimental hosts of the beet leafhopper transmitted virescence agent. *Plant Disease*, 73: 850-854.
69. Gundersen, D. E., Lee, I.-M., and Davis, R. E. (1994a). RFLP analyses of ribosomal protein genes reveal strain diversity in MLO 16S rRNA groups I and III. (Abstr.) *Phytopathology*, 84:1128.
70. Gundersen, D. E., Lee, I.-M., Rehner, S. A., Davis, R. E., and Kingsbury, D. E. (1994b): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 176 (17): 5244-5254.
71. Gundersen, D. E. and Lee, I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35 (3): 144-151.
72. Hartl, F. U. and Martin, J. (1995): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 5 (1): 92-102.
73. Hiruki, C. and Rocha, A. D. (1986): Histochemical diagnosis of mycoplasma infections in *Catharanthus roseus* by means of a fluorescent DNA-binding agent, 4'-6'-diamidino-2-phenylindole-HCl (DAPI). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8 (2): 185-188.



74. Hodgetts, J. and Dickinson, M. (2010): Phytoplasma Phylogeny and detection Based on Genes other than 16S rRNA. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Eds: P.G. Weintraub and P. Jones. CAB International, Cambridge, USA, pp 93-113.
75. Horwich, A. L., Low, K. B., Fenton, W. A., Hirshfield, I. N., and Furtak, K. (1993): Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: Role of GroEL. *Cell*, 74 (5): 909-917.
76. <http://paulownia.bg/en/tissue-culture.html>
77. Hu, Y., Henderson, B., Lund, P. A., Tormay, P., Ahmed, M. T., Gurcha, S. S., Besra, G. S., and Coates, A. R. (2008): A Mycobacterium tuberculosis mutant lacking the groEL homologue cpn60.1 is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection. *Infection and Immunity*, 76 (4): 1535–1546.
78. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group (2004): ‘Candidatus Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (Pt 4): 1243–1255.
79. Jarasch, W., Lansac, M., Saillard, C., Broquaire, J. M., and Dosba, F. (1998): PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. *European Journal of Plant Pathology*, 104 (1): 17-27.
80. Jomantiene, R., Davis, R. E., Maas, J., and Dally, E. L. (1998): Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48: 269-277.
81. Jović, J., Ember, I., Mitrović, M., Cvrković, T., Krstić, O., Krnjajić, S., Acs, Z., Kölber, M., and Toševski, I. (2011): Molecular detection of potato stolbur phytoplasma in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64: S83-S84.
82. Kakizawa, S., Oshima, K., Jung, H.-Y., Suzuki, S., Nishigawa, H., Arashida, R., Miyata, S., Ugaki, M., Kishino, H., and Namba, S. (2006): Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 188 (9): 3424–3428.
83. Karenlampi, R. I., Tolvanen, T. P., and Hanninen, M. L. (2004). Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial *groEL* gene. Sequence. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12): 5731-5738.
84. Katayama, H., Janowiak, B. E., Brzozowski, M. , Juryck, J. , Falke, S., Gogol, E. P., Collier, R. J., and Fisher, M. T. (2008): GroEL as a molecular scaffold for structural analysis of the anthrax toxin pore. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15: 754 - 760.
85. Khadhair, A.-H., Kawchuk, L. M., Taillon, R. C., and Botar, G. (1998): Detection and molecular characterization of an aster yellows phytoplasma in parsley. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20 (1), 55-61.

86. Kirkpatrick, B. C., Fisher, G. A., Fraser, J. D., and Purcell, A. H. (1987): Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasmalike organism. *Science*, 238 (4824): 197-200.
87. Ko, H. C. and Lin, C. P. (1994): Development and application of cloned DNA probes for a mycoplasmalike organism associated with sweetpotato witches'-broom. *Phytopathology*, 84 (5):468-473.
88. Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., et al. (2003): Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (8): 4678-4683.
89. Kollar, A. and Seemüller, E. (1989): Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology*, 127 (3): 177-186.
90. Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Benders, G. A., Phan, Q., Montague, M. G., and Glass, J. I. (2010): Targeted Chromosomal Knockouts in *Mycoplasma pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15): 5297-5299.
91. Kuan, C. P. and Su, H. J. (1998): Development of cloned DNA probes for phytoplasma associated with loofah witches' broom. *Journal of Phytopathology*, 146 (7): 309-313.
92. Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M., Reinhardt, R., and Seemüller, E. (2008): The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics*, 9: 306.
93. Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., and Seemüller, E. (2012): Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal*, doi:10.1100/2012/185942.
94. Kumar, S. and Nussinov, R. (2002): Close-range electrostatic interactions in proteins. *A European Journal of Chemical Biology*, 3 (7): 604-617.
95. Kunkel, L. O. (1926): Studies on aster yellows. *American Journal of Botany*, 13 (10):646-705.
96. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., et al. (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390 (6657): 249-256.
97. Langer, M. and Maixner, M. (2004): Molecular characterization of grapevine yellows associated with phytoplasmas of stolbur group based on RFP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43:185-189.
98. Lazarev, V. N., Levitskii, S. A., Basovskii, Y. I., Chukin, M. M., Akopian, T. A., Vereshchagin, V. V., Kostrjukova, E. S., et al. (2011): Complete genome and proteome of *Acholeplasma laidlawii*. *Journal of Bacteriology*, 193(18): 4943-53.
99. Lee, I.-M. and Davis, R. E. (1992): Mycoplasmas which infect plants and insects. In: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Eds: J. Maniloff, R. N. McElhansey, L. R. Finch, and J. B. Baseman. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 379-390.

100. Lee, I.-M., Hammond, R. W., Davis, R. E., and Gundersen, D. E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83 (8):834-842.
101. Lee, I.-M., Gundersen, D. E., Hammond, R. W., and Davis, R. E. (1994): Use of mycoplasma-like organism (MLO) groupspecific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84 (6): 559-566.
102. Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., and Bertaccini, A. (1998a). Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88 (12):1359-1366.
103. Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., and Bartoszyk, I. M. (1998b): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48: 1153-1169.
104. Lee, I.-M., Davis, R. E., and Gundersen-Rindal, D. E. (2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255.
105. Lee, I.-M., Martini, M., Bottner, K. D., Dane, R. A., Black, M. C., and Troxclair, N. (2003) Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*, 93 (11): 1368–1377.
106. Lee, I.-M., Martini, M., Marcone, C., and Zhu, S. F. (2004a): Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 337-347.
107. Lee, I.-M., Gundersen, D. E., Davis, R. E., Bottner, K. D., Marcone, C., and Seemüller, E. (2004b): ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1037-1048.
108. Lee, I.-M., Zhao, Y., and Bottner, K. D. (2006): SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular Cell Probes*, 20 (2): 87-91.
109. Lee, I.-M., Zhao, J., and Davis, R. E. (2010): Prospects of Multiple Gene-based Systems for Differentiation and Classification of Phytoplasmas. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Eds: P. G. Weintraub and P. Jones. CAB International, Cambridge, USA, pp 51-63.
110. Lee, S. and Tsai, F. T. F. (2005): Molecular chaperones in Protein Quality control. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(3): 259-265.
111. Lee, W. T., Terlesky, K. C., and Tabita, F. R. (1997). Cloning and characterization of two groESL operons of *Rhodobacter sphaeroides*: transcriptional regulation of the heat-induced groESL operon. *Journal of Bacteriology*, 179 (2): 487–495.
112. Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., and Seemüller, E. (1999): Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55 (1): 59–68.

113. Lessio, F. and Alma, A. (2004): Seasonal and daily movement of *Scaphoideus titanus* ball (Homoptera : Cicadellidae). *Environmental Entomology*, 33 (6): 1689-1694.
114. Li, M. and Wong, S. L. (1992): Cloning and characterization of the groESL operon from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 174 (12): 3981–3992.
115. Lim, P. O. and Sears, B. B. (1989): 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 171 (11):5901-5906.
116. Lim, P. O. and Sears, B. B. (1991): DNA sequence of the ribosomal protein genes rpl2 and rps19 from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *FEMS Microbiology Letters*, 68 (1): 71–73.
117. Lim, P. O. and Sears, B. B. (1992). Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174 (8): 2606-2611.
118. Lim, P. O., Sears, B. B., and Klomparens, K. L. (1992): Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *Journal of Bacteriology*, 174 (3): 682-686.
119. Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (2005): Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. In: *Microbial Phylogeny and Evolution, Concepts and Controversies*. Ed: Sapp. Oxford University Press, New York, pp. 70-98.
120. Ludwig, W., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B. (2009): Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2<sup>nd</sup> ed., vol. 3: The *Firmicutes*). Eds.: P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer and W. B. Whitman. Springer, New York, pp. 1-13.
121. Maniloff, J. (2000): Reconstructing the timing and selective events of mycoplasma evolution. *Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM)*, 65.
122. Marcone, C., Ragozzino, A., Credi, R., and Seemüller, E. (1996): Detection and characterization of phytoplasmas infecting grapevine in southern Italy and their genetic relatedness to other grapevine yellows phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 35 (3): 207-213.
123. Marcone, C., Neimark, A., Ragozzino, A., Lauer, U., and Seemüller, E. (1999): Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89 (9): 805–810.
124. Marcone, C., Lee, I.-M., Davis, R. E., Ragozzino, A., and Seemüller, E. (2000). Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1703–1713.

125. Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K. D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro, L., Marcone, C., and Osler, R. (2007): Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037-2051.
126. Martinović, M. i Bjegović, P. (1950): O nekim bolestima i štetočinama utvrđenim u NR Srbiji u 1949 godini. *Plant Protection*, 2: 59-68.
127. Mäurer, R., Roux, J., Seemüller, E., and Cousin, M.-T. (1994): Characterization of witches' broom MLO disease by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene and RFLP (restriction fragment length polymorphism). *IOM Letters*, 3:265.
128. Maust, B. E., Espadas, F., Talavera, C., Aquilar, M., Santamaría, J. M., and Oropeza, C. (2003) Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology*, 93 (8): 976–981.
129. Mayhew, M., da Silva, A. C. R., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Hartl, F. U. (1996): Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature*, 379 (6564): 420-426.
130. McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale, J. L., et al. (1989): Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: *The Mycoplasmas* (volume 5). Eds: R. F. Whitcomb and J. G. Tully. Academic Press, San Diego, CA, pp. 545-640.
131. Milne, R. G., Ramasso, E., Lenzi, R., Masenga, V., Sarindu, S., and Clark, M. F. (1995): Pre- and Post-embedding immunogold labeling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big bud and bermudagrass whiteleaf. *European Journal of Plant Pathology*, 101 (1): 57-67.
132. Mitrović, J. and Duduk, B. (2011): Occurrence of a new stolbur strain in tobacco in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S107-S108.
133. Mori, H. and Ito, K. (2001): The Sec protein-translocation pathway. *Trends in Microbiology*, 9 (10): 494-500.
134. Murrall, D. J., Nault, L. R., Hoy, C. W., Madden, L. V., and Miller, S. A. (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89 (5): 1223-1232.
135. Musetti, R., Loi, N., Carraro, L., and Ermacora, P. (2002): Application of immunoelectron microscopy techniques in the diagnosis of phytoplasma diseases. *Microscopy Research and Technique*, 56 (6): 462- 464.
136. Nipah, J. O., Jones, P., Hodgetts, J., and Dickinson, M. (2007): Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru. *Bulletin of Insectology*, 60 (2): 385-386.

137. Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. (2004): Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36 (1): 27-29.
138. Palermo, S., Arzone, A., and Bosco, D. (2001): Vector-pathogen-host plant relationships of chrysanthemum yellows (CY) phytoplasma and the vector leafhoppers *Macrostelus quadripunctulatus* and *Euscelidius variegatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99 (3): 347-354.
139. Paltrinieri, S., Botti, S., Bertaccini, A., Mori, N., Dal Motin, F., and Fiore, N. (2006): Are phytoplasmas involved in a severe peach decline? *ISHS Acta Horticulturae*, 713 (VI International Peach Symposium): 421-426.
140. Purcell, A. H. and Suslow, K. G. (1987): Pathogenicity and effects on transmission of a mycoplasma-like organism of a transovarially infective bacterium on the leafhopper *Euscelidius variegatus* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 50 (3): 285-290.
141. Ranford, J. C., Coates, A. R., and Henderson, B. (2000): Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2 (8), 1-17.
142. Ranson, N. A., White, H. E., and Saibil, H. R. (1998): Review article- Chaperonins. *Biochemistry Journal*, 333: 233-242.
143. Ranson, N. A., Farr, G. W., Roseman, A. M., Gowen, B., Fenton, W. A., Horwich, A. L., and Saibil, H. R. (2001): ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy. *Cell*, 107 (7): 869-879.
144. Ranson, N. A., Clare, D. K., Farr, G. W., Houldershaw, D., Horwich, A. L., and Saibil, H. R. (2006): Allosteric signalling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13 (2): 147-152.
145. Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998): Molecular biology and pathology of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (4): 1094-1156.
146. Rhode, W., Kullaya, A., Mpunami, A., and Becker, D. (1993): Rapid and sensitive diagnosis of mycoplasma-like organisms associated with lethal disease of coconut palm by a specifically primed polymerase chain reaction for the amplification of 16S rDNA. *Oleagineux*, 48: 319-322.
147. Richard-Molard, M., Garressus, S., Malatesta, G., Orny, G., Valentin, P., Reinbold, C., Gerst, M., Blech, F., Fonne, G., Putz, C., Grousseau, C., and Boudon-Padieu, E. (1995): Le syndrome des basses richesses – Investigations au champ et tentatives d'identification de l'agent pathogène et du vecteur. 58ème Congrès de l'IIRB, Dijon-Beaune, pp. 299-309.
148. Rodríguez-Quinones, F., Maguire, M., Wallington, E. J., Gould, P. S., Yerko, V., Downie, J. A., and Lund, P. A. (2005): Two of the three *groEL* homologues in *Rhizobium leguminosarum* are dispensable for normal growth. *Archives of Microbiology*, 183 (4): 253-265.

149. Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T., and Hattori, M. (2002): The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Research*, 30 (23): 5293-5300.
150. Satheesh, N, Thong, K. L., Tikki, P, and Martin, A. (2002). Characterization of *Salmonella* Serovars by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (7): 2346-2351.
151. Scherm, B., Gerlach, G.-F., and Runge, M. (2002): Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. *Veterinary Microbiology*, 89 (2-3): 141-150.
152. Schneider, H. (1977): Indicator hosts for pear decline: symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. *Phytopathology*, 67 (5): 592-601.
153. Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C., and Seemüller, E. (1993): Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139: 519-527.
154. Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., and Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* (vol. I). Eds: R. Razin and J. G. Tully. Academic Press, San Diego, pp. 369-380.
155. Schneider, B., Gibb, K. S., and Seemüller, E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381-3389.
156. Sears, B. B. and Kirkpatrick, B. C. (1994): Unveiling the evolutionary relationships of plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News*, 60 (6): 307-312.
157. Seemüller, E. and Lederer, W. (1988): MLO-associated decline of *Alnus glutinosa*, *Populus tremula* and *Crataegus monogyna*. *Journal of Phytopathology*, 121 (1): 33-39.
158. Seemüller, E., Garnier, M., and Schneider, B. (2002) Mycoplasmas of plant and insects. In: *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Eds: S. Razin and R. Herrmann. Kluwer Academic, pp. 91-115.
159. Servant, P., Thompson, C., and Mazodier, P. (1993): Use of new *Escherichia coli*/*Streptomyces conjugative* vectors to probe the functions of the two *groEL*-like genes of *Streptomyces albus* G by gene disruption. *Gene*, 134 (1): 25-32.
160. Sharma, A. K. and Cousin, M.-T. (1986): Mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with the witches' broom disease of poplar. *Journal of Phytopathology*, 117 (4), 349-356.

161. Siewert, C., Mitrovic, J., Duduk, B., Hecht, J., Mölling, K., Bröcker, F., Beyerlein, P., Büttner, C., Bertaccini, A., and Kube, M. (2012): Enrichment of phytoplasma DNA by selected oligonucleotides and Phi29 polymerase amplification. Book of abstracts of the 22<sup>nd</sup> International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, p. 100.
162. Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B. (1996): Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (8): 2988-2993.
163. Stephanou, A. and Latchman, D. S. (2011): Transcriptional modulation of heat-shock protein gene expression. *Biochemistry Research International*, doi:10.1155/2011/238601.
164. Streten, C. and Gibb, K. S. (2005): Genetic variation in *Candidatus Phytoplasma australiense*. *Plant Pathology*, 54: 8-14.
165. Szczepanek, S. M., Tulman, E. R., Gorton, T. S., Liao, X., Lu, Z., Zinski, J., Aziz, F., Frasca, S. Jr., Kutish, G. F., and Geary, S. J. (2010): Comparative Genomic Analyses of Attenuated Strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity*, 78 (4): 1760-1771.
166. Swenson, K. G. (1971): Relation of age, sex and mating of *Macrosteles fascifrons* to transmission of Aster yellows. *Phytopathology*, 61 (6): 657-659.
167. Šeruga, M., Škorić, D., Botti, S., Paltrinieri, S., Juretić, N., and Bertaccini, A. (2003): Molecular characterization of a phytoplasma from the aster yellows (16SrI) group naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. *Forest pathology*, 33 (2):113-125.
168. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
169. Tedeschi, R., Bosco, D., and Alma, A. (2002): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology*, 95 (3): 544-551.
170. Tran-Nguyen, L. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., and Gibb, K. S. (2008): Comparative genome analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' Strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190 (11): 3979-3991.
171. Tsai, J. H. (1979): Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. In: *The Mycoplasmas* (Vol. 3.). Eds: R. E. Whitcomb and J. G. Tully, eds. Academic Press, New York, pp. 265-307.
172. Tseng, T.-T., Tyler, B. M., and Setubal, J. C. (2009): Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*, 9 (Suppl 1):S2, doi:10.1186/1471-2180-9-S1-S2.
173. Van Der Meer, F. A. (1980) Witches' Broom in Poplars. *Populier*, 17 (2): 42-43.



174. Van Der Meer, F. A. (1981): Mozaiekvirus, heksenbezem en knobbelziekte bij populier, en een virusachtige groeiremming bij wilg. *Populier*, 18: 51-59.
175. Viczián, O., Süle, S., and Gáborjányi, R. (1998): Detection and identification of stolbur phytoplasma in Hungary by PCR and RFLP methods. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 33(3/4): 255-260.
176. Webb, D. R., Bonfiglioli, R. G., Carraro, L., Osler, R., and Symons, R. H. (1999): Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology*, 89 (10), 894–901.
177. Wei, W., Lee, I.-M., Davis, R. E., Suo, X., and Zhao, Y. (2008): Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2368-2377.
178. Weintraub, P. G. and Beanland, L. (2006): Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91-111.
179. Woese, C. R. (2000): Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97: 8392-8396.
180. Wong, P. and Houry, W. A. (2004): Chaperone networks in bacteria: analysis of protein homeostasis in minimal cells. *Journal of Structural Biology*, 146 (1-2): 79-89.
181. Woo, P. C. Y., Woo, G. K. S., Lau, S. K. P., Wong, S. S. Y., and Yuen, K. (2002): Single gene target bacterial identification: *groEL* gene sequencing for discriminating clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 44 (2): 143–149.
182. Xu, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1997): The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature*, 388 (6644): 741-750.
183. Yoshikada, N., Nakamura, H., Shashi, N., Kubono, T., Katsube, K., Shoji, T., and Takahashi, T. (1994): Amplification and nucleotide sequences of ribosomal protein and 16S rRNA genes of mycoplasma-like organism associated with paulownia witches' broom. *Annual of Phytopathological Society of Japan*, 60 (5): 569-575.
184. Yushan, H., Lei, L., Weijia, L., and Xiaoguang, C. (2010): Sequence analysis of the *groEL* gene and its potential application in identification of pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (16): 1733-1741.
185. Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X., and Davis, R. E. (2009): Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2582-2593.
186. Zhao, J., Wei, W., Davis, R. E., and Lee, I.-M. (2010): Recent Advances in 16S rRNA Gene-based Phytoplasma Differentiation, Classification and Taxonomy. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Eds: P.G. Weintraub and P. Jones. CAB International, Cambridge, USA, pp. 64-92.

187. Zwolińska, A., Krawczyk, K. and Pospieszny, H. (2012): Molecular Characterization of Stolbur Phytoplasma Associated with Pea Plants in Poland. *Journal of Phytopathology*, 160 (7-8): 317–323.

**PRILOZI****PRILOG A****Priprema pufera i rastvora supstanci korišćenih u ovoj doktorskoj tezi****• 0.5M EDTA pH8**

za 100 ml rastvora:

bidestilovana voda                      100 ml

EDTA    18.61 g

**-način pripreme:**

U erlenmajer, u koji je prethodno stavljen magnet, sipano je 70 ml bidestilovane vode, erlenmajer je stavljen na magnetnu mešalicu a potom je sipan EDTA. Nakon 5-10 minuta kada je rastvor postao mlečno bele boje a EDTA se rastvorio, izmerena je pH vrednost rastvora a potom podešena na pH8 dodavanjem natrijum hidroksida (NaOH). Kada je pH podešena, rastvor je sipan u menzuru i dopunjen bidestilovanom vodom do 100 ml. Rastvor je potom autoklaviran pri temperaturi 121°C u trajanju 21 minut. Ovako pripremljen rastvor EDTA je čuvan na 4°C.

**• 1M TRIS pH8**

za 100 ml rastvora:

bidestilovana voda                      100 ml

TRIS baza                                      12.1 g

**-način pripreme:**

U erlenmajer, u koji je prethodno stavljen magnet, sipano je 60 ml bidestilovane vode, erlenmajer je stavljen na magnetnu mešalicu a potom je sipana TRIS baza. Nakon 5 minuta kada se TRIS baza rastvorila, izmerena je pH vrednost rastvora a potom podešena na pH8 dodavanjem HCl-a. Kada je pH podešena, rastvor je sipan u menzuru i dopunjen bidestilovanom vodom do 100 ml. Ovako pripremljen pufer je autoklaviran pri temperaturi 121°C u trajanju 21 minut, a potom čuvan na 4°C.

**• 10% APS**

za 1 ml rastvora:

bidestilovana voda	1 ml
APS	0.1 g

**-način pripreme:**

U tubicu od 1.5 ml je sipan 1 ml bidestilovane vode a potom je dodat APS. Tubica je par puta invertovana, nakon čega je čuvana na 4°C.

**• 3% CTAB ekstrakcioni pufer**

za 500 ml rastvora:

CTAB	15 g
TRIS baza	60.55 g
natrijum hlorid (NaCl)	40.90 g
0.5M EDTA pH8	20 ml

**-način pripreme:**

U erlenmajer, u koji je prethodno stavljen magnet, sipano je 300 ml bidestilovane vode, erlenmajer je stavljen na magnetnu mešalicu a potom su sipane sve hemikalije. Kada su se sve supstance rastvorile, izmerena je pH vrednost rastvora a potom podešena na pH8 dodavanjem koncentrovane hlorovodonične kiseline (HCl). Kada je pH podešena, rastvor je sipan u menzuru i dopunjen bidestilovanom vodom do 500 ml. Ovako pripremljen pufer je autoklaviran pri temperaturi 121°C u trajanju 21 minut.

**• 1xTE pufer**

za 200 ml rastvora:

1M TRIS	2 ml
0.5M EDTA pH8	0.4 ml
bidestilovana voda	197.6 ml

**-način pripreme:**

U erlenmajeru su sa bidestilovanom vodom pomešani ostali rastvori nakon čega je ovako pripremljen 1xTE pufer autoklaviran pri temperaturi 121°C u trajanju 21 minut, a potom čuvan na 4°C.

**• 10xTBE pufer**

za 200 ml rastvora:

TRIS baza	21.6 g
borna kiselina	11 g
0,5M EDTA pH8	8 ml

**-način pripreme:**

U erlenmajer, u koji je prethodno stavljen magnet, sipano je 100 ml bidestilovane vode, erlenmajer je stavljen na magnetnu mešalicu a potom su sipane hemikalije. Kada su se hemikalije rastvorile, rastvor je sipan u menzuru i dopunjen bidestilovanom vodom do 200 ml. Ovako pripremljen pufer je čuvan na 4°C.

**• 1xTBE pufer**

za 500 ml rastvora:

U menzuri je odmereno 50 ml 10xTBE pufera i 450 ml destilovane vode koji su potom spojeni i sipani u staklenu bocu. Ovako pripremljen 1xTBE pufer je čuvan na 4°C.

**PRILOG B****Količine svih hemikalija potrebnih za pripremu poliakrilamidnih gelova**

<b>• 6% poliakrilamidni gel</b>	<b>10 bunarčica</b>	<b>14 bunarčica</b>
	<b>zapremine 5 ml</b>	<b>zapremine 25 ml</b>
bidestilovana voda	3.68 ml	18.43 ml
10xTBE	0.5 ml	2.5 ml
akrilamid (40% rastvor)	0.75 ml	3.75 ml
APS (10%)	62 µl	310 µl
TEMED (99%)	3.12 µl	15.6 µl
<b>• 8% poliakrilamidni gel</b>	<b>10 bunarčica</b>	<b>14 bunarčica</b>
	<b>zapremine 5 ml</b>	<b>zapremine 25 ml</b>
bidestilovana voda	3.44 ml	17.2 ml
10xTBE	0.5 ml	2.5 ml
akrilamid (40% rastvor)	1 ml	5 ml
APS (10%)	62 µl	310 µl
TEMED (99%)	3.12 µl	15.6 µl

## Biografija

Jelena Mitrović rođena je 4. marta 1981. godine u Beogradu. Završila je osnovnu školu „Lazar Savatić“ u Zemunu i Zemunsku I gimnaziju, prirodno-matematički smer. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2000/01. godine. Studije na smeru Biologija završila je aprila 2007. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,29. Diplomski rad sa temom „Embriionalno razviće mozga čoveka” odbranila je sa ocenom 10. U osnovnoj školi „Gornja Varoš“ u Zemunu radila je kao profesor biologije od 15. maja 2007. godine do 5. decembra 2008. godine. Doktorske studije je upisala na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, školske 2008/2009. godine na smeru Biologija, modul Genetika.

Od 1. februara 2009. godine bila je anagažovana kao stipendista sadašnjeg Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun, u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju, na projektu „Razvoj i unapređenje bioracionalnih metoda zaštite bilja od bolesti i štetočina” - rukovodilac projekta dr Pantelija Perić, TR20036, a od 2011. godine angažovana je na projektu „Proučavanje biljnih patogena, artropoda, korova i pesticida u cilju razvoja metoda bioracionalne zaštite bilja i proizvodnje bezbedne hrane“ - rukovodilac projekta dr Dejan Marčić, TR31043. Takođe je angažovana na međunarodnom projektu COST action FA0807: Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems od 2009. godine, u okviru koga je bila na četvoromesečnom usavršavanju u Berlinu, Nemačka, u institutu „Max Planck Institute for molecular genetics“ kod dr Michael Kube. Od 1. avgusta 2012. godine zaposlena je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun, u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju gde je i stekla zvanje istraživač saradnik 6. septembra 2012. godine.

Od početka naučnoistraživačkog rada bavi se proučavanjem fitoplazmi - njihovom identifikacijom i karakterizacijom.

Do sada je objavila i saopštila na naučnim skupovima preko 20 radova. Govori engleski, španski i francuski jezik i član je udruženja FEMS society i Internacionalnog društva za mikoplazmologiju (IOM - International Organization for Mycoplasmaology).





Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ **Јелена Р. Митровић** \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ **Б 503/2008** \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ **Генетика** \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ **Ген за велику субјединицу шаперонина (groEL ген) као  
додатни молекуларни маркер за диференцијацију фитоплазми сродних  
'Candidatus Phytoplasma asteris'** \_\_\_\_\_

Ментори \_\_\_\_\_ **Др Светлана Радовић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду- Биолошки факултет** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ **Др Бојан Дудук, виши научни сарадник,  
Институт за пестициде и заштиту животне средине** \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ **Јелена Р. Митровић** \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

Јелена Митровић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ген за велику субјединицу шаперонина (groEL ген) као додатни молекуларни маркер за диференцијацију фитоплазми сродних 'Candidatus Phytoplasma asteris'

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

Јелена Мишковић

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.