

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Zorana Katanić

**Identifikacija i molekularna
karakterizacija fitoplazme brijesta
'*Candidatus Phytoplasma ulmi*'
u Hrvatskoj**

Doktorska disertacija

Osijek, 2014.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Zorana Katanić

**Identifikacija i molekularna
karakterizacija fitoplazme brijesta
'*Candidatus Phytoplasma ulmi*'
u Hrvatskoj**

Doktorska disertacija predložena Sveučilišnom Vijeću za
poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije u svrhu stjecanja
akadenskog stupnja doktora znanosti na Sveučilišnom
poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom studiju
Molekularne bioznanosti - modul biologija biljaka

Osijek, 2014.

Doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica i doc. dr. sc. Ljiljane Krstin

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Identifikacija i molekularna karakterizacija fitoplazme brijesta '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' u Hrvatskoj

Zorana Katanić

Rad je izrađen u: Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu
Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Mentor/i: Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, redoviti profesor
Dr. sc. Ljiljana Krstin, docent

Kratki sažetak doktorskog rada: Fitoplazma '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' dokazana je na području Hrvatske u uzorcima brijesta veza i nizinskog brijesta, no učestalost zaraze brijesta veza bila je značajno veća. Zaraza gorskog brijesta ovom fitoplazmom nije utvrđena, ali je u jednom uzorku gorskog brijesta detektirana fitoplazma '*Ca. Phytoplasma solani*'. Nadalje, u jednom uzorku nizinskog brijesta detektirana je fitoplazma '*Ca. Phytoplasma asteris*' koja bi mogla predstavljati novu podskupinu 16SrI skupine fitoplazmi. Na istraživanom području bila je prisutna i gljiva *O. novo-ulmi*, uzročnik holandske bolesti brijesta te je ustanovljeno da ovaj patogen ima veći utjecaj na populacije brijesta u Hrvatskoj u odnosu na detektirane fitoplazme. Molekularna karakterizacija gena za 16S rRNA, gena za ribosomske proteine te gena *secY* i *map* pokazala je veliku gensku raznolikost izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*' s područja Hrvatske. Filogenetska analiza ukazala je na zajedničko porijeklo izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*' detektiranih u ovom istraživanju i prethodno opisanih izolata ove '*Ca. Phytoplasma*' vrste. Zaključeno je da izolati fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' predstavljaju monofiletsku skupinu velike raznolikosti unutar koje je moguće razlikovati više filogenetskih linija. Izolati detektirani u ovom istraživanju bili su međusobno srodni i pripadali su istoj filogenetskoj liniji. Jasna diferencijacija izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*' s različitih lokaliteta u Hrvatskoj te diferencijacija izolata koji zaražavaju različite vrste brijesta nije utvrđena.

Broj stranica: 125

Broj slika: 19

Broj tablica: 24

Broj literaturnih navoda: 203

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: brijest, fitoplazme, '*Candidatus Phytoplasma ulmi*', genska raznolikost, filogenetska analiza, holandska bolest brijesta

Datum obrane: 23. listopada 2014.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Zlatko Liber, izvanredni profesor
2. Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, redovita profesorica
3. Dr. sc. Ljiljana Krstin, docentica
4. Dr. sc. Karolina Vrandečić, izvanredna profesorica
5. Dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica
6. Dr. sc. Ivna Štolfa, docentica

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

University of Dubrovnik

Ruđer Bošković Institute

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

Identification and molecular characterization of elm yellows phytoplasma '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' in Croatia

Zorana Katanić

Thesis performed at: Faculty of Science, University of Zagreb
Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek

Supervisor/s: Ph. D. Mirna Ćurković Perica, Full Professor
Ph. D. Ljiljana Krstin, Assistant Professor

Short abstract: Phytoplasma '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' was detected in samples of European white and field elm in Croatia, but the incidence of infection was significantly higher for white elm. Infection of wych elm with this phytoplasma has not been determined, but one sample of this elm species was infected with '*Ca. Phytoplasma solani*'. Furthermore, '*Ca. Phytoplasma asteris*' isolate that could represent a new 16rl subgroup was detected in one sample of field elm. Fungus *O. novo-ulmi*, causal agent of Dutch elm disease, was also present in the investigated area and it was found to have greater impact on the populations of elms in Croatia than detected phytoplasmas. Molecular characterization of 16S rRNA gene, ribosomal protein genes, *secY* and *map* revealed high genetic diversity of '*Ca. Phytoplasma ulmi*' isolates in Croatia. Phylogenetic analysis indicated the common origin of '*Ca. Phytoplasma ulmi*' isolates detected in this study and previously described isolates of this '*Ca. Phytoplasma*' species. It was concluded that elm yellows phytoplasma isolates represent monophyletic group of high diversity with distinguishable several phylogenetic lineages within this group. The isolates detected in this study were related to each other and belonged to the same phylogenetic lineage. A clear differentiation of elm yellows phytoplasma isolates from different localities in Croatia and/or differentiation of isolates infecting different species of elm was not confirmed.

Number of pages: 125

Number of figures: 19

Number of tables: 24

Number of references: 203

Original in: Croatian

Key words: elm, phytoplasmas, '*Candidatus Phytoplasma ulmi*', genetic diversity, phylogenetic analysis, Dutch elm disease

Date of the thesis defense: 23 October 2014

Reviewers:

1. Ph. D. Zlatko Liber, Associate Professor
2. Ph. D. Mirna Ćurković Perica, Full Professor
3. Ph. D. Ljiljana Krstin, Assistant Professor
4. Ph. D. Karolina Vrandečić, Associate Professor
5. Ph. D. Vera Cesar, Full Professor
6. Ph. D. Ivna Štolfa, Assistant Professor

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentoricama, prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perica i doc. dr. sc. Ljiljani Krstin na pruženoj prilici i stručnom vodstvu. Hvala Vam na povjerenju koje ste mi ukazale i trudu i znanju koje ste uložile u ovaj rad.

Najljepše se zahvaljujem dr. sc. Marinu Ježiću na velikoj pomoći i korisnim savjetima u eksperimentalnom radu.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marku Zebecu na suradnji i pomoći tijekom terenskog istraživanja. Za pomoć na terenu najljepše se zahvaljujem i Vladi.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Martini Šerugi Musić na pomoći i korisnim savjetima te svim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i Zavoda za botaniku PMF-a u Zagrebu na gostoprimstvu.

Zahvaljujem se članovima Povjerenstva izv. prof. dr. sc. Zlatku Liberu, prof. dr. sc. Veri Cesar i izv. prof. dr. sc. Karolini Vrandečić na pomoći i susretljivosti.

Zahvaljujem se svim dragim kolegama s Odjela za biologiju na prijateljstvu i podršci.

Od srca hvala mojoj Mariji na nesebičnom prijateljstvu i razumijevanju.

Najveću zahvalnost upućujem cijeloj mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i podršci, osobito mojim roditeljima. Posebnu zahvalnost dugujem sestri Nataši – mom Cvrčku koji mi uveseljava život i Ivanu koji je uvijek bio uz mene, imao beskrajno mnogo strpljenja, hrabrio me i poticao.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Osnovna svojstva europskih vrsta brijesta (<i>Ulmus</i> sp.).....	2
1.2. Otkriće i prve spoznaje o fitoplazmama.....	5
1.3. Taksonomski položaj i metode klasifikacije fitoplazmi.....	6
1.3.1. Metode detekcije, identifikacije i klasifikacije fitoplazmi.....	6
1.3.2. Opis vrsta roda ‘ <i>Candidatus (Ca.) Phytoplasma</i> ’.....	8
1.4. Genom fitoplazmi.....	10
1.5. Životni ciklus fitoplazmi i interakcija s biljkama i kukcima.....	13
1.5.1. Utjecaj fitoplazmi na biljke.....	13
1.5.2. Utjecaj fitoplazmi na kukce.....	15
1.5.3. Mehanizmi interakcije fitoplazmi s biljkama i kukcima.....	16
1.6. Fitoplazmoze brijesta.....	19
1.7. Holandska bolest brijesta.....	22
1.8. Ciljevi istraživanja.....	25
2. Materijali i metode.....	27
2.1. Uzorci brijesta.....	27
2.2. Izolacija i identifikacija uzročnika holandske bolesti brijesta.....	29
2.2.1. Izolacija i održavanje izolata.....	29
2.2.2. Identifikacija uzročnika holandske bolesti brijesta.....	31
2.3. Detekcija, identifikacija i karakterizacija izolata fitoplazmi.....	32
2.3.1. Izolacija ukupne DNA.....	32
2.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA.....	32
2.3.3. Umnožavanje fitoplazmatskih gena ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom.....	33
2.3.3.1. Umnožavanje gena za 16S rRNA.....	34
2.3.3.2. Umnožavanje gena za ribosomske proteine.....	35
2.3.3.3. Umnožavanje gena <i>secY</i>	36
2.3.3.4. Umnožavanje genskog lokusa <i>secY-map</i>	37
2.3.4. Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu.....	38
2.3.5. Pročišćavanje produkata ugniježdene lančane reakcije polimerazom.....	38
2.3.6. Sekvenciranje fitoplazmatskih gena.....	39
2.3.7. Analiza sekvenci i filogenetska analiza.....	39
2.4. Statistička analiza.....	44

3. Rezultati	45
3.1. Fitoplazmoze brijesta u Hrvatskoj	45
3.2. Uzročnik holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj	47
3.3. Utjecaj fitoplazmi i gljive <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> na brijest u Hrvatskoj i učestalost miješane zaraze	51
3.4. Fitoplazma ' <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ' u Hrvatskoj	54
3.4.1. Varijabilnost sekvenciranih genskih lokusa	54
3.4.1.1. Varijabilnost gena za 16S rRNA	54
3.4.1.2. Varijabilnost gena za ribosomske proteine	56
3.4.1.3. Varijabilnost gena <i>secY</i>	59
3.4.1.4. Varijabilnost genskog lokusa <i>secY-map</i>	66
3.4.2. Zastupljenost genotipova fitoplazme ' <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> '	70
3.4.3. Raznolikost genotipova fitoplazme ' <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> '	72
3.5. Ostale fitoplazme koje zaražavaju brijest u Hrvatskoj	78
3.5.1. ' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> '	78
3.5.2. ' <i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> '	80
3.5.3. Filogenetski odnosi izolata fitoplazme ' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ' i ' <i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> '	82
4. Rasprava	84
5. Zaključci	98
6. Literatura	100
7. Sažetak	120
8. Summary	122
9. Životopis	124

1. Uvod

Fitoplazme su jedinstvena skupina patogenih prokariota iz razreda *Mollicutes* koje uzrokuju bolesti velikog broja biljnih vrsta. Parazitiraju u floemu zaraženih biljaka te utječu na fiziološke i metaboličke funkcije, što najčešće rezultira sušenjem i odumiranjem biljke (Musetti 2010, Sugio i Hogenhout 2012). Osnovni način prijenosa fitoplazmi je putem vektora – kukaca iz reda *Hemiptera* koji se hrane floemskim sokom i koji prenose fitoplazme na perzistentan način (Weintraub i Beanland 2006).

Nekoliko vrsta fitoplazmi može zaražavati brijest (*Ulmus* sp.), no najznačajnija među njima je fitoplazma ‘*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*’ (Lee i sur. 2004b). Na bolest žućenja brijesta uzrokovanu ovom fitoplazmom osobito su osjetljive američke vrste kao što su *U. americana* L., *U. rubra* Muhl., *U. alata* Michx., *U. serotina* Sarg. i *U. crassifolia* Nutt., no bolest pogađa i europske vrste, *U. minor* Mill. sensu latissimo, *U. glabra* Huds. i *U. laevis* Pall. te je do sad detektirana u nekoliko europskih zemalja uključujući Italiju, Francusku, Njemačku, Češku i Srbiju (Mäurer i sur. 1993, Marcone i sur. 1997, Boudon-Padieu i sur. 2004, Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2011). Upravo je karakterizacija izolata ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ s područja Europe pokazala da je genska raznolikost ove vrste fitoplazmi znatno veća nego što je pretpostavljano pri početnom opisu vrste (Jović i sur. 2008, Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2011).

Kako na sušenje brijesta, osim fitoplazmi, utječe i holandska bolest brijesta koju uzrokuju gljive mješinarke, *Ophiostoma ulmi* i *O. novo-ulmi* (Brasier i Buck 2001), usporedno istraživanje ovih različitih patogena brijesta moglo bi biti od velikog značaja. Međutim, dosadašnja istraživanja nisu obuhvaćala istovremenu detekciju ovih patogena niti je istražena mogućnost njihove međusobne interakcije. Ovo istraživanje provedeno je s osnovnim ciljem utvrđivanja pojave i zastupljenosti fitoplazmoze brijesta u različitim vrstama brijesta u Hrvatskoj, identifikacije vrsta fitoplazmi koje uzrokuju fitoplazmozu brijesta te molekularne karakterizacije najznačajnijeg uzročnika, fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’. Fitoplazme brijesta nisu do sad istraživane u Hrvatskoj, stoga će dobiveni rezultati predstavljati prve spoznaje o ovim značajnim patogenima na području Hrvatske, dok će utvrđivanje genske raznolikosti detektiranih izolata ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ doprinijeti karakterizaciji ove vrste fitoplazmi. Obzirom da je pojava holandske bolesti brijesta zabilježena u Hrvatskoj, istražiti će se i zastupljenost fitopatogenih gljiva *Ophiostoma ulmi* i *O. novo-ulmi*. To će pokazati učestalost

miješane zaraze različitim patogenima te omogućiti usporedbu njihovog utjecaja na populacije brijesta u Hrvatskoj.

1.1. Osnovna svojstva europskih vrsta brijesta (*Ulmus* sp.)

Rod *Ulmus* L. pripada porodici *Ulmaceae* Mirabel i obuhvaća velik broj vrsta široko rasprostranjenih u sjevernom umjerenom području (osim zapada Sjeverne Amerike) te u subtropskom području srednje Amerike i jugoistočne Azije (Wiegrefe i sur. 1994). Brijestovi su listopadne drvenaste vrste koje karakterizira simpodijalno razgranjenje habitusa i karakteristično izbrazdana kora. Cvjetovi su dvospolni, skupljeni u cvatove, a ocvijeće nalikuje čaški. Većina vrsta cvjeta u proljeće prije listanja, no neke vrste kao što su *U. serotina* Sarg i *U. parvifolia* Jacq. cvjetaju u jesen. Plod je jednosjemeni okriljeni oraščić (perutka ili samara) koji se raznosi pomoću vjetra. Pojedine vrste se mogu vegetativno razmnožavati. Listovi su jednostavni i imaju naizmjeničan raspored. Baza lisne plojke je izrazito asimetrična ili skoro simetrična (Nikolić 2013). Osim što su značajni u prirodnim ekosustavima, brijestovi su stoljećima imali veliku praktičnu primjenu. Koristili su se za izradu alata, oružja i namještaja (Stipes i Campana 1981). Većina brijestova ima kvalitetno drvo, otporno na uvjete koji vladaju u vodi i stoga pogodno za gradnju drvenih objekata koji su u stalnom dodiru s vodom (Nikolić 2013). Koristili su se kao stočna hrana, a pojedinim vrstama pripisuju se ljekovita svojstva. Nadalje, brojne vrste i kultivari brijesta su cijenjeni u hortikulturi. Često se sade kao ukrasne vrste zbog svoje ljepote i tolerantnosti na zagađenja u urbanim sredinama (Stipes i Campana 1981, Herath i sur. 2010, Nikolić 2013).

Taksonomska struktura roda *Ulmus* vrlo je kompleksna i tijekom povijesti istraživanja postojale su različite taksonomske podjele ovog roda (Armstrong i Sell 1996). Podjelu roda na pojedine vrste otežava nedostatak jednoznačnih taksonomskih svojstava uslijed postojanja jednostavnih, reduciranih cvjetova i plodova, varijabilnih morfoloških svojstava te mogućnosti interspecijske hibridizacije (Wiegrefe i sur. 1994). Prema Richens (1983) europske vrste brijesta uključuju treperavi brijest ili vez (*U. laevis* Pall.), gorski, glatki ili planinski brijest (*U. glabra* Huds.) i nizinski ili poljski brijest (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo).

Brijest vez (*U. laevis* Pall) pripada sekciji *Blepharocarpus*. Rasprostranjen je u srednjoj te jugoistočnoj Europi i na području Kavkaza (Idžojtić 2009). Može narasti do visine oko 30 m te ima široku, razgranatu, piramidalnu krošnju i dobro razvijen korijenov sustav koji prodire u

dubinu i širinu. Kora je tamnosivosmeđa, uzdužno raspucana i tanko se ljušti. Mlade grančice imaju smeđu, tanku, glatku i dlačicama posutu koru (Šilić 1973). Lisne plojke su eliptične do obrnuto jajaste, najšire iznad sredine, šiljastog vrha, oštro i dvostruko napiljenog ruba, s izrazito asimetričnom bazom. Listovi su odozgo svježije zeleni, sjajni, većinom hrapavi, a odozdo sivkasto zeleni, mekano dlakavi, bez posebno izraženih dlačica u kutovima žile. Peteljka lista je dlakava (Idžojtić 2009). Cvjetovi se nalaze u rahlim čupercima na dugačkim stapkama. Perutka je okruglasta do široko jajasta, po rubu gusto trepavičasto dlakava, a sjeme se nalazi u sredini (Šilić 1973, Idžojtić 2013). Počinje plodonositi u starosti od 30. do 40. godine. Puni urod daje svake dvije do tri godine (Idžojtić 2013). Ova vrsta ima vrlo malu sposobnost vegetativnog razmnožavanja te je reproduktivno izolirana od drugih europskih vrsta (Mittempergher i La Porta 1991, Goodal-Copestake i sur. 2005). Nasuprot tome, nizinski brijest (*U. minor* Mill. sensu latissimo) i gorski brijest (*U. glabra* Huds.) koji pripadaju sekciji *Ulmus* mogu se križati. Prirodni hibrid ovih vrsta *Ulmus x hollandica* (holandski brijest) rasprostranjen je na području Europe (Petrokas i Baliuckas 2012).

Za gorski brijest (*U. glabra* Huds.) je značajna široka rasprostranjenost u Europi, uglavnom u gorskim područjima, ali se javlja i u zapadnoj Aziji (Idžojtić 2009). Raste do visine od oko 35 m, ima masivno deblo, jake grane i gustu krošnju, a korijenov sustav je jako razvijen te površinski. Kora je tamno siva, duže vremena glatka, a kasnije plitko ispucala (Šilić 1973). Lisne plojke su široko obrnuto jajaste do eliptične, često s više vrhova, krupno i dvostruko napiljenog ruba, te zaobljene do klinaste, slabije kose osnove. Listovi odozgo tamnozeleni, bez dlaka ili gusto, kratko čekinjasto dlakavi, glatki ili hrapavi, dok je naličje svjetlije, slabije dlakavo, stariji listovi samo u kutovima žila i duž žila dlakavi (Idžojtić 2009). Cvjetovi se nalaze u čupercima na vrlo kratkim stapkama, a jednosjemeni oraščići smješteni su u sredini perutke (Šilić 1973). Razmnožava se isključivo spolno (Goodal-Copestake i sur. 2005). Počinje plodonositi u starosti od 35. do 40. godine, a puni urod daje svake druge godine (Idžojtić 2013). Nizinski brijest (*U. minor* Mill. sensu latissimo) može narasti do visine oko 40 m i ima pretežno uzdužno, duboko ispucanu koru, crvenkastomrke boje (Šilić 1973), a osim na području Europe rasprostranjen je i u jugozapadnoj Aziji i sjevernoj Africi (Idžojtić 2009). Ima obrnuto jajaste, jajaste do okrugle lisne plojke, šiljastog vrha, dvostuko napiljenog ruba i kose osnove. Listovi su odozgo zeleni do tamnozeleni, goli, sjajni i većinom glatki, a odozdo svjetliji, goli s čupercima dlačica u pazušcima žila prvog reda, dok je peteljka većinom slabo dlakava (Idžojtić 2009). Cvjetne stapke su kratke. Sjeme je smješteno ekscentrično u gornjem dijelu krilca te urez na vrhu krilca dopire do njega (Šilić 1973, Idžojtić 2013). Može se razmnožavati generativno i

vegetativno, ali se u sjevernijim područjima rasprostranjenosti rijetko razmnožava sjemenom (Goodal-Copestake i sur. 2005).

Sve tri opisane vrste brijesta prirodno su rasprostranjene na području Hrvatske. Brijestu vezu odgovaraju vlažnija staništa te se može naći u poplavnim šumama uz obale rijeka. Javlja se u šumi brijesta veza i poljskog jasena, a značajnije je zastupljen i u poplavnim šumama vrbe, topole i hrasta lužnjaka (Šilić 1973, Vukelić i Rauš 1998). Nizinski brijest se u kontinentalnom području javlja najčešće u šumama hrasta lužnjaka, kitnjaka i običnog graba te južnije u zajednici hrasta medunca i crnog jasena, dok u mediteranskom području raste u zajednici s hrastom meduncem te u čistim sastojinama, a uz veće rijeke kao što su Cetina, Kupa i Neretva se pojavljuje u zajednicama bijele topole (Zebec i sur. 2010). Gorski brijest se javlja u raznim asocijacijama brdske bukove šume i miješane šume bukve i jele (Šilić 1973, Vukelić i Rauš 1998).

Različiti biotički i abiotički čimbenici mogu negativno djelovati na populacije brijesta na određenom području. U Europi se kao najznačajniji čimbenici koji mogu ugroziti brijest navode gubitak i fragmentacija staništa te pandemija holandske bolesti brijesta koju uzrokuju fitopatogene gljive *Ophiostoma ulmi* i *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier i Buck 2001, Collin 2002, Goodal-Copestake i sur. 2005). Osim toga, značajnu prijetnju predstavlja i fitoplazmoza brijesta (Griffiths i sur. 1999, Lee i sur. 2004b). Brojna istraživanja provode se s ciljem očuvanja ove značajnih biljnih vrsta, između ostalog i istraživanja navedenih patogena (Goodal-Copestake i sur. 2005, Temple i sur. 2006, Solla i sur. 2008, Brasier i Kirk 2010, Herath i sur. 2010, Jović i sur. 2011, Oliveira i sur. 2012). Istraživanja provedena u Hrvatskoj ukazala su da promjena i gubitak staništa nepovoljno utječu na rasprostranjenost brijesta, a opaženo sušenje brijesta u hrvatskim šumama pripisuje se u najvećoj mjeri širenju holandske bolesti brijesta (Špiranec 1971, Jureša 1976, Stojković 1995, Zebec i sur. 2010, Hrašovec 2013). Međutim, istraživanja koja bi utvrdila prisutnosti i utjecaj fitoplazmoze na brijest u Hrvatskoj nisu do sad provedena.

1.2. Otkriće i prve spoznaje o fitoplazmama

Još početkom 20. stoljeća opisane su bolesti žućenja biljaka (eng. yellows diseases) koje je karakterizirala pojava žućenja listova te različite morfološke promjene na vegetativnim i generativnim organima. Znanstvenici su pretpostavili da ove bolesti uzrokuju virusi jer je utvrđeno da se prenose kukcima, a simptomi su bili slični simptomima opisanih virusnih bolesti, no nisu to uspijevali potvrditi (Lee i sur. 2000). Doi i sur. (1967) primijetili su u floemu biljaka sa navedenim simptomima pleomorfne prokariote bez stanične stijenke, promjera 200 do 800 nm koji su bili osjetljivi na tetraciklinske antibiotike te nalikovali mikoplazmama, uzročnicima bolesti životinja i čovjeka. Nakon ovog otkrića brojne biljne bolesti povezane su s novootkrivenim patogenima koji su zbog morfološke sličnosti s mikoplazmama nazvani mikoplazmama-slični organizmi (MLO) te svrstani u razred *Mollicutes*. Osim *Mycoplasma* sp., ovom razredu pripadaju i *Ureaplasma* sp., *Spiroplasma* sp., *Acholeplasma* sp. te druge bakterije bez stanične stijenke (Razin i sur. 1998). Sličnost s mikoplazmama u morfologiji i ultrastrukturi bila je jedini kriterij prema kojem su se ovi organizmi svrstavali u razred *Mollicutes*. Pronalaženje dodatnih dokaza koji bi to potvrdili otežavala je nemogućnost njihovog uzgoja na hranjivim podlogama. Sve do razvoja metoda molekularne biologije, ovi patogeni su bili slabo istraženi, a njihov taksonomski položaj bio je nesiguran. Primjenom molekularnih metoda utvrđen je vrlo nizak udio GC baznih parova (23 – 26,2 mol %) u genomu MLO (Kollar i Seemuler 1989) što je prethodno bilo dokazano i za druge predstavnike ovog razreda (Razin 1985) te sličnost u veličini genoma između MLO i mikoplazmi (Lim i Sears 1991, Neimark i Kirkpatrick 1993). Pripadnost mikoplazmama-sličnih organizama razredu *Mollicutes* potvrđena je na temelju analize nukleotidnog slijeda gena za 16S rRNA (Lim i Sears 1989, Kuske i Kirkpatrick 1992, Namba i sur. 1993, Gundersen i sur. 1994, Seemüller i sur. 1994) te gena za ribosomske proteine (Lim i Sears 1992, Toth i sur. 1994). Pokazalo se da ovi biljni patogeni imaju najviše sličnosti s predstavnicima roda *Acholeplasma*, na što je osim nukleotidnog slijeda navedenih gena ukazivala i primjena UGA kodona kao stop kodona, a ne kao kodona za triptofan, što je karakteristično za mikoplazme (Lim i Sears 1989) te sličnost u građi stanične membrane (Lim i sur. 1992). Stoga je naziv mikoplazmama-slični organizmi promijenjen u naziv fitoplazme (Tully 1993) koji se i danas koristi za ovu raznoliku skupinu prokariota bez stanične stijenke koji koloniziraju floem biljaka i kukce.

1.3. Taksonomski položaj i metode klasifikacije fitoplazmi

Fitoplazme predstavljaju monofiletski takson unutar razreda *Mollicutes*. Pretpostavlja se da su fitoplazme evoluirale od pretka sličnog današnjim predstavnicima roda *Acholeplasma* pred oko 180 milijuna godina (Gundersen i sur. 1994, Firrao i sur. 2007, Sugio i Hogenhout 2012). Zbog nemogućnosti kultiviranja fitoplazmi na umjetnim hranjivim podlogama, pri njihovoj klasifikaciji ne mogu se primijeniti minimalni standardi za opis vrsta iz razreda *Mollicutes* (Brown i sur. 2007). Umjesto toga, prihvaćena je taksonomska kategorija ‘*Candidatus*’ koju su predložili Murray i Schleifer (1994) za organizme koji se ne mogu kultivirati te su opisani samo na temelju DNA sekvenci. Prema predloženom konceptu fitoplazme su svrstane u rod ‘*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*’ (IRCPM 2004). Usporedo s imenovanjem ‘*Ca. Phytoplasma*’ vrsta, primjenjuje se i podjela fitoplazmi na ribosomske skupine i podskupine na temelju analize duljine restrikcijskih fragmenata 16S rDNA (Lee i sur. 1998, Zhao i sur. 2010) pri čemu se pretpostavlja da svaka skupina predstavlja najmanje jednu ‘*Ca. Phytoplasma*’ vrstu (Gundersen i sur. 1994).

1.3.1. Metode detekcije, identifikacije i klasifikacije fitoplazmi

Dugo vremena nakon otkrića fitoplazmi metode koje su se mogle primijeniti u istraživanjima ovih značajnih patogena bile su ograničene. Prije uvođenja molekularnih metoda, istraživanja fitoplazmi zasnivala su se na opažanju simptoma, utvrđivanju prirodnog kruga domaćina i vektora te promatranju ultratankih prereza provodnog tkiva elektronskim mikroskopom (Seemüller i sur. 1998, Lee i sur. 2000). Iako je uočavanje pleomorfni stanica fitoplazmi u floemu prilično pouzdan način detekcije, fitoplazme se ne mogu klasificirati na temelju ultrastrukture. Klasifikacija na temelju simptoma te specifičnosti prema vektoru i domaćinu vrlo je neprecizna jer pojedine fitoplazme mogu zaražavati vrlo širok krug domaćina te ih mogu prenositi različiti vektori (Lee i sur. 2004a, Quaglino i sur. 2013), nadalje različite fitoplazme mogu izazvati pojavu sličnih simptoma (Prince i sur. 1993), a jednako tako ista vrsta fitoplazmi može uzrokovati pojavu različitih simptoma u srodnih biljnih vrsta (Sinclair i sur. 2000). Serološke metode te primjena Southern analize predstavljale su napredak u metodologiji, no tek je uvođenje metode umnožavanja fitoplazmatskih gena lančanom reakcijom polimerazom (PCR) omogućilo razvoj učinkovitih sustava identifikacije i klasifikacije fitoplazmi (Lee i sur. 2000). Deng i Hiruki (1991) sintetizirali su početnice koje su omogućile specifično umnožavanje gena za 16S rRNA fitoplazmi, mikoplazmi i spiroplazmi, dok su Gundersen i Lee

(1996) primijenili ugniježdenu lančanu reakciju polimerazom (Nested PCR) pri kojoj se kao kalup koristi umnoženi odsječak dobiven u direktnoj lančanoj reakciji polimerazom te se koriste dva para početnica, što značajno povećava specifičnost i osjetljivost reakcije.

Precizno utvrđivanje biljnih vrsta koje neka fitoplazma zaražava te vrsta kukaca koji su vektori te fitoplazme od velikog je značaja, ali zbog kompleksnosti interakcije fitoplazmi s domaćinima i vektorima, nije prikladno kao osnova za klasifikaciju. Gen za 16S rRNA najčešće se primjenjuje kao osnovni parametar pri klasifikaciji fitoplazmi. Lee i sur. (1993) te Schneider i sur. (1993) primijenili su analizu polimorfizma restrikcijskih fragmenata (RFLP) umnoženog odsječka gena za 16S rRNA kako bi klasificirali fitoplazme, što se pokazalo kao praktična i pouzdana metoda. Na temelju RFLP analize 16S rDNA fitoplazme se svrstavaju u ribosomske (16Sr) skupine i podskupine. Lee i sur. (1998) analizirali su restrikcijske obrasce dobivene cijepanjem oko 1200 baznih parova dugog odsječka 16S rDNA pomoću 17 različitih restrikcijskih enzima. Istraživanje je uključilo 34 reprezentativna izolata fitoplazmi te je rezultiralo klasifikacijskom shemom prema kojoj se fitoplazme dijele u 14 ribosomskih (16Sr) skupina. Ovakav pristup ubrzo je prihvaćen od strane drugih fitoplazmologa te se do danas broj detektiranih skupina fitoplazmi povećao na 33 (16SrI-16SrXXXIII) (Bertaccini i sur. 2014). Tome je pridonio razvoj tehnologije i uvođenje sekvenciranja DNA kao standardne metode u biološkim istraživanjima i razvoj računalnih programa koji simuliraju cijepanje restrikcijskim enzimima. Primjena virtualne RFLP analize omogućila je detektiranje brojnih novih skupina i podskupina fitoplazmi (Wei i sur. 2007, 2008b, Zhao i sur. 2009).

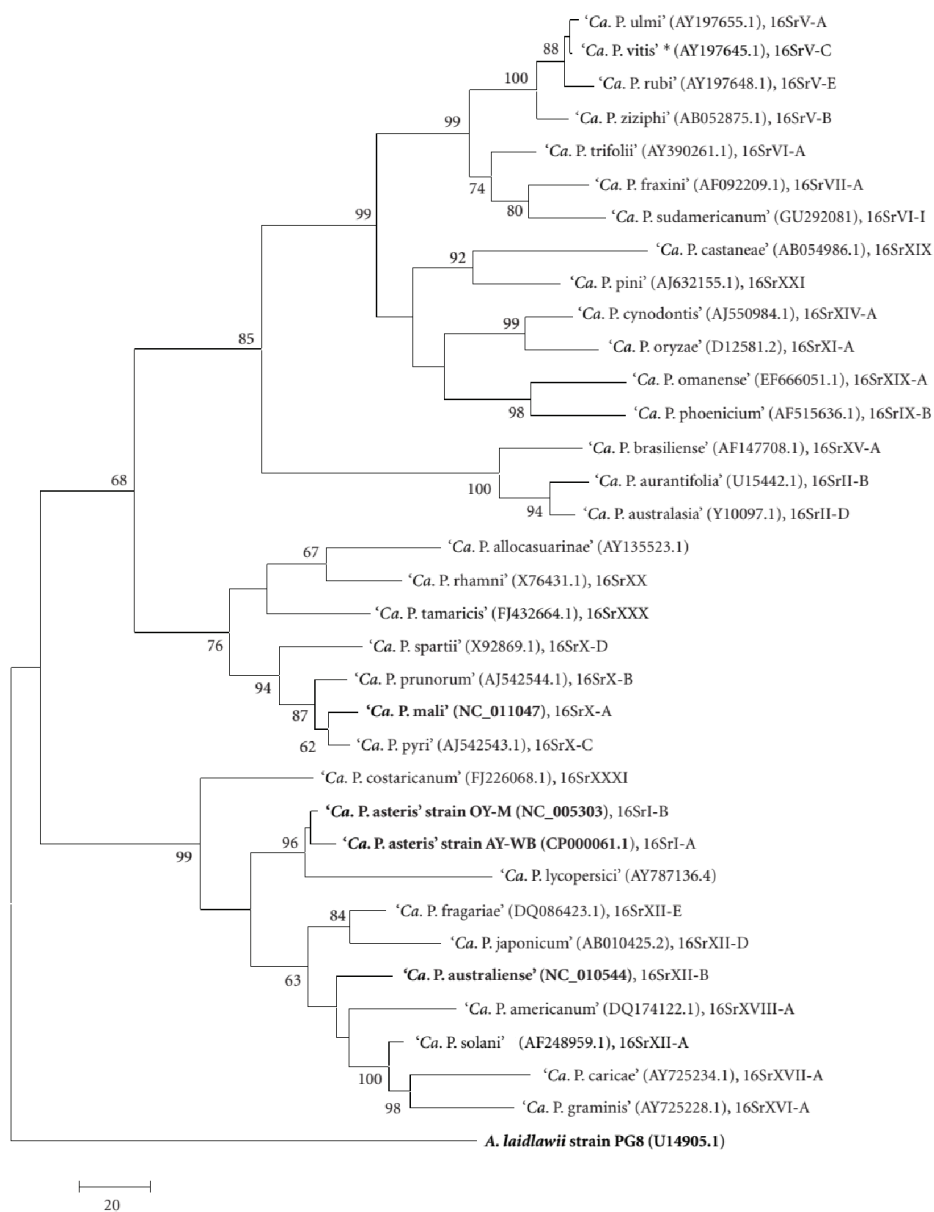
Iako je sekvenciranje i analiza 16S rDNA sekvence važna pri identifikaciji fitoplazmi i opisu 'Ca. Phytoplasma' vrsta, ova sekvencija vrlo je konzervirana te često nije dovoljna za utvrđivanje raznolikosti fitoplazmi. Osim toga, različite vrste fitoplazmi ponekad imaju vrlo veliku sličnost u nukleotidnoj sekvenci gena za 16S rRNA (Lee i sur. 2004b, Quaglino i sur. 2013). Stoga se pri klasifikaciji fitoplazmi, osim gena za 16S rRNA, analiziraju i drugi varijabilniji genski lokusi primjenom univerzalnih početnica ili početnica specifičnih za određenu skupinu fitoplazmi kao što su integensko područje između 16S i 23S rRNA (Smart i sur. 1996), gen *tuf* koji kodira elongacijski faktor Ef-Tu (Schneider i sur. 1997), geni za ribosomske proteine (Martini i sur. 2007) te geni *secY* (Lee i sur. 2010) i *secA* (Hodgetts i sur. 2008) koji kodiraju komponente Sec proteinskog translokacijskog sustava. Analiza većeg broja genskih lokusa omogućuje precizniju klasifikaciju fitoplazmi, diferencijaciju srodnih, ali ekološki različitih fitoplazmi, te određivanje njihove genske raznolikosti.

U novije vrijeme se sve više primjenjuje lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Real Time PCR) koja povećava brzinu i osjetljivost detekcije fitoplazmi, omogućava kvantifikaciju te preciznu identifikaciju uz primjenu početnica specifičnih za određenu skupinu fitoplazmi (Torres i sur. 2005, Herath i sur. 2010). Nadalje, i analiza polimorfizama jednolančane DNA (SSCP) pokazala se kao učinkovita metoda za određivanje molekularne varijabilnosti fitoplazmi (Šeruga Musić i sur. 2008). Potencijal navedenih metoda je velik, osobito u opsežnim epidemiološkim istraživanjima kada je potrebno analizirati velik broj uzoraka s velikom preciznošću u relativno kratkom vremenu. Međutim, umnožavanje fitoplazmatskih gena, osobito gena za 16S rRNA, koji se zatim sekvenciraju ili cijepaju (stvarno ili virtualno) restriktivnim enzimima još uvijek se najčešće primjenjuje za detekciju, identifikaciju i klasifikaciju fitoplazmi. Također, Contaldo i sur. (2012) uspjeli su kultivirati nekoliko fitoplazmi iz 16SrI-D, 16SrII-D, 16SrX-C, 16SrXII-A i 16SrIII podskupine. Daljnji napredak u kultiviranju fitoplazmi mogao bi značajno doprinijeti razumijevanju ovih jedinstvenih organizama.

1.3.2. Opis vrsta roda '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*'

Rod '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*' pripada razredu *Mollicutes*, redu *Acholeplasmatales* i porodici *Acholeplasmataceae*. Osnovno pravilo za imenovanje novih '*Ca. Phytoplasma*' vrsta odnosi se na sličnost u nukleotidnom slijedu gena za 16S rRNA. Nova vrsta može se opisati ukoliko se utvrdi da pokazuje manje od 97,5% sličnosti 16S rDNA (>1200 bp) s prethodno opisanim vrstama fitoplazmi (IRPCM 2004). Međutim, dvije fitoplazme čiji geni za 16S rRNA imaju više od 97,5% sličnosti mogu imati vrlo različita biološka, fitopatološka i molekularna svojstva te ih je potrebno taksonomski razdvojiti (Lee i sur. 2004b, Seemüller i Schneider 2004, Quaglino i sur. 2013). Stoga, ukoliko se dokaže da dvije fitoplazme prenose različiti vektori i da su različite biljne vrste prirodni domaćini tih fitoplazmi (ili u istog domaćina uzrokuju različite promjene) te se dokaže značajna raznolikost na molekularnom nivou (DNA probe, serološke reakcije, PCR), moguće je takve fitoplazme opisati kao zasebne '*Candidatus*' vrste (IRPCM 2004). Uvođenje kategorije '*Candidatus*' u taksonomiju fitoplazmi omogućilo je klasifikaciju na temelju podataka dobivenih molekularnim metodama, ali uzimajući u obzir i biološka svojstva što je vrlo značajno u epidemiološkim istraživanjima biljnih bolesti koje fitoplazme uzrokuju. Do danas je opisano preko trideset vrsta fitoplazmi te je za neke fitoplazme predložen status nove vrste (Kube i sur. 2012, Bertaccini i sur. 2014). Filogenetski

odnosi opisanih i predloženih vrsta prikazani su na Slici 1. Obzirom na raznolikost ove skupine patogena, vjerojatno je da će se broj vrsta unutar roda '*Ca. Phytoplasma*' i dalje povećavati.



Slika 1. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće štedljivosti (Maximum Parsimony) na temelju gena za 16S rRNA opisanih i predloženih (*) '*Ca. Phytoplasma*' vrsta uz *Acholeplasma laidlawii* kao vanjsku skupinu. Genom je u potpunosti sekvenciran za one fitoplazme koje su tiskane tamnije (prilagođeno prema Kube i sur. 2012)

1.4. Genom fitoplazmi

Parazitski način života, potreba za prilagođavanjem na različite životne sredine prilikom prijelaza iz floema biljaka u stanice kukaca i obrnuto te život u sredini koja je bogata nutrijentima utjecali su na oblikovanje genoma fitoplazmi (Oshima i sur. 2004). Tijekom evolucije fitoplazme su izgubile velik broj gena koji sudjeluju u ključnim metaboličkim procesima. Redukcija genoma utvrđena je i u drugih predstavnika razreda *Mollicutes* te u drugih parazitskih i endosimbiontskih organizama (Razin 1985, 1998, Sakharkar i sur. 2004, Pérez-Brocal i sur. 2006), no genom fitoplazmi pokazuje najveći stupanj redukcije i jedinstven je u živom svijetu. Osim gubitka mnogih metaboličkih gena, za sve fitoplazme je značajan i vrlo mali udio GC baznih parova, postojanje relativno malog broja gena za tRNA te dva rRNA operona. U sastavu fitoplazmatskog rRNA operona su tri rRNA gena, 5'-16S-23S-5S-3', a u intergenskom području između gena za 16S i 23S rRNA nalazi se gen za tRNA^{Ile} (Kollar i Seemuler 1989, Kuske i Kirkpatrick 1992, Kube i sur. 2012). Dva rRNA operona ponekad se mogu razlikovati u istog izolata fitoplazme (Liefing i sur. 1996). Nasuprot brojnim sličnostima, između pojedinih fitoplazmi postoje i značajne razlike u genomu koje bi mogle biti povezane s prilagodbom na određeni uži ili širi krug domaćina i vektora (Sugio i Hogenhout 2012). Metodom elektroforeze u pulsirajućem električnom polju (PFGE) utvrđen je širok raspon veličine genoma fitoplazmi (Neimark i Kickpatrick 1993, Marccone i sur. 1999). Najmanji kromosom, veličine samo oko 530 kb, pronađen je u '*Ca. Phytoplasma cynodontis*' (Bermuda grass white leaf phytoplasma), dok je najveći kromosom, veličine 1350 kb, pronađen u '*Ca. Phytoplasma solani*' (izolat STOLF) (Marccone i sur. 1999). Većina fitoplazmi ima kružni genom, no '*Ca. Phytoplasma mali*', '*Ca. Phytoplasma prunorum*' i '*Ca. Phytoplasma pyri*' imaju linearni genom, što je rijetkost u bakterija (Kube i sur. 2008). Osim kromosomske DNA, mnoge fitoplazme imaju i ekstrakromosomsku DNA odnosno jedan ili više plazmida (Firrao i sur. 2007).

Do sad je u potpunosti sekvenciran genom dva izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma asteris*': OY-M (16SrI-B podskupa) (Oshima i sur. 2004) i AY-WB (16SrI-A podskupini) (Bai i sur. 2006); dva izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma australiense*' (16SrXII-B podskupina): AUSGY (tuf-Australia I; rp-A) (Tran-Nguyen i sur. 2008) i SLY (tuf-New Zealand I, rp-B) (Andersen i sur. 2013); te izolata AT koje pripada vrsti '*Ca. Phytoplasma mali*' (Kube i sur. 2008). Veličina sekvenciranih genoma kreće se od 601 943 bazna para (linearni genom fitoplazme AT) do 959 779 parova baza (kružni genom fitoplazme SLY), dok se udio GC baznih parova kreće u rasponu od 21,4% (linearni genom fitoplazme AT) do 28% (kružni

genom fitoplazme OY-M). Sekvenciranje genoma pokazalo je da su fitoplazme sposobne za osnovne stanične funkcije kao što su DNA replikacija, transkripcija i translacija, ali su izgubile sposobnost sinteze aminokiselina, masnih kiselina i nukleotida te im nedostaju metabolički putevi kao što su Krebsov ciklus, oksidacijska fosforilacija, ciklus uree, put pentoza-fosfata i drugo. Uslijed redukcijske evolucije genoma, fitoplazme su postale u potpunosti ovisne o svojim domaćinima. U skladu s tim utvrđeni su brojni transportni sustavi koji omogućavaju unos metabolita iz stanice u kojoj fitoplazma parazitira. Nadalje, pronađen je Sec proteinski translokacijski sustav koji omogućava ugradnju membranskih proteina te sekreciju proteina u stanice domaćina (Oshima i sur. 2004, Bai i sur. 2006, Kube i sur. 2008, Tran-Nguyen i sur. 2008, Andersen i sur. 2013). Do sada istraženi sekrecijski proteini djeluju kao faktori virulentnosti (efektori) fitoplazmi koji utječu na fiziološke i razvojne procese u biljkama i modificiraju interakcije biljaka i kukaca, dok membranski proteini sudjeluju u interakciji fitoplazmi s domaćinima i vektorima (Suzuki i sur. 2006, Hoshi i sur. 2009, Galetto i sur. 2011, MacLean i sur. 2011, Sugio i sur. 2011a, Boonrod i sur. 2012). Također, u genomu fitoplazmi su pronađeni geni za brojne potencijalne efektore, čija funkcija nije istražena. Jedinstveno svojstvo, koje je do sada utvrđeno samo u fitoplazmi, je nedostatak F_0F_1 -tipa ATP sintaze. Još uvijek nije potpuno jasno na koji način fitoplazme sintetiziraju ATP te mogu li ga i na koji način unositi iz svoje okoline (Oshima i sur. 2004, Bai i sur. 2006, Kube i sur. 2008, Tran-Nguyen i sur. 2008, Andersen i sur. 2013). Proces glikolize je predložen kao osnovni put dobivanja ATP-a (Oshima i sur. 2004) i moguć je u većine fitoplazmi, no genom '*Ca. Phytoplasma mali*' ne kodira sve enzime potrebne za proces glikolize niti su utvrđeni alternativni putevi dobivanja energije, koji postoje u nekih vrsta iz razreda *Mollicutes* (Kube i sur. 2008, 2012). Nasuprot tome, postoje geni za P-tip ATPaza sličnih Na^+/K^+ i H^+/K^+ pumpama koje vjerojatno omogućavaju stvaranje membranskog potencijala utvrđenog u fitoplazmi (Christensen i sur. 2005, Bai i sur. 2006).

Osim redukcije važnih metaboličkih gena, za genom fitoplazmi značajno je postojanje ponovljenih otvorenih okvira čitanja (ORF) koji su uglavnom organizirani u jedinstvene elemente nazvane potencijalni mobilni elementi (eng. potential mobile units, PMU) (Bai i sur. 2006). Postojanje različitog broja PMU i PMU-sličnih sekvenci u velikoj mjeri pridonosi razlici u veličini genoma (Bai i sur. 2006, Andersen i sur. 2013). Ovi elementi kodiraju različite gene kao što su geni potrebni za replikaciju DNA, transpoziciju te sekrecijske i membranske proteine, a pronađeni su i dokazi koji upućuju na horizontalni prijenos PMU između različitih vrsta fitoplazmi (Chung i sur. 2013, Ku i sur. 2013). Brojni analizirani PMU elementi su

djelomični te se vjerojatno više ne mogu samostalno kretati u genomu fitoplazmi, no pojedini se čine sposobni za transpoziciju (Bai i sur. 2006, Tran-Nguyen i sur. 2008, Andersen i sur. 2013). Za PMU1 fitoplazme AY-WB dokazano je da se može izrezati iz kromosoma te postojati u dvije forme, linearnoj (L-PMU) i kružnoj (C-PMU). Kružna forma može se neovisno replicirati te je prisutna u većem broju kopija u kukcima nego u biljkama (Toruño i sur. 2010). Osim toga, geni smješteni na PMU potencijalni su efektori fitoplazmi (Sugio i Hogenhout 2012). Više od polovine gena za sekrecijske AY-WB proteine (SAP), od kojih je za neke dokazano da imaju funkciju fitoplazmatskih efektor, nalazi se na PMU, pri čemu su neki jače eksprimirani u biljkama, dok su drugi jače eksprimirani u kukcima (Bai i sur. 2009, MacLean i sur. 2011, Sugio i Hogenhout 2012). Prema tome, čini se da je uloga PMU u evoluciji fitoplazmatskog genoma bila značajna te da ovi genetički elementi sudjeluju u prilagodbi fitoplazmi na različite životne sredine i doprinose njihovoj virulentnosti prema domaćinu. Prema Jomantiene i Davis (2006) te Jomantiene i sur. (2007) skupine ponovljenih ORF-ova u genomu fitoplazmi nazivaju se „sequence-variable mozaicism“ i pretpostavlja se da su rezultat ponovljenih insercija mobilnih elemenata te da je njihov nastanak povezan s napadima bakteriofaga (Wei i sur. 2008a). Međutim, ovakva hipoteza nije sa sigurnošću potvrđena (Toruño i sur. 2010).

Za razliku od ‘*Ca. Phytoplasma mali*’ (Kube i sur. 2008), ‘*Ca. Phytoplasma australiense*’ i ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ imaju plazmide koji su također sekvencirani (Nishigawa i sur. 2002a, Oshima i sur. 2004, Bai i sur. 2006, Liefting i sur. 2006, Tran-Nguyen i Gibb 2006). U oba izolata ‘*Ca. Phytoplasma australiense*’ pronađen je jedan plazmid, dok su u izolata OY-M pronađena dva plazmida, a u izolata AY-WB četiri plazmida. Na plazmidima se nalaze geni *rep* i *ssb*, čiji produkti sudjeluju u replikaciji plazmida mehanizmom kotrljajućeg kruga (eng. rolling-circle replication). Zanimljivo je da gen *rep* u nekim od analiziranih plazmida pokazuje sličnost s biljnim (Bai i sur. 2006) ili životinjskim virusima (Oshima 2001). Na plazmidima se nalaze i dodatni geni čija funkcija nije poznata, ali bi mogli biti sekrecijski ili membranski proteini. Plazmidi bi mogli imati značajnu ulogu u prijenosu fitoplazmi putem vektora te utjecati na specifičnost prema domaćinu, a rekombinacije plazmida mogle bi biti jedan od mehanizama koji doprinosi raznolikosti fitoplazmi (Nishigawa i sur. 2002b, Ishii i sur. 2009a, b).

1.5. Životni ciklus fitoplazmi i interakcija s biljkama i kukcima

Fitoplazme su razvile jedinstvenu sposobnost uspješnog koloniziranja domaćina iz različitih carstava – *Planta* i *Animalia*. Iako se pomoću kukaca prenose i neki drugi patogeni organizmi, samo su fitoplazme i neke spiroplazme razvile sposobnost razmnožavanja i u stanicama biljaka i u stanicama kukaca (Hogenhout i sur. 2008, Gasparich 2010). Više stotina biljnih vrsta, kako kritosjemenjača tako i golosjemenjača, potencijalni su domaćini fitoplazmi, dok kukci koji prenose fitoplazme pripadaju redu *Hemiptera*. Osim posredstvom kukaca, fitoplazme se mogu širiti i vegetativnim razmnožavanjem te posredstvom parazitskih biljaka kao što je *Cuscuta* sp., ali ne mogu se prenositi mehaničkim putem (Lee i sur. 2000). Fitoplazme su pronađene u sjemenu i embriju nekih biljaka (Bertelli i sur. 2002, Cordova i sur. 2003, Nipah i sur. 2007), iako biljke izrasle iz zaraženog sjemena nisu uvijek i same bile zaražene (Nipah i sur. 2007). Također, pronađene su i u spolnim organima, jajima i ličinkama nekih vrsta kukaca (Kawakita i sur. 2000, Hanboonsong i sur. 2002, Tedeschi i sur. 2006) što upućuje na mogućnost vertikalnog prijenosa. Bez obzira na to, životni ciklus fitoplazmi neizostavno uključuje i biljke i kukce. Stoga su fitoplazme tijekom evolucije razvile vrlo složene mehanizme interakcije s domaćinima i vektorima kako bi osigurale svoj opstanak i širenje.

1.5.1. Utjecaj fitoplazmi na biljke

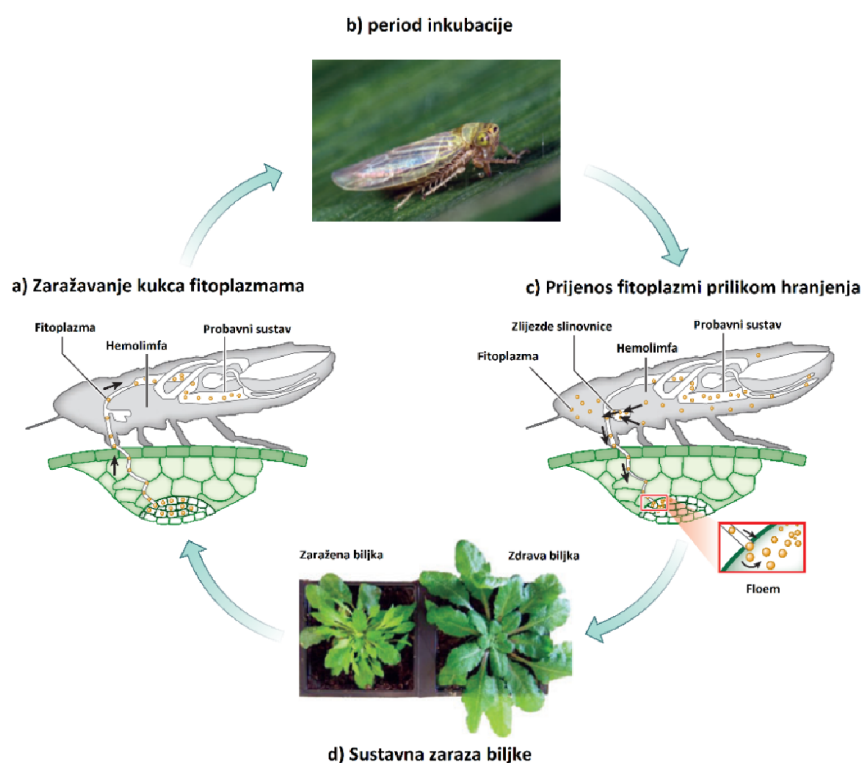
Biljke zaražene fitoplazmama razvijaju niz morfoloških i anatomskih promjena koje su povezane s promjenama na biokemijskom nivou. Na vegetativnim i reproduktivnim biljnim organima mogu se uočiti različiti simptomi kao što su virescencija (ozelenjavanje cvjetnih dijelova), filodija (transformacija cvjetnih dijelova u listove), sterilnost cvjetova, proliferacija aksilarnih pupova i razvoj vještličjih metli, promjene u dužini internodija, promjena boje (žućenje ili crvenjenje) te morfologije i anatomije listova, preuranjeno opadanje listova i zakržljaloost (Lee i sur. 2000). Često dolazi do povećanog taloženja kaloze u floemu i propadanja sitastih cijevi i stanica pratilica te nekroze floema (Braun i Sinclair 1976, Leljak-Levanić i sur. 2010, Musetti 2010). U brojnih biljnih vrsta dokazana je promjena u koncentraciji različitih biljnih hormona te promjena u ekspresiji gena koji sudjeluju u njihovoj biosintezi (Aguilar i sur. 2009, Ding i sur. 2013, Ehya i sur. 2013). Narušavanje hormonske ravnoteže moglo bi biti uzrok opaženih promjena u normalnom razvoju biljke. Osim toga, utvrđene su promjene u ekspresiji brojnih gena povezanih s razvojnim procesima (Pracros i sur. 2006, Wei i sur. 2013), te promjena u ekspresiji gena čiji su produkti uključeni u različite metaboličke procese (Hren i

sur. 2009). Dokazani su poremećaji u metabolizmu šećera i nakupljanje šećera u razvijenim listovima, dok se koncentracija u mladim listovima i korijenu smanjuje (Lepka i sur. 1999, Maust i sur. 2003, Giorno i sur. 2013), nakupljanje škroba u kloroplastima te promjena u ultrastrukturi tilakoidnih membrana (Musetti 2010), zatim značajno smanjenje fotosintetske učinkovitosti fotosustava II, smanjena ekspresija gena koji kodiraju podjedinice komponenti fotosintetskog aparata i smanjena koncentracija fotosintetskih pigmenata (Maust i sur. 2003, Ćurković Perica i sur. 2007, Hren i sur. 2009, Leljak-Levanić i sur. 2010, Endeshaw i sur. 2012). Zaraza fitoplazmama može utjecati na koncentraciju ukupnih proteina (Leljak-Levanić i sur. 2010, Zafari i sur. 2012) te koncentraciju brojnih sekundarnih biljnih metabolita (Musetti 2010) kao i na aktivaciju enzima uključenih u antioksidativni odgovor biljke (Leljak-Levanić i sur. 2010, Zafari i sur. 2012). Zaraza fitoplazmama najčešće dovodi do sušenja i odumiranja biljke, iako u rijetkim slučajevima nije praćena pojavom simptoma. Ponekad dolazi do privremenog ili trajnog nestanka simptoma bolesti i oporavka biljke (Lee i sur. 2000, Santi i sur. 2013).

Fitoplazme su detektirane u gotovo svim biljnim organima, gdje su uglavnom lokalizirane u sitastim cijevima floema. Prolaskom kroz pore sitastih cijevi, fitoplazme se mogu od mjesta zaraze širiti zajedno s floemskim sokom u druge dijelove biljke (Hogenhout i sur. 2008, Kube i sur. 2012). Ponekad se mogu uočiti i u stanicama prtilicama te u stanicama parenhima, no način prelaska iz jedne stanice u drugu nije u potpunosti razjašnjen (Rudzińska-Langwald i Kamińska 1999, Christensen 2005, Hogenhout i sur. 2008). U mnogih drvenastih vrsta dokazane su sezonske promjene u distribuciji fitoplazmi. Krajem vegetacijske sezone fitoplazme se nakupljaju u korijenu gdje prezimljuju te se u proljeće mogu ponovo širiti u nadzemne dijelove biljke (Braun i Sinclair 1976, Baric i sur. 2011), iako je u roda *Prunus* bilo moguće detektirati fitoplazme u nadzemnim dijelovima i tijekom perioda dormancije (Jarausch i sur. 1999). U mnogim slučajevima dokazana je pozitivna korelacija između koncentracije fitoplazmi i pojave te jačine simptoma, iako nije uvijek tako (Christensen 2005, Marcone 2010). Različiti čimbenici mogu utjecati na razvoj i tijek bolesti uzrokovanih fitoplazmama, uključujući svojstva i patogenost fitoplazmi, osjetljivost biljne vrste te djelovanje okolišnih čimbenika (Marcone 2010). Pojava određenih tipova simptoma te tijek bolesti mogu se značajno razlikovati čak i kad se radi o vrlo srodnim biljnim vrstama (Sinclair i sur. 2000). Jednako tako, različiti izolati iste vrste fitoplazmi mogu pokazivati značajne razlike u virulentnosti prema domaćinu (Oshima i sur. 2001).

1.5.2. Utjecaj fitoplazmi na kukce

Prijenos fitoplazmi u najvećoj mjeri ovisi o kukcima koji se hrane floemskim sokom. Kukci vektori fitoplazmi pripadaju redu *Hemiptera* koji obuhvaća više od 60 000 vrsta svrstanih unutar tri podreda: *Heteroptera*, *Stenorrhyncha* i *Auchenorrhyncha* (Wilson i Weintraub 2007). Najveći broj vektora fitoplazmi pripada podredu *Auchenorrhyncha*, nadporodici *Membracoidea*, porodici *Cicadellidae* te nadporodici *Fulgoroidea*, porodicama *Cixidae*, *Delphacidae*, *Derbide* i *Flastidae*, a značajni vektori pripadaju i podredu *Stenorrhyncha* porodici *Psyllidae*. Za neke vrste iz reda *Heteroptera* također je utvrđeno da mogu prenositi fitoplazme (Weintraub i Beanland 2006). Ove vrste kukaca imaju hemimetabolnu preobrazbu, a ličinke i odrasle jedinke slično se hrane pri čemu ne uzrokuju oštećenja provodnog sustava biljke. Prilikom hranjenja kukaca floemskim sokom zaraženih biljaka fitoplazme dospijevaju u probavni sustav svojih vektora. Iz stanica probavnog sustava prelaze u hemocel i putem hemolimfe se prenose u različite druge organe, između ostalog i žlijezde slinovnice. Tijekom perioda inkubacije (najčešće 10 do 30 dana) fitoplazme se razmnožavaju u stanicama vektora nakon čega se mogu prilikom hranjenja putem sline prenijeti na biljku (Slika 2) (Weintraub i Beanland 2006, Sugio i sur. 2011b). Prijenos fitoplazmi kukcima odvija se na perzistentan način te jednom zaražen kukac prenosi fitoplazme do kraja života (Carraro 2001). Neke fitoplazme može prenositi samo jedan ili mali broj vektora, dok druge prenosi velik broj različitih vektora. Broj vektorskih vrsta neke fitoplazme (polifagni, oligofagni ili monofagni) te način hranjenja utječu na širenje fitoplazmi i broj vrsta biljaka domaćina. Istraživanja utjecaja fitoplazmi na kukce vektore pokazala su da zaraza fitoplazmama može imati pozitivan učinak na dužinu života i broj potomaka, iako je ponekad utjecaj negativan ili neutralan (Beanland i sur. 2000, Bressan i sur. 2005). Fitoplazme mogu utjecati i na broj biljnih vrsta kojima se kukac hrani (Hogenhout i sur. 2008, Sugio i sur. 2011b). Utjecaj zaraze fitoplazmama na kukce vektore usko je povezan s modifikacijama interakcije kukaca i biljaka koje uzrokuju fitoplazme (Sugio i sur. 2011b). Pretpostavlja se da duža povezanost određene fitoplazme i vrste kukca tijekom evolucije rezultira smanjenjem virulentnosti fitoplazme prema toj vrsti te da u konačnici kukac može imati korist od zaraze fitoplazmama (Beanland i sur. 2000, Hogenhout i sur. 2008).



Slika 2. Životni ciklus fitoplazmi: a) nezaražen kukac se zaražava fitoplazmama (žute točkice) prilikom hranjenja floemskim sokom zaražene biljke; b) tijekom perioda inkubacije fitoplazme se razmnožavaju u tijelu kukca; c) zaraženi kukac prenosi fitoplazme na zdrave biljke tijekom hranjenja; d) fitoplazme se razmnožavaju u floemu biljke te dolazi do razvoja simptoma bolesti (prilagođeno prema Sugio i sur. 2011b)

1.5.3. Mehanizmi interakcije fitoplazmi s biljkama i kukcima

Mehanizmi interakcije fitoplazmi s biljkama i kukcima te mehanizmi modifikacije interakcija kukaca i biljaka posredstvom fitoplazmi nisu u potpunosti razjašnjeni. Na pojavu određenih simptoma u zaraženih biljaka može utjecati ometanje protoka tvari u floemu ili gubitak nutrijenata koje uzimaju fitoplazme (Oshima i sur. 2004), no istraživanja ukazuju na vrlo kompleksne mehanizme patogenosti. U tome bi značajnu ulogu mogli imati virulentni proteini ili efektori. Postojanje efektor koji se izlučuju u stanice domaćina te imaju različito djelovanje utvrđeno je u drugih patogenih organizama (Bai i sur. 2009, Sugio i sur. 2011b). Sekvenciranje genoma fitoplazmi omogućilo je identifikaciju potencijalnih fitoplazmatskih efektor za koje

se pretpostavlja da se izlučuju u stanice domaćina Sec proteinskim translokacijskim sustavom. Do sada je istražena funkcija nekoliko sekrecijskih i membranskih proteina. Za sekrecijski AY-WB protein SAP11 koji je kodiran genom smještenim na PMU utvrđeno je da ima signalnu sekvencu koja omogućava transport ovog efektoru u jezgru stanice domaćina te putem destabilizacije CIN-TCP transkripcijskih faktora dovode do smanjene ekspresije enzima lipoksigenaze2 (LOX2) uključenog u sintezu jasmonata. Jasmonat ima ulogu u procesima razvoja i senescencije te u obrani biljke od kukaca. Smanjena sinteza ovog biljnog hormona pogoduje vektoru *Macrosteleles quadrilineatus* koji producira veći broj potomaka kada se hrani AY-WB zaraženim biljkama (Bai i sur. 2009, Sugio i sur. 2011a). Signalna sekvenca za transport u jezgru biljne stanice pronađena je i u sekvenci SAP22, SAP30 i SAP42, no funkcija ovih proteina, koji bi također mogli utjecati na ekspresiju gena biljke domaćina, još uvijek nije istražena (Bai i sur. 2009). Poremećaj u razvoju cvijeta povezan je s djelovanjem SAP54. Ekspresija ovog proteina u transgenim biljkama *Arabidopsis thaliana* uzrokovala je slične promjene u razvoju cvijeta kakve se mogu uočiti na biljkama zaraženim AY-WB fitoplazmom kao što su filodija i virescencija, no mehanizam djelovanja ovog efektoru još nije utvrđen (MacLean i sur. 2011). Za protein TENGU pronađen u izolata OY-M ('*Ca. Phytoplasma asteris*') potvrđena je jača ekspresija u biljkama nego u kukcima te djelovanje na razvoj biljke. Ekspresija ovog proteina u transgenim biljkama *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana benthamiana* rezultirala je razvojem vještijih metli te patuljastim rastom. Osim toga, utvrđena je promjena u ekspresiji brojnih gena koja ukazuje da TENGU utječe na odgovor biljke na auksine te na smanjenu sintezu ovog fitohormona (Hoshi i sur. 2009). Biljke procesiraju TENGU na način da stvaraju male funkcionalne peptide, što bi moglo biti povezano s mehanizmom djelovanja ovog efektoru (Sugawara i sur. 2013). Sva tri istražena fitoplazmatska efektoru pronađena su u stanicama floema, ali i u drugim biljnim stanicama. Obzirom da se radi o vrlo malim proteinima koji bi mogli prolaziti kroz plazmodezmije, pretpostavlja se da se fitoplazmatski efektoru mogu transportirati kroz simplast iz floema u druge stanice i tkiva (Bai i sur. 2009, Hoshi i sur. 2009, MacLean i sur. 2011). Zanimljivo je da je pronađen veći broj potencijalnih efektoru u onih fitoplazmi koje mogu zaražavati veći broj biljnih vrsta, no potrebna su daljnja istraživanja koja bi potvrdila pozitivnu korelaciju između broja domaćina i broja efektoru (Sugio i sur. 2011b).

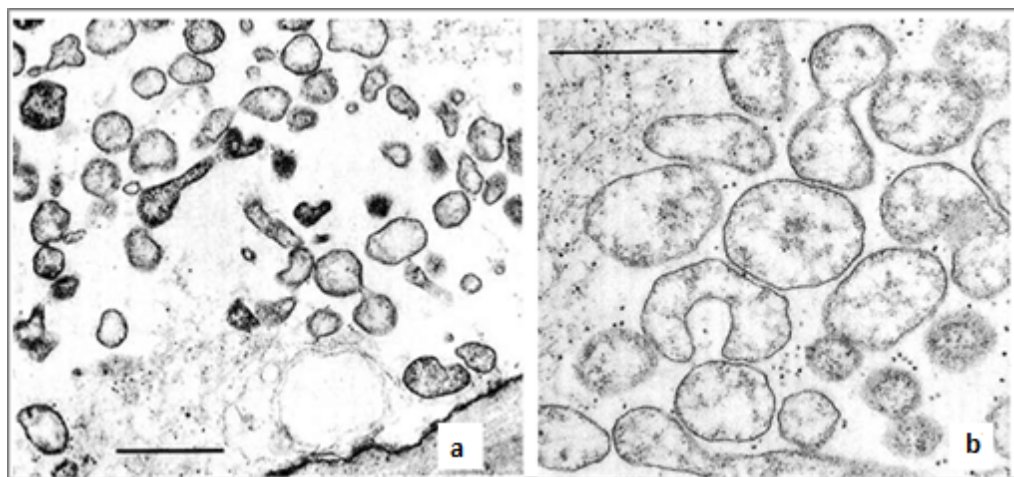
Osim fitoplazmatskih efektoru, značajnu ulogu u interakciji fitoplazmi s domaćinima i vektorima mogli bi imati i membranski proteini. Analiza imunodominantnih membranskih proteina (IDP) u različitim fitoplazmi pokazala je da se oni mogu podijeliti u tri skupne koje nisu međusobno homologne: 1) imunodominantni membranski protein – imp; 2)

imunodominantni membranski protein A – idpA; 3) antigenski membranski protein – Amp (Kakizawa i sur. 2006). Protein Amp fitoplazme OY-W (*Ca. Phytoplasma asteris*) stvara kompleks s mikrofilamentima stanica probavnog sustava kukaca samo u onih vrsta koji mogu biti vektori ove fitoplaze (Suzuki i sur. 2006). Protein Amp fitoplazme CYP (*Chrysanthemum yellows phytoplasma* – *Ca. Phytoplasma asteris*) veže se za aktin i ATP sintazu vektora *Euscelidius variegatus* (Galletto i sur. 2011). Za imunodominantni protein Imp fitoplazme LWB (lime witches broom) koja pripada 16SrII skupini dokazana je interakcija s proteinima vektora *Hishimonus phycitis* u *in vitro* uvjetima (Siampour i sur. 2011). Navedena istraživanja upućuju na značaj imunodominantnih membranskih proteina u prijenosu fitoplazmi te u specifičnosti interakcije fitoplazmi i kukaca vektora. Međutim, utvrđeno je da Amp stvara komplekse i s aktinskim molekulama biljaka (Boonrod i sur. 2012) te se pretpostavlja da bi ovi proteini mogli imati značajnu ulogu u interakciji s biljkama te pokretljivosti fitoplazmi unutar stanica domaćina i vektora (Galletto i sur. 2011, Boonrod i sur. 2012).

Pretpostavlja se da fitoplazme modificiraju razvojne procese i morfologiju biljaka kao i interakcije biljaka s kukcima kako bi osigurale svoje preživljavanje i rasprostranjivanje. Fitoplazme modificiraju biljke kako bi postale privlačnije kukcima i uzrokuju morfološke promjene kao što su razvoj vještijih metli te virescenciju i filodiju koje su usmjerene prema povećanom razvoju vegetativnih dijelova kako bi se osigurala veća površina za hranjenje i razmnožavanje kukaca vektora. Osim toga, odgađanje senescencije, koje obično slijedi nakon reproduktivne faze u jednogodišnjih biljaka, također pogoduje fitoplazmama.

1.6. Fitoplazmoze brijesta

Fitoplazmozu brijesta prvi puta je detaljno opisao Swingle (1938) koji navodi da su najčešći simptomi u američkog brijesta (*U. americana* L.) epinastija i uvijanje krajeva lisne plojke prema gore, zatim žućenje listova koje se širi na cijelu krošnjju, preuranjeno opadanje listova te nekroza floema i pojava karakterističnog mirisa koji potječe od metil-salicilata u kasnijim stadijima bolesti. Sušenje stabala uslijedilo bi vrlo brzo nakon pojave prvih simptoma. Smatralo se da bolest uzrokuje virus, obzirom da u to vrijeme fitoplazme još uvijek nisu bile poznate (Swingle 1938). Pravog uzročnika bolesti otkrili su Wilson i sur. (1972) kada su pomoću elektronskog mikroskopa uočili okrugle, ponekad ovalne te rjeđe filamentozne fitoplazmatske stanice u floemu simptomatičnog američkog brijesta (Slika 3). Prvi dokaz prisutnosti fitoplazmoze brijesta na području Europe dali su Pisi i sur. (1981), a do danas je bolest detektirana u više europskih zemalja uključujući Italiju, Francusku, Njemačku, Češku i Srbiju (Mäurer i sur. 1993, Marcone i sur. 1997, Sfalanga i sur. 2002, Boudon-Padieu i sur. 2004, Carraro i sur. 2004, Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2011).



Slika 3. Fitoplazme brijesta u sitastim cijevima vrste *Ulmus americana* L. – morfologija fitoplazmatskih stanica pri manjem (a) i većem (b) povećanju; bar = 1 μ m (preuzeto iz Braun i Sinclair 1976).

Najznačajniji uzročnik fitoplazmoze brijesta (*Ulmus* sp.) na području Sjeverne Amerike i Europe pripada skupini 16SrV koja se još naziva i EY skupina (eng. elm yellows group). Prema klasifikacijskoj shemi koju su uveli Lee i sur. (1998) te nadopunili Davis i Dally (2001), na temelju RFLP analize gena za 16S rRNA skupina 16SrV dijeli se na pet podskupina (16SrV-A

do E) i predstavlja jednu od najvećih skupina fitoplazmi. Osim fitoplazmi brijesta, u ovoj skupini nalaze se uzročnici bolesti različitih biljnih vrsta kao što su vinova loza, joha, kupina, višnja, te vrste iz roda *Spartium* i *Ziziphus* (Lee i sur. 2004b, Malembic-Maher i sur. 2011). Fitoplazme koje zaražavaju brijest svrstane su u 16SrV-A podskupinu te su 2004. godine opisane kao nova ‘*Candidatus*’ vrsta nazvana ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ (Lee i sur. 2004b). Također, fitoplazme iz 16SrV-B podskupine koje zaražavaju vrstu *Ziziphus jujuba* na području Azije opisane su kao vrsta ‘*Ca.* Phytoplasma ziziphi’ (Jung i sur. 2003), a fitoplazme iz 16SrV-E podskupina koje zaražavaju vrste *Rubus* sp. i *Rosa canina* opisane su kao vrsta ‘*Ca.* Phytoplasma rubi’ (Malembic-Maher i sur. 2011). Opis ‘*Ca.* Phytoplasma ulmi’ kao nove vrste temeljio se na analizi gena za 16S rRNA, ribosomske proteine i gena *secY*. Unutar sekvenci navedenih genskih lokusa pronađeni su oligonukleotidni slijedovi jedinstveni za fitoplazme brijesta (Tablica 1) što je, uz specifičnost prema vektoru i domaćinu, omogućilo izdvajanje ovih fitoplazmi kao nove vrste uz izolat EY1 kao referentni izolat (Lee i sur. 2004b).

Tablica 1. Jedinstvene oligonukleotidne sekvence fitoplazme ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ (Lee i sur. 2004b)

Gen	Jedinstvena sekvenca 5’– 3’	Položaj
16S rRNA	GGAAA	827–835
	CGTTAGTTGCC	1098–1108
<i>rpl22</i> i <i>rps3</i>	TTACGCTTGCC	284–294
	CATTTAATAAAAATTGCTATT	739–758
	AAATTCTATTCTATGGGAAT	910–932
<i>secY</i>	TTTGATCCAATGTAA	350–365
	GTCTTTCGGTCATGGATTGA	595–614
	ATTTAGTCTAAT	616–627
	CAAATAGAACAA	1053–1064

Prihvaćeni naziv bolesti koju uzrokuje fitoplazma ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ je bolest žućenja brijesta (eng. elm yellows disease), no kako se u različitim vrsta brijesta mogu uočiti različiti simptomi, bolest je u literaturi poznata i kao nekroza floema brijesta (eng. elm phloem necrosis) te bolest vještijih metli (eng. elm witches broom disease). Američke vrste kao što su *U. americana* L., *U. rubra* Muhl., *U. alata* Michx., *U. serotina* Sarg. i *U. crassifolia* Nutt. izrazito su osjetljive na zarazu ovom fitoplazmom. U ovih vrsta ubrzo nakon razvoja simptoma na listovima, dolazi do nekroze floema te se stablo suši najčešće prve ili druge godine nakon pojave simptoma. U vrste *U. rubra* Muhl. razvoj simptoma se obično može pratiti tijekom dvije vegetacijske sezone, a tijekom druge sezone često dolazi do razvoja vještijih metli (Braun i

Sinclair 1979, Sinclair i sur. 2000). Analiza anatomskih promjena u vrste *U. americana* L. pokazala je da dolazi do taloženja kaloze u floemu vrlo brzo nakon zaražavanja te do propadanja sitastih cijevi i stanica pratilica. Slijedi hiperaktivacija kambija te stvaranje novih floemskih elemenata koji s vremenom također propadaju. Osim toga, primijećeno je nakupljanje škroba u paranhimskim stanicama (Braun i Sinclair 1976). Europske i azijske vrste kao što su *U. minor* Mill. sensu latissimo, *U. laevis* Pall., *U. glabra* Huds., *U. parvifolia* Jacq. i *U. pumila* L. manje su osjetljive, no zaraza fitoplazmama može rezultirati sušenjem i ovih vrsta. Međutim, rjeđe dolazi do intenzivnog taloženja kaloze i nekroze floema. Često se razvijaju vještije metle, osobito u nizinskog brijesta (*U. minor* Mill. sensu latissimo) te se može pojaviti kloroza listova, usporen rast i zakrčljaloost (Braun i Sinclair 1979, Sinclair i sur. 2000). Također, u ovih vrsta zabilježena je i pojava asimptomatske zaraze (Mitterpergher 2000, Carraro i sur. 2004). U zaraženim stablima fitoplazme se mogu detektirati u listovima, granama i korijenu (Marcione i sur. 1997, Navrátil i sur. 2009, Herath i sur. 2010, Jović i sur. 2011). Uočene su samo u razvijenim sitastim cijevima te u području pora sitastih ploča, ali ne i u stanicama pratilicama ili stanicama parenhima (Slika 3). Broj opaženih fitoplazmatskih stanica bio je znatno veći u manje osjetljivih europskih vrsta nego u američkog brijesta (Braun i Sinclair 1976, 1979, Pisi i sur. 1981). Obzirom da je u američkog brijesta utvrđeno propadanje elemenata floema krajem vegetacijske sezone u nadzemnim dijelovima, pretpostavlja se da fitoplazme prezimljuju u korijenu gdje floemski elementi ostaju funkcionalni te se u proljeće, kada dođe do formiranja novih provodnih elemenata, ponovo mogu širiti u nadzemne dijelove (Braun i Sinclair 1976). Bertelli i sur. (2002) detektirali su fitoplazme i u cvjetovima, plodovima i sjemenu, ali mlade biljke nisu bile zaražene te je upitno mogu li se fitoplazme brijesta prenositi na ovaj način. Najznačajniji kukci vektori ovih fitoplazmi su *Scaphoideus luteolus* Van Duzee na području sjeverne Amerike te *Macropsis mendax* Fieber na području Italije (Carraro i sur. 2004). Međutim, druge vrste kao što su *Philaenus spumarius* L., *Hyalesthes luteipes* Fieber, *Lepyronia quadrangularis* Say, *Allygus atomarius* Fabricius i *Latalus* sp. mogle bi doprinosti širenju fitoplazmi brijesta (Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2010, Rosa i sur. 2014).

Istraživanja genske raznolikosti fitoplazmi brijesta pokazala su srodnost izolata s područja Sjeverne Amerike i Europe. Iako pri početnom opisu vrste '*Ca. Phytoplasma ulmi*' nije utvrđena velika raznolikost, novija istraživanja pokazala su značajnu gensku raznolikost izolata s područja Europe (Arnaud i sur. 2007, Jović i sur. 2008, Navratil i sur. 2009, Jović i sur. 2011). Opisani su izolati u kojih je postojala varijabilnost unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci koje su za vrstu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' definirali Lee i sur. (2004b) te su potrebna

dotatna istraživanja kako bi se omogućila bolja karakterizacija ovog značajnog patogena brijesta.

Iako je najznačajniji uzročnik fitoplazmoze brijesta, fitoplazma '*Ca. Phytoplasma ulmi*' nije jedna fitoplazma koja može zaražavati brijest. Kao uzročnik sušenja američkog brijesta (*U. americana*) u SAD-u, savezna država Illinois, detektirana je fitoplazma '*Ca. Phytoplasma trifolii*', podgrupa 16SrVI-C (Jacobs i sur. 2003). Međutim, zaraza ovom fitoplazmom nije do sad utvrđena na drugim područjima Sjeverne Amerike niti u Europi. Fitoplazme koje pripadaju 16SrI skupini, odnosno vrsti '*Ca. Phytoplasma asteris*', zaražavaju preko 80 različitih biljnih vrsta te ih može prenositi preko 30 vrsta kukaca (Lee i sur. 2004a). Zaraza ovim fitoplazmama utvrđena je u američkih i europskih brijestova, često u mješovitoj zarazi zajedno s '*Ca. Phytoplasma ulmi*' ili '*Ca. Phytoplasma trifolii*' (Lee i sur. 1995, Jacobs i sur. 2003). Nadalje, fitoplazme iz 16SrI-B podskupine uzrokovale su simptome vješticih metli u vrste *U. parvifolia* u Kini (Gao i sur. 2011). Također, zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma asteris*' utvrđena je i u azijskih vrsta *U. chenmoui* i *U. parvifolia* koje su unijete na područje Italije (Lee i sur. 1995, Sfalanga i sur. 2002). Fitoplazma '*Ca. Phytoplasma solani*', kao i '*Ca. Phytoplasma asteris*' ima vrlo širok krug domaćina i vektora (Quaglino i sur. 2013). Ovu fitoplazmu detektirali su Credi i sur. (2006) u pet od šest analiziranih uzoraka nizinskog brijesta u sjevernoj Italiji, ali značajniji utjecaj ove fitoplazme na brijest nije poznat.

1.7. Holandska bolest brijesta

Holandska bolest brijesta je traheomikoza koju uzrokuju fitopatogene gljive mješinarke (Ascomycota) iz roda *Ophiostoma* – *Ophiostoma ulmi* (Buism.) Nannf. i *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier. Do sada su zabilježene dvije pandemije ove bolesti. Prvu pandemiju, koja je započela u sjeverozapadnoj Europi oko 1910. godine, a zatim se proširila Europom, Sjevernom Amerikom te sjeverozapadnom i centralnom Azijom, uzrokovala je vrsta *O. ulmi*. Druga pandemija holandske bolesti još uvijek traje, a uzrokovana je virulentnijom vrstom *Ophiostoma novo-ulmi*. Ova vrsta zastupljena je s dvije podvrste – *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* čiji je centar širenja istočna Europa gdje se pojavila oko 1940. godine i *O. novo-ulmi* subsp. *americana* koja se pojavila na sjeveroistoku Sjeverne Amerika, a zatim je unijeta oko 1960. godine u Europu. Danas se na području Europe areali dviju podvrsta *O. novo-ulmi* u velikoj mjeri preklapaju (Brasier i Buck 2001, Brasier i Kirk 2010). Nedavno je otkriveno da su gljive *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* prisutne na području Japana (Masuya i sur. 2010). Osim spomenutih

vrsta koje su kao uneseni patogeni na području Europe uzrokovale intenzivno sušenje brijesta, postoji i treća vrsta, *O. himal-ulmi*, no ova vrsta je endemična na području Himalaja te je vrlo slabo virulentna prema vrstama brijesta koje su tamo prirodno rasprostranjene (Brasier i Mehrotra 1995). Obzirom da su američke i europske vrste brijesta vrlo osjetljive na holandsku bolest brijesta, za razliku od azijskih, pretpostavljeno je da bi i *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* mogle potjecati iz Azije, no dosadašnja istraživanja nisu uspjela potvrditi ovu pretpostavku (Brasier 1990, Brasier i Kirk 2010).

Uzročnici holandske bolesti brijesta mogu rasti kao jednostanični oblici (kvasci) i kao višestanični nitasti (filamentozni) oblici. Dimorfizam je povezan s okolišnim čimbenicima, pri čemu je jedan od ključnih faktora koji utječe na formu rasta izvor dušika (Hornby i sur. 2004, Nadal i sur. 2008). Razmnožavanje ovih vrsta može biti spolno i nespolno. Tijekom nitastog rasta nespolno razmnožavanje odvija se pomoću konidija. Postoje dva anamorfna (nespolna) stadija, jedan karakterizira formiranje konidija na pojedinačnim konidioforima (*Sporotrix*), dok drugi karakterizira razvoj koremija građenih od većeg broja povezanih konidiofora (*Graphium* ili *Pesotum*) (Stipes i Campana 1981). Spolno razmnožavanje odvija se pomoću askospora i moguće je samo između jedinki koje pripadaju različitim MAT tipovima parenja, što je određeno alternativnim idiomorfima MAT-1 i MAT-2 na MAT genskom lokusu (Paoletti i sur. 2005). Osim toga, jednostanični oblici mogu se razmnožavati pupanjem (Stipes i Campana 1981).

Širenju bolesti u najvećoj mjeri doprinose potkornjaci (red *Coleoptera*, porodica *Scolytidae*). Na području Europe utvrđeno je nekoliko vektorskih vrsta, no najznačajnije su vrste *Scolytus scolytus* i *S. multistriatus*, pri čemu je *S. scolytus* učinkovitiji vektor (Webber 1990, 2004). Potkornjaci buše hodnike u kori bolesnih i oslabljenih stabala brijesta gdje polažu jaja. Ličinke se hrane floemom bušeći nove hodnike koji su obično okomiti na primarni hodnik, a zatim se zakukulje. U hodnicima potkornjaka odvija se saprofitska faza gljive. U ovoj fazi gljiva raste nitasto i stvara mnoštvo spora. Spore se lijepe za tijelo mladih kukaca koji odlaze hraniti se na zdravim stablima. Putem oštećenja nastalih prilikom hranjenja, spore gljive dospijevaju u provodni sustav brijesta. Tada započinje patogena faza gljive u kojoj dominira jednostanična forma koja omogućava lako širenje gljive kroz ksilem, dok nitasta forma omogućava prijelaz u susjedne elemente ksilema. Osim toga, patogen se može širiti od zaraženih do zdravih stabala brijesta i putem anastomoza korijena (Stipes i Campana 1981, Ghelardini i Santini 2009).

Razvoj bolesti ovisi o vrsti brijesta, starosti stabla, vrsti i svojstvima patogena, načinu i mjestu zaraze (anastomozama korijena ili potkornjacima), periodu u vegetacijskoj sezoni kada je

zaraza nastupila te čimbenicima okoliša kao što su temperatura, vlažnost i kvaliteta tla (Sutherland i sur. 1997, Webber 2004, Ghelardini i Santini 2009). Kao prvi znakovi bolesti javljaju se venuće i žućenje te sušenje i opadanje listova, a ponekad suhi listovi ostaju duže na granama. Ponekad se listovi brzo osuše, ali ne požute pa se na stablu uočavaju tamnozeleni suhi listovi. U slučaju akutnog oblika bolesti sušenje se obično prvo uočava na mlađim listovima, a simptomi se mogu brzo proširiti cijelom krošnjom i rezultirati sušenjem stabla. Ovakav oblik bolesti javlja se u mlađih stabala te ako je zaraza nastupila ranije tijekom sezone. Kronični oblik bolesti karakterizira polako odumiranje stabala koje može trajati nekoliko godina i obično se javlja u starijih stabala. Osim vanjskih simptoma javljaju se i unutarnji simptomi koji se mogu uočiti na poprečnom prerezu zaraženih grana kao tamno obojenje ksilema u obliku isprekidanog ili cjelovitog prstena (Stipes i Campana 1981, Glavaš 1999)

Iako pripadaju istom rodu i posjeduju brojne zajedničke karakteristike, smatra se da su se vrste *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* odvojile davno u evoluciji, a moguće ih je razlikovati obzirom na brojna biološka, fiziološka i molekularna svojstva (Brasier 1991, Brasier i Kirk 2010). Jednostavna metoda identifikacije vrsta zasniva se na razlici u temperaturnom optimumu. Optimalna temperatura rasta vrste *O. novo-ulmi* je 20-22°C, dok je optimalna temperatura rasta vrste *O. ulmi* 30°C te je na temelju rasta i morfologije kolonije pri različitim temperaturama moguće determinirati uzročnika bolesti. Osobito je značajna razlika u virulentnosti. Vrsta *O. novo-ulmi* znatno je jači patogen od *O. ulmi* (Brasier 1991). Kako se ova agresivnija vrsta širila, tako je postupno zamjenjivala manje agresivnu vrstu *O. ulmi*, koja je uslijed toga vrlo rijetka u Europi (Hoegger i sur. 1996, Santini 2005, Dvořák i sur. 2007). Obje podvrste *O. novo-ulmi* vrlo su virulentne, iako se *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* smatra nešto manje virulentnom u odnosu na *O. novo-ulmi* subsp. *americana*. Ove podvrste razlikuju se obzirom na morfologiju peritecija te pokazuju određenu razliku u morfologiji kulture (Brasier 1986, Brasier i Kirk 2001), no pouzdaniji način za determinaciju podvrsta zasniva se na primjeni molekularnih metoda (Hoegger i sur. 1996, Konrad i sur. 2002, Solla i sur. 2008, Brasier i Kirk 2010). Uslijed postojanja reproduktivne barijere, hibridizacija između vrsta *O. ulmi* i *O. novo-ulmi* vrlo je rijetka, a nastali hibridi slabo su virulentni i brzo se gube u populaciji (Brasier i sur. 1998). Za razliku od toga, između podvrsta *O. novo-ulmi* postoji samo djelomična reproduktivna barijera, a prisutnost fertilnih hibrida ovih vrsta dokazana je u prirodi (Konrad i sur. 2002, Santini i sur. 2005, Solla i sur. 2008, Brasier i Kirk 2010).

Pojava bolesti u Hrvatskoj zabilježena je 1929. godine i od tada uzrokuje sušenje brijesta, osobito nizinskog (Škorić 1943, Spaić 1955, Glavaš 1999). Analiza uzoraka s nekoliko

lokaliteta u Hrvatskoj pokazala je da su osamdesetih godina na području Hrvatske bile prisutne i *O. ulmi* i obje podvrste *O. novo-ulmi* (Brasier i Kirk 2001). Noviji podaci o uzročnicima holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj nisu dostupni, iako je uočena aktivnost potkornjaka te sušenje brijesta u hrvatskim šumama (Hrašovec 2013).

1.8. Ciljevi istraživanja

Više od 40 godina poznato je da bolest žućenja brijesta uzrokuju fitoplazme, a uzročnik ove bolesti, fitoplazma '*Candidatus Phytoplasma ulmi*', formalno je opisan prije 10 godina (Lee i sur. 2004b), no u Hrvatskoj prisutnost ovog značajnog patogena brijesta nije do sada istraživana. Pretpostavka o prisutnosti i genskoj raznolikosti fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' u Hrvatskoj zasniva se na prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je ovaj patogen široko rasprostranjen i genetički raznolik u Europi te prisutan u područjima geografski susjednim Hrvatskoj (Jović i sur. 2008, 2011). Međutim, ne može se isključiti ni prisustvo drugih fitoplazmi koji mogu zaražavati brijest. Osim toga, dosadašnja istraživanja pokazala su da je propadanje brijesta u Hrvatskoj povezano s holandskom bolesti brijesta koju uzrokuju gljive *Ophiostoma ulmi* i *O. novo-ulmi* (Glavaš 1999, Hrašovec 2013). Poznato je da je virulentnija vrsta, *O. novo-ulmi*, osamdesetih godina prošlog stoljeća već bila prisutna u Hrvatskoj (Brasier i Kirk 2001). Može se pretpostaviti da je virulentniji patogen, vrsta *O. novo-ulmi*, do sad u potpunosti zamijenio manje virulentnog uzročnika holandske bolesti, vrstu *O. ulmi*, obzirom da je slična situacija zapažena na do sad istraženim područjima u Europi (Brasier i Buck 2001). Uz pretpostavku da su fitoplazma '*Ca. Phytoplasma ulmi*' i gljive koje uzrokuju holandsku bolest prisutne na istom području, postoji mogućnost detekcije miješane zaraze ovim patogenima.

Obzirom na navedeno postavljeni su slijedeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi prisutnost i zastupljenost fitoplazmoze brijesta te identificirati fitoplazme koje uzrokuju fitoplazmoze brijesta u triju vrsta brijesta, nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.) u Hrvatskoj
2. Molekularno karakterizirati izolate fitoplazme 'Ca. Phytoplasma ulmi' koji zaražavaju brijest u Hrvatskoj na temelju analize sekvence gena za 16S rRNA, gena *rpl22* i *rps3* koji kodiraju ribosomke proteine L22 i S3, gena *secY* koji kodira komponentu Sec proteinskog translokacijskog sustava te gena *map* koji kodira metionin aminopeptidazu
3. Utvrditi filogenetske odnose i međusobnu srodnost izolata fitoplazme 'Ca. Phytoplasma ulmi' s područja Hrvatske te srodnost s prethodno opisanim izolatima ove vrste fitoplazmi
4. Utvrditi prisutnost i zastupljenost holandske bolesti brijesta te identificirati uzročnika ove bolesti u triju vrsta brijesta, nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.) u Hrvatskoj
5. Utvrditi učestalost miješane zaraze fitoplazmama i fitopatogenim gljivama koje uzrokuju holandsku bolest brijesta te procijeniti utjecaj ovih različitih patogena na populacije brijesta u Hrvatskoj

2. Materijali i metode

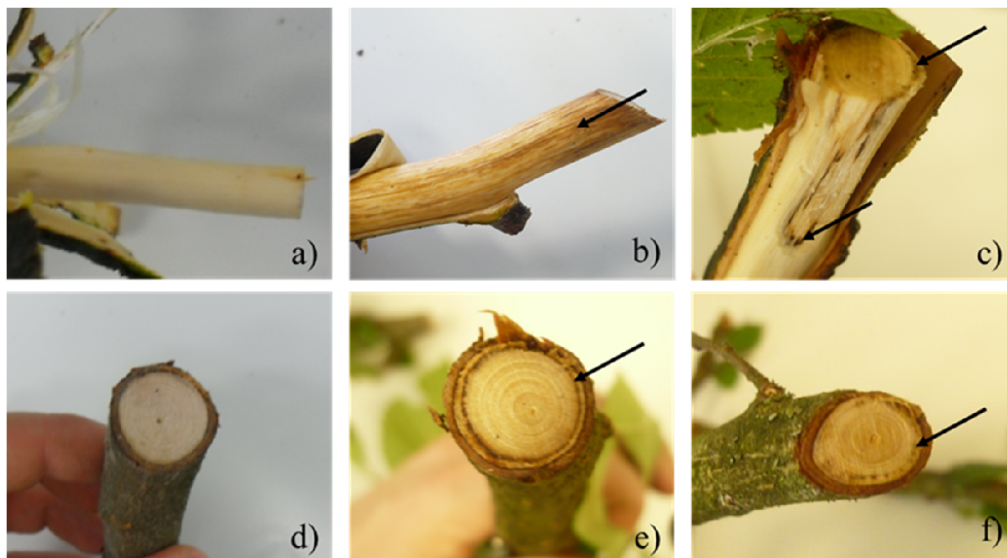
2.1. Uzorci brijesta

Tijekom lipnja i srpnja 2012. godine uzorkovana su stabla nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.) na šest lokaliteta na području Hrvatske: Donji Miholjac, Nova Kapela, Đurđevačka Bilogora, Kalnik, Jastrabarsko i Cetina (Slika 4). Sa svakog stabla prikupljeni su listovi koji su korišteni u istraživanju fitoplazmi te grančice promjera 1 – 2 cm koje su korištene za izolaciju uzročnika holandske bolesti brijesta. Ukupno je uzorkovano 139 stabala brijesta, od toga 79 stabala brijesta veza (10 na lokalitetu Nova Kapela, 18 na lokalitetu Donji Miholjac, 15 na lokalitetu Đurđevačka Bilogora, 16 na lokalitetu Jastrebarsko i 20 na lokalitetu Cetina), 37 stabala nizinskog brijesta (13 na lokalitetu Nova Kapela, 2 na lokalitetu Donji Miholjac, 10 na lokalitetu Đurđevačka Bilogora, 9 na lokalitetu Jastrebarsko i 3 na lokalitetu Cetina) i 23 stabla gorskog brijesta (prikupljeni na lokalitetu Kalnik).

Za svako uzorkovano stablo zabilježena je pojava slijedećih simptoma: žućenje, sušenje i opadanje listova, pojava vještičjih metli, promjena boje ksilema (Slika 5) i sušenje stabla. Obzirom da nije uvijek moguće procijeniti jesu li simptomi na listovima povezni s jednim od istraživanih patogena (Kirisits 2013) te kako bi se mogao usporediti utjecaj različitih patogena na pojedine vrste brijesta, procijenjen je intenzitet opaženih simptoma na listovima (žućenja i/ili sušenja i/ili opadanja listova) te je svakom uzorkovanom stablu dodijeljena jedna od pet kategorija intenziteta simptoma: 0 – nema simptoma na listovima; 1 – do 10% krošnje zahvaćeno simptomima; 2 – do 50% krošnje zahvaćeno simptomima; 3 – do 75% krošnje zahvaćeno simptomima; 4 – preko 90% krošnje zahvaćeno simptomima. Odabrani primjeri uzorkovanih stabala prikazani su na Slici 6. Ukoliko su na stablu opaženi simptomi koji bi ukazivali na fitoplazmozu i/ili holandsku bolest, uzorci (pet listova i tri grančice) su uzeti s dijela krošnje gdje su simptomi bili vidljivi pri čemu su uzeti samo simptomatični listovi i graniče koji su još uvijek živi, ali ne i potpuno suhi listovi ili potpuno suhe grančice. Ukoliko na stablu nisu uočeni simptomi, uzorci (pet listova i tri grančice) su uzeti nasumično s različitih dijelova krošnje. Nakon što su uzorci doneseni u laboratorij izrezani su glavna žila i peteljka listova i pohranjeni na -20°C do daljnje analize, a grančice su čuvane na 4°C do izolacije uzročnika holandske bolesti brijesta.



Slika 4. Lokaliteti na području Hrvatske na kojima su prikupljeni uzorci brijesta.



Slika 5. Prikaz grančica brijesta na kojima nisu vidljivi simptomi holandske bolesti brijesta (a i d) i grančica na kojima je vidljivo tamno obojenje ksilema (označeno strelicom) koje ukazuje na holandsku bolest brijesta (b, c, e i f).



Slika 6. Uzorkovano stablo nizinskog brijesta intenziteta simptoma 4 (a), dio uzorkovanog stabla gorskog brijesta koji pokazuje simptome žućenja i sušenja listova (b), uzorkovani listovi stabla brijesta veza sa simptomima žućenja (c).

2.2. Izolacija i identifikacija uzročnika holandske bolesti brijesta

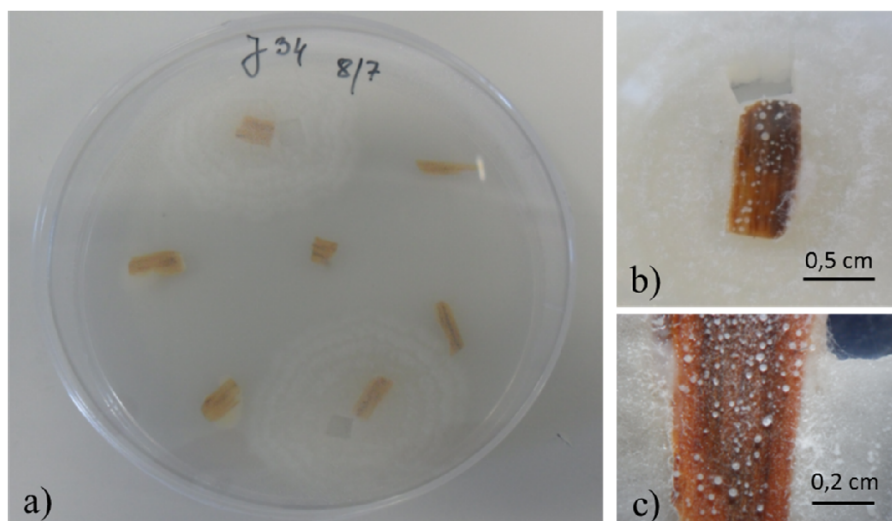
2.2.1. Izolacija i održavanje izolata

Gljiva koja uzrokuje holandsku bolest brijesta izolirana je iz uzoraka grančica, najviše tjedan dana nakon prikupljanja. Za izolaciju je korištena kruta MEA podloga (Malt Extract Agar, Biolife) priređena prema uputama proizvođača: 35,6 g praškaste podloge pomiješano je s 1000 mL destilirane vode, smjesa je zagrijana do vrenja, sterilizirana autoklaviranjem 15 minuta pri 120°C i zatim razlivena u sterilne plastične Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Tako pripremljena podloga potpunim hlađenjem prelazi u kruto stanje.

Izolacija uzročnika holandske bolesti brijesta rađena je prema Brasier (1981), bez dodatka antibiotika u podlogu. Prikupljene grančice brijesta su površinski dezinficirane 70%-tnim etanolom, kora je oguljena te su pomoću skalpela izrezani komadići ksilema (veličine oko 1 cm) i stavljeni na krutu MEA podlogu. Komadići ksilema na MEA podlozi inkubirani su na sobnoj temperaturi u mraku i svakodnevno vizualno analizirani. Ukoliko je uzorak bio zaražen, micelij gljive bi nakon nekoliko dana prorastao podlogu (Slika 7), ali bi se često razvili i drugi mikroorganizmi. Čista kultura gljive dobivena je na način da je izrezan komadić podloge s micelijem sa početne podloge te prenesen na novu MEA podlogu. Nakon prorastanja micelija na novoj podlozi, precjepljivanje je ponovljeno na isti način. Ponekad je bilo potrebno precjepljivanje ponoviti više puta kako bi se kultura u potpunosti pročistila.

Za održavanje čiste kulture gljive korištena je ista hranjiva podloga koja je korištena za izolaciju. Svježa kultura gljive u laboratoriju je održavana kontinuiranim precjepljivanjem svaka tri tjedna. Za duže čuvanje izolata gljive, korištena je 22%-tna otopina glicerola sterilizirana autoklaviranjem. Nakon prorastanja i sporulacije izolata, izrezani su mali komadići podloge s micelijem i nekoliko komadića stavljeno je u mikroeprevetu sa sterilnom 22%-tnom otopinom glicerola. Ovako priređeni uzorci pohranjeni su na -20°C .

Razlijevanje podloge, precjepljivanje izolata te priprema uzoraka za duže čuvanje rađena je u laminaru kako bi se izbjegla zagađenja.



Slika 7. Prorastanje izolata gljive iz zaraženih komadića grančica na krutoj MEA podlozi (a). Na uvećanom prikazu (b i c) vidljivo je stvaranje nespolnih spora.

2.2.2. Identifikacija uzročnika holandske bolesti brijesta

Kako bi se odredilo pripada li izolirana gljiva vrsti *Ophiostoma ulmi* ili *O. novo-ulmi*, analiziran je rast pri 20°C i 33°C te morfologija kulture pri 20°C. Izolate *O. ulmi* karakterizira sporiji rast pri temperaturi 20°C koji se kreće u rasponu od 2,0 – 3,1 mm/danu, dok rast pri 33°C iznosi 1,1 – 2,8 mm/danu. Izolate *O. novo-ulmi* karakterizira brži rast na 20°C koji iznosi 3,1 – 4,8 mm/danu, a pri 33°C rast je vrlo spor i kreće se u rasponu od 0 – 0,5 mm/danu. S obzirom na morfologiju kulture izolate *O. ulmi* karakterizira glatka, voštana konzistencija micelija ili produciraju vrlo malo nediferenciranog zračnog micelija, a dnevne zone raste slabo su vidljive, dok izolati *O. novo-ulmi* razvijaju zračni micelij (eng. fibrous-striate appearance, a petaloid pattern) s uočljivim dnevnim zonama rasta (Brasier 1981, 1991).

Rast kulture pri 20°C određivan je tako da je izrezan komadić MEA podloge s micelijem dimenzije 2x2 mm, stavljen na sredinu nove MEA podloge i inkubiran u mraku pri 20°C. Rast kulture mjeren je nakon 2 dana i ponovno nakon 7 dana rasta u mraku na način da je mjeren promjer dva puta pod kutom od 90°. Nakon toga Petrijeve zdjelice prenesene su na dnevno svjetlo te inkubirane pri 20 - 25°C tijekom 10 dana kako bi se odredila morfologija kulture. Rast kulture pri 33°C određivan je na isti način kao i pri 20°C, osim što je vremenski raspon između prvog i drugog mjerenja promjera kulture iznosio 10 dana. Brzina rasta izražena u mm/danu izračunata je prema formuli:

$$D2 - D1/2 \times (T2 - T1) = \text{brzina rasta}$$

gdje su D1 i D2 vrijednosti izmjerenog promjera kolonije (srednja vrijednost dva mjerenja pod kutom od 90°) prilikom prvog i drugog mjerenja, a T1 i T2 vrijeme kada su vršena mjerenja (2. i 7. dana pri 20°C odnosno 2. i 12. dan pri 33°C) (Brasier 1981, Brasier i Webber 1987). Za svaki izolat opisano mjerenje rasta ponovljeno je tri puta.

2.3. Detekcija, identifikacija i karakterizacija izolata fitoplazmi

2.3.1. Izolacija ukupne DNA

Ukupna DNA izolirana je iz izrezanih žila prikupljenih listova brijesta pomoću tržišnog paketa OmniPrep for Plant (G-Bioscience) u skladu s uputama proizvođača, uz manje prilagodbe. Odvagano je 50 – 70 mg tkiva i usitnjeno pomoću sterilnog, ohlađenog tarionika i tučka uz dodatak tekućeg dušika. Usitnjeno tkivo je prebačeno u mikroeprijetu volumena 2 ml u koju je dodano 500 µl pufera za lizu (Genomic Lysis Buffer) i 5 µl proteinaze K. Smjesa je promućkana rukom i inkubirana 60 minuta na 60°C uz povremeno miješanje. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu dodano je 250 µl kloroforma, snažno promućkano rukom te centrifugirano 15 minuta pri 14000xg na sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo prebačen u novu mikroeprijetu. Dodano je 50 µl otopine za odvajanje komponenti (DNA Stripping Solution), promiješano okretanjem nekoliko puta i zatim inkubirano 10 minuta na 60°C. Nakon toga dodano je 100 µl otopine za precipitaciju (Precipitation Solution) te snažno miješano na vrtložnoj mješalici. Ukoliko se u pojedinom uzorku nije stvorio talog, dodavano je po 50 µl otopine za precipitaciju (Precipitation Solution) sve dok se nakon miješanja talog ne bi pojavio. Nakon pojave bijelog taloga, uzorci su inkubirani na ledu 15 minuta te centrifugirani pri 14000xg 10 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo prebačen u novu mikroeprijetu te je dodano 500 µl izopropanola, promiješano okretanjem nekoliko puta i centrifugirano 5 minuta pri 14000xg na sobnoj temperaturi kako bi se DNA istaložila. Nakon centrifugiranja supernatant je pažljivo dekantiran i bačen, a u mikroeprijetu je dodano 700 µl 70%-tnog etanola kako bi se talog isprao. Uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 14000xg na 4°C. Supernatant je ponovo bačen, a talog ostavljen da se osuši na zraku kako bi etanol ishlapio. Nakon sušenja talog je otopljen u 70 µl sterilne deionizirane vode. Uzorci nukleinskih kiselina čuvani su na 4°C kraće vrijeme, a za dužu pohranu uzorci su čuvani u hladnjaku na -20°C.

2.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Masena koncentracija ukupne DNA određena je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije uzorka na valnoj duljini 260 nm pomoću instrumenta NanoDrop 2000c (Termo Fisher Scientific, SAD). Koncentracija je mjerena u 2 µl pri čemu je sterilna deionizirana voda korištena kao slijepa proba. Vrijednosti koncentracije su izražene u jedinicama ng/µl. Čistoća

uzorka određena je na temelju omjera apsorbancije pri 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Pri valnoj duljini 280 nm najveća je apsorbancija proteina, stoga omjer A_{260}/A_{280} ukazuje na zaostale proteine u uzorku. Čista DNA ima omjer A_{260}/A_{280} koji iznosi 1,8 – 2.

2.3.3. Umnožavanje fitoplazmatskih gena ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom

Obzirom da je udio fitoplazmatske DNA relativno mali u uzorku ukupne DNA izolirane iz zaraženog biljnog tkiva, za umnožavanje analiziranih genskih lokusa primijenjena je metoda ugniježdene lančane reakcije polimerazom (Nested PCR).

Pri tome su korišteni GoTaq Flexi DNA polimeraza i smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) tvrtke Promega (SAD) te početnice koje je sintetizirala tvrtka Invitrogen (Life Technologies, SAD). Nukleotidne sekvence korištenih početnica navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Nukleotidne sekvence početnica korištenih za umnožavanje fitoplazmatskih gena

Genski lokus	Naziv početnice	Nukleotidni sekvenca 5' – 3'
16S rDNA	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT
	P1A	AACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC
	P7A	CCTTCATCGGCTCTTAGTGC
	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG
	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG
<i>rpl22 i rps3</i>	rp(V)F 1	TCGCGGTCATGCAAAAGGCG
	rpR 1	ACGATATTTAGTTCTTTTTGG
	rp(V)F1A	AGGCGATAAAAAAGTTTCAAAA
	rp(V)R1A	GGCATTAACATAATATATTATG
<i>secY</i>	FD9f	GAATTAGAACTGTTGAAGACG
	FD9r	TTTGCTTTCATATCTTGTATCG
	FD9f2	GCTAAAGGTGATTTAAC
	FD9f3	GGTAGTTTTATATGACAAG
	FD9r2	GACTAGTCCCGCCAAAAG
<i>secY-map</i>	FD9f5	CAAAAAATTACTTTTGCGGGAC
	MAPr1	TGCTCAAAATGAGCGCTTAAAC
	FD9f6	GTCGCTTTAGAATCGACACA
	MAPr2	TCGGAAGTAACAGCAGTCCA

Za umnožavanje gena za 16S rRNA korištene su univerzalne početnice pomoću kojih je bilo moguće detektirati različite fitoplazme, dok su za umnožavanje ostalih genskih lokusa korištene početnice specifične za 16SrV skupinu kojoj pripada fitoplazma ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’. U svakoj direktnoj i ugniježđenoj PCR reakciji kao pozitivna kontrola korišteni su standardni sojevi fitoplazmi EY-C (‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’; 16SrV-A); HYDB (‘*Ca. Phytoplasma asteris*’; 16SrI-B) i SA-1 (‘*Ca. Phytoplasma solani*’; 16SrXII-A) uzgajani u kulturi tkiva biljke *Catharantus roseus* te FD70 i FD92 (Flavescence dorée; 16SrV-C i 16SrV-D) koje je ustupila doc.dr.sc. Martina Šeruga Musić (PMF, Zagreb), a kao negativna kontrola korišteno je zdravo biljno tkivo i sterilna destilirana voda.

2.3.3.1. Umnožavanje gena za 16S rRNA

U direktnoj PCR reakciji pomoću para početnica P1/P7 (Deng i Hiruki 1991, Schneider i sur. 1995) umnožen je odsječak veličine oko 1,83 kb koji obuhvaća gen za 16S rRNA, integrensko područje između 16S i 23S rRNA te 3' kraj 23S rRNA. Reakcijska smjesa sadržavala je 1xPCR pufer, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0,2 μM svake početnice, 0,625 U GoTaq polimeraze i 20 ng DNA kalupa u ukupnom volumenu 25 μl. Uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 3.

U ugniježđenoj PCR reakciji kao kalup korišteno je 0,5 μl produkta dobivenog direktnom PCR reakcijom. Za umnožavanje su korištena dva para početnica u dvije odvojene reakcije. Pomoću početnica P1A/P7A (Lee i sur. 2004a) umnožen je odsječak veličine oko 1,8 kb. Reakcijska smjesa je sadržavala 1xPCR pufer, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0,4 μM svake početnice, 1 U GoTaq Polimeraze u ukupnom volumenu 25 μl. Uvjeti reakcije navedeni su u Tablici 3. Pomoću početnica R16F2n/R2 (Lee i sur. 1993, Gundersen i Lee 1996) umnožena je djelomična sekvenca 16S rRNA gena veličine oko 1,2 kb. Reakcijska smjesa sadržavala je 1xPCR pufer, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0,2 μM svake početnice, 0,625 U GoTaq Polimeraze u ukupnom volumenu 25 μl. Uvjeti reakcije navedeni su u Tablici 3.

Ukoliko je za neki uzorak reakcija bila negativna, odnosno nije došlo do umnožavanja fitoplazmatskog gena za 16S rRNA, direktna i ugniježđena PCR reakcija su ponovljene uz jednake uvjete te na način da je u direktnoj PCR umjesto 20 ng kalupa korišteno 10 ng i 50 ng kako bi se rezultat provjerio te potvrdilo da taj uzorak nije zaražen fitoplazmama.

Tablica 3. Uvjeti umnožavanja 16S rDNA lančanom reakcijom polimerazom.

Početnice		Reakcijski koraci	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
P1 i P7	1 ciklus	Početna denaturacija	2	95
	35 ciklusa	Denaturacija	1	95
		Sparivanje početnica i kalupa	1	50
		Produljivanje lanca	2	68
	1 ciklus	Završno produljivanje lanca	10	68
Početnice		Reakcijski koraci	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
P1A i P7A	1 ciklus	Početna denaturacija	2	94
	35 ciklusa	Denaturacija	1	94
		Sparivanje početnica i kalupa	2	55
		Produljivanje lanca	3	72
	1 ciklus	Završno produljivanje lanca	7	72
Početnice		Reakcijski koraci	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
R16F2n i R16R2	1 ciklus	Početna denaturacija	1	94
	35 ciklusa	Denaturacija	1	94
		Sparivanje početnica i kalupa	2	50
		Produljivanje lanca	3	72
	1 ciklus	Završno produljivanje lanca	7	72

2.3.3.2. Umnožavanje gena za ribosomske proteine

Dio operona koji kodira ribosomske proteine umnožen je u direktnoj PCR reakciji pomoću para početnica rp(V)F1/rpR1 (Lim i Sears 1992, Lee i sur. 1998). Pri tome je korišteno 20 – 50 ng DNA kalupa. U ugniježdenoj PCR reakciji korištene su početnice rp(V)F1A i rp(V)R1A (Lee i sur. 2004b) kako bi se umnožio odsječak veličine oko 1,2 kb koji obuhvaća gene *rpl22* i *rps3* koji kodiraju ribosomske proteine L22 i S3. Kao kalup korišteno je 0,5 µl produkta direktne reakcije. Reakcijska smjesa u obje reakcije sadržavala je 1xPCR pufer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,4 µM svake početnice, 1,25 U GoTaq Polimeraze u ukupnom volumenu 25 µl. Također, obje reakcije su se odvijale pri jednakim uvjetima koji su opisani u Tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti umnožavanja gena za ribosomske proteine lančanom reakcijom polimerazom.

Reakcijski koraci		Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
1 ciklus	Početna denaturacija	2	94
38 ciklusa	Denaturacija	1	94
	Sparivanje početnica i kalupa	2	50
	Produljivanje lanca	3	68
1 ciklus	Završno produljivanje lanca	10	68

2.3.3.3. Umnožavanje gena *secY*

Gen *secY* umnožen je parom početnica FD9f/r u direktnoj PCR reakciji (Daire i sur. 1997). Pomoću navedenih početnica umnožen je odsječak dužine oko 1,4 kb. Ovaj odsječak označen kao FD9 genski lokus obuhvaća 3' kraj *rplO* koji kodira ribosomski protein L15 te gen *secY*. Reakcijska smjesa sadržavala je 1xPCR pufer, 3,5 mM MgCl₂, 250 μM dNTP, 0,25 μM svake početnice, 1 U GoTaq Polimeraze u ukupnom volumenu 20 μl. Uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 5. Volumen od 0,5 μl produkta dobivenog u direktnoj reakciji korišten je kao kalup u ugniježdenoj PCR reakciji s dva para početnica FD9f2/r i FD9f3/r2 (Angelini i sur. 2001). Očekivana veličina produkta ugniježdene PCR reakcije je oko 1,2 odnosno 1,1 kb. Reakcijska smjesa u obje reakcije sadržavala je 1xPCR pufer, 2,5 mM MgCl₂, 250 μM dNTP, 0,5 μM svake početnice, 1 U GoTaq Polimeraze u ukupnom volumenu 25 μl. Uvjeti reakcija prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti umnožavanja gena *secY* lančanom reakcijom polimerazom.

Početnice		Reakcijski koraci	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
FD9f i FD9r	1 ciklus	Početna denaturacija	1:30	92
	35 ciklusa	Denaturacija	0:30	92
		Sparivanje početnica i kalupa	0:30	52
		Produljivanje lanca	1:20	72
		1 ciklus	Završno produljivanje lanca	10
Početnice		Reakcijski koraci	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
FD9f2 i FD9r	1 ciklus	Početna denaturacija	1:30	92
	35 ciklusa	Denaturacija	0:30	92
		Sparivanje početnica i kalupa	0:30	47
		Produljivanje lanca	1:15	72
		1 ciklus	Završno produljivanje lanca	10
Početnice		Reakcijski koraci	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
FD9f3 i FD9r2	1 ciklus	Početna denaturacija	1:30	92
	35 ciklusa	Denaturacija	0:30	92
		Sparivanje početnica i kalupa	0:30	48
		Produljivanje lanca	1:15	72
		1 ciklus	Završno produljivanje lanca	10

2.3.3.4. Umnožavanje genskog lokusa *secY-map*

Za umnožavanje genskog lokusa *secY-map* u direktnoj PCR reakciji korištene su početnice FD9f5 i MAPr1 koje umnožavaju 3' kraj gena *secY* i veći dio gena *map* (Arnaud i sur. 2007). Očekivana veličina umnoženog produkta je 875 parova baza. Kao kalup korišteno je 20 ng ukupne DNA. U ugniježdenoj reakciji pomoću početnica FD9f6 i MAPr2 (Arnaud i sur. 2007) umnožen je odsječak dužine oko 803 para baza, a kao kalup korišteno je 0,5 µl produkta direktne PCR reakcije. Reakcijska smjesa za obje sadržavala je 1xPCR pufer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 µM svake početnice, 1 U GoTaq Polimeraze u ukupnom volumenu 25 µl. Uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti umnožavanja genskog lokusa *secY-map* lančanom reakcijom polimerazom.

Reakcijski koraci		Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
1 ciklus	Početna denaturacija	1	92
35 ciklusa	Denaturacija	0:30	92
	Sparivanje početnica i kalupa	0:30	55
	Produljivanje lanca	1:30	66
1 ciklus	Završno produljivanje lanca	10	66

2.3.4. Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu

Produkti direktne i ugniježdene lančane reakcije polimerazom za sve umnožavane genske lokuse fitoplazmi analizirani su horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Agarozni gel je pripremljen otapanjem agaroze u $0,5 \times$ TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3). U jažice je nanošeno 5 μ l PCR produkta pomiješanog s 1 μ l obojenog pufera za nanošenje uzorka (koncentriranog 6x, konačna koncentracija 1x). Kao standard za određivanje duljine odsječaka DNA korišten je GenRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Termo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza se odvijala u kadici Wide Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad, SAD) u $0,5 \times$ TBE puferu pri konstantnom naponu 100V tijekom 1h. Kako bi se PCR produkti nakon elektroforeze mogli vizualizirati, u gel je dodana DNA boja Stain G (Serva Electrophoresis GmbH, Njemačka). Za vizualizaciju PCR produkta korišten je GelVue UV transiluminator (Singene, Synoptic Ltd., Velika Britanija).

2.3.5. Pročišćavanje produkata ugniježdene lančane reakcije polimerazom

Za pročišćavanje produkata ugniježdene lančane reakcije polimerazom umnoženih pomoću početnica P1A/P7A, rp(V)F1A/R1A, FD9f2/r i FD9f6/MAPr2 korišten je GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich, SAD) prema uputama proizvođača. U kolonu (GenElute plasmid mini spin column) je dodano 0,5 ml otopine za pripremu kolone (Column Preparation Solution) koja osigurava bolje vezivanje DNA na silica membranu i zatim centrifugirano 30 sekundi pri 12 000 x g. Jedan volumen PCR produkta pomiješan je s pet volumena otopine za vezivanje (Binding Solution) te je smjesa prenijeta u pripremljenu kolonu. Nakon centrifugiranja tijekom 1 minute pri 14 000 x g eluat je bačen, a DNA koja je ostala vezana na membrani kolone isprana

je dodatkom 0,5 mL otopine za ispiranje (Wash Solution) u koju je prethodno dodan etanol (4 volumena apsolutnog etanola na 1 volumen otopine za ispiranje). Uzorci su centrifugirani 1 minutu, a nakon što je eluat bačen, centrifugiranje je ponovljeno pri 14 000 x g tijekom 2 minute kako bi se otopina za ispiranje u potpunosti uklonila. Nakon toga, kolona je premještena u novu mikroeprevetu te je u kolonu dodano 50 µl otopine za eluiranje (Elution Solution) i inkubirano 1 minutu na sobnoj temperaturi. Pročišćeni PCR produkti eluirani su centrifugiranjem 1 minutu pri 14 000 x g te pohranjeni na -20°C.

2.3.6. Sekvenciranje fitoplazmatskih gena

Pročišćeni PCR produkt volumena 5µl pomiješan je s 5 µl početnice za sekvenciranje koncentracije 5 pmol/µl te sekvenciran u Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska). Za sve uzorke sekvenciranje je bilo dvosmjerno, pomoću najmanje dvije početnice. Gen za 16S rRNA umnožen parom početnica P1A/P7A je sekvenciran početnicama R16F2n i R16R2, a odabrani uzorci (NK20 i KA2) dodatno su sekvencirani početnicama P1A i P7A. Gen *secY* umnožen parom početnica FD9f2/r je sekvenciran početnicama FD9f3 i FD9r2. Za sekvenciranje gena za ribosomalne proteine te gena *map* korištene su iste početnice koje su korištene i za umnožavanje navedenih gena.

Rezultati sekvenciranja dobiveni različitim početnicama sravnjeni su u programu DNADynamo. Na temelju sravnjenih sekvenci određena je konsenzus sekvenca koja predstavlja konačni nukleotidni slijed tog uzorka.

2.3.7. Analiza sekvenci i filogenetska analiza

Dobivene sekvence uspoređene su sa sekvencama pohranjenim u banci gena (GenBank, NCBI) primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Za višestruko sravnjivanje nukleotidnih sekvenci te transliranih sekvenci korišten je program CLASTALW2 implementiran u program MEGA6 (Tamura i sur. 2013). Pri višestrukom sravnjivanju sekvenci korištene su standardne postavke programa CLASTALW2 (gap opening penalty: 15,00; gap extension penalty: 6,66). Po potrebi su sravnjene sekvence dodatno uređene pomoću programa BioEdit (Hall 1999). Postotak identičnosti sekvenci uzimajući u obzir i postojanje delecija i

insercija, izračunavan je u programu BioEdit. Isti program korišten je i za određivanje udjela GC baznih parova te za translaciju dobivenih nukleotidnih sekvenci.

Za filogenetsku analizu primjenom metoda najveće štedljivosti (Maximum Parsimony) i najveće vjerojatnosti (Maximum likelihood) korišten je program MEGA6 (Tamura i sur. 2013). Pri rekonstrukciji filogenetskog stabla primjenom metode najveće štedljivosti korišten je SPR algoritam (Subtree-Pruning-Regrafting), a analiza je obuhvatila sve položaje, uključujući i praznine (gap) (opcija: use all sites). Najprikladniji model nukleotidne supstitucije pri rekonstrukciji stabla primjenom metode najveće vjerojatnosti određen je u programu MEGA6 na osnovu najmanje BIC vrijednosti (Bayesian Information Criterion). Za statističku analizu vjerodostojnosti grupiranja korištena je metoda samoučitavanja (Bootstrap) u 1000 ponavljanja.

Na opisani način filogenetska stabla rekonstruirana su na temelju svakog sekvenciranog gena. Osim sekvenci dobivenih u ovom istraživanju u filogenetsku analizu uključene su i sekvence fitoplazmatskih gena preuzete iz banke gena (GenBank, NCBI) koje su prikazane u Tablici 7. U filogenetskoj analizi gena za 16S rRNA korištene su i sekvence vrsta *Acholeplasma laidlawii* PG-8A (pristupni broj CP000896), *Acholeplasma palmae* J233 (pristupni broj L33734) i *Bacillus subtilis* 168 (pristupni broj AL009126) također preuzete iz banke gena (GenBank, NCBI).

Sekvence korištene za virtualnu RFLP analizu porezane su na dužinu od oko 1,2 kb u programu BioEdit (Hall 1999). Za *in silico* cijepanje pomoću 17 restrikcijskih enzima (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *Hinfl*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI* (*Sau3AI*), *RsaI*, *SspI* i *TaqI*) te vizualizaciju virtualnih RFLP obrazaca korišten je program pDRAW32 1.0 (Aacclone software). Koeficijent sličnosti virtualnih RFLP obrazaca između dvije sekvence (x i y) izračunat je prema formuli:

$$F = 2 \times N_{xy} / (N_x + N_y)$$

gdje su N_x i N_y ukupan broj DNA fragmenata dobiven cijepanje pomoću svih 17 prethodno navedenih restrikcijskih enzima za sekvencu x, odnosno sekvencu y, a N_{xy} je broj fragmenata koji je zajednički analiziranim sekvencama. Granična vrijednost koeficijenta sličnosti za opis nove podskupine fitoplazmi iznosi 0,97 (Wei i sur. 2007, 2008b, Zhao i sur. 2010).

Tablica 7. Nukleotidne sekvence preuzete iz banke gena (GenBank, NCBI). Kosa crta (/) označava da sekvence za pojedini genski lokus nisu poznate ili nisu korištene u ovom istraživanju.

Izolat	16Sr skupina	Porijeklo	Pristupni broj			
			16S rDNA	rpl22 i rps3	secY	secY-map
EY1*	16SrV-A	<i>Ulmus americana</i> NY, SAD	AY197655	AY197675	AY197690	/
EY125*	16SrV-A	<i>Ulmus minor</i> Italija	AY197656	AY197676	/	/
EY626*	16SrV-A	<i>Ulmus minor</i> Italija	AY197657	AY197677	AY197691	/
EY627*	16SrV-A	<i>Ulmus minor</i> Italija	AY197658	AY197678	/	/
EYCZ1	16SrV-A	<i>Ulmus minor</i> Češka	EU194021	EU116428	EU116429	/
EY24_SRB	16SrV-A	<i>Ulmus minor</i> Srbija	HM038460	HM038464	HM038470	HM038480
EY1_SRB	16SrV-A1	<i>Ulmus minor</i> Srbija	HM038455	EU592500	HM038465	HM038471
EY10_SRB	16SrV-A1	<i>Ulmus laevis</i> Srbija	HM038457	EU592501	HM038467	HM038474
EY18_SRB	16SrV-A1	<i>Ulmus laevis</i> Srbija	HM038457	HM038462	HM038468	HM038478
EY20_SRB	16SrV-A1	<i>Ulmus laevis</i> Srbija	HM038459	HM038463	HM038469	HM038479
E04-D438	16SrV-A	<i>Ulmus minor</i> Francuska	/	/	/	AM384900
E04-D714	16SrV-A	<i>Ulmus glabra</i> Francuska	/	/	/	AM384901
JWB	16SrV-B	<i>Ziziphus jujuba</i> Kina	AY197661	AY197681	AY197695	/
PY-In	16SrV-B	<i>Prunus persica</i> Indija	AY197660	AY197680	AY197694	/
CLY-5	16SrV-B	<i>Prunus avium</i> Kina	AY197659	AY197679	AY197693	/
ALY	16SrV-C	<i>Alnus glutinosa</i> Italija	AY197646	AY197666	AY197684	AM384885
ALY882	16SrV-C	<i>Alnus glutinosa</i> Njemačka	AY197642	AY197662	AY197692	/
ALY1068	16SrV-C	<i>Alnus glutinosa</i> Italija	AY197647	AY197667	/	/
AI04-2-4	16SrV-C	<i>Alnus glutinosa</i> Italija	/	/	/	AM384884
HD1	16SrV-C	<i>Apocynum cannabinum</i> SAD	AY197654	AY197674	AY197687	AM3848902
FD70	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Francuska	AY197643	AY197663	AY197686	AM238512
V02-101	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Francuska	/	/	/	AM384887
V03-9-2	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Francuska	/	/	/	AM384888
V04-11-19	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Francuska	/	/	/	AM384889
V04-11-01	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Francuska	/	/	/	AM384890
PGY-A	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Njemačka	/	/	/	AM384892

Tablica 7. Nastavak

Izolat	16Sr skupina	Porijeklo	Pristupni broj			
			16S rDNA	rpl22 i rps3	secY	secY-map
PGY-B	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Njemačka	/	/	/	AM384893
VI04-C28	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Italija	/	/	/	AM384894
VI04-Toscana1	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Italija	/	/	/	AM384895
VI04-188-04	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Italija	/	/	/	AM384896
WJ1444-32	16SrV-C	<i>Alnus glutinosa</i> Francuska	/	/	/	AM384897
SI04-S4	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Italija	/	/	/	AM384899
FD-C	16SrV-C	<i>Vitis vinifera</i> Italija	AY197645	AY197665	AY197688	/
SpaWB229	16SrV-C	<i>Spartium junceum</i> Italija	AY197652	AY197672	AY197680	/
SpaWB251	16SrV-C	<i>Spartium junceum</i> Italija	AY197653	AY197673	/	/
VC-F1	16SrV-C	<i>Parthenocissus quinquefolia</i> SAD	AF305198	/	/	/
FD-D	16SrV-D	<i>Vitis vinifera</i> Italija	AY197644	AY197664	AY197685	/
V00-SP5	16SrV-D	<i>Vitis vinifera</i> Francuska	/	/	/	AM384886
RuSR19	16SrV-E	<i>Rubus caesius</i> Njemačka	AY197651	AY197671	/	/
RuS400	16SrV-E	<i>Rubus fruticosus</i> Italija	AY197649	AY197669	/	/
RuS971	16SrV-E	<i>Rubus idaeus</i> Švicarska	AY197650	AY197670	/	/
RUS	16SrV-E	<i>Rubus fruticosus</i> Italija	AY197648	AY197668	AY197696	AM384898
AY-WB	16SrI-A	<i>Lactuca sativa</i> SAD	NC_007716	/	NC_007716	/
BB	16SrI-A	<i>Lycopersicon esculentum</i> SAD	AF222064	/	/	/
OnionD2	16SrI-A	<i>Allium cepa</i> SAD	AY180931	/	/	/
OY-M	16SrI-B	<i>Chrysanthemum coronarum</i>	NC_005303	/	/	/
OAY	16SrI-B	<i>Oenothera hookeri</i> SAD	M30790	/	/	/
ELM-ZHY	16SrI-B	<i>Ulmus parvifolia</i> Kina	GU356333	/	/	/
ELM-TA	16SrI-B	<i>Ulmus parvifolia</i> Kina	GU356532	/	/	/
CPh	16SrI-C	<i>Trifolium sativum</i> Kanada	AF222065	/	/	/
KVE	16SrI-C	<i>Trifolium repens</i> Njemačka	AY265217	/	/	/
PaWB	16SrI-D	<i>Paulownia spp.</i> Tajvan	AY265206	/	/	/
BBS1	16SrI-E	<i>Vaccinium spp.</i> SAD	AY525220	/	/	/
BBS3	16SrI-E	<i>Vaccinium spp.</i> SAD	AY265213	/	/	/
ACLR-AY	16SrI-F	<i>Prunus aremeniaca</i> Njemačka	AY265211	/	/	/

Tablica 7. Nastavak

Izolat	16Sr skupina	Porijeklo	Pristupni broj			
			16S rDNA	rpl22 i rps3	secY	secY-map
CVB	16SrI-F	<i>Cicadellidae</i> Njemačka	AY265212	/	/	/
STRAWB2	16SrI-K	<i>Fragaria x ananassa</i> SAD	U96616	/	/	/
98UW166B	16SrI-O	<i>Glycine max</i> SAD	AF268405	/	/	/
Populus nigra	16SrI-P	<i>Populus nigra</i> Hrvatska	AF503568	/	/	/
CherLL	16SrI-Q	<i>Prunus cerasus</i> Litva	AY034089	/	/	/
COAH10	16SrI-S	<i>Solanum tuberosum</i> Meksiko	FJ914654	/	/	/
COAH19	16SrI-T	<i>Solanum tuberosum</i> Meksiko	FJ914639	/	/	/
JAL6	16SrI-U	<i>Solanum tuberosum</i> Meksiko	FJ914650	/	/	/
SON18	16SrI-V	<i>Solanum tuberosum</i> Meksiko	FJ914642	/	/	/
PRU0382	16SrI-W	<i>Prunus persica</i> Kanada	HQ450211	/	/	/
STOL11	16SrXII-A	<i>Capsicum annum</i> Srbija	AF248959	/	/	/
Rus-PPT97	16SrXII-A	<i>Solanum tuberosum</i> Rusija	EU344886	/	/	/
BN-Fc3	16SrXII-A	<i>Vitis vinifera</i> Italija	EU836647	/	/	/
BN-Op224	16SrXII-A	<i>Vitis vinifera</i> Italija	EU836658	/	/	/
BN-Op123	16SrXII-A	<i>Vitis vinifera</i> Italija	EU836657	/	/	/
BN-Ma198	16SrXII-A	<i>Vitis vinifera</i> Italija	FJ409898	/	/	/
BN-Ma193	16SrXII-A	<i>Convolvulus arvensis</i> Italija	FJ409897	/	/	/
134 04	16SrXII-A	<i>Vitis vinifera</i> Italija-Francuska	EU014780	/	/	/
2005/02	16SrXII-A	<i>Zea mays</i> Srbija	DQ222972	/	/	/
VK	16SrXII-A	<i>Vitis vinifera</i> Njemačka	X76428	/	/	/
3-21-36	16SrXII-A	<i>Trifolium repens</i> Češka	EU814645	/	/	/
G66	16SrXII-A	<i>Pisum sativum</i> Poljska	JN887313	/	/	/
P1/P7-Conv2/2010-Bg	16SrXII-A	<i>Convolvulus arvensis</i> Bugarska	JN561702	/	/	/
125/10	16SrXII-A	<i>Vitis vinifera</i> Srbija	JQ730745	/	/	/
5043	16SrXII-A	<i>Solanum lycopersicum</i> Grčka	JX311953	/	/	/

Tablica 7. Nastavak

Izolat	16Sr skupina	Porijeklo	Pristupni broj			
			16S rDNA	<i>rpl22</i> i <i>rps3</i>	<i>secY</i>	<i>secY-map</i>
'Ca. P. australiense' AUSGY	16SrXII-B	<i>Vitis vinifera</i> Australija	L76865	/	/	/
'Ca. P. australiense' SLY	16SrXII-B	<i>Fragaria x ananassa</i> Australija	AJ243045	/	/	/
'Ca. P. japonicum' JPH	16SrXII-D	<i>Hydrangea spp.</i> Japan	AB010425	/	/	/
'Ca. P. fragariae' StrawY	16SrXII-E	<i>Fragaria x ananassa</i> Litva	DQ086423	/	/	/
'Ca. P. trifolii' PWB	16SrVI-A	<i>Solanum tuberosum</i> Kanada	AY197682	/	/	GU004316
'Ca. P. fraxini' AshY1	16SrVII-A	<i>Fraxinus americana</i> SAD	AF092209	/	/	/
'Ca. P. mali' AT	16SrX-A	<i>Malus sp.</i> Njemačka	NC_011047	/	/	/

* izolati fitoplazme 'Ca. Phytoplasma ulmi' analizirani pri opisu vrste (Lee i sur. 2004b)

2.3.8. Statistička analiza

Za testiranje statističke značajnosti opaženih razlika u učestalosti zaraze pojedine vrste brijesta istraživanim patogenima korišteni su Fisherov egzaktni test i χ^2 test, dok je za statističku analizu intenziteta simptoma korišten Kruskal-Wallis test. Fisherov egzaktni test te Kruskal-Wallis test i *post hoc* test provedeni su u programu STATISTICA 12 (Statsoft, Inc, Tulsa, SAD) uz razinu značajnosti 1%, dok je za χ^2 test korišten program STATISTICA 12 i aplikacija In-Silico Statistical Tools (Joosse i Hannemann, In-Silico Statistical Tools, [14.06.2014.]).

3. Rezultati

3.1. Fitoplazmoze brijesta u Hrvatskoj

Zaraza fitoplazmama dokazana je umnožavanjem gena za 16S rRNA u 64 od ukupno 139 analiziranih uzoraka listova triju vrsta brijesta, nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.). Od toga je u 36 uzoraka bilo moguće detektirati fitoplazme već u direktnoj PCR reakciji početnicama P1/P7. U ostalih 28 uzoraka je prisutnost fitoplazmi dokazana tek ugniježđenom PCR reakcijom pomoću parova početnica R16F2n/R2 i P1A/P7A (Tablica 8). Analizom sekvenciranih odsječaka gena za 16S rRNA te usporedbom dobivenih sekvenci sa sekvencama pohranjenim u banci gena (GenBank, NCBI), što je detaljno opisano u narednim poglavljima, utvrđeno je da detektirane fitoplazme pripadaju trima vrstama, '*Candidatus* Phytoplasma ulmi', '*Ca. Phytoplasma asteris*' i '*Ca. Phytoplasma solani*'. Većina detektiranih fitoplazmi, 62 od 64, pripadala je vrsti '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Fitoplazma '*Ca. Phytoplasma asteris*' je detektirana u jednom uzorku nizinskog brijesta prikupljenom na lokalitetu Nova Kapela, dok je u jedinom zaraženom stablu gorskog brijesta detektirana fitoplazma '*Ca. Phytoplasma solani*' (Tablica 8).

Fitoplazma '*Ca. Phytoplasma ulmi*' zaražavala je brijest vez i nizinski brijest, ali je broj zaraženih stabala brijesta veza bio značajno veći. Od ukupno 79 analiziranih uzoraka brijesta veza, 59 je bilo zaraženo. Na lokalitetu Đurđevačka Bilogora zaraza je dokazana u svim analiziranim stablima ove vrste brijesta, dok je na ostalim lokalitetima najmanje polovina analiziranih stabala brijesta veza bila zaražena ovom fitoplazmom. Nasuprot tome, od 37 analiziranih stabala nizinskog brijesta, samo 3 su bila zaražena fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (2 s lokaliteta Đurđevačka Bilogora te 1 s lokaliteta Jastrebarsko). Fisherov egzaktni test pokazao je statističku značajnost opaženih razlika u učestalosti zaraze fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' ovisno o vrsti brijesta (Tablica 9).

Tablica 8. Rezultati detekcije i klasifikacije fitoplazmi umnožavanjem gena za 16S rRNA pomoću para početnica P1/P7 u direktnoj lančanoj reakciji polimerazom i parova početnica R16F2n/R2 i P1A/P7A u ugniježdenoj lančanoj reakciji polimerazom. Svi uzorci u kojima je zaraza fitoplazmama utvrđena u direktnoj lančanoj reakciji polimerazom, bili su ponovno potvrđeni u ugniježdenoj lančanoj reakciji polimerazom.

Lokalitet	Vrsta brijesta	Broj analiziranih stabala	Umnožavanje gena za 16S rRNA		'Ca. Phytoplasma' vrsta
			Direktni PCR	Ugniježđeni PCR	
Nova Kapela	<i>U. laevis</i>	10	3	5	'Ca. Phytoplasma ulmi'
	<i>U. minor</i>	13	0	1	'Ca. Phytoplasma asteris'
Donji Miholjac	<i>U. laevis</i>	18	6	14	'Ca. Phytoplasma ulmi'
	<i>U. minor</i>	2	0	0	/
Đurdevačka Bilogora	<i>U. laevis</i>	15	15	15	'Ca. Phytoplasma ulmi'
	<i>U. minor</i>	10	0	2	'Ca. Phytoplasma ulmi'
Kalnik	<i>U. glabra</i>	23	0	1	'Ca. Phytoplasma solani'
Jastrebarsko	<i>U. laevis</i>	16	10	13	'Ca. Phytoplasma ulmi'
	<i>U. minor</i>	9	0	1	'Ca. Phytoplasma ulmi'
Cetina	<i>U. laevis</i>	20	2	12	'Ca. Phytoplasma ulmi'
	<i>U. minor</i>	3	0	0	/
Ukupno	<i>U. laevis</i>	79	36	59	'Ca. Phytoplasma ulmi'
	<i>U. minor</i>	37	0	4	'Ca. Phytoplasma ulmi' i 'Ca. Phytoplasma asteris'
	<i>U. glabra</i>	23	0	1	'Ca. Phytoplasma solani'
		139	36	64	

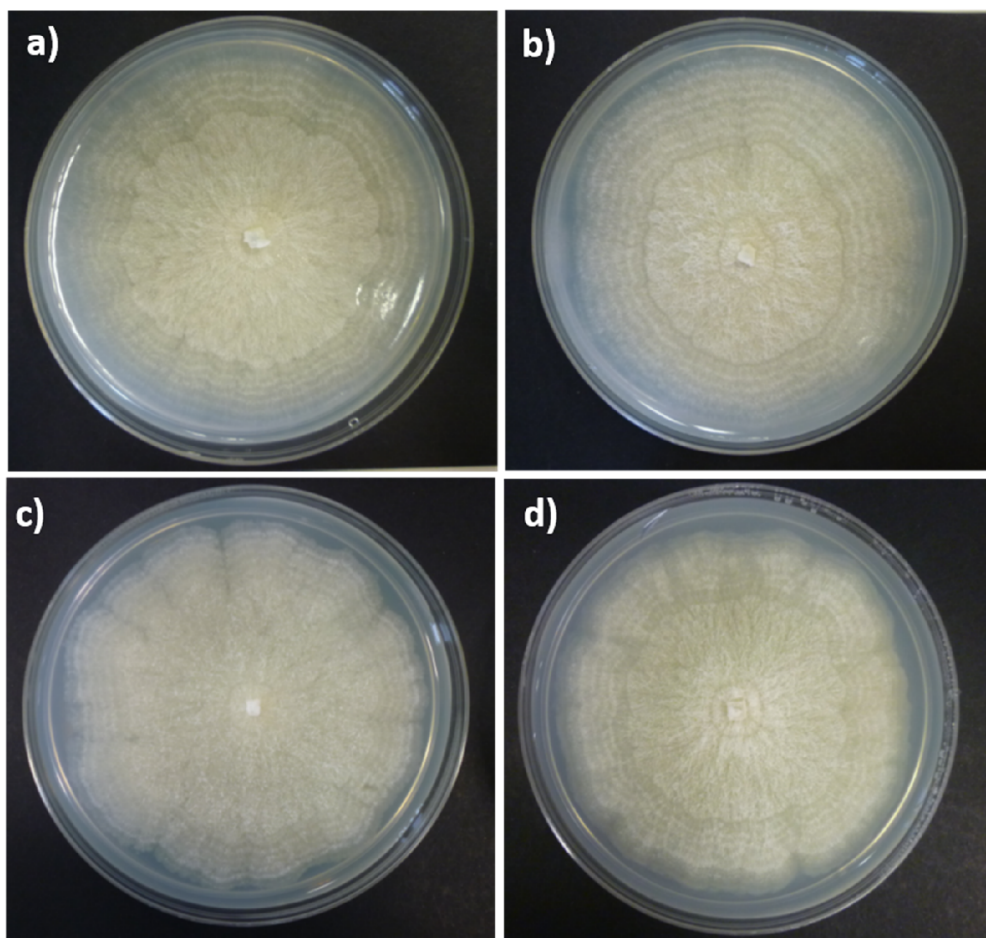
Tablica 9. Prikaz kontingencijske tablice korištene za Fisherov egzakti test kako bi se testirala statistička značajnost postojanja razlike u učestalosti zaraze različitih vrsta brijesta fitoplazmom 'Candidatus Phytoplasma ulmi'.

	<i>U. laevis</i>	<i>U. minor</i>	Ukupno
Broj stabala zaraženih 'Ca. Phytoplasma ulmi'	59	3	62
Broj nezaraženih stabala	20	34	54
Ukupno	79	37	116
Fisherov egzakti test	p < 0,001		

3.2. Uzročnik holandske bolesti brijesta u Hrvatskoj

Holandska bolest brijesta dokazana je izolacijom uzročnika na krutoj MEA podlozi u 55 od 139 analiziranih uzoraka grančica triju vrsta brijesta, nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.). Rezultati testiranja rasta pri 20°C i 33°C ukazali su da je zarazu uzrokovala vrsta *Ophiostoma novo-ulmi* (Tablica 10). Rast većine izolata pri 20°C nalazio se u rasponu od 3,1 – 4,8 mm/danu, dok je rast pri 33°C bio u rasponu od 0 – 0,5 mm/danu. Iznimka su jedan izolat s lokaliteta Kalnik te tri izolata s lokaliteta Jastrebarsko čiji je rast pri 20°C bio manji od 3,1 mm/danu, no njihov rast pri 33°C nalazio se u rasponu vrijednosti koja odgovara vrsti *O. novo-ulmi*. Također, dva izolata s lokaliteta Nova Kapela pokazivali su veći rast od 0,5 mm/danu, no rast pri 20°C odgovarao je vrsti *O. novo-ulmi*. Na isti zaključak upućuje i analiza morfologije. Svi izolati razvijali su zračni micelij s dobro uočljivim dnevnim zonama rasta pri uzgoju na dnevnom svjetlu i temperaturi od približno 20°C, što odgovara vrsti *O. novo-ulmi* (Slika 8).

Na lokalitetu Donji Miholjac nije utvrđena prisutnost holandske bolesti brijesta, dok je na ostalim analiziranim lokalitetima bolest bila prisutna, iako je na lokalitetu Cetina samo jedno stablo brijesta veza bilo zaraženo. Zaraza fitopatogenom gljivom *O. novo-ulmi* dokazana je u svih analiziranih vrsta brijesta, no učestalosti zaraze razlikovala se ovisno o vrsti brijesta, što je pokazao χ^2 test. Učestalost zaraze brijesta veza bila je manja u odnosu na nizinski brijest kao i u odnosu na gorski brijest, dok se učestalost zaraze nizinskog i gorskog brijesta nije statistički značajno razlikovala (Tablica 11).



Slika 8. Morfologija odabranih izolata gljive *Ophiostoma novo-ulmi* s lokaliteta Nova Kapela (a), Đurđevačka Bilogora (b), Kalnik (c) i Jastrebarsko (d) nakon rasta u mraku 7 dana i zatim na dnevnom svjetlu 10 dana pri temperaturi 20°C na krutoj MEA podlozi u Petrijevim zdjelicama promjera 90 mm.

Tablica 10. Rezultati izolacije i klasifikacije uzročnika holandske bolesti brijesta na temelju mjerenja rasta pri 20°C i 33°C. Vrijednosti rasta prikazane su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, a raspon od najmanje do najveće izmjerene vrijednosti prikazan je u zagradi. Na lokalitetu Cetina se prikazana vrijednost brzine rasta pri 20°C i 33°C odnosi samo na jedan izolat pronađen na tom lokalitetu.

Lokalitet	Vrsta brijesta	Broj analiziranih stabala	Broj izolata	Brzina rasta (mm/dan)		Uzročnik zaraze
				20°C	33°C	
Nova Kapela	<i>U. laevis</i>	10	4	3,59 ± 0,37 (3,23 - 4,00)	0,20 ± 0,13 (0,12 - 0,41)	<i>O. novo-ulmi</i>
	<i>U. minor</i>	13	10	3,75 ± 0,35 (3,33 - 4,23)	0,32 ± 0,28 (0,08 - 0,88)	<i>O. novo-ulmi</i>
Donji Miholjac	<i>U. laevis</i>	18	0	/	/	/
	<i>U. minor</i>	2	0	/	/	/
Đurdevačka Bilogora	<i>U. laevis</i>	15	3	3,59 ± 0,31 (3,38 - 3,83)	0,19 ± 0,08 (0,12 - 0,25)	<i>O. novo-ulmi</i>
	<i>U. minor</i>	10	8	3,67 ± 0,20 (3,38 - 3,83)	0,18 ± 0,11 (0,12 - 0,25)	<i>O. novo-ulmi</i>
Kalnik	<i>U. glabra</i>	23	15	3,63 ± 0,40 (3,03 - 4,37)	0,15 ± 0,07 (0,00 - 0,25)	<i>O. novo-ulmi</i>
Jastrebarsko	<i>U. laevis</i>	16	5	3,58 ± 0,51 (3,02 - 4,42)	0,18 ± 0,11 (0,07 - 0,29)	<i>O. novo-ulmi</i>
	<i>U. minor</i>	9	9	3,58 ± 0,51 (2,77 - 3,95)	0,18 ± 0,09 (0,00 - 0,29)	<i>O. novo-ulmi</i>
Cetina	<i>U. laevis</i>	20	1	3,67	0,10	<i>O. novo-ulmi</i>
	<i>U. minor</i>	3	0	/	/	/
Ukupno	<i>U. laevis</i>	79	13	3,55 ± 0,42	0,18 ± 0,10	<i>O. novo-ulmi</i>
	<i>U. minor</i>	37	27	3,56 ± 0,39	0,23 ± 0,20	<i>O. novo-ulmi</i>
	<i>U. glabra</i>	23	15	3,69 ± 0,40	0,15 ± 0,07	<i>O. novo-ulmi</i>
		139	55			

Tablica 11. Prikaz 2x3 kontingencijskih tablica korištenih za χ^2 test kako bi se testirala statistička značajnost postojanja razlike u učestalosti zaraze različitih vrsta brijesta fitopatogenom gljivom *Ophiostoma novo-ulmi*.

	<i>U. laevis</i>	<i>U. minor</i>	<i>U. glabra</i>	Ukupno
Broj stabala zaraženih gljivom <i>O. novo-ulmi</i>	13	27	15	55
Broj nezaraženih stabala	66	10	8	84
Ukupno	79	37	23	139
χ^2 test	$\chi^2 = 41,24; p < 0,001$			

	<i>U. laevis</i>	<i>U. minor</i>	Ukupno
Broj stabala zaraženih gljivom <i>O. novo-ulmi</i>	13	27	40
Broj nezaraženih stabala	66	10	76
Ukupno	79	37	116
χ^2 test	$\chi^2 = 35,63; p < 0,001$		

	<i>U. laevis</i>	<i>U. glabra</i>	Ukupno
Broj stabala zaraženih gljivom <i>O. novo-ulmi</i>	13	15	28
Broj nezaraženih stabala	66	8	74
Ukupno	79	23	102
χ^2 test	$\chi^2 = 21,27; p < 0,001$		

	<i>U. minor</i>	<i>U. glabra</i>	Ukupno
Broj stabala zaraženih gljivom <i>O. novo-ulmi</i>	27	15	42
Broj nezaraženih stabala	10	8	18
Ukupno	37	23	60
χ^2 test	$\chi^2 = 0,41; p = 0,5239$		

3.3. Utjecaj fitoplazmi i gljive *Ophiostoma novo-ulmi* na brijest u Hrvatskoj i učestalost miješane zaraze

Udio simptomatičnih stabala u ukupnom uzorku iznosio je 86,49% za nizinski brijest, 82,61% za gorski te 46,84% za brijest vez, što ukazuje na loše zdravstveno stanje brijesta u Hrvatskoj. Sva stabla zaražena gljivom *O. novo-ulmi* pokazivala su simptome žućenja, sušenja i opadanja listova. Također, u ovih stabala postojali su i unutarnjih simptomi, odnosno tamno obojenje ksilema vidljivo na poprečnom prerezu grančice (Slika 5). Stabla u kojih zaraza gljivom *O. novo-ulmi* nije dokazana imala su normalnu pigmentaciju ksilema. Žućenje i opadanje listova utvrđeno je i u 21 stabla brijesta veza zaraženog fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' te u 2 stabla nizinskog brijesta, od kojih je jedno bilo zaraženo vrstom '*Ca. Phytoplasma ulmi*', a drugo vrstom '*Ca. Phytoplasma asteris*'. Iako se razvoj vještičjih metli smatra karakterističnim simptomom fitoplazmoze nizinskog brijesta (Braun i Sinclair 1979, Macrone i sur. 1997), pojava vještičjih metli nije utvrđena u ovom istraživanju. Osim za simptomatična stabla, zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' dokazana je i za 32 stabla brijesta veza koja nisu pokazivala vidljive simptome u trenutku uzorkovanja.

Pojava miješane zaraze, odnosno istovremene zaraze i fitoplazmama i gljivom *O. novo-ulmi*, utvrđena je na lokalitetima Đurđevačka Bilogora, Jastrebarsko i Kalnik u ukupno 9 uzoraka. Uz gljivu *O. novo-ulmi*, miješanu zarazu 6 stabala brijesta veza te 2 stabala nizinskog brijesta uzrokovala je fitoplazma '*Ca. Phytoplasma ulmi*', dok je u gorskog brijesta utvrđena vrsta '*Ca. Phytoplasma solani*'. Sva stabla u kojih je postojala miješana zaraza pokazivala su simptome na listovima kao i obojenost ksilema. Detaljan prikaz broja simptomatičnih stabala, stabala zaraženih fitoplazmama, stabala zaraženih gljivom *O. novo-ulmi* te stabala s miješanom zarazom nalazi se u Tablici 12.

Intenzitet simptoma uzorkovanih stabala brijesta prikazan je u Tablici 6. Obzirom na mali broj stabala nizinskog brijesta u kojih je utvrđena zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' te miješana zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' i gljivom *O. novo-ulmi*, ovi podaci nisu uključeni u statističku analizu simptoma. Osim toga, niti jedno stablo gorskog brijesta nije bilo zaraženo fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' niti je postojala miješana zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' i gljivom *O. novo-ulmi* u ove vrste brijesta. Statistička analiza intenziteta simptomatičnosti ovisno o vrsti patogena koji je uzrokovao zarazu i vrsti brijesta za one kombinacije za koje je postojao dovoljan broj podataka, pokazala je da *O. novo-ulmi* uzrokuje jednak intenzitet simptoma u svih vrsta brijesta, dok fitoplazma '*Ca. Phytoplasma*

ulmi' u brijesta veza nije uzrokovala statistički značajnu simptomatičnost u odnosu na nezaražena stabla. Nadalje, miješana zaraza brijesta veza uzrokovala je jednak intenzitet simptoma kao i zaraza uzrokovana samo gljivom *O. novo-ulmi* (Slika 9).

Tablica 12. Prikaz broja i udjela (%) simptomatičnih stabala nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.), broja stabala zaraženih fitoplazmama, broja stabala zaraženih gljivom *Ophiostoma novo-ulmi* te broja stabala u kojih je detektirana miješana zaraza. Navedeni broj stabala zaraženih fitoplazmama i stabala zaraženih gljivom *Ophiostoma novo-ulmi* ne obuhvaća stabla s miješanom zarazom. Podaci za broj stabala zaraženih fitoplazmama odnose se na vrstu 'Ca. Phytoplasma ulmi', ukoliko nije drugačije naznačeno. Za stabla zaražena fitoplazmama naveden je broj zaraženih stabala koja su bila simptomatična (S) i broj zaraženih stabala u kojih nisu postojali vidljivi simptomi na listovima (As). Sva stabla zaražena gljivom *O. novo-ulmi* bila su simptomatična, kao i sva stabla s miješanom zarazom.

Lokalitet	Vrsta brijesta	Omjer simptomatičnih i uzorkovanih stabala (%)	Broj stabala zaraženih fitoplazmama		Broj stabala zaraženih gljivom <i>O. novo-ulmi</i>	Broj stabala s miješanom zarazom
			S	As		
Nova Kapela	<i>U. laevis</i>	8/10 (80%)	4	1	4	0
	<i>U. minor</i>	13/13 (100%)	1*	0	10	0
Donji Miholjac	<i>U. laevis</i>	6/18 (33,33%)	6	8	0	0
	<i>U. minor</i>	0/2	0	0	0	0
Đurdevačka Bilogora	<i>U. laevis</i>	8/15 (53,33%)	5	7	0	3
	<i>U. minor</i>	10/10 (100%)	1	0	7	1
Kalnik	<i>U. glabra</i>	19/23 (82,61%)	0	0	14	1**
Jastrebarsko	<i>U. laevis</i>	11/16 (68,75%)	5	5	2	3
	<i>U. minor</i>	9/9 (100%)	0	0	8	1
Cetina	<i>U. laevis</i>	4/20 (20%)	1	11	1	0
	<i>U. minor</i>	0/3	0	0	0	0
Ukupno	<i>U. laevis</i>	37/79 (46,84%)	21	32	7	6
	<i>U. minor</i>	32/37 (86,49%)	2***	0	25	2
	<i>U. glabra</i>	19/23 (82,61%)	0	0	14	1**

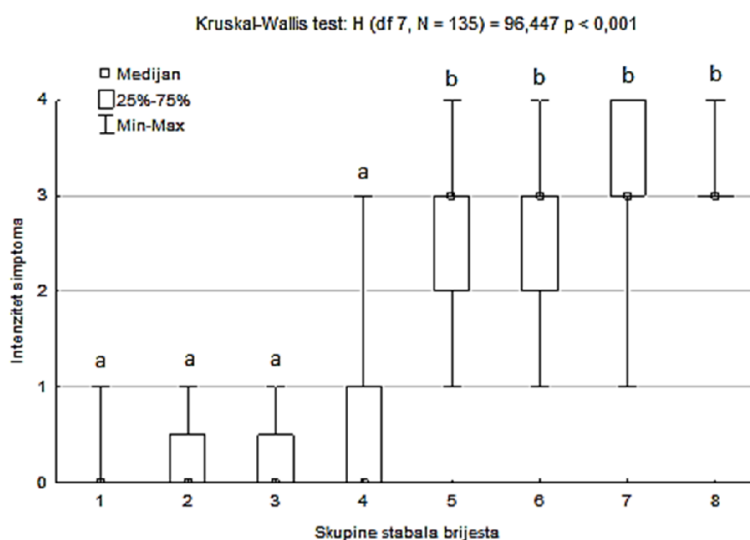
* zaraza fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma asteris'

** zaraza fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma solani'

*** jedno stablo zaraženo fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma ulmi', a drugo fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma asteris'

Tablica 13. Zabilježeni intenzitet simptoma nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.) ovisno o zarazi fitoplazmom ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ i gljivom *Ophiostoma novo-ulmi*. Intenzitet simptoma izražen je kao medijan i raspon od najmanjeg do najvećeg intenziteta simptoma, osim za nizinski brijest zaražen fitoplazmom ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ za koji je prikazan intenzitet simptoma jednog stabla koje se nalazilo u toj skupini, te za miješanu zarazu nizinskog brijesta gdje je prikazan intenzitet simptoma dvaju stabala iz te skupine.

		Nezaražena stabla	Stabla zaražena fitoplazmom ‘ <i>Ca. P. ulmi</i> ’	Stabla zaražena gljivom <i>O. novo-ulmi</i>	Miješana zaraza
<i>U. laevis</i>	Broj stabala	13	53	7	6
	Intenzitet simptoma	0 (0-1)	0 (0-3)	3 (1-4)	3 (3-4)
<i>U. minor</i>	Broj stabala	8	1	25	2
	Intenzitet simptoma	0 (0-1)	5	3 (1-4)	3 i 4
<i>U. glabra</i>	Broj stabala	8	0	15	0
	Intenzitet simptoma	0 (0-1)	/	3 (1-4)	/



Slika 9. Rezultati statističke analize intenziteta simptoma primjenom Kruskal-Wallis i *post hoc* testa. U analizu su uključene slijedeće skupine: nezaražena stabla brijesta veza (1), nezaražena stabla nizinskog brijesta (2), nezaražena stabla gorskog brijesta (3), stabla brijesta veza zaražena fitoplazmom ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ (4), stabla brijesta veza zaražena gljivom *Ophiostoma novo-ulmi* (5), stabla nizinskog brijesta zaražena gljivom *Ophiostoma novo-ulmi* (6), stabla gorskog brijesta zaražena gljivom *Ophiostoma novo-ulmi* (7), miješana zaraza brijesta veza (8).

3.4. Fitoplazma ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ u Hrvatskoj

3.4.1. Varijabilnost sekvenciranih genskih lokusa

3.4.1.1. Varijabilnost gena za 16S rRNA

Djelomična sekvenca gena za 16S rRNA umnožena je parom početnicama P1A i P7A te dvosmjerno sekvencirana pomoću početnica R16F2n i R16R2. Analizom dobivenih kromatograma određeni su nukleotidni sljedovi dužine 1187 parova baza koji predstavljaju odsječak gena za 16S rRNA fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ od položaja 170 do položaja 1356 u odnosu na referentni izolat EY1. Detaljnom analizom sekvenciranog odsječka određena su dva 16S rRNA genotipa ove vrste fitoplazmi, označena kao 16S-1 i 16S-2, koja su se međusobno razlikovala samo u jednom nukleotidu (supstitucija C u T na položaju 405). Sekvenca genotipa 16S-1 bila je u potpunosti identična 16S rDNA sekvenci fitoplazmi koje zaražavaju brijest na području Srbije (izolati EY1_SRB, EY10_SRB, EY18_SRB i EY20_SRB), dok je u odnosu na referentni izolat EY1 utvrđeno 99,8% identičnosti. Sekvenca genotipa 16S-2 nije bila u potpunosti identična niti jednoj sekvenci pohranjenoj u banci gena (GenBank, NCBI), a postotak identičnosti u odnosu na 16S rDNA izolata EY1 iznosio je 99,7%. Ukupno su postojala tri varijabilna mjesta u genotipova 16S-1 i 16S-2 u odnosu na EY1. Jedno varijabilno mjesto (položaj 1100 u odnosu na sekvencu referentnog izolata EY1 gdje je došlo do supstitucije T u C) nalazilo se unutar jedinstvene oligonukleotidne sekvence vrste ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ prikazane u Tablici 1. (Lee i sur. 2004b). Navedena promjena unutar jedinstvene oligonukleotidne sekvence postojala je i u genotipa 16S-1 i u genotipa 16S-2, kao i u izolata ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ porijeklom iz Srbije (izolati EY1_SRB, EY10_SRB, EY18_SRB i EY20_SRB) i Češke (izolat EYCZ1). Ova promjena uzrokuje pojavu dodatnog restrikcijskog mjesta za enzim *Bfa*I što je karakteristično za podskupinu 16SrV-A1 koja predstavlja restrikcijski podprofil 16SrV-A podskupine. Promjene u nukleotidnoj sekvenci gena za 16S rRNA prikazane su u Tablici 14., a postotci identičnosti sekvenci nalaze se u Tablici 15. Radi pojednostavljenja prikaza identične sekvence izolata iz Srbije predstavljene su izolatom EY20_SRB. Sukladno sličnosti u nukleotidnom slijedu, analizirane sekvence genotipova 16S-1 i 16S-2, kao i sekvenca referentnog izolata EY1, imale su sličan sadržaj G i C baznih parova koji je iznosio 45,58% za genotip 16S-1, 45,49% za genotip 16S-2 te 45,41% za EY1.

Tablica 14. Nukleotidne promjene sekvenciranog odsječka gena za 16S rRNA izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7. Položaj promjena određen je u odnosu na sekvencu referentnog izolata EY1. Točkice označavaju identične nukleotide. Crveno označena promjena nalazi se unutar jedinstvene oligonukleotidne sekvence fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ navedene u Tablici 1.

Nukleotidne promjene 16S rDNA				
Oznaka	170	405	468	1100
EY1	C	C	A	T
EY626	.	.	C	.
EY24 SRB	.	.	C	.
EY20 SRB	.	.	C	C
EYCZ1	T	.	C	C
16S-1	.	.	C	C
16S-2	.	T	C	C

Tablica 15. Postotak identičnosti nukleotidnih sekvenci gena za 16S rRNA izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7.

Oznaka	EY1	EY626	EY24_SRB	EY20_SRB	EYCZ1	16S-1	16S-2
EY1	100						
EY626	99,9	100					
EY24_SRB	99,9	100	100				
EY20_SRB	99,8	99,9	99,9	100			
EYCZ1	99,4	99,4	99,4	99,5	100		
16S-1	99,8	99,9	99,9	100	99,5	100	
16S-2	99,7	99,8	99,8	99,9	99,4	99,9	100

3.4.1.2. Varijabilnost gena za ribosomske proteine

Produkt ugniježdene PCR reakcije umnožen početnicama rp(V)F1 i rpR1 je sekvenciran pomoću istih početnica koje su korištene za umnožavanje te je određena nukleotidna sekvenca dijela operona ribosomskih proteina dužine 1069 parova baza koja uključuje djelomičnu sekvencu gena *rpl22* i cijelu sekvencu gena *rps3*. Analizom dobivenih sekvenci određeno je 5 različitih genotipova, označenih kao rp-1 do rp-5. Detektirani genotipovi međusobno su se razlikovali u jednom do tri nukleotida te je postotak identičnosti sekvence bio u rasponu od 99,7% do 99,9%. Sekvenca genotipa rp-1 bila je najslbližija sekvenci EY1 (postotak identičnosti sekvence iznosio je 99,4%) te identična sekvenci gena za ribosomske proteine izolata ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ s područja Srbije (izolati EY1_SRB, EY10_SRB, EY18_SRB i EY20_SRB). U usporedbi sa sekvencom referentnog izolata EY1, ukupno je postojalo 10 varijabilnih mjesta u genotipova ribosomskih proteina pronađenih u ovom istraživanju. Tri varijabilna mjesta nalazila su se u području gena *rpl22*, a preostalih 7 u području gena *rps3*. Četiri varijabilna mjesta, jedno u području gena *rpl22* i tri u području gena *rps3*, nalazila su se unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci gena za ribosomske proteine fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ prikazanih u Tablici 1 (Lee i sur. 2004b). Sve promjene nukleotidne sekvence gena za ribosomske proteine *rpl22* i *rps3* prikazane su u Tablici 16., a postotci identičnosti sekvenci prikazani su u Tablici 17. Radi pojednostavljenja prikaza identične sekvence izolata iz Srbije predstavljene su izolatom EY20_SRB. Sadržaj G i C baznih parova sekvenci detektiranih genotipova ribosomskih proteina iznosio je od 25,35% do 25,63%, a sličan sadržaj, 25,16%, utvrđen je i za sekvencu referentnog izolata EY1.

Usporedbom transliranih sekvenci dijela operona za ribosomske proteine utvrđeno je da većina nukleotidnih promjena ne uzrokuje promjenu aminokiseline (sinonimne promjene). U području gena *rpl22* samo je jedna promjena u genotipa rp-5 bila nesinonimna, dok su u području gena *rps3* postojale dvije nesinonimne promjene u genotipova rp-1, rp-2 i rp-3 te tri u genotipova rp-4 i rp-5 uslijed kojih je došlo do promjene aminokiseline u transliranoj sekvenci (Slika 10). Prema tome, fitoplazme rp-1, rp-2 i rp-3 genotipa ribosomskih proteina međusobno se ne razlikuju obzirom na transliranu sekvencu gena *rpl22* i *rps3*. Također, u transliranoj sekvenci gena *rpl22* nije bilo razlike između genotipova rp-1, rp-2 i rp-3 i genotipa rp-4, no genotip rp-4 razlikovao se obzirom na genotipove rp-1, rp-2 i rp-3 u transliranoj sekvenci gena *rps3*. Genotip rp-5 razlikovao se obzirom na transliranu sekvencu oba gena za ribosomske proteine u usporedbi s genotipovima rp-1, rp-2 i rp-3, dok se u odnosu na rp-4 razlikovao samo obzirom na transliranu sekvencu gena *rpl22*.

Tablica 16. Nukleotidne promjene gena za ribosomske proteine *rpl22* i *rps3* izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7. Položaj promjena određen je u odnosu na sekvencu referentnog izolata EY1. Točkice označavaju identične nukleotide. Crveno označene promjene nalaze se unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ navedenih u Tablici 1, a zvjezdica (*) označava položaj nesinonimnih promjena.

Oznaka	Nukleotidne promjene													
	<i>rpl22</i>				<i>rps3</i>									
	258	274	281*	284	521	571	591*	641	753*	912*	925*	930*	1033*	1124
EY1	T	C	G	T	T	T	T	T	G	A	T	A	A	T
EY626	C	G	.
EY24_SRB
EY20_SRB	.	T	.	C	.	C	.	C	.	G	.	G	.	.
EYCZ1	C	A	C	.	G	C	G	.	.
rp-1	.	T	.	C	.	C	.	C	.	G	.	G	.	.
rp-2	.	T	.	C	.	C	.	C	.	G	.	G	.	G
rp-3	.	T	.	C	C	C	.	C	.	G	.	G	.	.
rp-4	.	T	.	C	.	C	.	C	T	G	.	G	.	.
rp-5	.	T	T	C	.	C	.	C	T	G	.	G	.	.

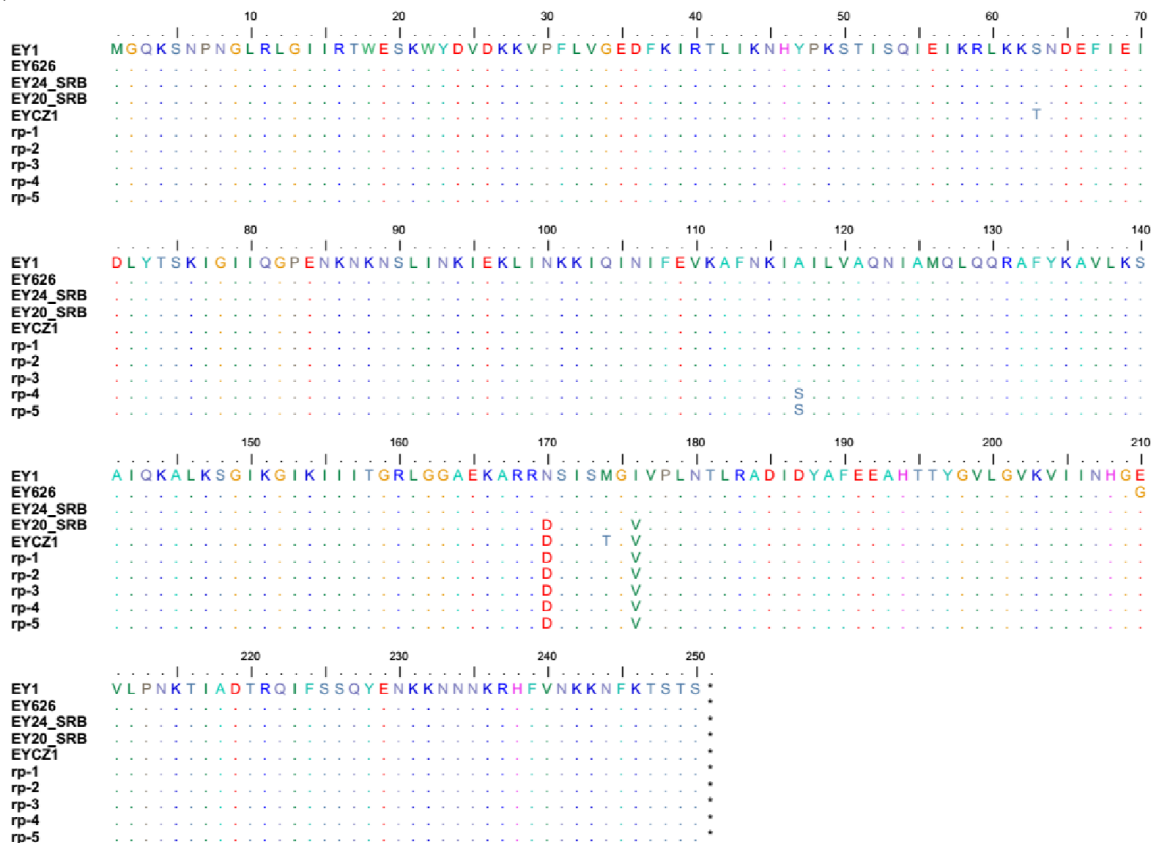
Tablica 17. Postotak identičnosti nukleotidnih sekvenci analiziranog dijela operona za ribosomske proteine izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7.

Oznaka	EY1	EY626	EY24_SRB	EY20_SRB	EYCZ1	rp-1	rp-2	rp-3	rp-4	rp-5
EY1	100									
EY626	99,8	100								
EY24_SRB	100	99,8	100							
EY20_SRB	99,4	99,2	99,4	100						
EYCZ1	99,4	99,2	99,4	99,6	100					
rp-1	99,4	99,2	99,4	100	99,6	100				
rp-2	99,3	99,1	99,3	99,9	99,5	99,9	100			
rp-3	99,3	99,1	99,3	99,9	99,5	99,9	99,8	100		
rp-4	99,3	99,1	99,3	99,9	99,5	99,9	99,8	99,8	100	
rp-5	99,2	99	99,2	99,8	99,4	99,8	99,7	99,7	99,9	100

a)



b)



Slika 10. Višestruko srađnjene translaticrane djelomicne sekvence gena *rpl22* (a) i sekvence gena *rps3* (b) izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 2. Točkice označavaju identične aminokiseline.

3.4.1.3. Varijabilnost gena *secY*

Produkti ugniježdene PCR reakcije umnoženi početnicama FD9f2 i FD9r dvosmjerno su sekvencirani početnicama FD9f3 i FD9r2 što je omogućilo određivanje nukleotidnog slijeda odsječka gena *secY*. Analizom dobivenih sekvenci određena su 24 različita genotipa (*secY*-1 do *secY*-24). Gen *secY* bio je znatno varijabilniji u odnosu na ostale analizirane genske lokuse. Iako su se neki genotipovi razlikovali samo u jednoj nukleotidnoj promjeni u drugih su pronađene značajne razlike te se postotak identičnosti sekvence kretao od 92,8% do 99,9%. Osim nukleotidnih supstitucija, postojale su delecije i insercije većeg broja nukleotida zbog čega se dužina analizirane sekvence razlikovala u pojedinim genotipova i kretala se u rasponu od 1068 do 1116 baznih parova. Najbliži referentnom izolatu EY1 bio je genotip *secY*-10 (postotak identičnosti sekvence iznosio je 98,2%) dok je najveća razlika u odnosu na EY1 uočena u genotipa *secY*-15 (postotak identičnosti sekvence iznosio je 94,5%). U odnosu na EY1 sekvencu dužine 1107 parova baza, u analiziranih genotipova pronađeno je ukupno 56 varijabilnih mjesta na kojima je došlo do nukleotidne supstitucije te četiri delecije i tri insercije. Delecije su uključivale gubitak od 6 do 39 nukleotida dok su insercije uključivale dodatak 3 do 6 nukleotida. Delecija je utvrđena u ukupno 12 genotipova pri čemu je u dva genotipa (*secY*-2 i *secY*-3) do delecije došlo na dva mjesta, a insercija je utvrđena u 8 genotipova pri čemu je u tri genotipa (*secY*-22, *secY*-23 i *secY*-24) do insercije došlo na dva mjesta. Nukleotidne promjene te delecije i insercije utvrđene su u tri od četiri jedinstvene oligonukleotidne sekvence fitoplazme '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' prikazane u Tablici 1 (Lee i sur. 2004b). U pojedinim slučajevima delecija je obuhvatila cijelu ili gotovo cijelu jedinstvenu oligonukleotidnu sekvencu. Promjene jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci gena *secY* prikazane su u Tablici 18., a postotci identičnosti sekvenci prikazani su u Tablici 19. Obzirom na sadržaj G i C baznih parova koji se kretao od 23,98% do 24,48%, monolokusni genotipovi analizirani u ovom istraživanju nisu se značajno razlikovali u odnosu na soj EY1 u kojeg je sadržaj G i C baznih parova u analiziranom dijelu *secY* sekvence iznosio 24,39%.

Analiza translirane sekvence pokazala je da opažene delecije i insercije dovode do odgovarajućeg smanjenja ili povećanja broja aminokiselina, ali ne uzrokuju pomak okvira čitanja. Također je utvrđeno da je velik dio nukleotidnih promjena nesinoniman, uključujući i 12 promjena unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci, međutim svi detektirani genotipovi međusobno su se razlikovali obzirom na transliranu *secY* sekvencu. Ukupno je u cijeloj transliranoj sekvenci pronađeno 37 položaja na kojima je došlo do promjene aminokiseline u odnosu na transliranu sekvencu referentnog izolata EY1 (Slika 11).

Tablica 18. Nukleotidne promjene izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ koje se nalaze unutar jedinstvenih nukleotidnih sekvenci gena *secY* od položaja 350 do položaja 365 (a), od položaja 595 do 614 (b) te od položaja 616 do 627 (c) u odnosu na sekvencu referentnog izolata EY1. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7. Točkice označavaju identične nukleotide, crtice (-) označavaju deleciju, a kosa crta (/) označava da insercija nije prisuta. Položaj nesinonimnih promjena označen je zvjezdicom (*).

a)

Oznaka	Nukleotidne promjene gena <i>secY</i> (350–365)																
	350	351*	352	353*	354	355	356*	357*	358	359	360*	361	Ins.	362	363	364	365
EY1	T	T	T	G	A	T	C	C	A	A	T	G	/	T	T	A	A
EY-626	/
EY24_SRB	/
EY1_SRB	.	.	.	A	/
EY10_SRB	/
EY18_SRB	.	.	.	A	/
EY20_SRB	.	.	.	A	/
secY-1	.	C	/
secY-2	.	C	/
secY-3	.	C	/
secY-4	.	A	/
secY-5	.	C	/
secY-6	.	C	/
secY-7	.	C	/
secY-8	.	C	T	T	.	.	C	T	TCTGAT
secY-9	.	C	/
secY-10	.	C	/
secY-11	.	C	/
secY-12	.	C	/
secY-13	.	C	/
secY-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-
secY-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-
secY-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-
secY-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-
secY-18	.	.	.	A	/
secY-19	.	.	.	A	/
secY-20	.	.	.	A	/
secY-21	.	.	.	A	/
secY-22	.	.	.	A	/
secY-23	.	.	.	A	/
secY-24	.	.	.	A	/

b)

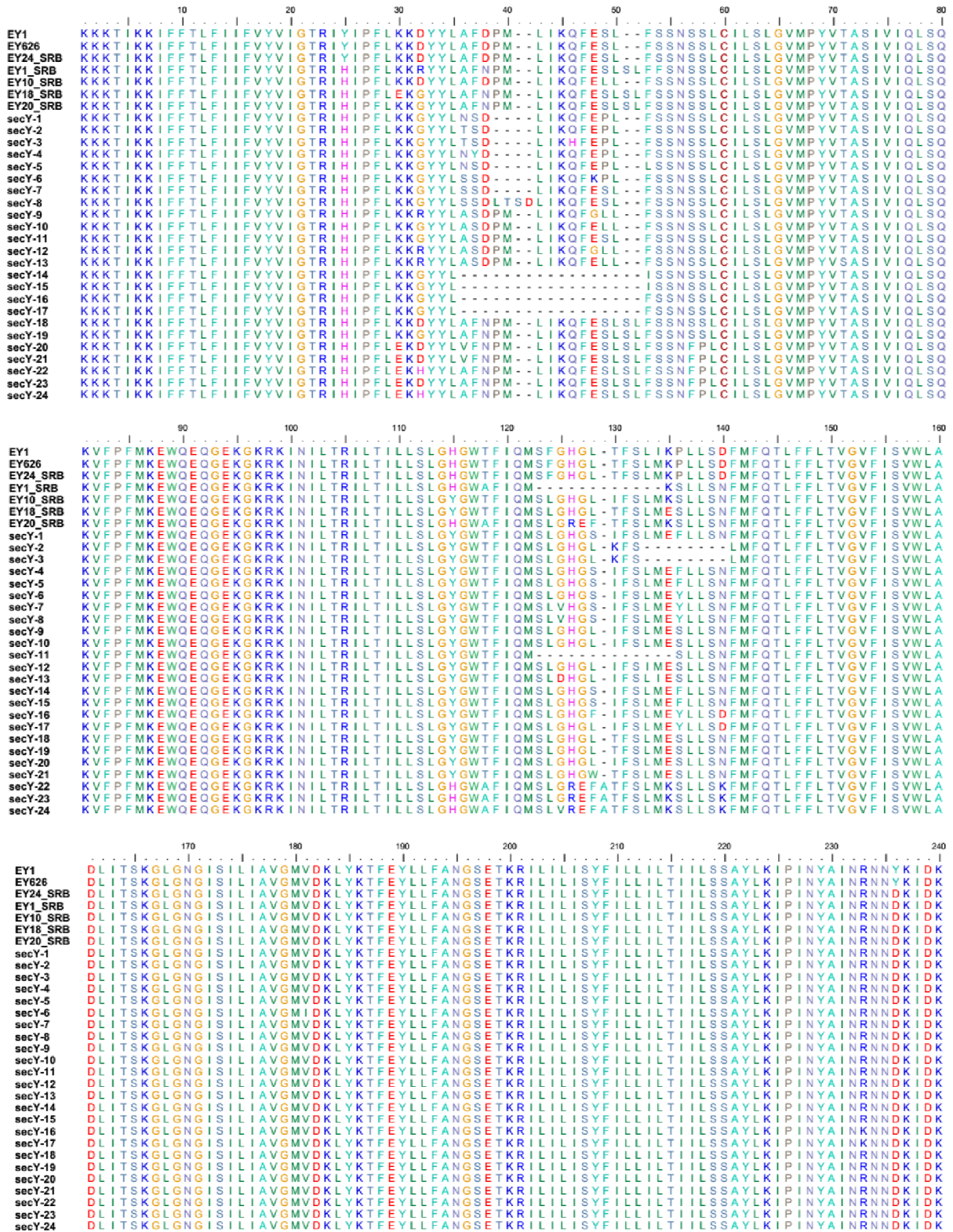
Oznaka	Nukleotidne promjene gena <i>secY</i> (595–614)																				
	595	596	597	598	599	600	601*	602	603*	604	605	606*	607	608	609*	610	611	612*	613*	Ins.	614
EY1	G	T	C	T	T	T	C	G	G	T	C	A	T	G	G	A	T	T	G	/	A
EY-626	/	.
EY24_SRB	/	.
EY1_SRB	/	.
EY10_SRB	A	/	.
EY18_SRB	A	/	.
EY20_SRB	A	.	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T	/	.	
secY-1	A	C	/	.	
secY-2	A	/	.	
secY-3	A	/	.	
secY-4	A	C	/	.	
secY-5	A	C	/	.	
secY-6	A	C	/	.	
secY-7	A	T	C	/	.	
secY-8	A	T	C	/	.	
secY-9	A	/	.	
secY-10	A	/	.	
secY-11	/	.	
secY-12	A	/	.	
secY-13	A	A	/	.	
secY-14	A	C	/	.	
secY-15	A	C	/	.	
secY-16	A	T	/	.	
secY-17	A	/	.	
secY-18	A	/	.	
secY-19	A	/	.	
secY-20	A	/	.	
secY-21	A	G	.	/	.	
secY-22	A	.	.	.	G	.	.	A	.	.	T	GCA	.	.	
secY-23	A	.	.	.	G	.	.	A	.	.	T	GCA	.	.	
secY-24	A	T	.	.	G	.	.	A	.	.	T	GCA	.	.	

c)

Oznaka	Nukleotidne promjene gena <i>secY</i> (616-627)											
	616	617	618	619	620	621	622	623*	624	625	626	627
EY1	A	T	T	T	A	G	T	C	T	A	A	T
EY-626
EY24_SRB
EY1_SRB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EY10_SRB
EY18_SRB
EY20_SRB
secY-1
secY-2
secY-3
secY-4
secY-5
secY-6
secY-7
secY-8
secY-9
secY-10
secY-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
secY-12	A
secY-13
secY-14
secY-15
secY-16
secY-17
secY-18
secY-19
secY-20
secY-21
secY-22
secY-23
secY-24

Tablica 19. Postotak identičnosti nukleotidnih sekvenci gena *secY* izolata fitoplazme '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7.

	EY1	EY-626	EY24_SRB	EY1_SRB	EY10_SRB	EY18_SRB	EY20_SRB	secY-1	secY-2	secY-3	secY-4	secY-5	secY-6	secY-7	secY-8	secY-9	secY-10	secY-11	secY-12	secY-13	secY-14	secY-15	secY-16	secY-17	secY-18	secY-19	secY-20	secY-21	secY-22	secY-23	secY-24	
EY1	100																															
EY-626	99,9	100																														
EY24_SRB	99,7	99,8	100																													
EY1_SRB	94,8	94,8	94,8	100																												
EY10_SRB	98,5	98,6	98,6	95,6	100																											
EY18_SRB	97,8	97,9	97,9	96,3	98,9	100																										
EY20_SRB	97,5	97,6	97,6	96,5	98,4	99,1	100																									
secY-1	97,2	97,3	97,3	94,6	98,5	98,0	97,3	100																								
secY-2	95,6	95,7	95,7	92,8	96,6	96,1	95,5	97,5	100																							
secY-3	95,5	95,6	95,6	92,7	96,5	96,0	95,5	97,4	99,9	100																						
secY-4	97,2	97,3	97,3	94,6	98,5	98,0	97,3	99,9	97,4	97,3	100																					
secY-5	97,1	97,2	97,2	94,6	98,4	97,9	97,3	99,9	97,4	97,3	99,8	100																				
secY-6	97,1	97,2	97,2	94,6	98,4	97,9	97,3	99,5	97,3	97,2	99,4	99,4	100																			
secY-7	97,3	97,4	97,4	94,8	98,6	98,1	97,4	99,5	97,3	97,2	99,4	99,4	99,6	100																		
secY-8	97,0	97,1	97,1	94,5	98,2	97,7	97,1	98,4	96,3	96,2	98,3	98,3	98,5	98,9	100																	
secY-9	97,9	98,0	98,0	95,4	99,3	98,6	98,0	98,4	96,4	96,3	98,3	98,3	98,3	98,5	98,2	100																
secY-10	98,2	98,3	98,3	95,5	99,7	99,0	98,3	98,8	96,8	96,7	98,7	98,7	98,7	98,9	98,5	99,6	100															
secY-11	95,3	95,3	95,3	98,3	96,3	95,8	95,5	95,6	94,2	94,2	95,5	95,5	95,5	95,8	95,5	96,2	96,5	100														
secY-12	97,9	98,0	98,0	95,5	99,3	98,6	98,0	98,4	96,4	96,3	98,3	98,3	98,3	98,5	98,2	99,8	99,6	96,2	100													
secY-13	97,9	97,9	97,9	95,5	99,2	98,5	97,9	98,3	96,3	96,2	98,2	98,2	98,2	98,5	98,2	99,5	99,5	96,2	99,5	100												
secY-14	94,6	94,7	94,7	92,1	96,0	95,5	94,8	96,9	94,5	94,5	96,9	96,8	96,7	96,7	96,7	95,6	95,9	96,2	92,9	95,9	95,7	100										
secY-15	94,5	94,6	94,8	92,0	95,9	95,4	94,7	96,8	94,4	94,4	96,8	96,7	96,6	96,6	95,5	95,8	96,1	92,8	95,8	95,6	99,9	100										
secY-16	94,7	94,8	94,8	92,0	95,9	95,4	94,9	96,5	94,5	94,5	96,5	96,4	96,5	96,5	95,5	95,8	96,1	92,8	95,8	95,6	99,4	99,3	100									
secY-17	94,8	94,9	94,9	92,0	96,0	95,5	94,8	96,6	94,6	94,6	96,6	96,5	96,6	96,6	95,5	95,9	96,2	92,8	95,9	95,7	99,5	99,4	99,9	100								
secY-18	98,0	98,1	98,1	96,3	99,1	99,8	99,1	98,0	96,1	96,0	98,0	97,9	97,9	98,1	97,7	98,6	99,0	95,8	98,6	98,5	95,5	95,4	95,4	95,5	100							
secY-19	97,9	98,0	98,0	96,4	99,0	99,9	99,2	98,1	96,2	96,1	98,1	98,0	98,2	97,8	98,7	99,1	95,9	98,7	98,6	95,5	95,5	95,5	95,5	99,9	100							
secY-20	97,4	97,5	97,5	95,8	98,7	99,4	98,6	97,7	95,6	95,5	97,7	97,6	97,5	97,7	97,4	98,2	98,6	95,4	98,2	98,2	95,2	95,1	95,1	95,2	99,4	99,3	100					
secY-21	97,4	97,5	97,5	95,8	98,5	99,4	98,6	97,6	95,5	95,5	97,6	97,5	97,4	97,6	97,3	98,1	98,4	95,4	98,1	98,0	95,1	95,0	94,9	95,0	99,4	99,3	99,8	100				
secY-22	97,0	97,1	97,1	96,1	97,7	98,4	98,8	96,5	94,8	94,7	96,5	96,4	96,4	96,5	96,2	97,3	97,4	94,7	97,3	97,2	93,9	93,9	94,0	93,9	98,4	98,3	98,4	98,4	100			
secY-23	97,1	97,2	97,2	96,0	97,8	98,5	98,9	96,5	94,8	94,8	96,5	96,5	96,5	96,6	96,3	97,2	97,5	94,8	97,2	97,1	94,0	93,9	94,1	94,0	98,5	98,4	98,5	98,5	99,9	100		
secY-24	96,9	97,0	97,0	96,1	97,6	98,3	98,7	96,4	94,7	94,6	96,4	96,3	96,3	96,6	96,3	97,2	97,4	94,7	97,2	97,2	93,9	93,8	93,9	93,9	98,3	98,2	98,3	98,3	99,9	99,8	100	



Slika 11. Višestruko srađnjene translahirane djelomične sekvence gena *secY* izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7.

3.4.1.4. Varijabilnost genskog lokusa *secY-map*

Produkt ugniježdene PCR reakcije umnožen početnicama FD9f6 i MAPr2 je sekvenciran pomoću istih početnica koje su korištene za umnožavanje. Ukupna dužina sekvenciranog odsječka bila je 719 ili 718 parova baza i obuhvaćala je 3' kraj gena *secY* dužine 52 para baza, intergensko područje između gena *secY* i *map* te djelomičnu sekvencu gena *map* dužine 606 parova baza. Analizom sekvence lokusa *secY-map* utvrđeno je 7 genotipova označenih kao map-1 do map-7. Opažena razlika u ukupnoj dužini sekvence rezultat je delecije jednog nukleotida u intergenskom području u 2 od 7 genotipova. Međusobno su se detektirani genotipovi relativno malo razlikovali, u jednoj do dvije nukleotidne promjene ili samo uslijed delecije u intergenskom području te je postotak identičnosti sekvence iznosio 99,5% do 99,8%. U banci gena (GenBank, NCBI) nalaze se sekvence *secY-map* lokusa prethodno opisanih izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' dužine 675 parova baza. Stoga je samo prvih 675 parova baza sekvenci dobivenih u ovom istraživanju moglo biti uspoređeno s referentnim sekvencama. Obzirom da prilikom prvog opisa vrste '*Ca. Phytoplasma ulmi*' lokus *secY-map* nije analiziran, kao referentni izolat uzet je izolat E04-D714 izoliran iz gorskog brijesta s područja Francuske koji je obzirom na ovaj lokus identičan izolatu EY1 (Arnaud i sur. 2007, Jović i sur. 2011). U odnosu na izolat E04-D714 u području genskog lokusa *secY-map* u genotipova detektiranih u ovom istraživanju postojalo je ukupno 10 varijabilnih mjesta od koji se većina nalazila u području gena *map*, dok u području gena *secY* nije bilo promjena. Genotip map-5 bilo je najbližiji izolatu E04-D714, postotak identičnosti sekvence iznosio je 99,1 %. Osim toga, sekvenca genotipa map-5 bila je identična sekvenci izolata EY1-SRB iz Srbije. Promjene u nukleotidnoj sekvenci lokusa *secY-map* prikazane su u Tablici 20, a postotci identičnosti sekvence prikazani su u Tablici 21. Sadržaj G i C baznih parova u analiziranoj sekvenci lokusa *secY-map* za izolat E04-D714 iznosio je 25,89% dok je za genotipove detektirane u ovom istraživanju bio u rasponu od 25,89% do 26,42%.

Djelomična sekvenca gena *map* translirana je kako bi se utvrdio utjecaj nukleotidnih promjena na slijed aminokiselina. Pokazalo se da su četiri mutacije nesinonimne od čega su dvije prisutne u svih genotipova. Genotipovi map-1, map-3 i map-4 nisu se međusobno razlikovali obzirom na transliranu sekvencu gena *map*. Međusobne razlike nisu postojale ni između genotipova map-5, map-6 i map-7, dok se genotip map-2 razlikovao u transliranoj sekvenci u usporedbi sa svim ostalim detektiranim genotipovima (Slika 12).

Tablica 20. Položaj nukleotidnih promjena intergenskog područja između gena *secY* i *map* i djelomične sekvence gena *map* izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7. Položaj promjena određen je u odnosu na soj E04-D714. Točkice (.) označavaju identične nukleotide, crtice (-) označavaju deleciju, kosa crta (/) označava da insercija nije prisuta, a * označava položaj nesinonimnih promjena.

Oznaka	Položaj nukleotidne promjene																		
	<i>secY-map</i> intergensko područje					<i>map</i>													
	62	76	Ins. 76 - 77	87	111	165*	270	324	342	358	387	405	466	525	583*	591	624	670*	675*
E04-D714	G	A	/	T	T	T	T	T	C	A	T	C	A	G	T	T	T	G	T
E04-D438	A	.	A	.	.	G	.	G	.	.	C	.	G	.	C	C	.	.	.
EY24_SRB	.	.	/
EY1_SRB	.	.	/	.	.	G	.	T	T	C	C	C	.	.	.
EY10_SRB	.	.	/	.	.	G	.	T	G	.	.	.	T	C	C	C	.	.	.
EY18_SRB	.	.	A	.	.	G	.	T	T	C	C	C	.	.	.
EY20_SRB	T	.	/	.	.	G	.	T	T	C	C	C	.	.	.
map-1	.	.	/	.	.	G	.	T	T	C	C	C	T	.	.
map-2	.	.	/	.	.	G	.	T	T	C	C	C	T	A	.
map-3	.	.	/	.	-	G	.	T	T	C	C	C	T	.	.
map-4	.	-	/	.	.	G	.	T	T	C	C	C	T	.	.
map-5	.	.	/	.	.	G	.	T	T	C	C	C	.	.	.
map-6	.	.	/	.	.	G	C	T	T	C	C	C	.	.	.
map-7	.	.	/	G	.	G	.	T	T	C	C	C	.	.	.

Tablica 21. Postotak identičnosti sekvenci lokusa *secY-map* hrvatskih i prethodno opisanih izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7.

Oznaka	E04-D714	E04-D438	EY24_SRB	EY1_SRB	EY10_SRB	EY18_SRB	EY20_SRB	map-1	map-2	map3	map-4	map-5	map-6	map-7
E04-D714	100													
E04-D438	98,8	100												
EY24 SRB	100	98,8	100											
EY1 SRB	99,1	98,8	99,1	100										
EY10 SRB	98,9	98,6	98,9	99,8	100									
EY18 SRB	98,9	98,9	98,9	99,8	99,7	100								
EY20 SRB	98,9	98,8	98,9	99,8	99,7	99,7	100							
map-1	98,9	98,6	98,9	99,8	99,7	99,7	99,7	100						
map-2	98,8	98,5	98,8	99,7	99,5	99,5	99,5	99,8	100					
map-3	98,8	98,5	98,8	99,7	99,5	99,5	99,5	99,8	99,7	100				
map-4	98,8	98,5	98,8	99,7	99,5	99,5	99,5	99,8	99,7	99,7	100			
map-5	99,1	98,8	99,1	100	99,8	99,8	99,8	99,8	99,7	99,7	99,7	100		
map-6	98,9	98,6	98,9	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	99,5	99,5	99,5	99,8	100	
map-7	98,9	98,6	98,9	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	99,5	99,5	99,5	99,8	99,7	100

3.4.2. Zastupljenost genotipova fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’

Svi izolati fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ s lokaliteta Nova Kapela, Donji Miholjac, Đurđevačka Bilogora i Jastrebarsko bili su identični obzirom na sekvencu gena za 16S rRNA i imali su genotip 16S-1, dok je genotip 16S-2 bio ograničen na lokalitet Cetina. Izolati s lokaliteta Cetina razlikovali su se od izolata s ostalih lokaliteta i prema sekvenci gena za ribosomske proteine L22 i S3. Na lokalitetu Cetina bila su zastupljena dva genotipa ribosomskih proteina, rp-4 i rp-5, pri čemu je genotip rp-5 bio zastupljen samo s jednim izolatom, dok su svi ostali izolati imali genotip rp-4. Najzastupljeniji genotip ribosomskih proteina na drugim lokalitetima bio je genotip rp-1, dok je genotip rp-2 pronađen samo u jednog izolata s lokaliteta Nova Kapela, a genotip rp-3 u jednog izolata s lokaliteta Đurđevačka Bilogora. Na lokalitetima Donji Miholjac, Đurđevačka Bilogora i Jastrebarsko pronađeno je po 7 *secY* genotipova, a na lokalitetima Nova Kapela i Cetina pronađena su po dva *secY* genotipa. Većina *secY* genotipova je bila zastupljena samo na jednom lokalitetu, iako je u pojedinim slučajevima sličnost u sekvenci između genotipova s različitih lokaliteta bila veća nego između izolata s istog lokaliteta (Tablica 19). Jedini genotip koji je bio prisutan na više lokaliteta je genotip *secY*-1 koji je utvrđen u 6 izolata s lokaliteta Donji Miholjac i dva izolata s lokaliteta Đurđevačka Bilogora. Najčešći *secY-map* genotip bio je genotip map-1 koji je pronađen u ukupno 32 izolata s lokaliteta Donji Miholjac, Đurđevačka Bilogora, Jastrebarsko i Cetina. Genotipovi map-2 i map-5 također su utvrđeni na različitim lokalitetima (Donji Miholjac, Nova Kapela i Đurđevačka Bilogora), dok su ostali genotipovi pronađeni samo na jednom lokalitetu pri čemu je samo genotip map-6 utvrđen u više od jednog izolata. Odvajanje fitoplazmi s lokaliteta Cetina nije bilo vidljivo na temelju analize ovog lokusa. Jedino je izolat koji se razlikovao od ostalih izolata s ovog lokaliteta i obzirom na genotip ribosomskih proteina i gena *secY*, imao jedinstven genotip lokusa *secY-map* (map-5) (Tablica 22).

Obzirom da zaraza fitoplazmom ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ nije detektirana za gorski brijest te da su samo tri stabla nizinskog brijesta bila zaražena, nije moguće sa sigurnošću utvrditi razlikuje li se genotip izolata koji zaražavaju različite vrste brijesta. Izolati porijeklom iz nizinskog brijesta imali su identičan genotip gena za 16S rRNA i ribosomske proteine te *secY-map* genotip, a međusobno su se razlikovali obzirom na gen *secY*. Međutim *secY* sekvenca izolata porijeklom iz nizinskog brijesta bila je identična *secY* sekvenci pojedinih izolata porijeklom iz brijesta veza s istih lokaliteta. To ukazuje da se fitoplazme koje zaražavaju različite vrste brijesta vjerojatno genotipski međusobno ne razlikuju.

Tablica 22. Zastupljenost genotipova fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ na lokalitetima Donji Miholjac (DM), Nova Kapela (NK), Đurđevačka Bilogora (KP), Jastrebarsko (J) i Cetina (C).

Genotip	Lokalitet (broj izolata)	Vrsta brijesta
16S rDNA		
16S-1	DM (14), NK (5), KP (17), J (14)	<i>U. laevis</i> , <i>U. minor</i>
16S-2	C (12)	<i>U. laevis</i>
Ribosomski proteini		
rp-1	DM (14), NK (4), KP (16), J (14)	<i>U. laevis</i> , <i>U. minor</i>
rp-2	NK (1)	<i>U. laevis</i>
rp-3	KP (1)	<i>U. laevis</i>
rp-4	C (11)	<i>U. laevis</i>
rp-5	C (1)	<i>U. laevis</i>
secY		
secY-1	DM (6), KP (2)	<i>U. laevis</i> , <i>U. minor</i>
secY-2	DM (1)	<i>U. laevis</i>
secY-3	KP (2)	<i>U. laevis</i>
secY-4	DM (1)	<i>U. laevis</i>
secY-5	J (1)	<i>U. laevis</i>
secY-6	DM (2)	<i>U. laevis</i>
secY-7	C (1)	<i>U. laevis</i>
secY-8	C (11)	<i>U. laevis</i>
secY-9	DM (1)	<i>U. laevis</i>
secY-10	KP (1)	<i>U. laevis</i>
secY-11	KP (8)	<i>U. laevis</i>
secY-12	KP (1)	<i>U. laevis</i>
secY-13	J (2)	<i>U. laevis</i> , <i>U. minor</i>
secY-14	NK (4)	<i>U. laevis</i>
secY-15	NK (1)	<i>U. laevis</i>
secY-16	J (2)	<i>U. laevis</i>
secY-17	J (3)	<i>U. laevis</i>
secY-18	DM (1)	<i>U. laevis</i>
secY-19	DM (2)	<i>U. laevis</i>
secY-20	KP (1)	<i>U. laevis</i>
secY-21	KP (2)	<i>U. laevis</i> , <i>U. minor</i>
secY-22	J (4)	<i>U. laevis</i>
secY-23	J (1)	<i>U. laevis</i>
secY-24	J (1)	<i>U. laevis</i>
secY-map		
map-1	DM (6), KP (9), J (6), C (11)	<i>U. laevis</i>
map-2	KP (4), J (2)	<i>U. laevis</i> , <i>U. minor</i>
map-3	NK (1)	<i>U. laevis</i>
map-4	C (1)	<i>U. laevis</i>
map-5	NK (4), DM (7), KP (4)	<i>U. laevis</i>
map-6	J (6)	<i>U. laevis</i>
map-7	KP (1)	<i>U. laevis</i>

3.4.3. Raznolikost genotipova fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’

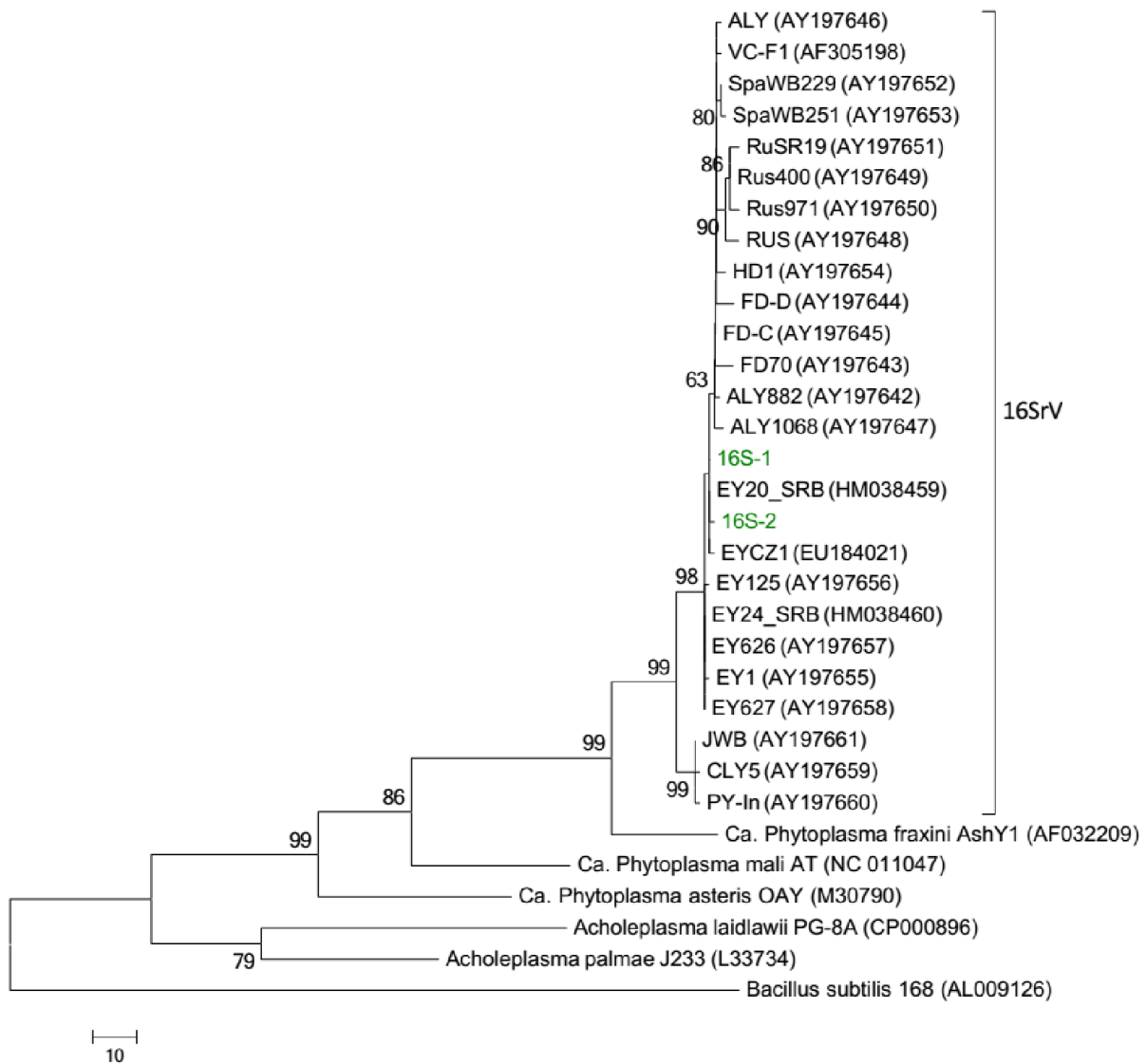
Obzirom da su metodom najveće štedljivosti i metodom najveće vjerojatnosti dobiveni slični rezultati koji su doveli do jednakih zaključaka, prikazana su samo filogenetska stabla dobivena metodom najveće štedljivosti.

Filogenetska analiza na temelju 16S rDNA sekvence pokazala je jasno odvajanje fitoplazmi 16SrV skupine u zasebnu filogenetsku skupinu u koju su se svrstali i genotipovi 16S-1 i 16S-2 (Slika 13). Zbog velike sličnosti 16S rDNA sekvence sve fitoplazme iz ove skupine grupirale su se zajedno, osim fitoplazmi 16SrV-B podskupina (‘*Ca. Phytoplasma ziziphi*’), odnosno izolata CLY5, JWB, PY-In (Lee i sur. 2004b) koje su se izdvojili kao zasebna grana. Postojanje dva klastera unutar 16SrV skupine potvrđuju visoke vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja od 99% i 98%. Fitoplazme detektirane u ovom istraživanju grupirale su se zajedno s izolatima EYCZ1 i EY20_SRB koje zaražavaju brijest u Češkoj i Srbiji (Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2011), dok su se izolati EY1, EY125, EY626, EY627 koje su analizirali Lee i sur. (2004b) prilikom opisa vrste ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ i EY24_SRB izolat iz Srbije (Jović i sur. 2011) izdvojili na drugoj grani, iako vjerodostojnost ovakvog grupiranja nije potvrđena visokom vrijednošću dobivenom metodom samoučitavanja. Za razliku od toga, grupiranje izolata RUS, RuS971, RuS400 i RuSR19 (Lee i sur. 2004b) koji pripadaju 16Sr-E podskupini (‘*Ca. Phytoplasma rubi*’) podržano je visokom vrijednošću dobivenom metodom samoučitavanja. Obzirom da se izolati fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ nisu jasno odvojili od ostalih fitoplazmi iz 16SrV skupine, filogenetski odnosi fitoplazmi brijesta nisu se mogli precizno utvrditi analizom gena za 16S rRNA.

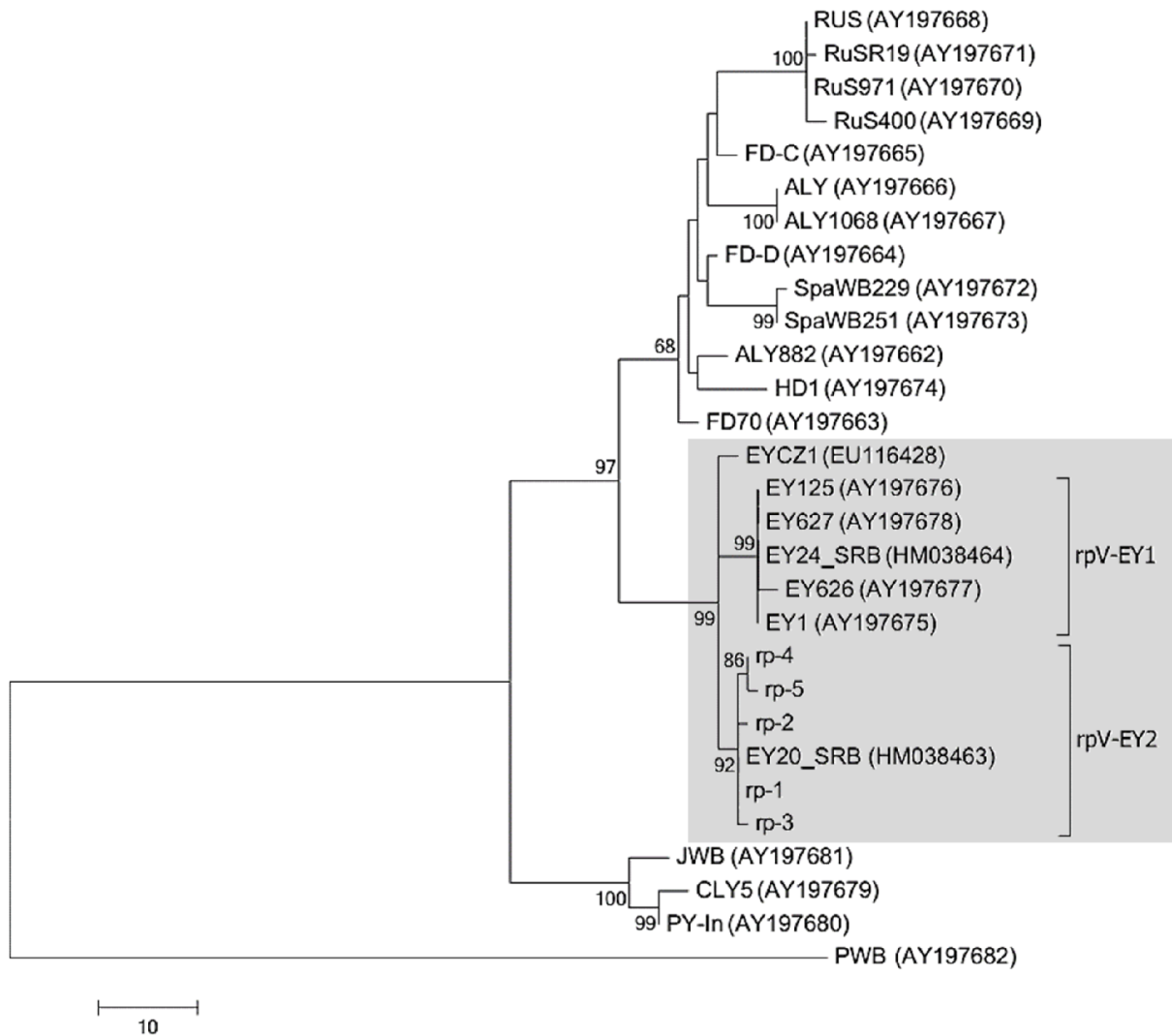
Geni *rpl22* i *rps3*, te geni *secY* i *map* pokazali su se kao znatno učinkovitiji filogenetski parametri u odnosu na 16S rDNA. Filogenetska stabla dobivena analizom gena za ribosomske proteine (Slika 14), gena *secY* (Slika 15) te genskog lokusa *secY-map* (Slika 16) ukazuju na monofiletsko porijeklo fitoplazmi brijesta koje predstavljaju zasebnu filogenetsku skupinu unutar 16SrV skupine fitoplazmi, što potvrđuje visoku vrijednost dobivena metodom samoučitavanja. S druge strane, ovi genski lokusi ukazali su na varijabilnost fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ i podjelu na više filogenetskih linija. Prema Jović i sur. (2011) na temelju sekvence gena za ribosomske proteine moguće je razlikovati dvije filogenetske linije fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ (rp-EY1 i rp-EY2) kao i na temelju gena *secY* (secY-EY1 i secY-EY2) te tri filogenetske linije na temelju lokusa *secY-map* (Map-EY1, Map-EY2 i Map-EY3). Postojanje navedenih filogenetskih linija potvrđeno je ovim istraživanjem. Svi izolati

detektirani u ovom istraživanju svrstali su se zajedno s izolatima iz Srbije unutar filogenetskih linija rpV-EY2, secY-EY2 te Map-EY3, jasno odvojenih od filogenetski linija rpV-EY1, secY-EY1 i Map-EY1 koje su formirali referentni izolat EY1 zajedno s izolatima EY125, EY626 i EY627 (Lee i sur. 2004b) te izolat EY24_SRB (Jović i sur. 2011). Međutim, češki izolat EUCZ1 (Navrátil i sur. 2009) za koji je poznata sekvenca gena za 16S rRNA, ribosomske proteine i gena *secY*, ali ne i gena *map*, nije se grupirao unutar opisanih filogenetskih linija, već se izdvojio kao zaseban. Vjerodostojnost ovakvog grupiranja potvrđuje visoka vrijednost dobivena metodom samoučitavanja.

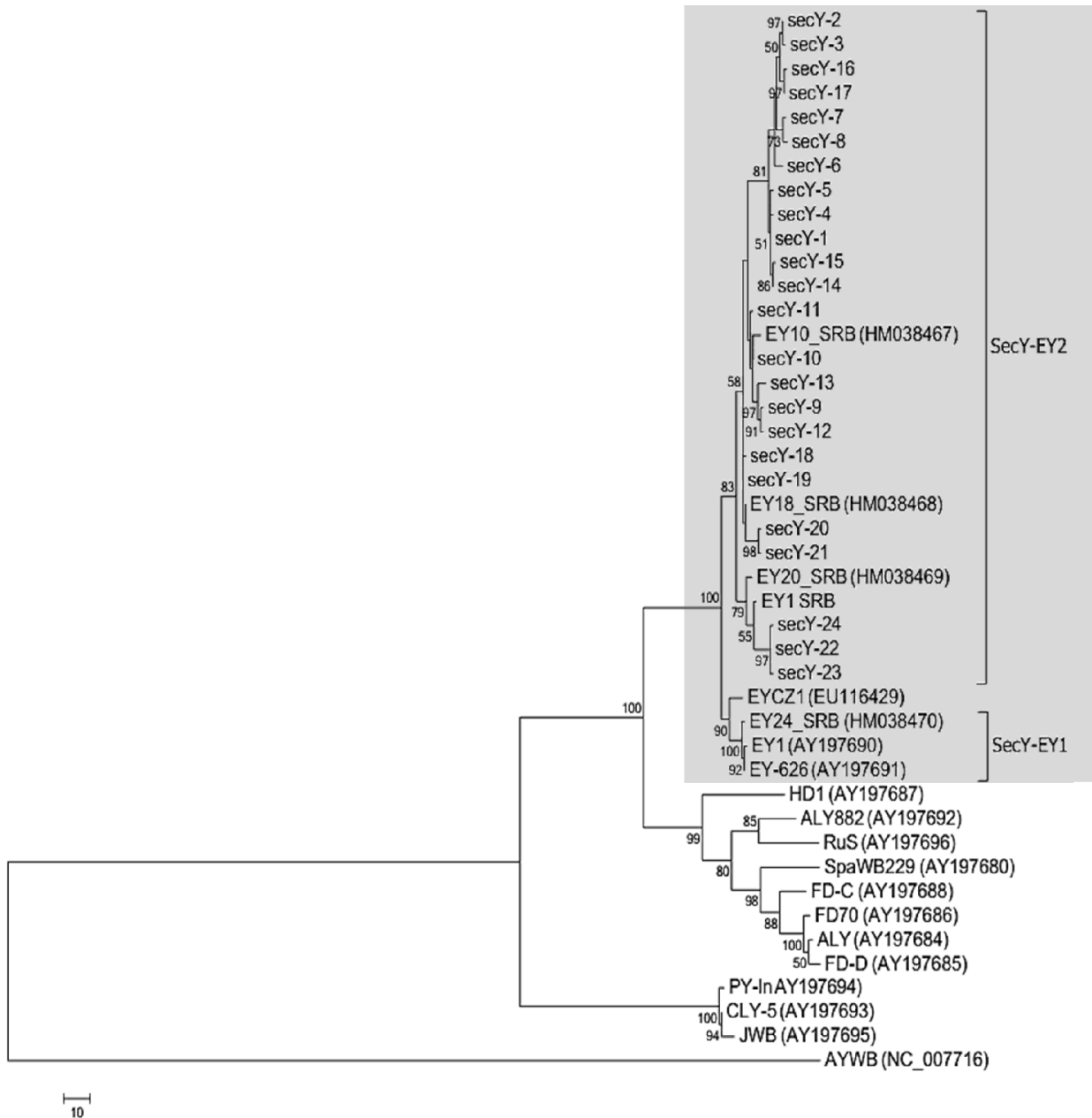
Na filogenetskom stablu dobivenom analizom gena za ribosomske proteine vidljivo je odvajanje izolata s lokaliteta Cetina u odnosu na izolate s ostalih lokaliteta. Genotipovi rp-4 i rp-5 pronađeni na lokalitetu Cetina formirali su zasebnu granu za koju je vrijednost dobivena metodom samoučitavanja iznosila 86%. Na filogenetskom stablu dobivenom analizom genskog lokusa *secY-map* vidljivo je grupiranje genotipova map-1, map-2, map-3 i map-4 podržano s 81% koji su se odvojili od ostalih genotipova detektiranih u ovom istraživanju, no daljnja diferencijacija fitoplazmi brijesta na temelju ovog genskog lokusa nije bila moguća. Uslijed velike varijabilnosti gen *secY* pokazao se kao najinformativniji filogenetski parametar. Na filogenetskom stablu dobivenom analizom gena *secY* vidljivo je grupiranje genotipova secY-22, secY-23 i secY-24 s lokaliteta Jastrebarsko koji su se zajedno s EY1_SRB i EY20_SRB (Jović i sur. 2011) odvojili od ostalih izolata secY-EY2 klastera. Također je vidljivo grupiranje pojedinih genotipova s istih lokaliteta, kao na primjer secY-20 i secY-21 s lokaliteta Đurđevačka Bilogora, secY-15 i secY-14 s lokaliteta Nova Kapela, secY-16 i secY-17 s lokaliteta Jastrebarsko te secY-7 i secY-8 s lokaliteta Cetina. Međutim, zajedno su se grupirali i pojedini izolati s različitih lokaliteta kao što su izolati secY-9, secY-12 i secY-13 s lokaliteta Donji Miholjac, Đurđevačka Bilogora i Jastrebarsko te secY-2 i secY-3 s lokaliteta Donji Miholjac i Đurđevačka Bilogora. Navedeno ukazuje na zajedničko porijeklo i međusobnu srodnost svih izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' s područja Hrvatske detektiranih u ovom istraživanju.



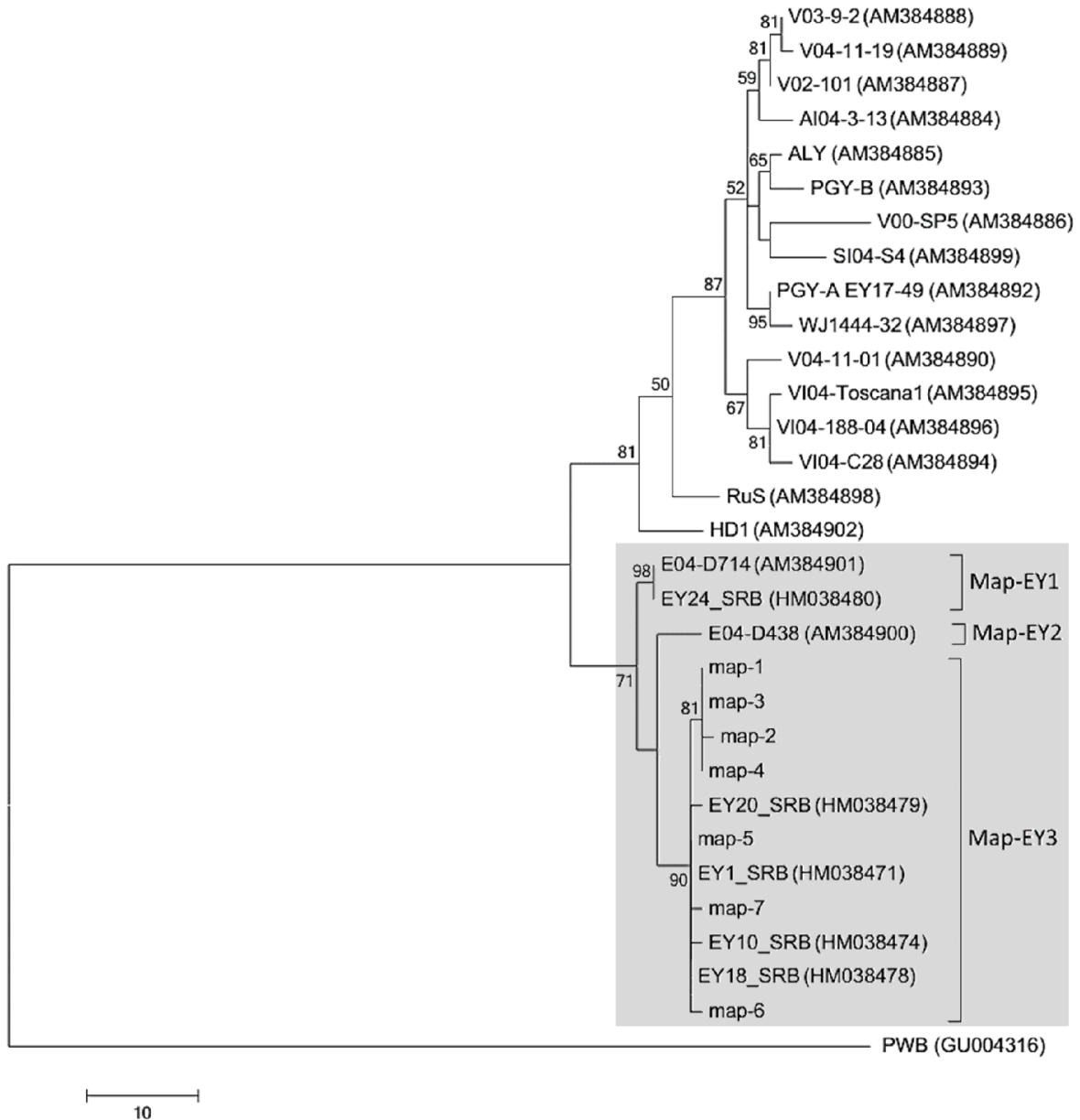
Slika 13. Filogenetsko stablo dobiveno analizom djelomične sekvence gena za 16S rRNA primjenom metode najveće štedljivosti (Maximum Parsimony). Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI) prikazani su u zagradi, a ostali podaci nalaze se u Tablici 7. Kao vanjska skupina korištena je 16S rDNA sekvenca vrste *Bacillus subtilis*. Na desnoj strani označeno je grupiranje 16S rDNA sekvenci fitoplazmi iz 16SrV skupine. Genotipovi 16S rDNA fitoplazme ‘*Candidatus* *Phytoplasma ulmi*’ detektirani u ovom istraživanju označeni su zeleno. Dužina grana proporcionalna je broju promjena (bar = 10 promjena). Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja, prikazane su samo vrijednosti veće od 50%.



Slika 14. Filogenetsko stablo dobiveno analizom djelomične sekvence gena *rpl22* i cijele sekvence gena *rps3* koji kodiraju ribosomske proteina L22 i S3 primjenom metode najveće štedljivosti (Maximum Parsimony). Filogenetska analiza je obuhvatila sekvence fitoplazmi 16SrV skupine, a sekvenca fitoplazme PWB (Potato witches'-broom) koja pripada skupini 16SrVI korištena je kao vanjska skupina. Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI) prikazani su u zagradi, a ostali podaci nalaze se u Tablici 7. Sekvence izolata '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' označene su sivo. Na desnoj strani označene su filogenetske skupine fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' koje su na temelju analize gena za ribosomske proteine opisali Jović i sur. (2011). Dužina grana proporcionalna je broju promjena (bar = 10 promjena). Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja (prikazane su samo vrijednosti veće od 50%).



Slika 15. Filogenetsko stablo dobiveno analizom djelomične sekvence gena *secY* primjenom metode najveće štedljivosti (Maximum Parsimony). Filogenetska analiza je obuhvatila sekvence fitoplazmi 16SrV skupine, a sekvenca fitoplazme AY-WB (*Candidatus* *Phytoplasma asteris*, 16SrI skupina) korištena je kao vanjska skupina. Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI) prikazani su u zagradi, a ostali podaci nalaze se u Tablici 7. Sekvence izolata *Candidatus* *Phytoplasma ulmi* označene su sivo. Na desnoj strani označene su filogenetske skupine fitoplazme *Ca. Phytoplasma ulmi* koje su na temelju analize gena *secY* opisali Jović i sur. (2011). Dužina grana proporcionalna je broju promjena (bar = 10 promjena). Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja (prikazane su samo vrijednosti veće od 50%).



Slika 16. Filogenetsko stablo dobiveno analizom genskog lokusa *secY-map* primjenom metode najveće štedljivosti (Maximum Parsimony). Filogenetska analiza je obuhvatila sekvence fitoplazmi 16SrV skupine, a sekvenca fitoplazme PWB (Potato witches'-broom) koja pripada skupini 16SrVI korištena je kao vanjska skupina. Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI) prikazani su u zagradi, a ostali podaci nalaze se u Tablici 7. Sekvence izolata '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' označene su sivo. Na desnoj strani označene su filogenetske skupine fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' koje su na temelju analize genskog lokusa *secY-map* opisali Arnaud i sur. (2007) i Jović i sur. (2011). Dužina grana proporcionalna je broju promjena (bar = 10 promjena). Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja (prikazane su samo vrijednosti veće od 50%).

3.5. Ostale fitoplazme koje zaražavaju brijest u Hrvatskoj

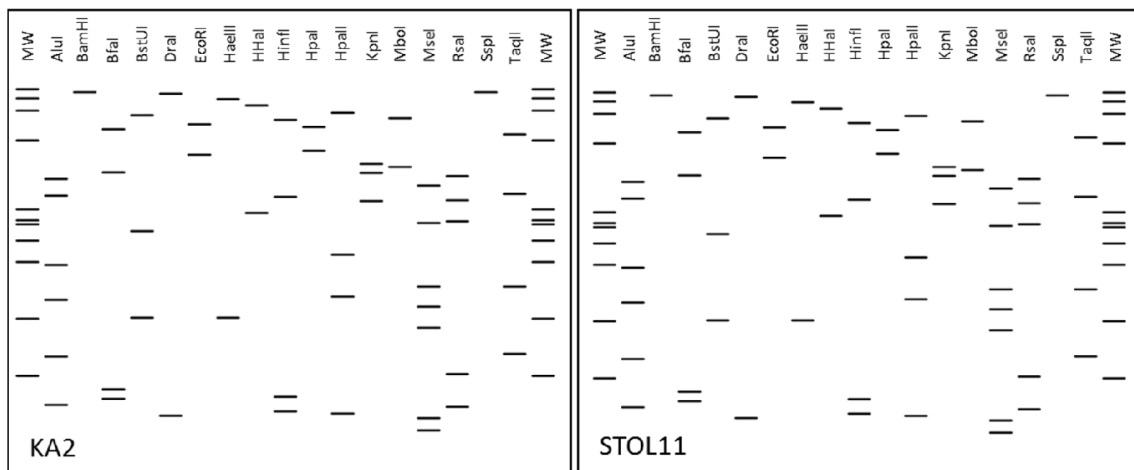
3.5.1. ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’

Za jedini izolat ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ (oznaka KA2) koji je detektiran u ovom istraživanju produkt ugniježdene PCR reakcije umnožen početnica P1A i P7A je sekvenciran primjenom četiri početnice (R16F2n, R16R2, P1A i P7A) te je određena nukleotidna sekvenca odsječka gena za 16S rRNA dužine 1244 parova baza. U odnosu na sekvencu referentnog izolata STOL11 pronađene su 4 nukleotidne promjene (Tablica 23) te je postotak identičnosti sekvence iznosio 99,6%. Nukleotidne supstitucije se nisu nalazile unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci ili DBS sekvenci (eng. distinguishing sequence blocks) karakterističnih za vrstu ‘*Ca. Phytoplasma solani*’ (Quaglino i sur 2013). Nadalje, utvrđeno je da fitoplazme identične obzirom na analizirani odsječak gena za 16S rRNA izolata KA2 zaražavaju veći broj kultiviranih i divljih vrsta kao što su rajčica, grašak, krumpir, vinova loza, poljski slak, crvena djetelina u različitim dijelovima Europe. Sadržaj G i C baznih parova analizirane sekvence uzorka KA2 iznosio je 46,62%, dok je za sekvencu referentnog izolata STOL11 iznosio 46,54%.

Tablica 23. Nukleotidne promjene sekvenciranog odsječka gena za 16S rRNA izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7. Položaj promjena određen je u odnosu na sekvencu referentnog izolata STOL11.

Oznaka	Nukleotidne promjene 16S rDNA			
	628	719	1012	1208
STOL11	T	A	C	T
Rus-PPT97	A	G	T	C
P17P7-Conv2/2010-Bg	A	G	T	C
G66	A	G	T	C
125/10	A	G	T	C
3-21-36	A	G	T	C
KA2	A	G	T	C

Obzirom da opisane nukleotidne supstitucije nisu utjecala na promjenu restrikcijskih mjesta, restrikcijski obrasci dobiveni *in silico* cijepanjem djelomične sekvence 16S rRNA referentnog soja STOL11 i izolata KA2 pomoću svih 17 restrikcijskih enzima koji se uobičajeno koriste za analizu ovog fitoplazmatskog gena nisu se međusobno razlikovali (Slika 17) te je koeficijent sličnosti virtualnih RFLP obrazaca (F) iznosio 1.



Slika 17. Virtualni RFLP obrasci djelomične sekvence 16S rRNA (1,2 kb) izolata KA2 i referentnog izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ STOL11 dobiveni restrikcijskim enzimima *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI* (*Sau3AI*), *RsaI*, *SspI* i *TaqI*. MW: standard duljine odsječaka *Phi-X174 Hae III digest*.

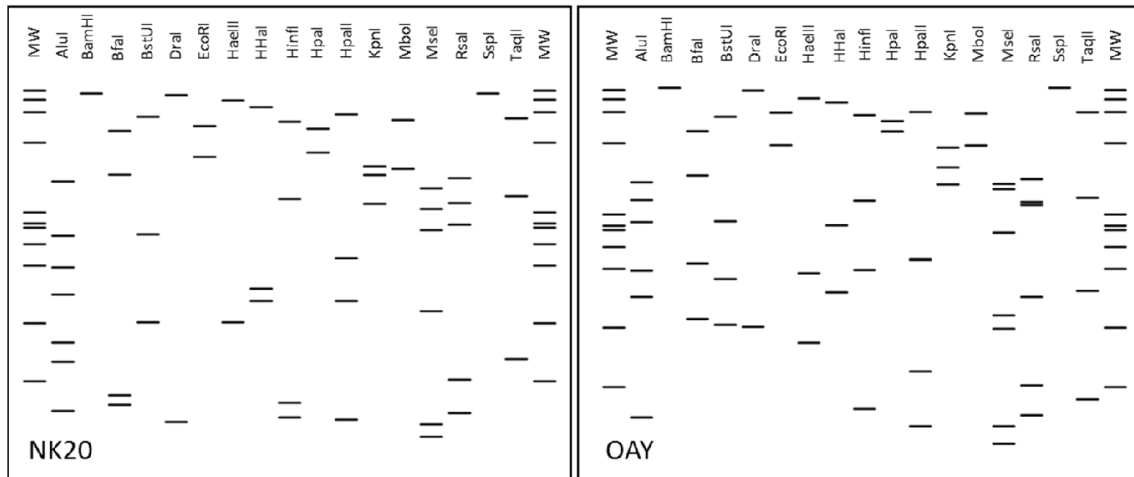
3.5.2. ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’

Za jedini izolat ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ (oznaka NK20) koji je detektiran u ovom istraživanju produkt ugniježdene PCR reakcije umnožen početnica P1A i P7A je sekvenciran primjenom četiri početnice (R16F2n, R16R2, P1A i P7A) te je određen nukleotidni slijed odsječka gena za 16Sr RNA dužine 1452 parova baza. Analizirana sekvenca imala je najveću sličnost sa 16S rRNA sekvencom fitoplazmi koje pripadaju podskupini 16SrI-B. U usporedbi sa sekvencom referentnog izolata OAY utvrđeno je 5 položaja na kojima je došlo do nukleotidne supstitucije te tri delecije (Tablica 24), a postotak identičnosti sekvence iznosio je 95,5%. U odnosu na izolat OY-M koji kao i OAY pripada podgrupi 16SrI-B pronađene su 4 nukleotidne promjene te je postotak identičnosti sekvence iznosio 99,7%. Poznata sekvenca 16S rDNA izolata ELM-ZHY i ELM-TA koji su izolirani iz vrste *Ulmus parvifolia* u Kini dužine je 1236 baznih parova. U ovom dijelu sekvence izolat NK20 razlikovao se od izolata ELM-ZHY i ELM-TA za 7 odnosno 5 nukleotida. Supstitucija na položaju 228 u 16S rDNA u izolata ELM-ZHY i ELM-TA nalazila se unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci karakterističnih za fitoplazmu ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ (Lee i sur. 2004a), no ova promjena nije utvrđena u izolata NK20. Također, ni ostale promjene u izolata NK20 u odnosu na referentni soj OAY nisu se nalazile unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci. Sadržaj G i C baznih parova analizirane sekvence uzorka NK20 iznosio je 46,45%, dok je za sekvencu referentnog izolata OAY iznosio 46,63%.

Tablica 24. Nukleotidne promjene gena za 16S rRNA izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’. Podaci o sekvencama preuzetim iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se u Tablici 7. Položaj promjena određen je u odnosu na izolat OAY. Točkice (.) označavaju identične nukleotide, crtice (-) označavaju deleciju, a upitnik (?) položaje koji nisu poznati. Crveno označena promjena nalazi se unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ (Lee i sur. 2004a).

Oznaka	Promjene u nukleotidnom slijedu gena za 16 S rRNA																					
	99	124	137	182	210	211	228	301	452	475	584	598	668	898	1002	1113	1209	1251	1303	1350	1413	1424
OAY	C	G	G	A	G	C	G	A	G	G	G	A	C	A	T	A	G	G	T	C	C	G
OY-M	.	.	.	G	-	-	.	.	T	-	T	.
AY-WB	.	.	T	.	T	T	.	.	-	-	T	.	T	.	.	G	.	A	.	-	.	A
ELM-ZHY	?	?	T	.	-	-	.	G	T	.	C	.	.	.	C	-	?	?
ELM-TA	?	?	T	.	-	-	.	G	T	-	?	?
NK20	T	.	.	G	-	-	.	.	T	G	.	.	A	.	.	-	.	.

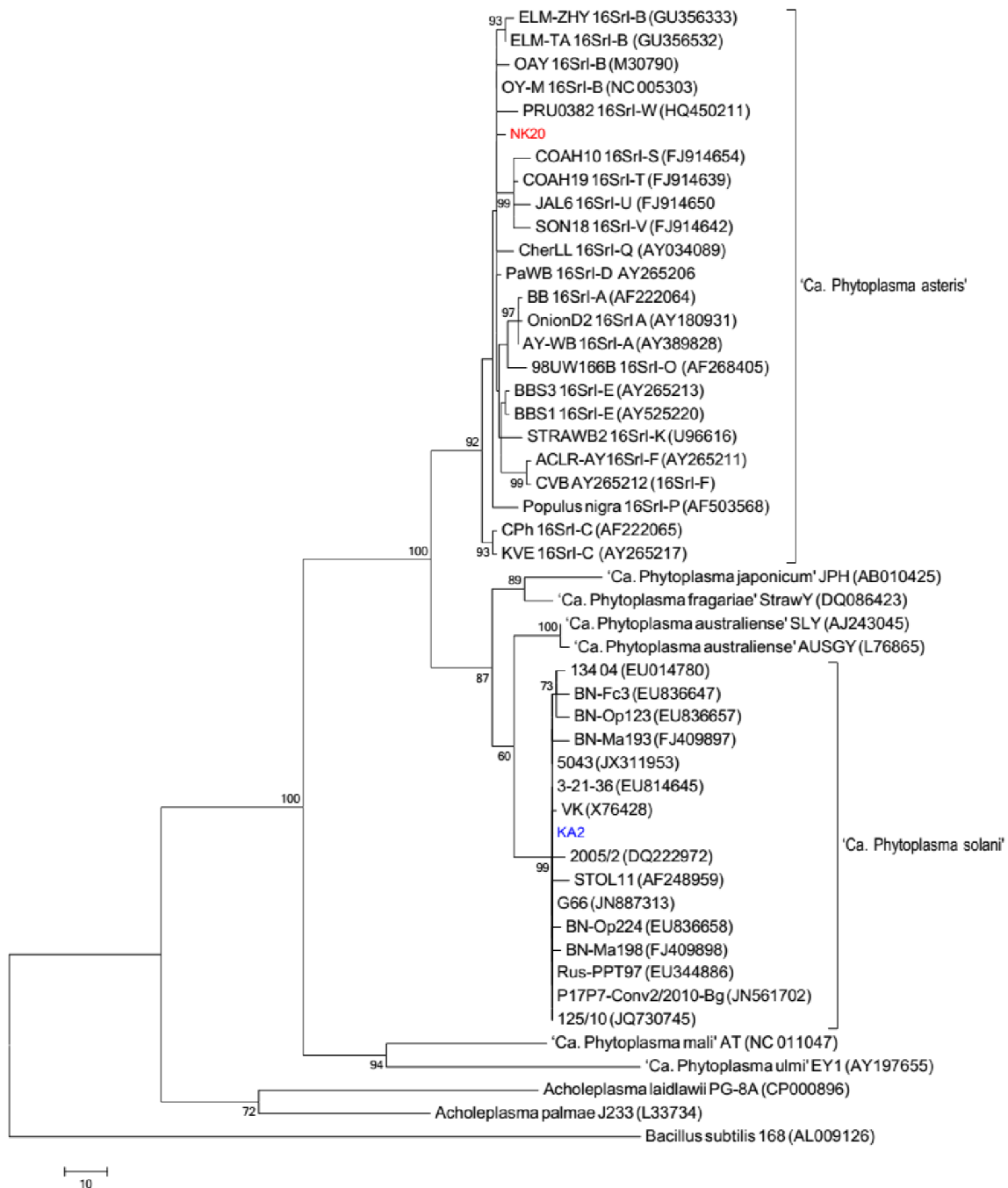
Primjena *in silico* restrikcijske analize pokazala je razliku u virtualnom RFLP obrascu za enzim *AluI* izolata NK20 u odnosu na sve do sad opisane izolate 16SrI podskupine. Opažena razlika rezultat je supstitucije A u G na položaju 898 uslijed koje je nastalo dodatno restrikcijsko mjesto za enzim *AluI*. Kao i na temelju analize nukleotidne sekvence gena za 16S rRNA, izolat NK20 imao je najveću sličnost s 16SrI-B podskupinom u odnosu na koju se razlikovao samo na temelju restrikcijskog obrasca za enzim *AluI* (Slika 18), dok se u odnosu na ostale izolate 16SrI podskupine razlikovao u restrikcijskom obrascu za dva ili više enzima. Međutim, koeficijent sličnosti virtualnih RFLP obrazaca (F) između izolata NK20 i fitoplazmi koje pripadaju 16SrI-B podskupini iznosio je 0,97, što je granična vrijednost za opis nove podskupine (Wei i sur. 2008b, Zhao i sur. 2010) te bi izolat NK20 mogao predstavljati novu podskupinu unutar 16SrI skupine fitoplazmi.



Slika 18. Virtualni RFLP obrasci djelomične sekvence 16S rRNA (1,2 kb) izolata NK20 i referentnog izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ OAY i dobiveni restrikcijskim enzimima *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI* (*Sau3AI*), *RsaI*, *SspI* i *TaqI*. MW: standard duljine odsječaka *Phi-X174 Hae III digest*.

3.5.3. Filogenetski odnosi izolata fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ i ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’

Filogenetska analiza na temelju djelomične sekvence gena za 16S rRNA (Slika 19) pokazala je grupiranje izolata KA2 zajedno s ostalim izolatima fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ te grupiranje izolata NK20 zajedno s ostalim izolatima fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’. Obje vrste fitoplazmi predstavljale su jasno odvojenu filogenetsku skupinu, međutim zbog male varijabilnosti ovog genskog lokusa filogenetski odnosi unutar tih skupine nisu se mogli jasno razlučiti, osobito za fitoplazmu ‘*Ca. Phytoplasma solani*’. Unutar filogenetske skupine koju su činili izolati fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ vidljivo je odvajanje izolata pojedinih podskupina te najveća srodnost izolata NK20 s izolatima 16SrI-B podskupine. Filogenetska analiza na temelju dodatnih, varijabilnijih genskih lokusa mogla bi preciznije pokazati položaj izolata KA2 i NK20 i dati bolji uvid u filogenetske odnose izolata ‘*Ca. Phytoplasma solani*’ te izolata ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’.



Slika 19. Filogenetsko stablo dobiveno analizom djelomične sekvence gena za 16S rRNA primjenom metode najveće štedljivosti (Maximum Parsimony). Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI) prikazani su u zagradi. Kao vanjska skupina korištena je 16S rDNA sekvenca vrste *Bacillus subtilis*. Na desnoj strani označeno je grupiranje 16S rDNA sekvenci izolata '*Candidatus Phytospasma asteris*' i '*Candidatus Phytospasma solani*'. Izolati detektirani u ovom istraživanju označeni su crvenom i plavom bojom. Dužina grana proporcionalna je broju promjena (bar = 10 promjena). Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja, prikazane su samo vrijednosti veće od 50%.

4. Rasprava

Provedeno istraživanje pokazalo je prisutnost i veliku gensku raznolikost fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’, uzročnika bolesti žućenja brijesta, u Hrvatskoj. Na istraživanim lokalitetima uz prisutnost fitoplazme ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ dokazana je i prisutnost gljive *Ophiostoma novo-ulmi*, uzročnika holandske bolesti brijesta. Fitoplazma ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ te fitopatogena gljiva *O. novo-ulmi* uzrokuju vrlo intenzivno sušenje brijesta (*Ulmus* sp.) u Sjevernoj Americi i Europi (Lee i sur. 2004b, Brasier i Kirk 2010). Poznato je da se holandska bolest brijesta pojavila u Hrvatskoj približno u isto vrijeme kada se proširila i u drugim dijelovima Europe te da je i danas prisutna (Škorić 1943, Spaić 1955, Glavaš 1999, Hrašovec 2013), iako uzročnik bolesti nije detaljno istražen. Međutim, pojava fitoplazmoze brijesta nije do sada istraživana, stoga ovo istraživanje predstavlja prvi dokaz prisutnosti fitoplazmoze brijesta u Hrvatskoj. Najznačajniji uzročnik fitoplazmoze brijesta bila je fitoplazma ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ koja je detektirana u 62 od 64 zaražena stabla brijesta (Tablica 8). To je bilo i očekivano obzirom da je ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ najznačajniji uzročnik fitoplazmoze brijesta i u drugim do sad istraženim područjima Europe (Mäurer i sur. 1993, Marcone i sur. 1997, Boudon-Padieu i sur. 2004, Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2011). Međutim, fitoplazma ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ nije bila jedina identificirana fitoplazma u analiziranim uzorcima brijesta. Na istraživanom području detektirana je i zaraza brijesta fitoplazmom ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ te fitoplazmom ‘*Ca. Phytoplasma solani*’, iako je učestalost zaraza ovim fitoplazmama bila niska. Fitoplazma ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ detektirana je u jednom uzorku nizinskog brijesta, dok je ‘*Ca. Phytoplasma solani*’ detektirana u jednom uzorku gorskog brijesta.

Sušenje brijesta zbog širenja holandske bolesti u Hrvatskoj je prvi puta zabilježeno 1929. godine na području Slavonije za vrijeme trajanja prve panfitocije koju je uzrokovala gljiva *O. ulmi* (Škorić 1943, Spaić 1955, Glavaš 1999, Brasier i Buck 2001). Druga panfitocija, koja još uvijek traje, uzrokovana je virulentnijom vrstom *O. novo-ulmi*. Gljiva *O. novo-ulmi* je već 1980.-ih godina bila rasprostranjena na području Hrvatske, iako je u to vrijeme još uvijek bila prisutna i vrsta *O. ulmi* (Brasier i Kirk 2001). Provedeno istraživanje nije pokazalo prisutnost vrste *O. ulmi*. Za nekoliko izolata utvrđeno je odstupanje od karakterističnih vrijednosti rasta pri 20°C ili pri 33°C, no kombinacija analize rasta pri 20°C i pri 33°C te analize morfologije ukazuje da svi izolati detektirani u ovom istraživanju pripadaju vrsti *Ophiostoma novo-ulmi* (Tablica 10, Slika 1). Na temelju navedenog može se pretpostaviti da je do danas virulentniji

patogen, vrsta *O. novo-ulmi*, u potpunosti istisnuo manje virulentnu vrstu *O. ulmi* na ovom području. Slična situacija utvrđena je i u drugim Europskim zemljama. Svi izolati prikupljeni na području Švicarske u periodu od 1979. do 1994. pripadali su vrsti *O. novo-ulmi* (Hoegger i sur. 1996), kao i svi izolati s područja Italije koje su analizirali Santini i sur. (2005) te svi izolati iz Češke koje su analizirali Dvořák i sur. (2007) dok je samo 6 od 106 izolata iz Španjolske koje su analizirali Solla i sur. (2008) pripadalo vrsti *O. ulmi*. Sukcesivna zamjena jednog patogena drugim odvijala se brzinom od približno 10% godišnje i vjerojatno je posljedica antagonizma dviju vrsta, razlike u virulentnosti, ali i činjenice da je *O. novo-ulmi* vjerojatno bolje prilagođena umjerenom klimatskom području (Brasier i Buck 2001). Prema Brasier i Kirk (2001) u Hrvatskoj je u najvećoj mjeri zastupljena podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, iako je zabilježena i podvrsta *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, no kako se radi o starijim podacima, zastupljenost podvrsta u Hrvatskoj trebalo bi ponovo istražiti. Analizom morfologije izolata nije moguće precizno odrediti podvrstu *O. novo-ulmi*. Kako cilj ovog znanstvenog istraživanja nije bila karakterizacija uzročnika holandske bolesti brijesta, već samo detekcija uzročnika bolesti kako bi se mogao ustanoviti doprinos gljive *O. novo-ulmi* simptomima zaraze i razlučiti utjecaj fitoplazmi od utjecaja gljive na domaćina, u ovo istraživanje nisu uključene dodatne metode koje bi omogućile determinaciju podvrsta *O. novo-ulmi*. Dostupni podaci ukazuju da se na području Hrvatske preklapaju areali dvaju podvrsta (Brasier i Buck 2001, Brasier i Kirk 2001). Obzirom da je pojava hibridizacije podvrsta te širenje fertilnih hibrida zabilježeno na područjima gdje se njihovi areali preklapaju (Konrad i sur. 2002, Santini i sur. 2005, Solla i sur. 2008, Brasier i Kirk 2010), može se pretpostaviti da je do hibridizacije došlo i na području Hrvatske. U ovom istraživanju holandska bolest brijesta detektirana je na 5 od 6 analiziranih lokaliteta u ukupno 55 od 139 analiziranih uzoraka, (Tablica 10), odnosno gotovo 40% analiziranih stabala bilo je zaraženo ovim patogenom. Na lokalitetima Nova Kapela, Đurđevačka Bilogora, Kalnik i Jastrebarsko patogen je bio zastupljen u većem broju analiziranih stabala, dok je na lokalitetu Cetina pronađeno samo jedno zaraženo stablo. Međutim, kako je patogen ipak prisutan na lokalitetu Cetina, postoji mogućnost da će se proširiti kroz populaciju. Također, utvrđen je značajan utjecaj bolesti, osobito na nizinski i gorski brijest (Tablica 13, Slika 9). Hrašovec (2013) ističe da je tijekom 2013. zabilježena povećana aktivnost potkornjaka te intenzivnije sušenje brijesta u hrvatskim šumama. Navedeno ukazuje na potrebu detaljnije karakterizacije patogena na molekularnom nivou te utvrđivanje prisutnosti i zastupljenosti pojedinih podvrsta te prisutnosti i zastupljenosti njihovih hibrida.

Učestalost zaraze fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' i gljivom *O. novo-ulmi* razlikovala se ovisno o vrsti brijesta. Učestalost zaraze brijesta veza fitoplazmom '*Ca. phytoplasma ulmi*' bila je znatno veća u odnosu na nizinski brijest, dok u gorskog brijesta zaraza ovim patogenom nije dokazana (Tablica 8 i 9). Za razliku od toga, gljiva *O. novo-ulmi* znatno je češće zaražavala nizinski i gorski brijest u usporedbi s brijestom vezom (Tablica 10 i 11). Zaraza nizinskog brijesta fitoplazmom '*Ca. phytoplasma ulmi*' opažena je u dosadašnjim istraživanjima na području Europe (Lee i sur. 1993, Mäurer i sur. 1993, Marcone i sur. 1997, Griffiths i sur. 1999, Baudon-Padieu i sur. 2004, Carraro i sur. 2004, Arnaud i sur. 2007, Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2011). Prilikom opisa vrste '*Ca. phytoplasma ulmi*' analizirani su izolati koji su zaražavali nizinski brijest na području Italije (Lee i sur. 2004b). Također, zaražena stabla gorskog brijesta utvrđena su u Njemačkoj i Francuskoj (Mäurer i sur. 1993, Mittempergher 2000, Arnaud i sur. 2007). U pojedinim dosadašnjim istraživanjima analiziran je i određen broj stabala koja nisu pokazivala simptome bolesti. Jović i sur. (2011) dokazali su zarazu fitoplazmama u 11 stabala nizinskog brijesta i 14 stabala brijesta veza te su u istraživanje uključili i četiri stabla nizinskog brijesta koja nisu pokazivala simptome zaraze kao kontrolu. Međutim, na istraživanim lokalitetima Jović i sur. (2011) uzorkovali su samo simptomatična stabla pri čemu ne navode jesu li na tim lokalitetima uočena i stabala koja nisu pokazivala simptome zaraze, a kontrolna, nesimptomatična stabla nisu se nalazila na istom lokalitetu gdje je zaraza fitoplazmama detektirana. Boudon-Padieu i sur. (2004) analizirali su stabala nizinskog i gorskog brijesta u umjetnim i prirodnim populacijama koja nisu pokazivala simptome te u tim stablima nisu detektirali fitoplazme, no u drugim istraživanjima dokazana je mogućnost izostanaka specifičnih simptoma uslijed zaraze fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' te pojave potpuno asimptomatskih zaraza ovom fitoplazmom kod prirodno i eksperimentalno zaraženih stabala europskih i azijskih vrsta brijesta te različitih hibrida (Braun i Sinclair 1979, Mittempergher 2000, Sinclair i sur. 2000, Carraro i sur. 2004). U ovom istraživanju zaraza fitoplazmama dokazana je u značajnom udjelu stabala brijesta veza koja nisu pokazivala simptome žućenja i opadanja listova. Od 53 stabla koja su bila zaražena samo fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*', čak 32 stabla nisu pokazivala vidljive simptome zaraze (Tablica 12). Navedeno ukazuje da je za utvrđivanje zastupljenosti fitoplazmi brijesta na nekom području važno analizirati i stabla koja ne pokazuju jasne simptome bolesti. Razlika u učestalosti zaraze fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' može se povezati s različitim čimbenicima. Moguće je da postoje razlike u osjetljivosti istraživanih vrsta brijesta (Mittempergher 2000), no na širenje zaraze ne utječe samo osjetljivost domaćina, već vrlo značajnu ulogu ima i životni ciklus vektora. Iako su mogući i drugi načini prijenosa (Lee i sur. 2000), najznačajniju ulogu u prijenosu fitoplazmi

imaju kukci (red *Hemiptera*) koji se hrane floemskim sokom (Weintraub i Beanland 2006). Vrsta *Macropsis mendax* potvrđeni je vektor fitoplazmi brijesta u Italiji (Carraro i sur. 2004), ali bi i druge vrste kukaca, kao što su *Hyalesthes luteipes*, *Philenus spumarium*, *Allygus atomarius* mogle biti vektori fitoplazmi brijesta u Europi (Jović i sur. 2009, Navrátil i sur. 2009). Nije poznato koje su vrste kukaca odgovorne za širenje fitoplazmoze brijesta u Hrvatskoj, ali velika zastupljenost fitoplazmi brijesta ukazuje na prisutnost učinkovitog vektora. Istraživanja potencijalnih vektora fitoplazmi brijesta u Hrvatskoj, njihove rasprostranjenosti te dinamike hranjenja na pojedinim vrstama brijesta mogla bi doprinijeti razumijevanju opaženih razlika u učestalosti zaraze kod nizinskog, gorskog i brijesta veza. Upravo specifičnost vektora prema domaćinu može objasniti opaženu razliku u učestalosti zaraze gljivom *O. novo-ulmi*. Potkornjaci *Scolytus scolytus* i *S. multistriatus* koji su najznačajniji vektori gljive *O. novo-ulmi* u Europi i kod nas (Glavaš 1999, Hrašovec 2013) preferiraju nizinski brijest u usporedbi s gorskim i brijestom vezom (Webber 1990, 2004, Pajares 2004). Na lokalitetu Kalnik prisutan je samo gorski brijest, međutim na ostalim lokalitetima gdje je zabilježena holandska bolest zajedno su rasla stabla nizinskog i brijesta veza. Vjerojatno je češće razmnožavanje i hranjenje potkornjaka na stablima nizinskog brijesta rezultiralo većim stupnjem zaraze ove vrste. Pri tumačenju razlika u učestalosti zaraze pojedinim patogenom brijesta treba uzeti u obzir i mogućnost njihove međusobne interakcije. Zastupljenost fitoplazme ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ i gljive *O. novo-ulmi* na istom području te postojanje miješane zaraze ovim patogenima dokazano je u provedenom istraživanju. Ukupno su 6 stabala brijesta veza i 2 stabla nizinskog brijesta bila zaražena i jednim i drugim patogenom na dva analizirana lokaliteta, Đurđevačka Bilogora i Jastrebarsko (Tablica 12). Iako se radi o vrlo značajnim patogenima brijesta, njihova interakcija nije istražena. Europske vrste brijesta osjetljivije su na zarazu gljivom *O. novo-ulmi* nego fitoplazmom ‘*Ca. phytoplasma ulmi*’, što je potvrđeno i ovim istraživanjem (Slika 9). U najjednostavnijem slučaju, kod europskih vrsta brijesta zaraza virulentnijim patogenom, gljivom *O. novo-ulmi*, mogla bi uzrokovati brzo sušenje i odumiranje stabla prije nego što koncentracija fitoplazmi dosegne razinu detekcije PCR reakcijom. S druge strane, mogle bi postojati i složene interakcije ova dva patogena. Dokazane su brojne promjene na fiziološkom i molekularnom nivou uslijed zaraze gljivom *O. novo-ulmi* kod različitih vrsta brijesta i hibrida koji pokazuju različit stupanj osjetljivosti na holandsku bolest brijesta (Aoun i sur. 2009, 2010, Oliveira i sur. 2012, Đurković i sur. 2014). Također, u literaturi je opisan vrlo širok raspon utjecaja različitih fitoplazmi na zaražene biljke (Hogenhout i sur. 2008, Musetti 2010, Sugio i sur. 2011b), uključujući i izolat fitoplazme ‘*Ca.*

Phytoplasma ulmi' (izolat EY-C) na vrstu *Catharantus roseus* u *in vitro* uvjetima (Ćurković Perica i sur. 2007, Leljak-Levanić i sur. 2010).

Razlika u intenzitetu simptoma koji su opaženi na stablima zaraženim fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma ulmi' i stablima zaraženim gljivom *O. novo-ulmi* ukazuje da holandska bolest brijesta predstavlja znatno veću prijetnju populacijama brijesta u Hrvatskoj. Gljiva *O. novo-ulmi* uzrokovala je pojavu simptoma u svih zaraženih stabala nizinskog, gorskog i brijesta veza (Tablica 12). Iako se intenzitet simptoma kod pojedine vrsta brijesta uzrokovan gljivom *O. novo-ulmi* nije razlikovao (Slika 9), uzimajući u obzir učestalost zaraze (Tablica 11) može se zaključiti da ova bolest u Hrvatskoj ima najveći utjecaj na nizinski i gorski brijest. Intenzivno sušenje nizinskog brijesta povezano s holandskom bolesti koje je utjecalo na sastav i strukturu nizinskih šuma u Hrvatskoj opaženo je i u prethodnim istraživanjima (Špiranec 1971, Stojković 1995, Zebec i sur. 2010). Za razliku od toga, gorski brijest nije bio zaražen fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma ulmi', broj zaraženih stabala nizinskog brijesta bio je relativno mali, a više od pola zaraženih stabla brijesta veza nije bilo simptomatično u trenutku uzorkovanja te intenzitet simptoma brijesta veza povezan s zarazom 'Ca. Phytoplasma ulmi' nije bio statistički značajan. Intenzitet simptoma uzrokovan miješanom zarazom bio je jednak intenzitetu simptoma koji je uzrokovala gljiva *O. novo-ulmi*, što podržava zaključak da je *O. novo-ulmi* znatno jači patogen europskih vrsta brijesta u usporedbi s 'Ca. Phytoplasma ulmi'. Ovakvi rezultati ukazuju da fitoplazmoza brijesta ne predstavlja značajan problem u Hrvatskoj. Međutim, ne može se zanemariti velika zastupljenost ovog patogena. Fitoplazma 'Ca. Phytoplasma ulmi' detektirana je na svim analiziranim lokalitetima, osim na lokalitetu Kalnik gdje je bio zastupljen samo gorski brijest, dok se udio zaraženih stabala brijesta veza kretao u rasponu od 50% na lokalitetu Nova Kapela do čak 100% na lokalitetu Đurđevačka Bilogora (Tablica 8). Do sličnog zaključka došao je Mittempergher (2000), koji navodi da bolest žućenja brijesta ne predstavljaju značajnu prijetnju za native populacije brijesta u Italiji, ali je patogen prisutan te postoji mogućnost širenja u slučaju unosa osjetljive biljne vrste. Osim toga, zaraza fitoplazmama može oslabiti stablo i učiniti ga podložnijim drugim negativnim okolišnim čimbenicima (Sinclair i Griffiths 1994, Mittempergher 2000). Braun i Sinclair i sur. (1979) utvrdili su da se simptomi na listovima u brijesta veza uočavaju tijekom prve dvije godine nakon eksperimentalnog zaražavanja fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma ulmi', nakon čega ne dolazi do pojave simptoma na listovima, ali stablo zakržlja. Također, zaraza brijesta veza fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma ulmi' u prirodi može biti praćena sporijim rastom i razvojem stabala (Mittempergher 2000). Rezultati ovog istraživanja te istraživanja drugih znanstvenih grupa ukazuju na potrebu

višegodišnjeg praćenja utjecaja zaraze fitoplazmama i gljivom *O. novo-ulmi* na razvoj simptoma i učestalost odumiranja zaraženih stabala. Višegodišnja istraživanja omogućila bi bolju procjenu utjecaja fitoplazmi na populacije brijesta u Hrvatskoj.

Glavni cilj ovog istraživanja bila je molekularna karakterizacija izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. U istraživanju je primijenjen multigeniski pristup koji je obuhvatio analizu gena za 16S rRNA, gena *rpl22* i *rps3* koji kodiraju ribosomske proteine L22 i S3, gena *secY* koji kodira komponentu Sec proteinskog translokacijskog sustava te genskog lokusa *secY-map* koji obuhvaća 3' kraj gena *secY* i veći dio gena *map* koji kodira metionin aminopeptidazu. Analiza gena za 16S rRNA ima velik značaj u istraživanjima fitoplazmi, kao i u istraživanjima drugih prokariota (Woese i sur. 1980, 1987, Yarza i sur. 2008, Zhao i sur. 2010) te je osnova za opis novih '*Ca. Phytoplasma*'. Međutim, kako je 16S rDNA sekvenca vrlo konzervirana, biološki i ekološki različite fitoplazme mogu imati visok stupanj sličnosti ove sekvence. Obzirom da sve fitoplazme 16SrV skupine, kojoj pripada i fitoplazma '*Ca. Phytoplasma ulmi*', imaju veliku sličnost 16S rDNA sekvence (Lee i sur. 2004b), analiza varijabilnijih genskih lokusa važna je kako bi se fitoplazme brijesta mogle razlikovati od srodnih fitoplazmi iz 16SrV skupine. Ovakav pristup korišten je i pri početnom opisu vrste '*Ca. Phytoplasma ulmi*' koja je 2004. godine opisana kao nova vrsta fitoplazmi koja zaražava brijest (*Ulmus* sp.) uz izolat EY1 kao referentni izolat (Lee i sur. 2004b). Primjena multigenске karakterizacije koja je uključila analizu gena za 16S rRNA, gena za ribosomske proteina te gena *secY*, utvrđivanje jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci unutar svih analiziranih gena te postojanje specifičnosti prema domaćinu i vektoru omogućilo je odvajanje fitoplazmi brijesta od ostalih fitoplazmi 16SrV skupine s kojima fitoplazme brijesta dijele vrlo visok stupanj sličnosti sekvence gena za 16S rRNA, veći od veću od 97,5% (Lee i sur. 2004b) što je granična vrijednost za opis nove '*Ca. Phytoplasma*' vrste (IRPCM 2004). Međutim, za utvrđivanje raznolikosti fitoplazmi brijesta važan je ne samo broj analiziranih genskih lokusa već i broj analiziranih izolata. Pri početnom opisu analizirana su samo četiri izolata fitoplazmi brijesta, izolat EY1 koji je i referentni izolat ovih fitoplazmi te tri izolata porijeklom iz Italije. Međusobna sličnost u sekvenci analiziranih gena za ova četiri izolata bila je vrlo velika (99,9% za 16SrRNA, 99,7% za ribosomalne proteine i 99,5% za *secY*) što je upućivalo na malu raznolikost unutar vrste '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (Lee i sur. 2004b). Istraživanja koja su uslijedila ukazala su na postojanje značajnih razlika u izolata koji potječu s različitih geografskih područja (Jović i sur. 2008, 2011, Navrátil i sur. 2009). U ovom istraživanju analizirana su 62 izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Dobiveni rezultati potvrđuju postojanje velike genetičke raznolikosti unutar ove skupine

fitoplazmi. Jović i sur. (2011) opisuju izolate detektirane u Srbiji kao nove sojeve ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’, a ne kao ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’-srodne sojeve, bez obzira na postojanje razlika unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci u odnosu na referentni izolat EY1, čak i u 16S rDNA sekvenci. Izraz „pripadnost“, a ne „srodnost“ vrsti ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ prihvaćena je i u ovom istraživanju.

Gen *secY* pokazao se kao najvarijabilniji genski lokus fitoplazmi brijesta, znatno varijabilniji u odnosu na ostale analizirane genske lokuse. Na temelju analize nukleotidne sekvence ovog gena određena su 24 različita genotipa (*secY*-1 do *secY*-24) pri čemu su između pojedinih genotipova postojale značajne razlike koje su uključivale ne samo nukleotidne promjene već i delecije i insercije. Vrlo je važno da delecije i insercije uočene u sekvenci gena *secY* nisu poremetile okvir čitanja. Prema tome, iako je proteinski produkt gena *secY* za određeni broj aminokiselina kraći ili duži u usporedbi s izolatom EY1, može se pretpostaviti da je i dalje funkcionalan (Tablica 18, Slika 11). Prethodna istraživanja ukazala su na veliku varijabilnost sekvence gena *secY* među različitim fitoplazmama, ali i među izolatima iste skupine fitoplazmi (Filippin i sur. 2009, Lee i sur. 2010). Istraživanja fitoplazmi brijesta također su pokazala da je među dosad analiziranim genskim lokusima gen *secY* najvarijabilniji (Lee i sur. 2004b, Jović i sur. 2011, Navrátil i sur. 2009). Najmanja varijabilnost utvrđena je za 16S rDNA sekvencu. Na temelju sekvence ovog genskog lokusa bilo je moguće razlikovati dva genotipa (16S-1 i 16S2) koji su se međusobno razlikovali samo u jednoj nukleotidnoj promjeni (Tablica 14). Mali broj 16S rDNA genotipova te male razlike između njih u skladu su sa konzerviranom prirodom 16S rDNA sekvence. Geni *rpl22* i *rps3* koji su dio operona ribosomskih proteina bili su varijabilniji nego 16S rDNA, ali znatno manje varijabilni u usporedbi s genom *secY*, što je bilo očekivano obzirom na dosadašnja istraživanja (Martini i sur. 2007). Analizom gena za ribosomske proteine određeno je 5 genotipova koji su se međusobno razlikovali u najviše tri nukleotida (Tablica 16). Genski lokus *secY-map* pokazao je nešto veću varijabilnost u odnosu na gene za ribosomske proteine, ali manju u odnosu na gen *secY*. Analizom genskog lokusa *secY-map* određeno je 7 genotipova koji su se međusobno razlikovali u najviše tri nukleotida, ali je kod dva genotipa utvrđena i delecija koja se nalazila u intergenskom području između gena *secY* i *map* (Tablica 16). Arnaud i sur. (2007) analizirali su sekvence gena *map* i *uvrB-degV* fitoplazmi iz 16SrV skupine, uključujući i američke i europske izolate ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’. Iako je njihov cilj bio određivanje filogenetskih odnosa fitoplazmi vinove loze (FD) i johe (ALY), dobiveni rezultati bili su značajni i za istraživanja fitoplazmi brijesta te je gen *map* predložen kao prikladan marker za finiju diferencijaciju ovih fitoplazmi. U istraživanju Jović i sur. (2011) u

sekvenci genskog lokusa *secY-map* utvrđeno je manje promjena nego u sekvenci gena *secY*, no broj genotipova određenih na temelju ovih genskih markera bio je jednak. Međutim, Jović i sur. (2011) odredili su nukleotidnu sekvencu samo onih izolata za koje se razlikovao RFLP obrazac gena *secY* dobiven cijepanjem restriksijskim enzimom *MseI*, dok je u ovom istraživanju određena nukleotidna sekvenca svih detektiranih izolata. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju da je gen *secY* bolji pokazatelj raznolikosti fitoplazmi brijesta u odnosu na gen *map*.

Veća varijabilnost gena *secY* u odnosu na gene za ribosomske proteine i gen *map* vidljiva je i na temelju usporedbe transliranih sekvenci. Uslijed sinonimnih mutacija usporedbom transliranih sekvenci gena za ribosomske proteine te gena *map* nije utvrđena jednaka raznolikost izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' kao usporedbom nukleotidnih sekvenci navedenih gena. Za razliku od toga, bilo je moguće razlikovati sve detektirane *secY* genotipove obzirom na transliranu *secY* sekvencu, iako je i u sekvenci ovog genskog lokusa značajan udio nukleotidnih promjena bio sinoniman.

Niti jedan izolat detektiran u ovom istraživanju nije bio identičan referentnom izolatu EY1 niti nekom od izolata koje su analizirali Lee i sur. (2004b). U sekvenci gena za 16S rRNA, ribosomske proteine i genskog lokusa *secY-map* utvrđen je veći broj promjena kada su izolati iz ovog istraživanja uspoređeni s izolatom EY1 nego kada su međusobno uspoređeni (Slike 15, 17, 21). Međutim, to nije uvijek bio slučaj kada je uspoređena sekvenca gena *secY*; pojedini izolati imali su veći postotak identičnosti sekvence s izolatom EY1 nego međusobno obzirom na sekvencu gena *secY* (Tablica 19). Ovi rezultati također ukazuju na veliku varijabilnost ovog genskog lokusa, ali i veliku raznolikost izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*'.

Lee i sur. (2004b) su pri opisu vrste definirali jedinstvene oligonukleotidne sekvence specifične za fitoplazme brijesta. Dvije takve sekvence nalaze se unutar gena za 16S rRNA, tri unutar gena za ribosomske proteine te četiri unutar gena *secY*. Međutim, u svih izolata analiziranih u ovom istraživanju pronađene su promjene unutar jedinstvenih oligonuklotidnih sekvenci, čak i u konzerviranoj sekvenci gena za 16S rRNA. Promijene jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci gena za 16S rRNA te gena za ribosomalne proteine uključivale su samo nukleotidne promjene, no u tri od četiri jedinstvene oligonuklotidne sekvence gena *secY* pronađene su opsežne promjene koje su kod nekih genotipova uključivale deleciju cijele jedinstvene oligonukleotidne sekvence (Tablica 18). Jedinstvene oligonukleotidne sekvence utvrđuju se za pojedinu '*Ca. Phytoplasma*' vrstu kako bi se upotpunio opis vrste i olakšala diferencijacija srodnih taksonomskih skupina (Firrao i sur. 2005). Prema tome, jedinstvene oligonukleotidne sekvence

trebale bi predstavljati karakteristiku vrste i olakšati identifikaciju fitoplazmi, no postojanje ovako značajnih promjena, koje su utvrđene i kod češkog izolata EYCZ1 (Navrátil i sur. 2009) te izolata iz Srbije (Jović i sur. 2008, 2011) dovodi u pitanje primjenjivost jedinstvenih oligonukletidnih sekvenci pri identifikaciji izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Jović i sur. (2011) istaknuli su potrebu za kontinuiranom evaluacijom i verifikacijom jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci te ukazali na problematiku nedovoljnog broja izolata analiziranih pri opisu '*Ca. Phytoplasma*' vrsta. Rezultati ovog istraživanja upućuju na isti zaključak. U ovom istraživanju utvrđena je velika raznolikost fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' te dodatne promjene unutar jedinstvenih oligonukleotidnih sekvenci koje nisu dokazane u istraživanju Jović i sur. (2011). Čini se da su fitoplazme brijesta široko rasprostranjena i vrlo raznolika skupina fitoplazmi na području Europe. Daljnja istraživanja koja bi utvrdila područje rasprostranjenosti fitoplazmi brijesta te njihovu raznolikost na različitim područjima rasprostranjenosti mogla bi rezultirati preciznijim opisom vrste.

Metodološki pristup koji je odabran u ovom istraživanju imao je za cilj omogućiti što bolji uvid u gensku strukturu fitoplazmi brijesta u Hrvatskoj. Ovo istraživanje obuhvatilo je do sad najveći ukupan broj izolata fitoplazmi brijesta te najveći broj izolata koji su prisutni u pojedinačnoj populaciji brijesta za koje je određena nukleotidna sekvencija četiri genska lokusa, gena za 16S rRNA, gena za ribosomske proteine, gena *secY* i genskog lokusa *secY-map*. Dosadašnja istraživanja obično su uključivala manji broj izolata i/ili analizu manjeg broja genskih lokusa ili su određene sekvence samo onih izolata koji su imali različit RFLP profil (Macone i sur. 1997, Lee i sur. 2004b, Arnaud i sur. 2007, Jović i sur. 2008, 2011, Navrátil i sur. 2009). Iako su navedena istraživanja dala velik doprinos karakterizaciji fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' te ukazala na postojanje varijabilnosti ove vrste fitoplazmi, zbog razlike u metodologiji istraživanja teško je usporediti raznolikost opaženu u ovom istraživanju s raznolikošću koja je utvrđena u prethodnim istraživanjima. Na svim lokalitetima na području Hrvatske koji su analizirani u ovom radu utvrđena je prisutnost genetičkih različitih izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Sukladno prethodno opisanoj varijabilnosti gena *secY*, genetička raznolikost izolata s istog lokaliteta u najvećoj je mjeri bila povezana s postojanjem razlika u sekvenci ovog gena, iako je ponekad razlika bila povezana i s promjenama u sekvenci genskog lokusa *secY-map*. Unutar istog lokaliteta svi izolati imali su identičnu sekvencu gena za 16S rRNA. Također, većina izolata s istog lokaliteta imala je identičnu sekvencu gena za ribosomske proteine, izuzev jednog izolata s lokaliteta Nova Kapela, jednog izolata s lokaliteta Đurđevačka Bilogora i jednog izolata s lokaliteta Cetina čija se sekvencija gena za ribosomske

proteine razlikovala u usporedbi s ostalim izolatima s istog lokaliteta. Najveći broj identičnih izolata detektiran je na lokalitetu Cetina gdje je 11 od 12 izolata bilo identično obzirom na sekvencu svih analiziranih lokusa. Usporedba izolata s različitim lokalitetima ukazuje na postojanje razlika između lokaliteta Cetina i ostalih lokaliteta. Izolati s lokaliteta Cetina razlikovali su se u odnosu na izolate s ostalih lokaliteta ne samo obzirom na najvarijabilniji genski lokus, gen *secY*, već i obzirom na manje varijabilne lokuse, gene za 16S rRNA i ribosomske proteine. Suprotno očekivanom, diferencijacija izolata s lokaliteta Cetina nije bila vidljiva na temelju genskog lokusa *secY-map* obzirom da je većina izolata imala genotip *map-1* koji je bio najzastupljeniji i na lokalitetu Đurđevačka Bilogora te prisutan na lokalitetima Donji Miholjac i Jastrebarsko. Postojanje razlika među izolatima fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' s lokaliteta Cetina i ostalih lokaliteta moglo bi biti povezano s geografskim položajem lokaliteta Cetina koji je udaljen od ostalih lokaliteta te se nalazi pod utjecajem drugačijih klimatskih uvjeta. Manja raznolikost izolata na lokalitetu Cetina mogla bi se objasniti mogućim kraćim prisustvom patogena na tom lokalitetu u usporedbi s ostalim lokalitetima, no samo na temelju rezultata ovog istraživanja teško je pretpostaviti što je ključni čimbenik koji je utjecao na opažene razlike.

Stabla nizinskog i brijesta veza uzorkovana su na lokalitetima Donji Miholjac, Nova Kapela i Jastrebarsko kao i na lokalitetu Cetina koji pripada ekstrazonalnom području rasprostranjenosti brijesta veza. Planirano je uzorkovanje približno jednakog broja stabala ovih vrsta brijesta na svakom lokalitetu kako bi se moglo istražiti postoji li razlika između izolata koji zaražavaju različite vrste brijesta na istom lokalitetu. Međutim, broj stabala nizinskog brijesta bio je manji na svakom od navedenih lokaliteta, vjerojatno zbog holandske bolesti brijesta čiji je značajan utjecaj na propadanje ove vrste potvrđen i u ovom radu. Također, u ovom istraživanju detektirana su samo tri stabla nizinskog brijesta koja su bila zaražena fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Zbog postojanja razlike kako u broju analiziranih uzoraka tako i u broju izolata teško je donijeti konačni zaključak, no izolati porijeklom iz nizinskog brijesta analizirani u ovom istraživanju nisu se razlikovali u usporedbi s izolatima porijeklom iz brijesta veza. To ukazuje da se vjerojatno izolati koji zaražavaju nizinski i brijest vez genetički ne razlikuju, što bi nadalje značilo da je isti vektor/vektori odgovoran/odgovorni za širenje zaraze u obje vrste brijesta.

Filogenetska analiza pokazala je zajedničko porijeklo izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*' detektiranih u ovom istraživanju i prethodno opisanih izolata ove vrste fitoplazmi. Pokazalo se da je učinkovitost primjene analiziranih genskih lokusa u procjeni filogenetskih odnosa izolata

'*Ca. Phytoplasma ulmi*' proporcionalna njihovoj varijabilnosti, obzirom da je najvarijabilniji gen *secY* bio i najinformativniji filogenetski parametar. Ovaj zaključak u skladu je s dosadašnjim rezultatima istraživanja kako fitoplazmi brijesta (Lee i sur. 2004b, Navrátil i sur. 2009, Jović i sur. 2011), tako i drugih fitoplazmi (Lee i sur. 2006, Filippin i sur. 2009, Lee i sur. 2010). Na temelju filogenetske analize 16S rDNA sekvence (Slika 13) može se zaključiti da su fitoplazme 16SrV skupine međusobno srodne te evolucijski odvojene od ostalih fitoplazmi. Skupina 16SrV je velika i heterogena skupina koja uključuje više različitih fitoplazmi povezanih s različitim domaćinima i vektorima (Lee i sur. 2004b). Do sada su unutar ove skupine opisane tri '*Ca. Phytoplasma*' vrste - '*Ca. Phytoplasma ziziphi*' (Jung i sur. 2003), '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (Lee i sur. 2004b) i '*Ca. Phytoplasma rubi*' (Malembic-Maher i sur. 2011). Međutim, uslijed velike sličnosti 16S rDNA sekvence, filogenetska analiza na temelju ovog genskog lokusa nije pokazala jasnu diferencijaciju različitih fitoplazmi iz 16SrV skupine (Slika 13). Iako su se izolati 16SrV-B podskupine ('*Ca. Phytoplasma ziziphi*') koji su filogenetski udaljeniji od ostalih fitoplazmi iz ove skupine odvojili kao zaseban klaster te je vidljivo i međusobno grupiranje izolata 16SrV-E podskupine ('*Ca. Phytoplasma rubi*'), grupiranje izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*' nije bilo podržano visokom vrijednošću dobivenom metodom samoučitavanja. Za razliku od toga, filogenetska analiza na temelju gena *rpl22* i *rps3*, te gena *secY* i *map* pokazala je da iako su srodne s ostalim fitoplazmama 16SrV skupine, fitoplazme brijesta predstavljaju zasebnu filogenetsku skupinu monofiletskog porijekla. Postojanje više filogenetskih linija fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' vidljivih na stablima koja su dobivena analizom gena za ribosomske proteine (Slika 14), gena *secY* (Slika 15) te genskog lokus *secY-map* (Slika 16) ukazuje na gensku raznolikost ove skupine fitoplazmi. Na veliku varijabilnost izolata detektiranih u ovom istraživanju osobito je ukazala filogenetska analiza na temelju gena *secY*. Međutim, usprkos postojanju značajnih razlika, svi izolati iz ovog istraživanja međusobno su srodni te pripadaju istoj filogenetskoj liniji označenoj kao rp-EY2 na filogenetskom stablu dobivenom na temelju gena za ribosomske proteine, secY-EY2 na filogenetskom stablu dobivenom na temelju gena za *secY* te Map-EY3 na filogenetskom stablu dobivenom na temelju genskog lokusa *secY-map*. Najveću srodnost hrvatski izolati pokazuju s izolatima iz Srbije s kojima su se zajedno grupirali unutar navedenih filogenetskih linija, dok su evolucijski udaljeniji od referentnog izolata EY1 koji pripada drugoj filogenetskoj liniji označenoj kao rp-EY1 na filogenetskom stablu dobivenom na temelju gena za ribosomske proteine, secY-EY1 na filogenetskom stablu dobivenom na temelju gena za *secY* te Map-EY1 na filogenetskom stablu dobivenom na temelju genskog lokusa *secY-map*. Obzirom da se češki izolat nije grupirao unutar opisanih filogenetskih linija '*Ca. Phytoplasma ulmi*', može se

pretpostaviti da bi raznolikost na širem području rasprostranjenosti fitoplazmi brijesta mogla biti još i veća.

Iako je analiza sekvence i zastupljenosti genotipova pokazala da su svi detektirani *secY* genotipovi, osim *secY-1*, zastupljeni samo na jednom lokalitetu (Tablica 22), filogenetska analiza na temelju gena *secY* ukazuje da ne postoji jasna diferencijacija fitoplazmi s različitim lokaliteta (Slika 15). Obzirom na analizu nukleotidnih sekvenci te zastupljenost pojedinih genotipova svih analiziranih gena, uočeno je postojanje razlike između lokaliteta Cetina i ostalih lokaliteta. Na odvajanje izolata s lokaliteta Cetina ukazuje filogenetska analiza gena za ribosomske proteine. Grupiranje izolata s lokaliteta Cetina koje ukazuje da su oni međusobno najsrodniji vidljivo je i na filogenetskom stablu koje je dobiveno analizom gena *secY* (Slika 14). Međutim, vidljiva je i njihova srodnost s izolatima s drugih lokaliteta te pripadnost istoj filogenetskoj liniji. Srodnost izolata s različitim lokaliteta istraženih u ovom radu, kao i srodnost s izolatima iz susjednih područja te njihova velika varijabilnost ukazuju da bi fitoplazme brijesta mogle biti dugo prisutne na ovom području. To ide u prilog hipotezi da su fitoplazme brijesta native na području Europe (Jović i sur. 2011). Velika raznolikost fitoplazmi brijesta u Europi uz malu virulentnost prema europskim vrstama brijesta, što bi moglo biti rezultat koevolucije domaćina i patogena, ukazuje da bi fitoplazme brijesta mogle potjecati iz Europe. Mogućnost europskog porijekla dokazana je za fitoplazme 16SrV-C i 16SrV-D koje su srodne fitoplazmama brijesta (Arnaud i sur. 2007, Filipin i sur. 2009). Daljnja karakterizacija izolata iz Europe te detaljnija karakterizacija izolata iz Sjeverne Amerike mogla bi potvrditi pretpostavku da se centar širenja fitoplazmi brijesta nalazi u Europi (Jović i sur. 2011).

Pretpostavlja se da bi nastanak novih fitoplazmoza kultiviranih biljnih vrsta mogao biti povezan s prirodnim ciklusom fitoplazmi koji uključuje divlju biljnu vrstu, manje ili više osjetljivu na zarazu fitoplazmama u koje je često zaraza asimptomatska te vektora na kojeg zaraza fitoplazmama značajno ne utječe. Uslijed unosa odgovarajućih biljnih vrsta na kojima će se postojeći vektor hraniti ili unosa nove vektorske vrste može doći do širenja prirodnog ciklusa te nastanka novih bolesti. Pri tome divlja biljna vrsta može služiti kao stalni izvor inokuluma ili može doći do potpunog izdvajanja novonastalog epidemiološkog sustava koji u konačnici može voditi ka nastanku genetički različitih sojeva fitoplazmi (Maixner 2010). Teško je pretpostaviti kolika je mogućnost da se slično dogodi i sa fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' obzirom na brojne čimbenike koji na to utječu. Kako se radi o raznolikoj skupini fitoplazmi zastupljenoj na širem području Europe, karakterizacija izolata ove fitoplazme važna je i zbog

toga što se ne može u potpunosti isključiti mogućnost širenja ciklusa fitoplazmi brijesta (Jović i sur. 2011).

Osim fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*', u ovom istraživanju detektirana je i zaraza brijesta fitoplazmama '*Ca. Phytoplasma asteris*' (16SrI skupina) i '*Ca. Phytoplasma solani*' (16SrXII-A podskupina). Obje ove vrste fitoplazmi imaju vrlo širok krug domaćina i vektora (Lee i sur. 2004a, Quaglino i sur. 2013) te su i prethodno detektirane u uzorcima brijesta, ponekad u miješanoj zarazi s '*Ca. Phytoplasma ulmi*', no njihov značajniji utjecaj na brijest u Europi nije dokazan (Lee i sur. 1995, Credi i sur. 2006). U ovom istraživanju utvrđena je niska učestalost zaraze brijesta ovim fitoplazmama. Fitoplazma '*Ca. Phytoplasma asteris*' detektirana je u jednom uzorku nizinskog brijesta s lokaliteta Nova Kapela sa simptomima žućenja listova koji su mogli biti povezani sa zarazom, dok je fitoplazma '*Ca. Phytoplasma solani*' detektirana u jednom uzorku gorskog brijesta s lokaliteta Kalnik, no to je stablo bilo zaraženo i gljivom *O. novo-ulmi* te je teško procijeniti je li na žućenje i sušenje listova koje je opaženo na ovom stablu utjecala i zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma solani*'. Analiza 16S rDNA sekvence pokazala je da se izolat '*Ca. Phytoplasma solani*' (oznaka KA2) koji je detektiran u uzorku gorskog brijesta nije razlikovao od izolata '*Ca. Phytoplasma solani*' koji su prethodno pronađeni u uzorcima kultiviranih i divljih vrsta kao što su rajčica, grašak, krumpir, vinova loza, poljski slak i crvena djetelina u različitim dijelovima Europe. Međutim, izolat '*Ca. Phytoplasma asteris*' (oznaka NK20) se razlikovao od prethodno opisanih izolata ove vrste fitoplazmi. Najveću sličnost u sekvenci gena za 16S rRNA izolat NK20 pokazivao je s izolatima 16SrI-B podskupine, no RFLP obrazac dobiven *in silico* cijepanjem 16S rDNA sekvence enzimom *AluI* razlikovao se u odnosu na RFLP obrazac 16SrI-B podskupine. Kako je koeficijent sličnosti virtualnih RFLP obrazaca (F) između izolata NK20 i izolata koje pripadaju 16SrI-B podskupini iznosio 0,97, što je granična vrijednost za opis nove podskupine (Wei i sur. 2008b, Zhao i sur. 2010), izolat NK20 bi mogao predstavljati novu podskupinu unutar 16SrI skupine fitoplazmi. Filogenetska analiza na temelju gena za 16S rRNA (Slika 19) pokazala je jasno grupiranje izolata NK20 s izolatima fitoplazme '*Ca. Phytoplasma asteris*' te grupiranje izolata KA2 s ostalim izolatima fitoplazme '*Ca. Phytoplasma solani*', no potrebna je analiza varijabilnijih genskih lokusa koja bi omogućila bolju karakterizaciju izolata iz ovog istraživanja te preciznije utvrđivanje filogenetskih odnosa unutar ovih skupina fitoplazmi. Obzirom na nisku učestalost zaraze fitoplazmama '*Ca. Phytoplasma asteris*' i '*Ca. Phytoplasma solani*', moguće je da se radi o sporadičnoj zarazi povezanoj s polifagnim vektorom koji se povremeno hrani na brijestu, no postojanje razlika između izolata '*Ca. Phytoplasma asteris*' koji zaražavaju brijest u

Hrvatskoj i ostalih izolata ove skupine fitoplazmi moglo bi biti značajno. Potrebna su dodatna istraživanja koja bi pokazala mogućnost širenja fitoplazmi '*Ca. Phytoplasma asteris*' i '*Ca. Phytoplasma solani*' u populacijama brijesta u Hrvatskoj.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da područje rasprostranjenosti fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' obuhvaća i Hrvatsku, što do sad nije bilo poznato te je utvrđeno da je od tri vrste brijesta koje su prirodno rasprostranjene na području Hrvatske brijest vez najčešće zaražen ovom fitoplazmom. Nadalje, molekularna karakterizacija gena za 16S rRNA, gena za ribosomske proteine te gena *secY* i *map* izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' s područja Hrvatske dala je nove spoznaje o raznolikosti ovog značajnog patogena brijesta. Uz fitoplazmu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' detektiran je i jedan izolat fitoplazme '*Ca. Phytoplasma asteris*' u uzorku nizinskog brijesta i jedan izolat fitoplazme '*Ca. Phytoplasma solani*' u uzorku gorskog brijesta te je potvrđena prisutnost holandske bolesti uzrokovane gljivom *O. novo-ulmi* i po prvi puta je opisana pojava miješane zaraze uzrokovane fitoplazmama i gljivom *O. novo-ulmi*. Velik udio analiziranih stabala brijesta bio je simptomatičan što ukazuje na loše zdravstveno stanje brijesta u Hrvatskoj. Iako je tome u većoj mjeri doprinijela zaraza gljivom *O. novo-ulmi*, nego zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' potrebna su daljnja istraživanja i jednog i drugog patogena pojedinačno kao i njihovog zajedničkog utjecaja na brijest u Hrvatskoj.

5. Zaključci

- Fitoplazma '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' prisutna je i široko rasprostranjena na području Hrvatske. Učestalost zaraze ovom fitoplazmom razlikuje se ovisno o vrsti brijesta te je znatno veća za brijest vez (*Ulmus laevis* Pall.) u odnosu na nizinski brijest (*U. minor* Mill. sensu latissimo), dok u gorskog brijesta (*U. glabra* Huds.) zaraza ovom fitoplazmom nije detektirana.
- Osim fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*', brijest u Hrvatskoj zaražavaju i fitoplazma '*Ca. Phytoplasma solani*' te fitoplazma '*Ca. Phytoplasma asteris*', no učestalost zaraze ovim fitoplazmama je niska; fitoplazma '*Ca. Phytoplasma solani*' detektirana je u jednom uzorku gorskog brijesta, a detektirani izolat je obzirom na 16S rRNA sekvencu bio identičan izolatima koji zaražavaju veći broj kultiviranih i divljih vrsta na području Europe; fitoplazma '*Ca. Phytoplasma asteris*' detektirana je u jednom uzorku nizinskog brijesta, a detektirani izolat bi mogao predstavljati novu podskupinu 16SrI skupine fitoplazmi.
- Holandska bolest brijesta na području Hrvatske je uzrokovana virulentnijim uzročnikom, gljivom *Ophiostoma novo-ulmi*, dok prisutnost manje virulentnog uzročnika, vrste *O. ulmi*, nije utvrđena. Učestalost zaraze gljivom *O. novo-ulmi* razlikuje se ovisno o vrsti brijesta te je veća za nizinski (*U. minor* Mill. sensu latissimo) i gorski brijest (*U. glabra* Huds.) nego za brijest vez (*U. laevis* Pall.).
- Fitoplazme i fitopatogene gljive mogu istovremeno zaražavati brijest; miješana zaraza fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' i gljivom *O. novo-ulmi* utvrđena je za šest stabala brijesta veza (*U. laevis* Pall.) te dva stabla nizinskog brijesta (*U. minor* Mill. sensu latissimo); fitoplazma '*Ca. Phytoplasma solani*' bila je prisutna u miješanoj zarazi s gljivom *O. novo-ulmi*.
- Holandska bolest brijesta predstavlja veću prijetnju populacijama brijesta u Hrvatskoj; zaraza gljivom *O. novo-ulmi* uvijek je povezana s pojavom simptoma bolesti, dok zaraza brijesta fitoplazmom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' može biti asimptomatska.

- Izolati fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' predstavljaju monofiletsku skupinu velike raznolikosti unutar koje je moguće razlikovati više filogenetskih linija; izolati s područja Hrvatske pokazuju veliku varijabilnost, ali su međusobno srodni te pripadaju istoj filogenetskoj liniji ove skupine fitoplazmi; jasna diferencijacija izolata s različitih lokaliteta u Hrvatskoj te diferencijacija izolata koji zaražavaju različite vrste brijesta nije utvrđena.
- Od četiri analizirana genska lokusa, gena za 16S rRNA, dijela operona ribosomskih proteina koji obuhvaća djelomičnu sekvencu gena *rpl22* i cijelu sekvencu gena *rps3* koji kodiraju ribosomke proteine L22 i S3, gena *secY* koji kodira komponentu Sec proteinskog translokacijskog sustava te gena *map* koji kodira metionin aminopeptidazu, najbolji pokazatelj raznolikosti fitoplazmi brijesta je gen *secY*.

6. Literatura

1. Aguilar ML, Espadas F, Maust B, Sáenz L (2009) Endogenous cytokinin content in coconut palms affected by lethal yellowing. *Journal of Plant Pathology* 91: 141-146
2. Andersen MT, Liefting LW, Havukkala I, Beever, RE (2013) Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ reveals genome plasticity. *BMC Genomics* 14: 529. doi:10.1186/1471-2164-14-529
3. Angelini E, Clair D, Borgo M, Bertaccini A, Boudon-Padieu E (2001) Flavescence dorée in France and Italy-Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40: 79-86.
4. Aoun M, Jacobi V, Boyle B, Bernier L (2010) Identification and monitoring of *Ulmus americana* transcripts during in vitro interactions with the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 254-266
5. Aoun M, Rioux D, Simard M, Bernier L (2009) Fungal colonization and host defense reactions in *Ulmus americana* callus cultures inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi*. *Phytopathology* 99: 642-650
6. Armstrong JV, Sell PD (1996) A revision of the British elms (*Ulmus* L, Ulmaceae): the historical background. *Botanical Journal of the Linnean Society* 120: 39-50
7. Arnaud G, Malembic-Maher S, Salar P, Bonnet P, Maixner M, Marcone C, Boudon-Padieu E, Foissac X (2007) Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4001-4010
8. Bai X, Correa VR, Toruño TY, Ammar ED, Kamoun S, Hogenhout SA (2009) AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 18-30
9. Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA (2006) Living with genome

- instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188: 3682-3696
10. Baric S, Berger J, Cainelli C, Kerschbamer C, Letschka T, Dalla Via J (2011) Seasonal colonisation of apple trees by '*Candidatus Phytoplasma mali*' revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. *European Journal of Plant Pathology* 129: 455-467
 11. Beanland L, Hoy CW, Miller SA, Nault LR (2000) Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93: 271-276
 12. Bertaccini A, Duduk B, Paltrinieri S, Contaldo N (2014) Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5: 1763-1788
 13. Bertelli E, Tegli S, Sfalanga A, Surico G (2002) Detection of phytoplasma DNA in flowers and seeds from elm trees infected with Elm Yellows. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 259-265
 14. Boonrod K, Munteanu B, Jarausch B, Jarausch W, Krczal G (2012) An immunodominant membrane protein (Imp) of '*Candidatus Phytoplasma mali*' binds to plant actin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 889-895
 15. Boudon-Padieu E, Larrue J, Clair D, Hourdel J, Jeanneau A, Collin E, Sforza R (2004) Detection and prophylaxis of Elm Yellows phytoplasma in France. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 13: 71-80
 16. Brasier CM (1981) Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. U: Stipes RJ, Campana RJ (ur.) *Compendium of elm diseases*. Str. 76-79 American Phytopathological Society
 17. Brasier CM (1986) Comparison of pathogenicity and cultural characteristics in the EAN and NAN aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi*. *Transactions of the British Mycological Society* 87: 1-13
 18. Brasier CM (1990) China and the origins of Dutch elm disease: an appraisal. *Plant Pathology* 39: 5-16
 19. Brasier CM (1991) *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115: 151-161

20. Brasier CM, Buck KW (2001) Rapid evolutionary changes in a globally invading fungal pathogen (Dutch elm disease). *Biological Invasions* 3: 223-233
21. Brasier CM, Kirk SA (2001) Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycological Research* 105: 547-554
22. Brasier CM, Kirk SA (2010) Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. *Plant Pathology* 59: 186-199
23. Brasier CM, Kirk SA, Pipe ND, Buck KW (1998) Rare interspecific hybrids in natural populations of the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycological Research* 102: 45-57
24. Brasier CM, Mehrotra MD (1995) *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycological Research* 99: 205-215
25. Brasier CM, Webber JF (1987) Positive correlations between in vitro growth rate and pathogenesis in *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology* 36: 462-466
26. Braun EJ, Sinclair WA (1976) Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. *Phytopathology* 66: 598-607
27. Braun EJ, Sinclair WA (1979) Phloem necrosis of elms: symptoms and histopathological observations in tolerant hosts. *Phytopathology* 69: 354-358
28. Bressan A, Clair D, Sémétey O, Boudon-Padieu É (2005) Effect of two strains of Flavescence dorée phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 144-149
29. Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM (2007) Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2703-2719
30. Carraro L, Loi N, 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

31. Carraro L, Ferrini F, Ermacora P, Loi N, Martini M, Osler R (2004) *Macropsis mendax* as a vector of elm yellows phytoplasma of *Ulmus* species. *Plant Pathology* 53: 90-95
32. Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10: 526-535
33. Chung WC, Chen LL, Lo WS, Lin, C P, & Kuo, C H (2013) Comparative analysis of the peanut witches'-broom phytoplasma genome reveals horizontal transfer of potential mobile units and effectors. *PLoS ONE* 8: e62770. doi:10.1371/journal.pone.0062770
34. Collin, E. (2002). Strategies and guidelines for the conservation of the genetic resources of *Ulmus* spp. U: Turok J, Eriksson G, Russel K (ur) Noble Hardwoods Network: Report of the Fourth Meeting, 4-6 September 1999, Gmunden, Austria and the Fifth Meeting, 17-19 May 2001, Blessington, Ireland. Bioersivity International, str. 50-67
35. Contaldo N, Bertaccini A, Paltrinieri S, Windsor HM, Windsor GD (2012) Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 607-617
36. Cordova I, Jones P, Harrison NA, Oropeza C (2003) In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology* 4: 99-108
37. Credi R, Terlizzi, F Milanesi L, Bondavalli R, Cavallini G, Montermini A, Dradi D (2006) Wild host plants of stolbur phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of grapevine Bois noir occurrence in Emilia-Romagna, Italy. U: *Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa* (pp 3-7)
38. Ćurković Perica M, Lepeduš H, Šeruga Musić M (2007) Effect of indole-3-butyric acid on phytoplasmas in infected *Catharanthus roseus* shoots grown *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* 268: 171-177
39. Daire X, Clair D, Reinert W, Boudon-Padieu E (1997) Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103: 507-514
40. Davis RE, Dally EL (2001) Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Disease* 85: 790-797

41. Deng S, Hiruki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61
42. Ding Y, Wu W, Wei W, Davis RE, Lee IM, Hammond RW, Sheng JP, Shen L, Jiang Y, Zhao Y (2013) Potato purple top phytoplasma-induced disruption of gibberellin homeostasis in tomato plants. *Annals of Applied Biology* 162: 131-139
43. Doi Y, Teranaka M, Yora K, Asuyama H (1967) Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem element of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or Paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266
44. Dvořák M, Tomšovský M, Jankovský L, Novotný D (2007) Contribution to identify the causal agents of Dutch elm disease in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 43: 142-145
45. Ehya F, Monavarfeshani A, Fard EM, Farsad LK, Nekouei MK, Mardi M, Salekdeh GH (2013) Phytoplasma-responsive microRNAs modulate hormonal, nutritional, and stress signalling pathways in Mexican lime trees. *PLoS ONE* 8: e66372. doi:10.1371/journal.pone.0066372
46. Endeshaw ST, Murolo S, Romanazzi G, Neri D (2012) Effects of Bois Noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinifera*) cv Chardonnay. *Physiologia Plantarum* 145: 286-295
47. Filippin L, Jović J, Cvrković T, Forte V, Clair D, Toševski I, BoudonPadieu E, Borgo M, Angelini E (2009) Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology* 58: 826-837
48. Firrao G, Garcia-Chapa M, Marzachi C (2007) Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience* 12: 1353-1375
49. Firrao G, Gibb K, Streten C (2005) Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus Phytoplasma*'. *Journal of Plant Pathology* 87: 249-263
50. Galetto L, Bosco D, Balestrini R, Genre A, Fletcher J, Marzachi C (2011) The major antigenic membrane protein of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. *PLoS ONE* 6: e22571. doi:10.1371/journal.pone.0022571

51. Gao R, Wang J, Shao YH, Li XD, Yang BH, Chang WC, Zhao WJ, Zhu, SF (2011) Molecular identification of a phytoplasma associated with Elm witches'-broom in China. *Forest Pathology* 41: 355-360
52. Gasparich GE (2010) Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals* 38: 193-203
53. Ghelardini L, Santini A (2009) Avoidance by early flushing: a new perspective on Dutch elm disease research. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 2: 143-153
54. Giorno F, Guerriero G, Biagetti M, Ciccotti AM, Baric S (2013) Gene expression and biochemical changes of carbohydrate metabolism in *in vitro* micro-propagated apple plantlets infected by '*Candidatus* Phytoplasma mali'. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 311-317
55. Glavaš M (1999) Gljivične bolesti šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb
56. Goodall-Copestake WP, Hollingsworth ML, Hollingsworth PM, Jenkins GI, Collin E (2005) Molecular markers and ex situ conservation of the European elms (*Ulmus* spp). *Biological Conservation* 122: 537-546
57. Griffiths HM, Sinclair WA, Boudon-Padieu E, Daire X, Lee IM, Sfalanga A, Bertaccini A (1999) Phytoplasmas associated with elm yellows: molecular variability and differentiation from related organisms. *Plant Disease* 83: 1101-1104
58. Gundersen DE, Lee IM (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151
59. Gundersen DE, Lee IM, Rehner SA, Davis RE, Kingsbury DT (1994) Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176: 5244-5254
60. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98
61. Hanboonsong Y, Choosai C, Panyim S, Damar S (2002) Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology* 11: 97-103

62. Herath P, Hoover G A, Angelini E, Moorman, GW (2010) Detection of elm yellows phytoplasma in elms and insects using real-time PCR. *Plant Disease* 94: 1355-1360
63. Hodgetts J, Boonham N, Mumford R, Harrison N, Dickinson M (2008) Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1826-1837
64. Hoegger PJ, Binz T, Heiniger U (1996) Detection of genetic variation between *Ophiostoma ulmi* and the NAN and EAN races of *O. novo-ulmi* in Switzerland using RAPD markers. *European Journal of Forest Pathology* 26: 57-68
65. Hogenhout SA., Oshima K, Ammar ED, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9: 403-423
66. Hornby JM, Jacobitz-Kizzier SM, McNeel DJ, Jensen EC, Treves DS, Nickerson KW (2004). Inoculum size effect in dimorphic fungi: extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1356-1359
67. Hoshi A, Oshima K, Kakizawa S, Ishii Y, Ozeki J, Hashimoto M, Komatsu K, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S (2009) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 6416-6421
68. Hrašovec B (2013) Brijestovi potkornjaci – važni i neizostavni biološki čimbenik širenja holandske bolesti brijesta. *Šumarski list* 7-8: 440
69. Hren M, Nikolić P, Rotter A, Blejec A, Terrier N, Ravnikar M, Dermastia M., Gruden K (2009) 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* 10: 460. doi:10.1186/1471-2164-10-460
70. Idžojtić M (2009). *Dendrologija-List*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb
71. Idžojtić, M. (2013). *Dendrologija-Cvijet, češer, plod, sjeme*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb

72. IRPCM (2004) '*Candidatus Phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255
73. Ishii Y, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S (2009a) In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology* 155: 2058-2067
74. Ishii Y, Oshima K, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S (2009b) Process of reductive evolution during 10 years in plasmids of a non-insect-transmissible phytoplasma. *Gene* 446: 51-57
75. Jacobs KA, Lee IM, Griffiths HM, Miller Jr. FD, Bottner KD (2003) A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. *Plant Disease* 87: 241-246
76. Jarausch W, Lansac M, Dosba F (1999) Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology* 147: 47-54
77. Jomantiene R, Davis RE (2006) Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS Microbiology Letters* 255: 59-65
78. Jomantiene R, Zhao Y, Davis RE (2007) Sequence-variable mosaics: composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA and Cell Biology* 26: 557-564
79. Joosse SA, J Hannemann J. In-Silico Statistical Tools; [14.06.2014]. Available from: <http://in-silico.net/tools/statistics>.
80. Jović J, Cvrković T, Mitrović M, Petrović A, Krnjajić S, Toševski I (2008) New strain of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' infecting *Ulmus minor* and *U. laevis* in Serbia. *Plant Pathology* 57: 1174-1174
81. Jović J, Cvrković T, Mitrović M, Petrović A, Krstić O, Krnjajić S, Toševski I (2010) Genetic variability among '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' strains infecting elms in Serbia and survey of potential vectors. U: Bertaccini A, Laviña A, Torres E (ur.) *Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management*,

- Abstract book of the combined meeting of Work Groups 1-4, COST Action FA0807, Sitges, Spain, pp. 18
82. Jović J, Cvrković T, Mitrović M, Petrović A, Krstić O, Krnjajić S, Toševski I (2011) Multigene sequence data and genetic diversity among ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ strains infecting *Ulmus* spp. in Serbia. *Plant Pathology* 60: 356-368
 83. Jung HY, Sawayanagi T, Kakizawa S, Nishigawa H, Wei W, Oshima K, Miyata S, Ugaki M, Hibi T, Namba S (2003) ‘*Candidatus Phytoplasma ziziphi*’, a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1037-1041
 84. Jureša B (1976) Sušenje hrasta, jasena i brijesta u razdoblju 1950–1974 na području ŠG “Hrast”, Vinkovci. *Šumarski list* 1–2: 61–66
 85. Kakizawa S, Oshima K, Namba S (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends in Microbiology* 14: 254-256
 86. Kawakita H, Saiki T, Wei W, Mitsuhashi W, Watanabe K, Sato M (2000) Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatifomis*. *Phytopathology* 90: 909-914
 87. Kirisits T (2013) Dutch elm disease and other *Ophiostoma* diseases U: Gonthier P, Nicolotti G (ur.) *Infectious forest diseases*, str. 256-282. CAB International
 88. Kollar A, Seemüller E (1989) Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* 127: 177-186
 89. Konrad H, Kirisits T, Riegler M, Halmschlager E, Stauffer C (2002) Genetic evidence for natural hybridization between the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* and *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. *Plant Pathology* 51: 78-84
 90. Ku C, Lo WS, Kuo CH (2013) Horizontal transfer of potential mobile units in phytoplasmas. *Mobile Genetic Elements* 3: e26145. doi.org/10.4161/mge.26145
 91. Kube M, Mitrovic J, Duduk B, Rabus R, Seemüller E (2012) Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal Article* ID 185942. doi:10.1100/2012/185942

92. Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R, Seemüller E (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. BMC Genomics 9: 306. doi:10.1186/1471-2164-9-306
93. Kuske CR, Kirkpatrick BC (1992) Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. International Journal of Systematic Bacteriology 42: 226-233
94. Lee IM, Bertaccini A, Vibio M, Gundersen DE, Davis RE, Mittempergher L, Conti L, Gennari F (1995) Detection and characterization of phytoplasmas associated with diseases in *Ulmus* and *Rubus* in northern and central Italy. Phytopathologia Mediterranea 34: 174-183
95. Lee IM, Bottner-Parker KD, Zhao Y, Davis RE, Harrison NA (2010) Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 2887-2897
96. Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000) Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. Annual Reviews in Microbiology 54: 221-255
97. Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 48: 1153-1169
98. Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bottner KD, Marcone C, Seemüller E (2004a) '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1037-1048
99. Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopathology 83: 834-842
100. Lee M, Martini M, Marcone C, Zhu SF (2004b) Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 337-347

101. Lee IM, Zhao Y, Bottner KD (2006) SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and cellular probes* 20: 87-91
102. Leljak-Levanić D, Ježić M, Cesar V, Ludwig-Müller J, Lepeduš H, Mladinić M, Katić M, Ćurković-Perica, M (2010) Biochemical and epigenetic changes in phytoplasma-recovered periwinkle after indole-3-butyric acid treatment. *Journal of Applied Microbiology* 109: 2069-2078
103. Lepka P, Stitt M, Moll E, Seemüller E (1999) Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 59-68
104. Liefting LW, Andersen MT, Beever RE, Gardner RC, Forster, RL (1996) Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3133-3139
105. Liefting LW, Andersen MT, Lough TJ, Beever RE (2006) Comparative analysis of the plasmids from two isolates of '*Candidatus* Phytoplasma australiense'. *Plasmid* 56: 138-144
106. Lim PO, Sears BB (1989) 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* 171: 5901-5906
107. Lim PO, Sears BB (1991) The genome size of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism resembles those of animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* 173: 2128-2130
108. Lim PO, Sears BB (1992) Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology* 174: 2606-2611
109. Lim PO, Sears BB, Klomparens KL (1992) Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *Journal of Bacteriology* 174: 682-686
110. MacLean AM, Sugio A, Makarova OV, Findlay KC, Grieve VM, Tóth R, Nicolaisen M, Hogenhout SA (2011) Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 157: 831-841

111. Maixner M (2010) Phytoplasma epidemiological systems with multiple plant hosts. U: Weintraub P, Jones P (ur.) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors, str. 213-232. CAB International
112. Malembic-Maher S, Salar P, Filippin L, Carle P, Angelini E, Foissac X (2011) Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of '*Candidatus* Phytoplasma rubi'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61: 2129-2134
113. Marcone C (2010). Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. U: Weintraub P, Jones P (ur.) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors, str. 114-131. CAB International
114. Marcone C, Neimark H, Ragozzino A, Lauer U, Seemüller E (1999) Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. Phytopathology 89: 805-810.
115. Marcone C, Ragozzino A, Seemüller E (1997) Identification and characterization of the phytoplasma associated with elm yellows in southern Italy and its relatedness to other phytoplasmas of the elm yellows group. European Journal of Forest Pathology 27: 45-54
116. Martini M, Lee IM, Bottner KD, Zhao Y, Botti S, Bertaccini A, Harrison NA, Carraro L, Marcone C, Khan AJ, 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
117. Masuya H, Brasier C, Ichihara Y, Kubono T, Kanzaki N (2010) First report of the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* in Japan. Plant Pathology 59: 805-805
118. Mäurer R, Seemüller E, Sinclair WA (1993) Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms affecting elm, alder, and ash in Europe and North America. Phytopathology 83: 971-976
119. Maust BE, Espadas F, Talavera C, Aguilar M, Santamaría JM, Oropeza C (2003) Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. Phytopathology 93: 976-981

120. Mittempergher L, La Porta N (1991) Hybridization studies in the Eurasian species of elm (*Ulmus* spp.). *Silvae Genetica* 40: 237-243
121. Mittempergher L (2000) Elm yellows in Europe. U: Dunn CP (ur.) *The elms: Breeding, conservation, and disease management*, str. 103-119. Springer Science+Business Media, New York
122. Murray RGE, Schleifer KH (1994) Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 174-176
123. Musetti R (2010) Biochemical Changes in Plants Infected by Phytoplasmas. U: Weintraub P, Jones P (ur.) 2010. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*, str. 132-146. CAB International
124. Nadal M, García-Pedrajas MD, Gold SE (2008) Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 284: 127-134
125. Namba S, Oyaizu H, Kato S, Iwanami S, Tsuchizaki T (1993) Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 461-467
126. Navrátil M, Šafářová D, Válová P, Fránová J, Šimková M (2009) Phytoplasma associated with witches'-broom disease of *Ulmus minor* Mill. in the Czech Republic: electron microscopy and molecular characterization. *Folia Microbiologica* 54: 37-42
127. Neimark H, Kirkpatrick BC (1993) Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic *Mycoplasma-like* organisms. *Molecular Microbiology* 7: 21-28
128. Nikolić T (2013) *Sistematska botanika: raznolikost i evolucija biljnog svijeta*. Alfa, Zagreb
129. Nipah JO, Jones P, Hodgetts J, Dickinson M (2007) Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru. *Bulletin of Insectology* 60: 385-386
130. Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Miyata SI, Ugaki M, Namba S (2002a) A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298: 195-201

131. Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Miyata SI, Ugaki M, Namba S (2002b) Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology* 148: 1389-1396
132. Oliveira H, Sousa A, Alves A, Nogueira AJ, Santos, C (2012) Inoculation with *Ophiostoma novo-ulmi* subsp. *americana* affects photosynthesis, nutrition and oxidative stress in *in vitro* *Ulmus minor* plants. *Environmental and Experimental Botany* 77: 146-155
133. Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung H, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Ugaki M, Namba S (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36: 27-29
134. Oshima K, Shiomi T, Kuboyama T, Sawayanagi T, Nishigawa H, Kakizawa S, Miyata S, Ugaki M, Namba S (2001) Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. *Phytopathology* 91: 1024-1029
135. Pajares JA (2004) Elm breeding for resistance against bark beetles. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 13: 207-215
136. Paoletti M, Buck KW, Brasier CM (2005) Cloning and sequence analysis of the MAT-B (MAT-2) genes from the three Dutch elm disease pathogens, *Ophiostoma ulmi*, *O. novo-ulmi*, and *O. himal-ulmi*. *Mycological Research* 109: 983-991
137. Pérez-Brocal V, Gil R, Ramos S, Lamelas A, Postigo M, Michelena JM, Silva FJ, Moya A, Latorre, A (2006) A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science* 314: 312-313
138. Petrokas R, Baliuckas V (2012) Natural hybridisation within elms (*Ulmus* L.) in Lithuania. *Baltic Forestry* 18: 237-246
139. Pisi A, Marani F, Bertaccini A (1981) Mycoplasma-like organisms associated with elm witches' broom symptoms. *Phytopathologie Mediterranea* 20: 189-191
140. Pracros P, Renaudin J, Eveillard S, Mouras A, Hernould M (2006) Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 62-68

141. Prince JP, Davis RE, Wolf TK, Lee IM, Mogen BD, Dally EL, Bertaccini A, Credi R, Barba M (1993) Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83: 1130-1137
142. Quaglino F, Zhao Y, Casati P, Bulgari D, Bianco PA, Wei W, Davis RE (2013) ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, a novel taxon associated with stolbur-and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2879-2894
143. Razin S (1985) Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). *Microbiological Reviews* 49: 419- 455
144. Razin S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 1094-1156
145. Richens RH (1983) *Elm*. Cambridge University Press, Cambridge
146. Rosa C, McCarthy E, Duong K, Hoover G, Moorman G (2014) First report of the spittlebug *Lepyronia quadrangularis* and the leafhopper *Latalus sp.* as vectors of the elm yellows associated phytoplasma, ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ in North America. *Plant Disease* 98: 154-154
147. Rudzińska-Langwald A, Kamińska M (1999) Cytopathological evidence for transport of phytoplasma in infected plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 68: 261-266
148. Sakharkar KR, Dhar PK, Chow VT (2004) Genome reduction in prokaryotic obligatory intracellular parasites of humans: a comparative analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1937-1941
149. Santi S, De Marco F, Polizzotto R, Grisan S, Musetti R (2013) Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. *Frontiers in Plant Science* 4: 171. doi: 10.3389/fpls.2013.00171
150. Santini A, Montagni A, Vendramin GG, Capretti P (2005) Analysis of the Italian Dutch elm disease fungal population. *Journal of Phytopathology* 153: 73-79
151. Schneider B, Ahrens U, Kirkpatrick BC, 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

152. Schneider B, Gibb KS (1997) Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381-3389
153. Schneider B, Seemüller E, Smart CD, Kirkpatrick BC (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. U: Razin S, Tully J (ur.) *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 1., str. 369–380. Academic Press, New York
154. Seemüller E, Schneider B, Mäurer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Lorenz KH, Firrao G, Avinent L, Sears BB (1994) Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 440-446
155. Seemüller E, Marcone C, Lauer U, Ragozzino A, Göschl M (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26
156. Seemüller E, Schneider B (2004) ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’, ‘*Candidatus* Phytoplasma pyri’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma prunorum’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1217-1226
157. Sfalanga A, Martini M, Surico G, Bertaccini, A (2002) Involvement of phytoplasmas in a decline of *Ulmus chenmoui* in Central Italy. *Forest Pathology* 32: 265-275
158. Siampour M, Galetto L, Bosco D, Izadpanah K, Marzachi C, Bertaccini A, Maini S (2011) *In vitro* interactions between immunodominant membrane protein of lime witches’ broom phytoplasma and leafhopper vector proteins. In *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S149-S150
159. Sinclair WA, Griffiths HM (1994) Ash yellows and its relationship to dieback and decline of ash. *Annual Review of Phytopathology* 32: 49-60
160. Sinclair WA, Townsend AM, Griffiths HM, Whitlow TH (2000) Responses of six Eurasian *Ulmus* cultivars to a North American elm yellows phytoplasma. *Plant Disease* 84: 1266-1270
161. Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E, Kirkpatrick BC (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on

- sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988-2993
162. Solla A, Dacasa MC, Nasmith C, Hubbes M, Gil L (2008) Analysis of Spanish populations of *Ophiostoma ulmi* and *O novo-ulmi* using phenotypic characteristics and RAPD markers. *Plant Pathology* 57: 33-44
163. Spaić I (1955) Problematika zaštite šuma u NR Hrvatskoj. *Šumarski list* 11-12: 440-468
164. Stipes RJ, Campana RJ (1981) Compendium of elm diseases. American Phytopathological Society
165. Stojković M (1995) Propadanje poljskog brijesta (*Ulmus minor* Mill., sin. *Ulmus carpinifolia* Suckow) u bivšem prigorsko-zagorskom području. *Šumarski list* 5-6: 183-188
166. Sugawara K, Honma Y, Komatsu K, Himeno M, Oshima K, Namba S (2013) The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiology* 162: 2005-2014
167. Sugio A, Hogenhout SA (2012) The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current Opinion in Microbiology* 15: 247-254
168. Sugio A, MacLean AM, Grieve VM, Hogenhout A (2011a) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: E1254-E1263
169. Sugio A, MacLean AM, Kingdom HN, Grieve VM, Manimekalai R, Hogenhout SA (2011b) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology* 49: 175-195
170. Sutherland ML, Pearson S, Brasier CM (1997) The influence of temperature and light on defoliation levels of elm by Dutch elm disease. *Phytopathology* 87: 576-581
171. Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung HY, Yamaji Y, Nishigawa H, Ugaki M, Namba S (2006) Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4252-4257
172. Swingle RU (1938) A phloem necrosis of Elm. *Phytopathology* 28: 757-759

173. Šeruga Musić M, Krajačić M, Škorić D (2008) The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *Journal of Microbiological Methods* 73: 69-72
174. Šilić Č (1973) Atlas drveća i grmlja. Zavod za izdavanje udžbenika, Sarajevo
175. Škorić V (1943) Holandska bolest brijestova. *Šumarski list* 3: 65-73
176. Špiranec M (1971) O prirastu nizinskog brijesta u mješovitim sastojinama. *Šumarski list* 1-2: 13-17
177. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-272
178. Tedeschi R, Ferrato V, Rossi J, Alma A (2006) Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55: 18-24
179. Temple B, Pines PA, Hintz WE (2006) A nine-year genetic survey of the causal agent of Dutch elm disease, *Ophiostoma novo-ulmi* in Winnipeg, Canada. *Mycological Research* 110: 594-600
180. Toth KF, Harrison N, Sears BB (1994) Phylogenetic relationships among members of the class *Mollicutes* deduced from *rps3* gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 119-124
181. Torres E, Bertolini E, Cambra M, Montón C, Martín MP (2005) Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19: 334-340
182. Toruño TY, Šeruga Musić M, Simi S, Nicolaisen M, Hogenhout SA (2010) Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Molecular Microbiology* 77: 1406-1415
183. Tran-Nguyen LTT, Gibb KS (2006) Extrachromosomal DNA isolated from tomato big bud and 'Candidatus Phytoplasma australiense' phytoplasma strains. *Plasmid* 56: 153-166

184. Tran-Nguyen, LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R, Gibb KS (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: 3979-3991
185. Tully JH (1993) International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Minutes of the Interim Meetings, 1 and 2 August, 1992, Ames, Iowa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43: 394-397
186. Vukelić J, Rauš Đ (1998). Šumarska fitocenologija i šumske zajednice u Hrvatskoj. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb
187. Wiegrefe SJ, Sytsma KJ, Guries RP (1994) Phylogeny of elms (*Ulmus*, Ulmaceae): molecular evidence for a sectional classification. *Systematic Botany* 19: 590-612
188. Webber JF (1990) Relative effectiveness of *Scolytus scolytus*, *S. multistriatus* and *S. kirschi* as vectors of Dutch elm disease. *European Journal of Forest Pathology* 20: 184-192
189. Webber JF (2004) Experimental studies on factors influencing the transmission of Dutch elm disease. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 13: 197-205
190. Wei W, Davis RE, Jomantiene R, Zhao Y (2008a) Ancient, recurrent phage attacks and recombination shaped dynamic sequence-variable mosaics at the root of phytoplasma genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 11827-11832
191. Wei W, Davis RE, Lee M, Zhao Y (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855-1867
192. Wei W, Davis RE, Nuss DL, Zhao Y (2013) Phytoplasmal infection derails genetically preprogrammed meristem fate and alters plant architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 19149-19154
193. Wei W, Lee M, Davis RE, Suo X, Zhao Y (2008b) 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

194. Weintraub PG, Beanland L (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111
195. Wilson CL, Seliskar CE, Krause CR (1972) Mycoplasma-like bodies associated with elm phloem necrosis. *Phytopathology* 62: 140-143
196. Wilson MR, Weintraub PG (2007) An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology* 60: 177-178
197. Woese CR, Maniloff J, Zablen LB (1980) Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 494-498
198. Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271
199. Yarza P, Richter M, Peplies J, Euzéby J, Amann R, Schleifer KH, Ludwig W, Glöckner FO, Rosselló-Móra R (2008) The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 241-250
200. Zafari S, Niknam V, Musetti R, Noorbakhsh SN (2012) Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 561-568
201. Zebec M, Idžojić M, Poljak I, Mihaldinec I (2010) Varijabilnost nizinskog brijesta (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo) na području Hrvatske podravine prema morfološkim svojstvima listova. *Šumarski list* 134: 569-579
202. Zhao Y, Wei W, Lee M, Shao J, Suo X, Davis RE (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
203. Zhao Y, Wei W, Davis RE, Lee M, Weintraub PG, Jones P (2010) Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. U: Weintraub P, Jones P (ur.) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*, str. 64-92. CAB International

7. Sažetak

Fitoplazme su patogeni prokarioti iz razreda *Mollicutes* koji uzrokuju bolesti brojnih biljnih vrsta. Kako bi se istražila prisutnost i zastupljenost fitoplazmoze brijesta u Hrvatskoj te identificirale vrste fitoplazmi koje uzrokuju fitoplazmoze brijesta, na šest lokaliteta na području Hrvatske prikupljeni su uzorci triju vrsta brijesta, nizinskog (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), gorskog (*U. glabra* Huds.) i brijesta veza (*U. laevis* Pall.). Detekcija i identifikacija fitoplazmi provedena je umnožavanjem te sekvenciranjem gena za 16S rRNA. Zaraza fitoplazmama dokazana je u 64 od 139 analiziranih uzoraka brijesta, od čega je u 62 uzorka identificirana fitoplazma 'Candidatus Phytoplasma ulmi'. Fitoplazma 'Ca. Phytoplasma ulmi' detektirana je u uzorcima brijesta veza i nizinskog brijesta, no učestalost zaraze brijesta veza bila je značajno veća. Zaraza gorskog brijesta fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma ulmi' nije utvrđena, ali je u jednom uzorku gorskog brijesta detektirana fitoplazma 'Ca. Phytoplasma solani'. Nadalje, u jednom uzorku nizinskog brijesta detektirana je fitoplazma 'Ca. Phytoplasma asteris' koja bi mogla predstavljati novu podskupinu 16SrI skupine fitoplazmi. Istražena je i prisutnost holandske bolesti brijesta koja može biti uzrokovana fitopatogenim gljivama *Ophiostoma ulmi* i/ili *O. novo-ulmi* kako bi se mogao ustanoviti doprinos pojedinih patogena simptomima zaraze te razlučiti utjecaj fitoplazmi od utjecaja gljiva na domaćina. Dobiveni rezultati potvrdili su prisutnost i veliku zastupljenost holandske bolesti u Hrvatskoj. Ustanovljeno je da holandsku bolest brijesta na području Hrvatske uzrokuje virulentnija vrsta, gljiva *Ophiostoma novo-ulmi*, koja je znatno češće zaražavala nizinski i gorski brijest nego brijest vez. Prisutnost manje virulentnog uzročnika, vrste *O. ulmi* nije utvrđena. Osim toga, dokazana je pojava miješane zaraze fitoplazmom 'Ca. Phytoplasma ulmi' i gljivom *O. novo-ulmi* u šest stabala brijesta veza i dva stabla nizinskog brijesta te je fitoplazma 'Ca. Phytoplasma solani' također bila prisutna u miješanoj zarazi s gljivom *O. novo-ulmi*. Velik udio simptomatičnih stabala, osobito stabala nizinskog i gorskog brijesta, ukazuje na loše zdravstveno stanje brijesta u Hrvatskoj. Fitoplazma 'Ca. Phytoplasma ulmi' je bila raširena na istraživanom području, ali velik broj zaraženih stabala nije pokazivao simptome bolesti u trenutku uzorkovanja. Međutim, zaraza gljivom *O. novo-ulmi* uvijek je bila povezana s pojavom simptoma bolesti, što ukazuje da holandska bolest predstavlja veću prijetnju populacijama brijesta u Hrvatskoj.

Kako bi se istražila genska raznolikost izolata fitoplazme 'Ca. Phytoplasma ulmi' na području Hrvatske, uz 16S rDNA sekvencu analizirane su i sekvence varijabilnijih genskih lokusa, gena

za ribosomske proteine te gena *secY* i *map*. Najveća varijabilnost utvrđena je za gen *secY* koji je bio najbolji pokazatelj velike raznolikosti fitoplazmi brijesta u Hrvatskoj. Međutim, postojanje varijabilnosti utvrđeno je i u sekvencama ostalih genskih lokusa. Sekvence analiziranih genskih lokusa svih izolata fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' detektiranih u ovom radu razlikovale su se od sekvence referentnog izolata EY1. Varijabilnost je utvrđena i unutar jedinstvenih oligonukleotinih sekvenci gena za 16S rRNA, ribosomske proteine i *secY* koje bi trebale biti karakteristika ove skupine fitoplazmi. Filogenetska analiza pokazala je zajedničko porijeklo izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*' detektiranih u ovom istraživanju i prethodno opisanih izolata ove vrste fitoplazmi. Zaključeno je da izolati fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' predstavljaju monofiletsku skupinu velike raznolikosti unutar koje je moguće razlikovati više filogenetskih linija. Iako pokazuju veliku varijabilnost, utvrđeno je da su svi izolati fitoplazme '*Ca. Phytoplasma ulmi*' detektirani u ovom istraživanju međusobno srodni te pripadaju istoj filogenetskoj liniji. Jasna diferencijacija izolata '*Ca. Phytoplasma ulmi*' s različitih lokaliteta u Hrvatskoj te diferencijacija izolata koji zaražavaju različite vrste brijesta nije utvrđena.

8. Summary

Phytoplasmas are pathogenic prokaryotes of the class *Mollicutes* that cause diseases of many plant species. In order to investigate presence and distribution of elm phytoplasmosis in Croatia and determine '*Ca. Phytoplasma*' species that infect elm species, samples of tree elm species, field elm (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo), wych elm (*U. glabra* Huds.) and European white elm (*U. laevis* Pall.), were collected at six localities in Croatia. Detection and identification of phytoplasmas was performed by amplification and sequencing of 16Sr RNA gene sequence. Phytoplasma infection was proven in 64 out of 139 analysed samples, of which 62 samples were infected with elm yellows phytoplasma '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Elm yellows phytoplasma was detected in samples of white elm and field elm, but incidence of infection was significantly higher for white elm. Infection of wych elm with this phytoplasma has not been determined, but one sample of this elm species was infected with '*Ca. Phytoplasma solani*'. Furthermore, '*Ca. Phytoplasma asteris*' isolate that could represent a new 16rI subgroup was detected in one sample of field elm. Also, presence of Dutch elm disease which can be caused by phytopathogenic fungi *Ophiostoma ulmi* and/or *O. novo-ulmi* was tested in order to determine the contribution of each individual pathogen to the observed symptoms and to distinguish the impact of phytoplasma from the impact of the fungi on the host. The results confirmed the presence of Dutch elm disease, which in Croatia is caused by more virulent species, *Ophiostoma novo-ulmi*. This fungus infected field and wych elm more often than white elm. The presence of less virulent species, *O. ulmi*, has not been detected. In addition, occurrence of mixed infection caused by '*Ca. Phytoplasma ulmi*' and *O. novo-ulmi* in six samples of white elm and two samples of field elm was demonstrated. '*Ca. Phytoplasma solani*' was also present in a mixed infection with *O. novo-ulmi*. A large proportion of symptomatic trees, especially trees of field and wych elm, indicate poor health of elms in Croatia. '*Ca. Phytoplasma ulmi*' was widespread at investigated area, but many trees infected with '*Ca. Phytoplasma ulmi*' showed no symptoms of the disease at the time of sampling. In contrast, infection with *O. novo-ulmi* has always been associated with development of disease symptoms, indicating that Dutch elm disease represent greater threat to populations of elms in Croatia.

In order to investigate the genetic diversity of '*Ca. Phytoplasma ulmi*' isolates in Croatia, aside 16S rDNA sequence, more variable genetic loci were analysed, namely genes for ribosomal proteins and genes *secY* and *map*. The most variable genetic locus, *secY*, was the best indicator of the high diversity of elm yellows phytoplasma in Croatia. However, variability was also

found in the sequences of other genetic loci. The sequences of the analysed genes of all elm yellows phytoplasma isolates detected in this study differed from the EY1 reference strain. Variability was determined in oligonucleotide sequences for 16S rRNA gene, ribosomal protein genes and *secY* that represent the signature sequence for '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Phylogenetic analysis revealed a common origin of '*Ca. Phytoplasma ulmi*' isolates detected in this study and the previously described isolates of this phytoplasma. It was concluded that isolates of '*Ca. Phytoplasma ulmi*' represent monophyletic group of great diversity with distinguishable several phylogenetic lineages within this group. The isolates detected in this study were variable but they were related to each other and belonged to the same phylogenetic lineage. A clear differentiation of '*Ca. Phytoplasma ulmi*' isolates from different localities in Croatia or differentiation of isolates infecting different elm species was not confirmed.

9. Životopis

Rođena sam 29. rujna 1985. godine u Vukovaru gdje sam završila srednju i osnovnu školu. Na Odjelu za biologiju i Odjelu za kemiju Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku diplomirala sam 2008. godine te stekla zvanje profesora biologije i kemije. Iste godine upisala sam Poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Zaposlena sam kao asistent na Odjelu za biologiju od 2008. godine do danas. Koautor sam četiri znanstvena rada, od toga tri citirana u bazi Current Contents, te pet sažetaka u zbornicima skupova.

Znanstveni radovi citirani u Current Contents:

Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, Drezner G, Lalić A, Lepeduš H, Zdunić Z, Jurković Z, Dvojković K, **Katanić Z**, Kovačević V (2013) Photosynthetic efficiency and quantitative reaction of bread winter wheat to mild short-term drought conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 37: 385-393

Katanić Z, Atić L, Ferhatović Dž, Cesar V, Lepeduš H (2012) PSII photochemistry in vegetative buds and needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurement. Acta Biologica Hungarica 63: 218-230

Lepeduš H, Tomašić A, Jurić S, **Katanić Z**, Cesar V, Fulgosi H (2009) Photochemistry of PSII in CYP38 *Arabidopsis thaliana* deletion mutant. Food Technology and Biotechnology 47: 275-280

Znanstveni rad citiran u drugim bazama:

Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, Lalić A, Lepeduš H, Dvojković K, Abičić I, **Katanić Z**, Antunović J, Kovačević V (2011) Photosynthetic efficiency in juvenile stage and winter barley breeding for improved grain yield and stability. Poljoprivreda (Osijek) 17: 28-35

Sažeci u zbornicima skupova:

Ćurković Perica M, Krstin Lj, Poljak I, Liber Z, Idzajtović M, **Katanić Z**, Jezic M (2014) Chestnut genotype plays a significant role in the recovery from chestnut blight disease. XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Book of abstracts, Kamoun S (ur.) Rodos, Grčka, P126

Štolfa I, Stanisavljević A, Marić S, Marić S, Vuković R, **Katanić Z**, Žuna Pfeiffer T, Špoljarić D, Teklić T (2013) Utjecaj ekološki prihvatljivih tretmana na antioksidativnu aktivnost plodova jagode tijekom skladištenja. 48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma, Zbornik sažetaka, Marić S, Lončarić Z (ur.) Osijek, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 326-327

Kovačević J, Kovačević Maja, Cesar Vera, Drezner G, Lalić A, Lepeduš H, Jurković Z, Dvojković K, **Katanić Z**, Kovačević V (2001) Fotosintetska učinkovitost u mladom stadiju razvoja i oplemenjivanje ozime pšenice na prinos zrna i njegovu stabilnost. 46. hrvatski i 6. međunarodni simpozij agronoma, Zbornik sažetaka, Pospišil M (ur.) Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 70-71

Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, Lalić A, Lepeduš H, Kovačević V, Dvojković K, Abičić I, **Katanić Z**, Antunović J (2011) Fotosintetska učinkovitost u mladom stadiju razvoja i oplemenjivanje ozimog ječma na prinos zrna i njegovu stabilnost. 46. hrvatski i 6. međunarodni simpozij agronoma, Zbornik sažetaka, Pospišil M (ur.) Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 82-83

Begović L, Mlinarić S, Antunović J, **Katanić Z**, Lepeduš H, Cesar V (2009) Physiological responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term cobalt exposure. 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka, Besendorfer V, Kopjar N, Vidaković-Cifrek Ž, Tkalec M, Bauer N, Lukša Ž (ur.) Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 93-94