Molekularna epidemiologija i multigenska tipizacija bakterije ‘Candidatus Phytoplasma mali’ u Hrvatskoj

Križanac, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:393944

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivana Križanac

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND MULTIGENE TYPING OF '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA MALI' IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Križanac

MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA I MULTIGENSKA TIPIZACIJA BAKTERIJE '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA MALI' U HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za mikrobiologiju, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA I MULTIGENSKA TIPIZACIJA BAKTERIJE '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA MALI' U HRVATSKOJ

IVANA KRIŽANAC

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek,

Zavod za mikrobiologiju

Sažetak

Fitoplazme ('*Candidatus* Phytoplasma') su unutarstanični, pleomorfni biljni patogeni iz razreda Mollicutes koji tijekom životnog ciklusa koloniziraju biljke i kukce - vektore. Proliferacija jabuke (*Apple Proliferation*, AP) jedna je od važnijih fitoplazmoza prisutnih u većini europskih zemalja. Uzrokuje ekonomske gubitke u proizvodnji i uzgoju jabuke. Ovim istraživanjem i multigenskom analizom sojeva uzročnika bolesti '*Ca.* P. mali' (2011. – 2014. i 2016.) obuhvaćena su značajna područja uzgoja jabuke u Hrvatskoj. '*Ca.* P. mali′ detektirana je i identificirana metodama PCR i *real-time* PCR baziranim na umnažanju gena za 16S rRNA. Za karakterizaciju sojeva primijenjena je metoda multigenske tipizacije za koju su odabrana 4 ciljna gena različite razine konzerviranosti i evolucije: *ace*F, *pnp, imp* i *sec*Y. U odnosu na do sada iz literature poznate genotipove, za svaki od gena je redom identificirano tri, dva, sedam te pet novih genotipova. Najveća raznolikost genotipova prisutna je na malom području Međimurske županije. Na osnovi rezultata opisano je 20 alelnih profila od kojih je dominantan ST1 (A13-P10-S12-I21). Po prvi puta uopće tipizirani su i sojevi izolirani iz kukca – vektora vrste *Cacopsylla picta* te su ovim istraživanjem značajno proširenи dosadašnji rezultati multigenske tipizacije *'Ca.* P. mali′ u Europi. Stečena saznanja pridonose razumijevanju epidemiologije i temelj su za daljnja istraživanja te poboljšanje mjera kontrole i sprečavanja širenja bolesti u Hrvatskoj.

(117 stranica, 39 slika, 4 tablice, 138 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: AP, MLST, molekularni markeri, genska varijabilnost, alelni profil, ST

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Dijana Škorić

Prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica

Izv. prof. dr. sc. Dušica Vujaklija

Zamjena: Prof. dr. sc. Bogdan Cvjetković, Profesor emeritus

Disertacija prihvaćena:

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND MULTIGENE TYPING OF '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA MALI' IN CROATIA

IVANA KRIŽANAC

University of Zagreb, Faculty of Science, Department of Biology, Division of Microbiology

Abstract

Phytoplasmas ('*Candidatus* Phytoplasma') are intracellular pleomorphic plant pathogens belonging to the class Mollicutes. Their life cycle includes colonisation of both plant hosts and insect vectors. Apple proliferation (AP) is present in many European countries. It is one of the most important phytoplasmoses causing significant economic loses in apple production. Causal agent, '*Ca.* P. mali', was identified in the scope of this survey (2011 – 2014 and 2016) using PCR and real-time PCR based on amplification of 16S rRNA gene. In multilocus sequence typing (MLST), variability of four selected genetic markers differing in level of conservation and evolution (*ace*F, *pnp*, *imp* and *sec*Y) was studied. In addition to previously described and published genotypes, new ones were discerned for each genetic marker: 3 for *ace*F, 2 for *pnp*, 7 for *imp* and 5 for *sec*Y gene. Overall, 20 different sequence types (ST) were revealed. Based on the current results, the core sequence type ST1 (A13-P10-S12-I21) can be proposed. This is the first extensive research and multigene typing performed on '*Ca.* P. mali' isolates in Croatia, as well as the first typed isolate from an insect vector host, *Cacopsylla picta*. Obtained results revealed considerable genetic diversity of epidemiological relevance limited to only one part of the country, Međimurje region. Characterization represents a good starting point for improvement of measures for preventing and control of the disease and further research.

(117 pages, 39 figures, 4 tables, 138 references, original in Croatian)

Keywords: apple proliferation, MLST, molecular markers, genotype, genetic variability, sequence type, ST

Supervisor: Martina Šeruga Musić, Ph.D., Associate Professor

Reviewers: Dijana Škorić, Ph. D., Professor

Mirna Ćurković-Perica, Ph. D., Professor

Dušica Vujaklija, Ph. D., Associate Professor

In lieu of: Bogdan Cvjetković, Ph. D., Professor Emeritus

Dissertation accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 4
2.1. Općenito o fitoplazmama 4
2.2. Klasifikacija, nomenklatura i evolucija fitoplazmi 6
2.4. Genomi fitoplazmi 9
2.5. Mehanizmi prijenosa i interakcije 11
2.5.1. Interakcije fitoplazmi s domaćinima i fiziologija bolesti 11
2.5.2. Prijenos fitoplazmi 13
2.6. Multigenska tipizacija 15
2.7. Proliferacija jabuke 16
2.7.1. Vektori fitoplazme '*Ca*. P. mali' 17
2.8. Istraživanja fitoplazmi u Hrvatskoj 18
3. MATERIJALI I METODE 20
3.1. Materijali 20
3.1.1. Uzorci 20
3.1.2. Referentni sojevi fitoplazmi i sekvence odabranih molekularnih markera 20
3.1.3. Puferi i otopine 20
3.1.4. Enzimi, PCR reagensi i početnice 22
3.1.5. Standardi za određivanje molekularne mase DNA 24
3.1.6. Kemikalije 24
3.1.7. Oprema i programi 25
3.2. Metode 26
3.2.1. Prikupljanje i pohrana uzoraka jabuke i kukaca 26
3.2.2. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina iz biljnog tkiva 26
3.2.3. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina iz kukaca 27
3.2.4. Spektrofotometrijsko mjerenje nukleinskih kiselina 27
3.2.5. Lančana reakcija polimerazom 27
3.2.6. Elektroforeza u gelu agaroze 29
3.2.7. Cijepanje amplikona restrikcijskim enzimima 29
3.2.8. Lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (*Real-time* PCR) 30
3.2.9. Sekvenciranje i analiza sekvenci 30
3.2.10. Analiza alelnih profila i ulančanih sekvenci 31
4. REZULTATI 33
4.1. Simptomatologija proliferacije jabuke i prikupljanje uzoraka 33

4.2. Detekcija i identifikacija '*Ca*. P. mali' 35
4.2.3. Filogenetska analiza gena za 16S rRNA 39
4.3. Multigenska analiza (*multilocus sequence typing*; MLST) 40
4.3.1. Gen *ace*F 40
4.3.2. Gen *pnp* 45
4.3.3. Gen *imp* 50
4.3.4. Gen *sec*Y 54
4.4. Dodjela oznaka i analiza alelnih profila (ST; *sequence type*) 61
4.5. Analiza ulančanih sekvenci 65
5. RASPRAVA 67
6. ZAKLJUČCI 73
7. POPIS LITERATURE 75
8. PRILOZI 90
8.1. Prilog 1. Popis korištenih kratica i oznaka 90
8.2. Prilog 2. Popis prikupljenih i testiranih uzoraka 91
8.3. Prilog 3. Sekvence korištene i dobivene u ovom istraživanju 98
9. ŽIVOTOPIS 116

1. UVOD

Fitoplazme su unutarstanične fitopatogene bakterije iz razreda Mollicutes (pleomorfni prokarioti bez stanične stijenke), porodice *Acholeplasmataceae*, roda '*Candidatus* Phytoplasma' (IRPCM 2004.) koje uzrokuju više stotina biljnih bolesti u cijelom svijetu (Lee i sur., 2000). Iako su simptomi fitoplazmoza bili opisivani još od 1926. kada je Kunkel prvi put opisao simptome žutice astera (Lee i sur., 2000), kao uzročnici bolesti otkrivene su tek 1967. transmisijskom elektronskom mikroskopijom u stanicama floema biljaka (Doi i sur., 1967). Dugi niz godina za njih se koristio naziv „mikoplazmama slični organizmi" (*mycoplasma-like organisms*; MLOs) te opisno ime prema simptomima koje uzrokuju na biljci domaćinu. Filogenetske analize gena za 16S ribosomsku RNA (16S rRNA) i ribosomski protein rpL22 potvrdile su monofiletsko porijeklo skupine unutar razreda Mollicutes i prihvaćen je naziv „fitoplazme" (Gundersen i sur., 1994.). Najčešći načini prijenosa fitoplazmi u prirodi su putem kukaca – vektora te vegetativnim razmnožavanjem biljaka. Kukci su ujedno i drugi domaćini ovih bakterija, a fitoplazme se u njima nalaze i repliciraju u žlijezdama slinovnicama, hemolimfi i drugim organima. Nemogućnost njihovog uzgoja u čistoj kulturi *in vitro* značajno otežava istraživanja i onemogućava konvencionalnu karakterizaciju koja bi zadovoljila minimalne standarde za formalni taksonomski opis novih vrsta prokariota. Stoga su do razvoja tehnika molekularne biologije bile klasificirane na osnovi bioloških svojstava (Lee i sur., 2000.). U njihovoj, danas rutinskoj, detekciji i identifikaciji najčešće se primjenjuje umnažanje visoko konzerviranog gena za 16S rRNA lančanom reakcijom polimerazom (*polymerase chain reaction*, PCR) nakon koje slijedi analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (*restriction fragment lenght polymorphism*, RFLP) (Lee i sur., 1993.). Prva klasifikacija fitoplazmi se i temelji na RFLP obrascima umnoženog fragmenta gena za 16S rRNA prema kojoj su podijeljene na trideset skupina unutar kojih se dodatno razlikuju podskupine, njih približno 100 (Zhao i Davis 2016.). Gotovo deset godina nakon što je predložen i usvojen koncept '*Candidatus*' - statusa za nepotpuno opisane vrste prokariota (Murray i Stackebrandt 1995.), prihvaćen je rod '*Candidatus* Phytoplasma' te je objavljen formalni opis roda i pravila za opis'*Ca*. Phytoplasma' vrsta (IRPCM 2004.). Za opis nove '*Candidatus*' vrste potrebno je zadovoljiti sljedeće kriterije: razlika u nukleotidnom slijedu gena za 16S rRNA od najmanje 1200 bp mora biti veća od 2,5 %, osim za fitoplazme koje se izrazito razlikuju u svojim biološkim svojstvima (imaju različit krug biljaka domaćina i prenose ih različiti vektori) i nukleotidnim sljedovima drugih gena (za 23S rRNA, elongacijski faktor Tu, ribosomske proteine i druge). Iste godine Seemüller i Schneider (2004) opisali su fitoplazme uzročnike

proliferacije jabuke (*apple proliferation* - AP), europske žutice koštuničavog voća (*European stone fruit yellows* - ESFY) i propadanja kruške (*pear decline* - PD) kao tri '*Candidatus*' vrste, redom: '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Ca*. P. prunorum' i '*Ca*. P. pyri'. Ove tri fitoplazme koje uzrokuju fitoplazmoze voćaka usko su srodne te pripadaju istoj ribosomskoj skupini, 16SrX (Lee i sur., 2000.), podskupinama 16SrX-A (AP), 16SrX-B (ESFY) i 16SrX-C (PD). Nukleotidni slijed 16S rDNA poklapa se između 98,6 i 99,1 %, ali se razlikuju u genima izvan rRNA-operona, krugu domaćina i vektora te drugim biološkim svojstvima, a uzrokuju fitoplazmoze karakterističnih simptoma (Seemüller i Schneider 2004.). Usprkos tome što su istraživanja fitoplazmi otežana nemogućnošću uzgoja čiste kulture u uvjetima *in vitro*, do sada je u potpunosti sekvencirano i anotirano šest fitoplazmatskih genoma (Oshima i sur., 2004.; Bai i sur., 2006.; Tran-Nguyen i sur., 2008.; Andersen i sur., 2013.; Orlovskis i sur., 2017.), među kojima je i genom soja AT *'Ca.* P. mali' (Kube i sur., 2008.). Genomi ovih fitoplazmi relativno su mali (576 – 959 kbp) i reducirani u brojnim metaboličkim putevima. Kromosom '*Ca*. P. mali' je linearan, što je iznimno rijetko, ne samo za fitoplazme, već općenito za bakterije, a linearnost kromosoma dokazana je i za druge dvije fitoplazme voćaka, '*Ca*. P. prunorum' i '*Ca*. P. pyri'. Osim ove očigledne razlike, genom '*Ca*. P. mali' ima manje kopija gena koji kodiraju proteine transportnih sustava te manje anotiranih „krnjih“ gena i pseudogena. Suprotno tome, prisutan je osnovni set gena koji kodiraju enzime uključene u homolognu rekombinaciju, SOS-odgovor i ekscizijski popravak. Iako je postignut značajan napredak u genomskim istraživanjima, sekvenciranih genoma je ipak premalo za donošenje općenitih pravila i zaključaka o genomima fitoplazmi (Kube i sur., 2008.).

Proliferacija jabuke je bolest koja je prisutna i rasprostranjena u većini europskih zemalja. Prvi put su je 1950. godine u Italiji opisali Rui i suradnici (Seemüller 1990.). Uz karakterističan simptom po kojem je i dobila ime, proliferaciju aksilarnih pupova, mogu se pojaviti i drugi simptomi u vidu manjih i klorotičnih listova s izrazito povećanim i nazubljenim palistićima, manjih plodova lošije boje i kvalitete te peteljke dulje nego u zdravih jabuka. Zaražene voćke listaju ranije u proljeće, a cvatnja kasni. Iako zaraza ne mora dovesti do potpunog propadanja voćke, zbog značajnog smanjenja veličine i kvalitete plodova, ekonomski gubici mogu biti i do 80 % (Seemüller 1990.). Poznati prirodni vektori fitoplazme AP su lisne buhe *Cacopsylla picta* i *Cacopsylla melanoneura* (Frisinghelli i sur., 2000.; Tedeschi i sur., 2002.). Prijenos je moguć i unutar nasada putem prirodnih spojeva korijenja susjednih voćaka (Ciccotti i sur., 2008.).

Uzgoj voćaka i vinove loze u Hrvatskoj ima dugu tradiciju, stoga se neke od značajnijih fitoplazmoza ovih poljoprivrednih kultura istražuju gotovo dvadeset godina (Škorić i sur., 1998.; Šeruga Musić i sur., 2011.; Križanac i sur., 2008.; Plavec i sur., 2015.). Prijašnjim je istraživanjima molekularnim metodama dokazana prisutnost i rasprostranjenost '*Ca*. P. pyri' i '*Ca*. P. prunorum' (Križanac i sur., 2010.), a neki od sojeva su i genotipizirani (Danet i sur., 2011.). Iako je pojava simptoma proliferacije jabuke u Hrvatskoj i njihova povezanost s fitoplazmatskim stanicama u lisnim žilama tih biljaka potvrđena elektronsko-mikroskopskim snimkama (Šarić i Cvjetković 1985.), '*Ca*. P. mali' tek je nedavno molekularno identificirana (Plavec i sur., 2013.). Pregledom dosadašnjih istraživanja uočena je potreba za detaljnijom karakterizacijom sojeva fitoplazmi kako bi se saznalo više o njihovoj epidemiologiji, geografskoj distribuciji te varijabilnosti sojeva u različitim domaćinima (biljkama i kukcima). Metoda multigenske tipizacije (MLST) ima široku primjenu u genotipizaciji i karakterizaciji prokariotskih gena izvan rRNA – operona, istraživanjima genetičke varijabilnosti između sojeva različite virulencije te molekularne epidemiologije, a daje i informacije o populacijskoj genetici i evoluciji prokariota (Urwin i Maiden 2003.; Danet i sur., 2011.). Kako se fitoplazme još uvijek ne mogu uzgojiti u čistoj kulturi, upravo je ova metoda pogodna za molekularnu karakterizaciju sojeva i razlučivanje varijabilnost '*Ca*. P. mali'.

Ciljevi istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bili su:

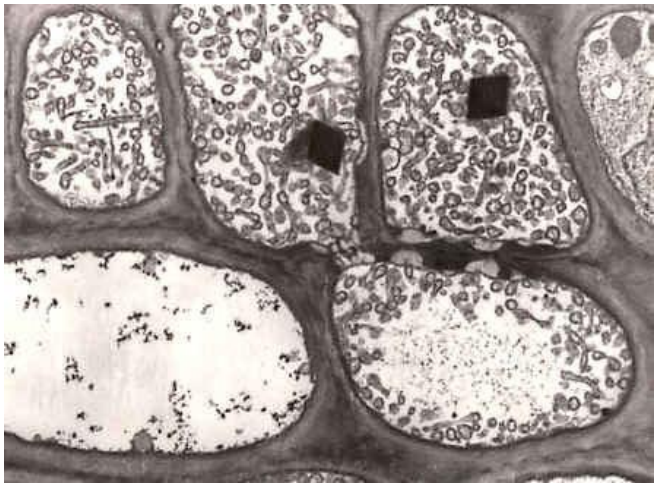
- Istražiti prisutnost i rasprostranjenost '*Ca*. P. mali' u Hrvatskoj u jabukama (*Malus domestica* Borkh) i kukcima – vektorima iz roda *Cacopsylla*.
- Metodom multigenske tipizacije istražiti varijabilnost 4 ciljana gena – *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y između sojeva '*Ca*. P. mali'.
- Istražiti rasprostranjenost i učestalost pojedinih genotipova i alelnih profila ovisno o domaćinu i uzgojnoj regiji.
- Procijeniti značaj i mogućnost primjene rezultata multigenske tipizacije u epidemiologiji '*Ca*. P. mali' u istraživanim agroekosistemima.

Rezultati ovakvog pristupa omogućiti će bolji uvid u genotipsku i biološku raznolikost '*Ca*. P. mali' te dodatno razjasniti potencijalne puteve širenja bolesti kao i međusobne odnose članova patosistema voćka – fitoplazma – vektor. Analiza sveukupnih rezultata predstavlja osnovu za razumijevanje molekularne epidemiologije proliferacije jabuke. Na temelju novih spoznaja moguće je unaprijediti dijagnostičke metode i fitosanitarne mjere kontrole ili sprečavanja rasprostiranja i širenja ovog fitopatogenog prokariota u Hrvatskoj.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Općenito o fitoplazmama

Fitoplazme su prokarioti čije stanice nemaju staničnu stijenku, zbog čega mogu biti različitog oblika, a najčešće su okruglaste (Slika 1), promjera 200 do 800 nm (Lee i Davis 1992.). Otkrivene su 1967. godine transmisijskom elektronskom mikroskopijom (Doi i sur., 1967.), do kad su se uzročnicima infektivnih žutica biljaka smatrali virusi.



Slika 1. Poprečni prerez provodnog tkiva gladiole inficirane fitoplazmama, povećanje 6000x (preuzeto iz Lee 2000.).

Obzirom da ne mogu sintetizirati sve enzime i tvari potrebne za samostalan rast i razvoj, fitoplazme parazitiraju u biljkama i u kukcima, koji su ujedno i njihovi vektori. Fitoplazme uzrokuju više stotina bolesti različitih biljnih vrsta. Zbog nemogućnosti kemijskog suzbijanja, često i nespecifičnosti glede vrste biljnog domaćina te lakog prijenosa, spadaju u opasnije biljne patogene (McCoy i sur., 1989.).

Najčešći simptomi fitoplazmoza u biljaka su: gubitak cvjetnih pigmenata i promjena cvjetnih dijelova u listove (ozelenjavanje ili virescencija te filodija; Slike 2a i 2b) što dovodi do sterilnosti cvjetova, smanjenja uroda, promjene boje listova (žućenje, crvenjenje) i njihovog smanjenja, skraćivanja internodija, proliferacije aksilarnih pupova (formiranje „vještičine metle“) te općenito venuća i propadanja zaražene biljke (Lee i sur., 2000.; Bertaccini i Duduk 2009.).

Biljne bolesti uzrokovane fitoplazmama nanose štete na mnogim kultiviranim vrstama zeljastih i drvenastih biljaka u cijelome svijetu i gotovo svim klimatskim područjima. Poseban je

gospodarski značaj izravnih šteta od potpunog gubitka do smanjenja prinosa na kulturama koje se uzgajaju za prehranu kao što su: kukuruz, krumpir, rajčica i mnoge druge povrtlarske kulture, riža, šećerna repa, mnoge voćne vrste (kruška, jabuka, marelica, papaja) te vinova loza. Uz to, na višegodišnjim kulturama kao što su voćke i vinova loza, značajne su i štete zbog propadanja rodnih stabala i trsova. Veliki su gubici zbog fitoplazmoza i na šumskom drveću, posebno brijestu u Europi i Americi te na ukrasnom bilju. Na žalost, još uvijek nema učinkovitih i direktnih mjera suzbijanja i sprečavanja širenja ovih bolesti (Bertaccini i Duduk 2009.; Lee i sur., 2000.). Indirektne su štete izazvane ograničavanjem trgovine biljnog i sadnog materijala zbog međunarodnih fitosanitarnih mjera (Lee i sur., 2000.).

a  b  c 

Slika 2. Neki od simptoma fitoplazmoza: virescencija i filodija na madagaskarskom zimzelenu (a) i purpurnoj ehinaceji (b) te patuljasti rast i izražena aksilarna proliferacija (lijevo) vrste *Euphorbia fulgens* (c). Slike a i b preuzete su iz Bertaccini i Duduk (2009.), slika c preuzeta s http://cpvo.europa.eu/sites/default/files/documents/techreports/report_literature_study_phytoplasma.pdf.

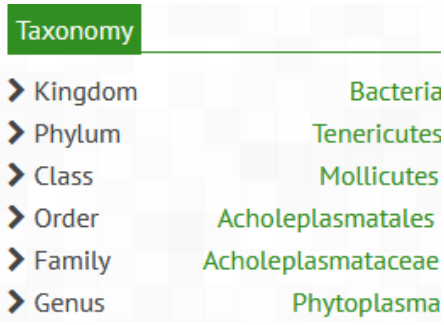
Ipak, postoji i jedan rijedak primjer pozitivnog utjecaja fitoplazmoza na ukrasno bilje. *Poinsettia* (*Euphorbia pulcherrima* Wild), u Hrvatskoj poznata pod nazivom „božićna zvijezda“, je tropska vrsta autohtona u Srednjoj Americi i Meksiku gdje raste kao grm. Nakon mnogo godina selekcije i uzgoja, svi komercijalni kultivari su patuljastog rasta, izražene aksilarne proliferacije (Slika 2c) s mnogo više crvenih „cvjetova“, zapravo pricvjetnih listova promijenjene boje (Lee 2000.). Dokazana je infekcija fitoplazmama podskupine 16SrIII-H u 20 komercijalnih kultivara (Lee i sur., 1995.b; Lee i sur., 1998.). Ova fitoplazma nije nađena ni u

jednom drugom domaćinu. Zahvaljujući ovoj fitoplazmozi, procjenjuje se da je samo u SAD-u godišnja vrijednost proizvodnje božićne zvijezde oko 325 milijuna dolara (Lee 2000.).

2.2. Klasifikacija, nomenklatura i evolucija fitoplazmi

Infektivne „žutice“ biljaka nepoznate etiologije bile su poznate još početkom 20. stoljeća te su korištena opisna imena prema simptomima na biljci domaćinu, a koriste se još i danas kad znamo daleko više o samim fitoplazmama i njihovom taksonomskom položaju. Doi i suradnici su 1967. u stanicama floema biljaka otkrili stanice morfološki i strukturno slične tada poznatim mikoplazmama i nazvali ih „mikoplazmama slični organizmi“. Stoga su fitoplazme, prije razvoja tehnika molekularne biologije, bile klasificirane na osnovi bioloških svojstava kao što su simptomi, krug domaćina i kukci – vektori (Lee i sur., 2000.). Naziv „MLO“ koristio se do 1993. kad je prihvaćen novi naziv „fitoplazme“ (ICSB 1993.). U njihovoj se, danas rutinskoj, detekciji i identifikaciji najčešće primjenjuje umnažanje visoko konzerviranog gena za 16S ribosomsku RNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR) nakon koje slijedi analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP).

Uvid u primarnu strukturu visoko konzerviranog fitoplazmatskog gena za 16S rRNA, svrstao je ove prokariote u razred Mollicutes, kojeg karakterizira nedostatak stanične stijenke, unutar domene Bacteria (Gundersen i sur., 1994.). Razred Mollicutes potekao je iz linije laktobacilusa, Gram-pozitivnih bakterija bogatih A-T baznim parovima (Woese 1987.). Unutar razreda, najbliži srodnici fitoplazmi su pripadnici roda *Acholeplasma* (Gundersen i sur., 1994.). Taksonomski položaj fitoplazmi prikazan je na slici 3 (EPPO 2017.).



Slika 3. Taksonomski položaj fitoplazmi (izvor: EPPO 2017.; https://gd.eppo.int/taxon/PHYPMA).

Klasifikacija fitoplazmi zasnivala se na razlici RFLP-obrazaca 16S rDNA te su tako bile podijeljene u 14 ribosomskih skupina i više od 40 podskupina (Lee i sur., 2000.). Računalno simuliranom RFLP-analizom (*in silico*) dostupnih fitoplazmatskih 16S rDNA-sekvenci mogu

se razlučiti skupine koje uključuju i fitoplazme kojima nije bila određena pripadnost nekoj od poznatih skupina (Wei i sur., 2007.), a sustav ribosomskih skupina i podskupina još uvijek se široko primjenjuje. Prema podacima objavljenim do 2016. godine, opisane su 33 ribosomske skupine (16SrI – 16SrXXXIII) unutar kojih je opisan veći broj podskupina (Zhao i Davis 2016.). Filogenetski položaj pojedinih fitoplazmi dobiven usporedbom sekvenci gena za ribosomske proteine podudara se s onim na osnovi 16S rDNA, ali omogućuje bolje razlučivanje unutar pojedinih 16S – skupina (Martini i sur., 2007.).

Gotovo deset godina nakon što je predložen i usvojen koncept '*Candidatus*' – statusa za nepotpuno opisane vrste prokariota (Murray i Stackebrandt 1995.) prihvaćen je i opisan takson '*Candidatus* Phytoplasma' na razini roda te pravila za opis '*Ca.* Phytoplasma' vrsta (IRPCM 2004.). Do 2016. godine su, u skladu s tim pravilima, opisane 43 vrste '*Ca.* Phytoplasma', a predloženo je i više vrsta koje još nisu u potpunosti opisane (Zhao i Davis 2016.). Nova klasifikacija objedinjuje biološka svojstva, nukleotidni slijed 16S rDNA te uključuje i podatke o sljedovima drugih gena (za 23S rRNA, elongacijski faktor Tu, ribosomske proteine) kod mnogih vrsta koje nije moguće diferencirati isključivo na osnovi 16S rDNA. Posljednjih godina postavlja se i pitanje pripadnosti redu Acholeplasmatales, obzirom na jedinstvena biološka, genetička i filogenetska svojstva fitoplazmi te se razmatra potreba za novim redom i porodicom za rod '*Ca*. Phytoplasma' (Zhao i sur., 2015.).

2.3. Metode detekcije i identifikacije

Razvoj tehnika i metoda molekularne dijagnostike omogućio je i ubrzao, sada već rutinsku, detekciju i identifikaciju fitoplazmi. Metode koje su se koristile prije, kao što je biološko indeksiranje, zahtijevale su puno više vremena i infrastrukturu potrebnu za uspješan višegodišnji rast i razvoj eksperimentalnih i indikatorskih biljaka domaćina (Gundersen i sur., 1994.; IRPCM 2004.). Prve metode kojima su u provodnom sustavu biljaka uspješno vizualizirale fitoplazmatske stanice, elektronska mikroskopija i DAPI, doprinijele su prvenstveno pripisivanju ovih bolesti staničnim, mikoplazmama sličnim, organizmima, a ne virusima (Doi i sur., 1967.; Lee i Davis 1992.). Slijedio ih je razvoj i uporaba seroloških metoda, kao što su ELISA i IF (redom od engl. *Enzyme – linked immunosorbent assay* i *Indirect immunofluorescence*; Lee i sur., 1993.). Iako je detekcija bila ubrzana, ove metode još uvijek nisu bile dovoljno specifične, ali relativno dobra specifičnost postizala se uporabom monoklonskih protutijela (Firrao i sur., 2007.).

Tek su metode koje se temelje na umnažanju specifičnih DNA – fragmenata, uz dovoljno specifičnu i osjetljivu detekciju i identifikaciju, omogućile razumijevanje međusobne srodnosti i filogenetskih odnosa među fitoplazmatskim vrstama (Deng i Hiruki 1991.; Wei i sur., 2007.). PCR je metoda koja je postala standard u dijagnostici fitoplazmi. Najčešće se koristi gen za 16S ribosomsku RNA, poznat i kao standard za bakterije općenito. Ovom metodom se, uz korištenje univerzalnih početnica, u uzorku mogu detektirati fitoplazme, a daljnje razlučivanje je moguće ili korištenjem početnica specifičnih za vrstu ili ribosomsku skupinu, ili cijepanjem amplikona restrikcijskim enzimima (RFLP) te usporedbom restrikcijskih profila s onima referentnih sojeva (Firrao i sur., 2007.). Vrlo je često potrebno koristiti i ugniježđeni PCR (*nested* PCR; nPCR), a dodatna manipulacija uzorcima povećava opasnost od kontaminacije i lažno pozitivnih rezultata. Iako je ovaj gen prvi i još uvijek najviše korišten, koriste se i mnoge druge metode koje umnažaju gene izvan ribosomskog RNA operona, kao npr. gene za ribosomske proteine, elongacijski faktor Tu, nitroreduktaze te niz drugih gena (Firrao i sur., 2007.).

Problemi kod detekcije fitoplazmi, poput niskog titra i neravnomjerne raspodjele u domaćinu, djelomično su nadvladani uvođenjem metode lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (*real time* PCR). Osim veće osjetljivosti, a u više slučajeva i specifičnosti metode, uporabom ove metode nema potrebe za vizualizacijom amplikona nakon umnažanja te se taj dodatni korak izbjegava. Najčešće se koriste protokoli specifični za pojedinu vrstu ili grupu fitoplazmi uz uporabu specifičnih proba. Dodatna prednost su i multipleks – reakcije kojima se u uzorku detektira više od jednog ciljanog markera (Baric i Dalla-Via 2004.; Pelletier i sur., 2009.; Hren i sur., 2007.). Ove metode omogućavaju ili istovremenu detekciju različitih fitoplazmi u uzorku, kao na primjer istovremenu detekciju fitoplazmi Flavescence dorée (FD) i Bois noir (BN) u uzorcima vinove loze (Pelletier i sur., 2009.) ili koriste jedan od ciljanih markera domaćina kao endogenu kontrolu reakcije (Baric i Dalla-Via 2004.; Pelletier i sur., 2009.). Zbog osjetljivosti, bržeg dobivanja rezultata i prikladnosti za testiranje većeg broja uzoraka, ove metode se primjenjuju u rutinskoj dijagnostici (Firrao i sur., 2007.). Iako se kontinuirano radi na osmišljavanju i uvođenju novih metoda, kao što su LAMP (*loop mediated isothermal amplification*) i T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*), one još uvijek nisu u širokoj, rutinskoj uporabi (Hogetts i sur., 2007.; Tomlinson i sur., 2010.).

Zbog već navedenog niskog titra fitoplazmi u uzorku, jedan od izazova je i ekstrakcija kvalitetne DNA u dovoljnoj koncentraciji. Iako se koristi više metoda, najčešća je još uvijek CTAB – metoda ekstrakcije (Prince i sur., 1993.; Maixner i sur., 1994.; Šeruga Musić i sur.,

2003.), a ekstrakcija kvalitetne DNA još uvijek predstavlja ograničavajući faktor u rutinskoj dijagnostici ovih biljnih bolesti kod nekih biljnih domaćina (Firrao i sur., 2007.; Galetto i Marzachi 2010.).

2.4. Genomi fitoplazmi

Genomi su kod većine fitoplazmi, kružne molekule DNA bogate A-T baznim parovima (72 – 79 %), a u mnogim fitoplazmama prisutni su i plazmidi (Oshima i sur., 2004.; Bai i sur., 2006.; Tran-Nguyen i sur., 2008.). Kube i suradnici (2008.) otkrili su kako fitoplazme voćaka, vrste '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Ca.* P. prunorum' i '*Ca.* P. pyri' imaju linearne kromosome, što je iznimno rijetko ne samo za fitoplazme, već općenito za bakterije. Veličina genoma fitoplazmi je različita, u rasponu od 530 do 1350 kb (Neimark i Kirkpatrick 1993.; Marcone i sur., 1999.). Unutar istih ribosomskih fitoplazmatskih skupina mogu postojati značajne razlike u veličini genoma, npr. fitoplazme skupine 16SrXII ('*Ca*. P. solani') mogu imati genom u rasponu od 860 do 1350 kb (Marcone i sur., 1999.). Najmanji genom (530 kbp) je onaj fitoplazme Bermuda grass white leaf (BGWL), odnosno '*Ca.* P. cynodontis' (Marcone i sur., 2004.).

Nemogućnost uzgoja fitoplazmi u čistoj kulturi na umjetnom mediju značajno je usporila genomska istraživanja. Do sad je sekvencirano 6 genoma: tri soja fitoplazme '*Candidatus* Phytoplasma asteris' – onion yellows M (OY-M; Oshima i sur., 2004.), Aster yellows-witches broom (AY-WB; Bai i sur., 2006.) i M3 Maize bushy stunt (MBSP; Orlovskis i sur., 2017.), dva soja (PAa i SLY) fitoplazme '*Ca.* P. australiense' (Tran-Nguyen i sur., 2008.; Andersen i sur., 2013.) te soja AT fitoplazme '*Ca.* P. mali' (Kube i sur., 2008.). Raspon veličine ovih genoma je od 576 kbp (MBSP) do 959 kbp (SLY soj '*Ca.* P. australiense'). Uvid u četiri genoma fitoplazmi iz različitih skupina i ekoloških niša (OY-M, AY-WB, PAa i AT) omogućio je komparativnu analizu njihove strukture i sastava. Iz ove analize vidljivo je da su fitoplazme podložne ubrzanoj evoluciji genoma, što je jedna od mogućih posljedica životnog ciklusa i stalne izmjene između biljke domaćina i kukca – vektora i samim time prilagodbe na različit okoliš i nišu (Hogenhout i Šeruga Musić 2010.).

U gotovo svim genomima fitoplazmi postoji gen za folat-sintetazu, jednog od enzima potrebnih za sintezu folne kiseline bitne za diobu i rast stanica, replikaciju i održavanje nukleinskih kiselina. Postojanje gena za folat-sintetazu u fitoplazmatskom genomu važno je za njihovu prilagodbu različitim biljnim vrstama, a time većina fitoplazmi nije metabolički specijalizirana, već može parazitirati u mnogo biljnih vrsta (Oshima i sur., 2004.). Nasuprot tome, nedostaju

im mnogi geni bitni za sintezu aminokiselina, masnih kiselina i nukleotida, a nedostatak se kod većine fitoplazmi nadoknađuje višestrukim kopijama gena koji kodiraju transportne sustave. Najvažniji geni koji nedostaju su oni za podjedinice ATP-sintaze, jednog od esencijalnih enzima bitnih za živi svijet. Sve poznate bakterije imaju ATP-sintazu F-tipa koja se sastoji od 8 podjedinica. U fitoplazmatskom genomu postoji gen sličan onome za P2-podjedinicu ATP-sintaze P-tipa koja je prisutna u biljaka, životinja i gljiva (Oshima i sur., 2004.; Bai i sur., 2006.). Osim toga, nema ni gena za protein FtsZ, sličnog tubulinu, za kojeg se smatra da je esencijalan za staničnu diobu (Moller-Jensen i Lowe 2005.). Sve spojeve koje ne mogu same sintetizirati, fitoplazme crpe iz domaćina. Pretpostavlja se da su se neki dijelovi genoma fitoplazmi evolucijski izgubili zbog parazitiranja u okolišu bogatom metabolitima (Oshima i sur., 2004.). Primjerice, fitoplazme također nemaju gene za sustav fosfotransferaze (PTS) koje ima većina bakterija za istovremeni unos i fosforilaciju saharoze, glukoze i fruktoze. No, imaju ABC-transportni sustav te mogu unositi maltozu, trehalozu, saharozu i palatinozu, iako još nije poznato što se u fitoplazmatskoj stanici događa s unesenim šećerima pošto ih ne mogu fosforilirati (Oshima i sur., 2004.; Bai i sur., 2006.). Jedna od pretpostavki je da fitoplazme na neki način mogu izazvati izlazak fosforiliranih šećera iz stanica pratilica u sitaste cijevi (Christensen i sur., 2005.).

Relativno velik genom nekih fitoplazmi (npr. sojeva AY-WB i OY-M '*Ca*. P. asteris') rezultat je prisustva višestrukih kopija gena, odnosno otvorenih okvira čitanja (ORF) kojih je većina organizirana u klastere nazvane „potencijalno mobilne jedinice“ (*potential mobile units*, PMUs). Genom AY-WB fitoplazme sadrži jednu potpunu PMU dužine 20 kb, nazvanu PMU1, unutar koje su geni za transpozazu (*tra*5), transkripcijski faktor (*sig*F), geni uključeni u replikaciju, sintezu i rekombinaciju DNA (*ssb*, *dna*B, *dna*G, *tmk*, *him*A) te još nekoliko gena koji kodiraju za membranske proteine (*hfl*B) i druge proteine efektore (Bai i sur., 2006.; Jomantiene i Davis 2006.), ali i još nekoliko kopija PMU koje sadrže „krnje“ gene (pseudogene). Višestruke kopije PMU nalaze se i u genomu '*Ca*. P. australiense' (Tran-Nguyen i sur., 2008.), dok je u odnosu na ova tri genoma broj potencijalno mobilnih jedinica u genomu '*Ca*. P. mali' znatno manji (Kube i sur., 2008.). Ovakva plastičnost i nestabilnost genoma omogućava fitoplazmama prilagodbu na različite uvjete života u biljkama i kukcima te dovodi do heterogenosti u veličini genoma, čak i među blisko srodnim sojevima (Bai i sur., 2006.; Tran-Nguyen i sur., 2008.; Hogenhout i Šeruga Musić 2010.).

Genom soja AT '*Ca.* P. mali' u mnogim se svojstvima razlikuje od ostalih opisanih genoma. Nema plazmida, a kromosom je linearan s velikim terminalnim obrnutim ponavljanjima (TIR, *terminal inverted repeats*) i kovalentno zatvorenim ukosnicama na krajevima. Sadrži samo dvije nepotpune PMU te, u odnosu na OY-M, AY-WB i '*Ca.* P. australiense', ima manje kopija gena koji kodiraju proteine transportnih sustava te manje krnjih gena i pseudogena. Suprotno tome, prisutan je osnovni set gena koji kodiraju enzime uključene u homolognu rekombinaciju, SOS-odgovor i ekscizijski popravak (Kube i sur., 2008.).

Iako je u genomskim istraživanjima postignut značajan napredak, a dubinsko istraživanje genoma (*data mining*) omogućuje njihovu međusobnu usporedbu (Hogenhout i Šeruga Musić, 2010.), još uvijek je premali broj sekvenciranih genoma za donošenje općenitih zaključaka o genomima fitoplazmi (Kube i sur., 2008.). Zbog potrebe za daljnjim informacijama, rad na genomima drugih fitoplazmi se intenzivno nastavlja te je dostupan čitav niz djelomično sekvenciranih genoma (Saccardo i sur., 2012.; Mitrović i sur., 2014.; Kakizawa i sur., 2014.; Zamorano i Fiore 2016.; Fischer i sur., 2016.).

2.5. Mehanizmi prijenosa i interakcije

Zaraza fitoplazmama može imati dramatičan učinak na fiziologiju i fenotip biljke domaćina, a isto tako može imati i značajan utjecaj na životni vijek i reprodukciju kukaca – vektora. Iako su mnogi mehanizmi interakcije i utjecaja na biologiju domaćina razjašnjeni, ostaju još mnoge nepoznanice za daljnja istraživanja (Sugio i sur., 2011.a).

2.5.1. Interakcije fitoplazmi s domaćinima i fiziologija bolesti

U biljkama, fitoplazme se uglavnom nalaze u sitastim stanicama floema (Lee i sur., 2000.). Sitaste stanice su specijalizirane stanice koje tijekom razvitka biljke gube jezgru i neke organele, a kroz njih prolaze hranjive tvari i minerali što ih čini idealnim mjestom za obligatne parazite. Osim u sitastim stanicama, fitoplazme su detektirane elektronskom mikroskopijom i u stanicama pratilicama (Siller i sur., 1987.). Mehanizam translokacije fitoplazmi u biljci nije u potpunosti poznat i ne može se objasniti samo pasivnim transportom u floemu (Wei i sur., 2004.; Garcia-Chapa i sur., 2003.). Češće se nalaze u listovima koji su primarni izvor infekcije biljke (Christensen i sur., 2004.). Nakon infekcije, razmnožavanje fitoplazmi u sitastim stanicama floema s vremenom dovodi do njihovog začepljenja i odumiranja provodnog tkiva te se pretpostavlja da je uzrok pojave nekih simptoma mehanički.

Osim toga, simptomi fitoplazmoza ukazuju na poremećaj ravnoteže biljnih hormona te uz poremećaj funkcije provodnog sustava i na moguću promjenu sadržaja asimilata (Lee i sur., 2000.). Akumulacija ugljikohidrata u listovima dovodi do inhibicije fotosinteze, što dovodi do pojave kloroze listova (Maust i sur., 2003.; Bertamini i sur., 2002.; Bertamini i sur., 2003.). Nema puno saznanja o molekularnim mehanizmima koji uzrokuju pojavu opisanih simptoma. Utvrđeno je da u listovima marelice inficirane fitoplazmama dolazi do povećane ekspresije gena *hsp*70 i *mt* koji sudjeluju u odgovoru biljke na stres izazvan visokim temperaturama, mehaničkim oštećenjima ili virusnom infekcijom. Smanjuje se ekspresija gena koji kodiraju proteine transportnog sustava aminokiselina te bi promjena u transportu aminokiselina mogla biti čimbenik pri pojavi simptoma (Carginale i sur., 2004.). Ova istraživanja nastavljena su na vrsti madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), kao modelu za proučavanje interakcija fitoplazma – biljka. Tako je otkriveno još 16 gena kojima se mijenja razina ekspresije nakon infekcije. Osim ranije navedenih, geni promijenjene ekspresije uključeni su u metabolizam i transport proteina, regulaciju transkripcije i regulaciju strukture stanične stijenke (Carginale i sur., 2007.). U rajčica zaraženih stolbur – fitoplazmom dolazi do promjene ekspresije gena za razvoj cvjetova, tako da u njima izostaje razvoj prašnika i tučka, a latice su slabo razvijene, zelene ili ih uopće nema (Pracros i sur., 2006.).

U daljnjim istraživanjima mehanizama interakcije otkriveno je nekoliko proteina efektora '*Ca.* P. asteris', kao što su SAP11, TENGU i SAP54, koji izravno utječu na ekspresiju gena biljke domaćina (Bai i sur., 2009.; Hoshi i sur., 2009.; Sugio i sur., 2011.b; MacLean i sur., 2011.). SAP11 AY-WB soja '*Ca*. P. asteris' jedan je od prvih anotiranih proteina efektora (Bai i sur., 2009.) koji se akumulira u jezgri biljne stanice domaćina i uzrokuje promjenu transkripcijskog profila stanice, što rezultira promjenama u razvoju biljke i biosintezi hormona (Sugio i sur., 2011.b). Janik i suradnici (2017.) su po prvi put okarakterizirali i dva TCP – transkripcijska faktora (*Teosinte Branched1/Cycloidea/Proliferating cell factors*) jabuke na koja se veže SAP11-like efektor '*Ca.* P. mali' (ATP_00189) te dokazali utjecaj na razinu fitohormona u stablima jabuke. Kako je poznato da su SAP11 – homolozi prisutni kod nekoliko fitoplazmatskih vrsta, pretpostavlja se da bi SAP11 – like proteini mogli imati jednu od ključnih uloga u infekcijama s fitoplazmama općenito (Janik i sur., 2017.).

Još jedan važan dio interakcija fitoplazmi i biljaka je sama faza ulaska ovih prokariota u biljnu stanicu. Imunodominantni membranski proteini (IDP) mogu se podijeliti u tri skupine (Konnerth i sur., 2016.): imunodominantni membranski proteini (IMP), imunodominantni

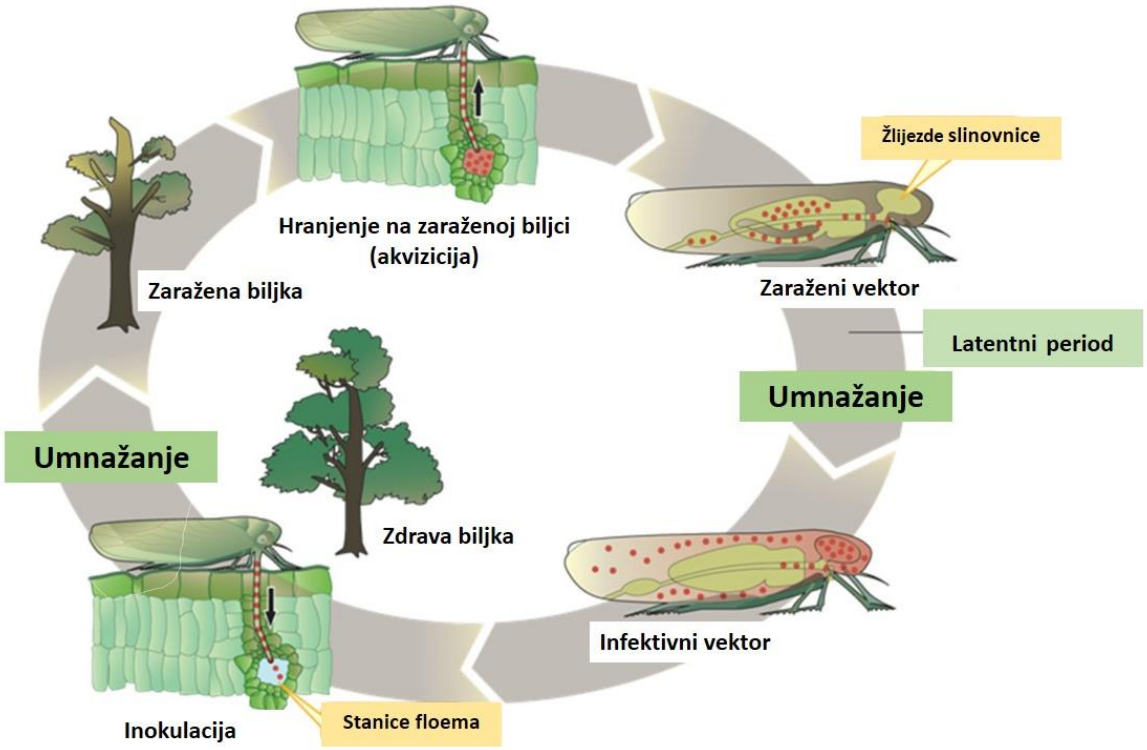
membranski proteini tipa A (IDPA) i antigenski membranski proteini (AMP). Oni imaju funkciju adhezina odgovornih za vezanje za stanicu domaćina, kako biljaka tako i kukaca. AMP OY-W soja '*Ca*. P asteris' se tako veže na aktin i miozin mikrofilamenata kukaca, a zanimljivo je da je formiranje kompleksa AMP – mikrofilament potvrđeno samo za one vrste kukaca koje su vektori ovog soja fitoplazme (Suzuki i sur., 2006.). Osim toga, uloga AMP–a u prijenosu fitoplazmi dokazana je u istraživanju interakcija '*Ca.* P. asteris' soja CYP i vektora *Euscelidius variegatus* i *Macrosteles quadripunctulatus in vivo*. Zabilježena je znatno smanjena sposobnost akvizicije fitoplazmi kod vektora koji su se prethodno hranili na mediju koji je sadržavao suspenziju protutijela anti-AMP, a uz to i smanjena učinkovitost inokulacije zdravih biljaka za jedinke vrste *E. variegatus* kojima je mikroinjektirana miješana suspenzija CYP i protutijela anti-AMP. Time je ujedno ukazano na direktnu povezanost proteina CYP AMP sa sposobnošću fitoplazme da kolonizira organe kukca putem vezanja i prolaska kroz epitelne stanice u probavnom sustavu i žlijezdama slinovnicama (Rashidi i sur., 2015.). U istraživanju interakcija proteina IMP '*Ca*. P. mali' dokazano je da se IMP veže na aktin biljnih stanica. Također je uočeno da transgene biljke vrste *Nicotiana tabacum* koje eksprimiraju IMP ne razvijaju simptome fitoplazmoza te formiranje ovog kompleksa vjerojatno ima ključnu ulogu u kolonizaciji biljke domaćina i razvoju bolesti (Boonrod i sur., 2012.). Imunodominantni membranski proteini pokazuju značajnu antigensku varijabilnost koja upućuje na selektivnu adaptaciju kako bi se izbjegao imuni odgovor domaćina (Kakizawa i sur., 2006.).

2.5.2. Prijenos fitoplazmi

Fitoplazme se sa zaraženih biljaka najčešće prenose kukcima iz reda Hemiptera koji se hrane sisanjem biljnog soka iz floema. Najviše je poznatih vrsta vektora iz porodica Cicadellidae, Cixiidae i Psyllidae (Weintraub i Beanland 2006.).

Nakon ulaska u organizam kukca putem rilca prilikom hranjenja na zaraženoj biljci, fitoplazme prolaze kroz probavilo te ulaze u hemolimfu. Fitoplazmatske se stanice u kukcima nalaze u različitim organima kao što su žlijezde slinovnice, masna tjelešca, reproduktivni organi i torakalni gangliji. Da bi zaraženi kukac postao infektivan, fitoplazme moraju kolonizirati žlijezde slinovnice i dostići koncentraciju koja je dovoljna da bi se zarazila zdrava biljka (Webb i sur., 1999.; Slika 4), za što je potrebno razdoblje od nekoliko dana do nekoliko tjedana (Webb i sur., 1999.; Carraro i sur., 2001.). Dužina latentnog perioda različita je za pojedine vrste kukaca – vektora te ovisi i o abiotskim čimbenicima kao što je temperatura. Isto tako, da bi kukci postali zaraženi, potreban je i period hranjenja određenog trajanja na zaraženoj biljci (Wei

i sur., 2004.; Carraro i sur., 2001.). Kad je jednom zaražen, kukac ostaje zaražen cijeli životni vijek (Tedeschi i sur., 2002.). Moguć je i transovarijski prijenos fitoplazmi na sljedeću generaciju (Kawakita i sur., 2000.; Hanboonsong i sur., 2002.; Tedeschi i sur., 2006.; Mittelberger i sur., 2017.). Čini se da utjecaj fitoplazmi na kukce nije jednoznačan jer su istraživanja pokazala da infekcija fitoplazmama može imati neutralan, povoljan ili nepovoljan učinak na kukca (Mittelberger i sur., 2017.; Beanland i sur., 2000.; Bressan i sur., 2005.).



Slika 4. Shematski prikaz ciklusa fitoplazmi kroz promjenu domaćina iz dva kraljevstva – biljke i kukca. Fitoplazme su na slici prikazane kao crvene točkice. Prilagođeno prema Oshima i sur., 2011. (http://journals.plos.org/plosone/article/figure/image?size=large&id=10.1371/journal.pone.0023242.g001).

Osim vektorima, fitoplazme se mogu rasprostranjivati i zaraženim sadnim materijalom. Eksperimentalno je dokazan i prijenos proliferacije jabuke unutar voćnjaka putem prirodnih spojeva korijenja susjednih voćaka (Ciccotti i sur., 2008.). Iako su fitoplazme detektirane u sjemenu nekih biljaka (Khan i sur., 2002.; Cordova i sur., 2003.; Šeruga Musić i sur., 2004.; Nečas i sur., 2008.), još uvijek se smatra da prijenos fitoplazmi sjemenom nije moguć ili barem nije značajan, jer je dokazan nepovoljan utjecaj fitoplazmi na vijabilnost i germinaciju sjemena (Nečas i sur., 2008.).

2.6. Multigenska tipizacija

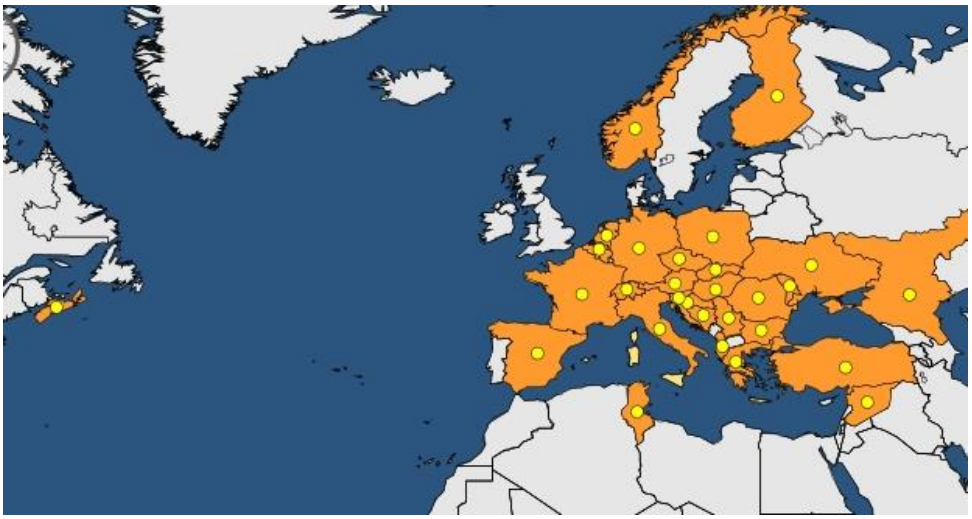
Genotipizacija patogenih izolata bakterija i drugih prokariota posebno je važna za istraživanje epidemiologije i genetičke raznolikosti populacija. Maiden i suradnici su 1998. godine predložili metodu multigenske tipizacije (MLST; *multilocus sequence typing*) na modelu uzročnika meningitisa i drugih meningokoknih bolesti, bakterije *Neisseria meningiditis* (Albrecht & Ghon). Od tada je pristup genotipizaciji među laboratorijima uniformiran, olakšala se razmjena i usporedba dobivenih informacija te su se izgradile dostupne baza podataka. U posljednjih 20 godina ovaj je model usvojen i primjenjuje se najviše za karakterizaciju sojeva humanih patogenih bakterija. U dostupnim bazama podataka mogu se naći podaci za više od 100 bakterija, a među njima i za mikoplazme (http://www.mlst.net/databases/; https://pubmlst.org/databases.shtml). Pri osmišljavanju i uspostavljanju novog MLST – sustava važna su tri elementa: izbor izolata koji će se koristiti u primarnoj evaluaciji, izbor molekularnih markera, odnosno gena za karakterizaciju te dizajn početnica za umnažanje i sekvenciranje ciljanih gena (Urwin i Maiden 2003.). Za većinu se ljudskih patogena u tipizaciji koristi najmanje sedam lokusa i to najvećim dijelom konstitutivnih gena. Velika prednost multigenske tipizacije je relativno jednostavna usporedba alelnih profila izolata iz cijelog svijeta kroz virtualne kolekcije. Moguće je direktno umnažanje ciljanih gena iz uzoraka bez potrebe uzgoja patogena u čistoj kulturi, što je posebno korisno za kliničke uzorke. Osim za istraživanje molekularne epidemiologije i populacijske genetike, ovaj pristup je primjenjiv i u svrhu istraživanja genetske varijabilnosti među sojevima različite virulencije, eventualno utvrđivanje porijekla te praćenje puteva i načina širenja pojedinih sojeva (Danet i sur., 2011.).

Takav pristup, nešto kasnije i u manjem obimu nego kod ostalih bakterija, korišten je i u svrhu istraživanja fitoplazmi. Za razlučivanje blisko srodnih vrsta fitoplazmi ili sojeva unutar iste vrste koristi se varijabilnost niza drugih gena, kao na primjer: *tuf* (za elongacijski faktor Tu, EF-Tu), *map* (za metionin aminopeptidazu), *sec*Y i *sec*A (za membranske podjedinice proteinske translokaze), *vmp* (za transmembranski protein), *amp* (za antigenski membranski protein), *gro*EL (za molekularni šaperonin GroEL), *imp* (za specifični imunodominanti membranski protein), *ace*F (za komponentu piruvat–dehidrogenaze), *pnp* (za polinukleotidnu fosforilazu) te više *rp* gena koji kodiraju ribosomske proteine (Schneider i sur., 1997.; Langer i Maixner 2004.; Arnaud i sur., 2007.; Hodgetts i sur., 2008.; Lee i sur., 2010.; Mitrović i sur., 2011.; Šeruga Musić i sur., 2014.; Danet i sur., 2011.).

Kako bi se bolje istražila genetska varijabilnost sojeva fitoplazmi voćaka, '*Ca*. P. mali', '*Ca*. P. pyri' i '*Ca*. P. prunorum', u istraživanju Danet i suradnika (2011.) ciljana su četiri gena izvan rRNA–operona. Uz dva konstitutivna, manje varijabilna gena, *ace*F i *pnp*, odabrana su i dva gena, *sec*Y i *imp*, koja su očekivano pokazala veću varijabilnost. Naglasak istraživanja u ovom radu bio je na fitoplazmi '*Ca*. P. prunorum' te je u potpunosti genotipizirano 126 izolata, iz više vrsta biljaka domaćina iz roda *Prunus* i vektora iz roda *Cacopsylla*, porijeklom iz devet zemalja, uključujući i Hrvatsku. Nažalost, tada je istražena varijabilnost samo 38 izolata '*Ca*. P. mali' isključivo iz biljke domaćina, jabuke, a samo njih 19 je u potpunosti genotipizirano (Danet i sur., 2011.) Od ovog istraživanja 2011. nije bilo sustavnih pokušaja multigenske tipizacije fitoplazme '*Ca*. P. mali', a u bazama podataka nisu dostupni profili izolata iz kukaca – vektora kao domaćina fitoplazme.

2.7. Proliferacija jabuke

Bolest proliferacije jabuke prvi je puta opisao Rui 1950. godine u Italiji. Proliferacija jabuke i uzročnik bolesti, vrsta '*Ca.* P. mali' raširene su u Europi i Turskoj (Slika 5; EPPO 2017.), dok su nalazi na drugim kontinentima bili sporadični (Kanada), nepouzdani (Tunis, Indija) ili nepotvrđeni (Sirija).



Slika 5. Karta rasprostranjenosti proliferacije jabuke i uzročnika bolesti, vrste '*Ca.* P. mali'. Izvor: EPPO 2017., https://gd.eppo.int.

Uz karakterističan simptom po kojem je i dobila ime, proliferaciju aksilarnih pupova, mogu se pojaviti i drugi simptomi u vidu manjih i klorotičnih listova s izrazito povećanim i nazubljenim palistićima, manjih plodova lošije boje i kvalitete te peteljke dulje nego u zdravih plodova

(Slika 7). Zaražene voćke listaju ranije u proljeće, a cvatnja kasni. Iako zaraza ne mora dovesti do potpunog propadanja voćke, zbog znatnog smanjenja veličine i kvalitete plodova ekonomski gubici mogu biti i do 80 % (Seemüller 1990.).

2.7.1. Vektori fitoplazme '*Ca.* P. mali'

Lisne buhe *Cacopsylla picta* (Foerester, 1848) i *Cacopsylla melanoneura* (Foerester, 1848) su poznati prirodni vektori fitoplazme AP (Frisinghelli i sur., 2000; Tedeschi i sur., 2002). Obje vrste su oligofagne i imaju jednu generaciju godišnje (Weintraub i Beanland 2006.). Uz lisne buhe, vektor može biti i polifagna cikada (Homoptera, Cicadellidae) *Fieberiella florii* (Stål), čija je populacija u voćnjacima vrlo mala te je važnost ovog vektora u prirodi prema dosadašnjim saznanjima vjerojatno zanemariva (Tedeschi i Alma 2006.).



Slika 6. Lisna buha *C. picta*, vektor fitoplazme '*Ca.* P. mali'.
Snimio: Željko Budinšćak

Iako je za sve tri vrste dokazan prijenos fitoplazme, sva dosadašnja istraživanja ukazuju na izrazitu važnost vrste *C. picta* (Slika 6) za koju je nizom istraživanja utvrđeno da je od navedenih upravo ova vrsta najefikasniji vektor, posebno u kontinentalnim klimatskim uvjetima Njemačke, Švicarske i Francuske (Jarausch i sur., 2011.). Unatoč tome što je gustoća populacije bila čak i do 10 puta manja u odnosu na populacije *C. melanoneura*, postotak zaraženih jedinki *C. picta* je kroz pet godina istraživanja iznosio oko 10 %, dok su u istom razdoblju samo dvije uhvaćene jedinke *C. melanoneura* bile zaražene AP – fitoplazmom (Jarausch i sur., 2011.). Čak i u sjevernoj Italiji, gdje se *C. melanoneura* smatra značajnim vektorom, postotak zaraženih jedinki iznosio je najviše 3,6 % (Tedeschi i sur., 2003.). U odnosu na vrstu *C. melanoneura*, *C. picta* provodi dulje razdoblje na jabuci prije migracije na četinjače (Budinšćak 2008.). Jedan od mogućih razloga za puno bolji kapacitet vektora je i transovarijski prijenos koji je nedavno dokazan za vrstu *C. picta*, čime fitoplazma zapravo zaobilazi proces multiplikacije u biljci te

ponovne akvizicije i multiplikacije u vektoru (Mittelberger i sur., 2017.). Transovarijski prijenos za vrstu *C. melanoneura* nije uspješno eksperimentalno dokazan (Tedeschi i sur., 2006.). Odrasli oblici obje vrste, kao i mnoge druge vrste iz roda *Cacopsylla* (uključujući i druge vektore fitoplazmi voćaka) prezimljuju na četinjačama s kojih se u proljeće ponovo sele na primarnog domaćina. Istraživanje migratornih obilježja lisnih buha provedeno u Republici Češkoj pokazalo je da se najbrojnije populacije i najveća raznolikost vrsta (čak 27) može pronaći na smrekama u odnosu na druge četinjače, a autori su predložili i model pasivne migracije zračnim strujama na mjesta prezimljavanja (Čermak i Lauterer 2008.).

2.8. Istraživanja fitoplazmi u Hrvatskoj

Još pedesetih godina 20. stoljeća zabilježena je pojava simptoma na rajčici, paprici i krumpiru za koje se smatralo da su uzrokovani virusom stolbur (Panjan 1957.). Kasnije je elektronskom mikroskopijom potvrđeno prisustvo mikoplazmama sličnih organizama u oboljelim biljkama (Panjan i sur., 1970.). Pojava propadanja kruške (Cvjetković 1976.) i proliferacije jabuke u Hrvatskoj i njihova povezanost s fitoplazmatskim stanicama u floemu tih biljaka također je potvrđena elektronsko-mikroskopskim snimkama (Šarić i Cvjetković 1985.). Prvi molekularni dokaz prisustva fitoplazmi u Hrvatskoj dali su Šarić i suradnici 1997. na vinovoj lozi te su do sada provedena sustavna istraživanja fitoplazmi vinove loze, njihovih kukaca – vektora i korovnih biljaka te multigenska tipizacija fitoplazmi BN i FD (Škorić i sur., 1998.; Šeruga i sur., 2000.; Mikec i sur., 2006.; Plavec i sur., 2015.). Osim voćaka i vinove loze, istražene su fitoplazmoze na uljanoj repici pri čemu je ustanovljena miješana infekcija biljaka fitoplazmom '*Ca*. P. asteris' (16SrI-B) i virusom mozaika repe (TuMV; Šeruga Musić i sur., 2014.). Još 2003. godine, Šeruga i suradnici su istražili uzrok pojave bolesti jablana (*Populus nigra* L. 'Italica') u Zagrebu te je identificirana fitoplazma iz 16SrI ribosomske skupine, i to nove podskupine 16SrI-P (Šeruga i sur., 2003.). Posljednjih godina pojačana su i istraživanja fitoplazmoza značajnih u šumarstvu te su u Hrvatskoj identificirane '*Ca*. P. pini' u vrstama bora *Pinus mugo* i *P. halepensis* (Ježić i sur., 2013.) kao i široko rasprostranjena '*Ca*. P. ulmi' u vrstama brijesta *Ulmus laevis* i *U. minor* (Katanić i sur., 2016.).

Istraživanja fitoplazmoza voćaka iz rodova *Malus*, *Prunus* i *Pyrus* te njihovih potencijalnih vektora započeta su prije desetak godina (Križanac i sur., 2008.). Uzgoj voćaka i vinove loze u Hrvatskoj ima dugu tradiciju, te se neke od značajnijih fitoplazmoza, primjerice vinove loze, istražuju gotovo dvadeset godina (Škorić i sur., 1998.; Šeruga Musić i sur., 2011.; Križanac i sur., 2010.). Isto tako, istraživana je i opisana fauna vektora fitoplazmi voćaka i vinove loze te

dinamika populacija najvažnijih vrsta iz porodice Psyllidae i podreda Auchenorrhyncha (Budinšćak 2008.). Prijašnjim je istraživanjima molekularnim metodama dokazana prisutnost i rasprostranjenost '*Ca*. P. pyri' i '*Ca*. P. prunorum' (Križanac i sur., 2010.), a neki od sojeva ovih fitoplazmi su i dodatno karakterizirani (Danet i sur., 2011.). Iako je pojava simptoma proliferacije jabuke u Hrvatskoj i njihova povezanost s fitoplazmatskim stanicama u lisnim žilama tih biljaka potvrđena elektronsko-mikroskopskim snimkama (Šarić i Cvjetković 1985.), '*Ca*. P. mali' tek je nedavno molekularno identificirana (Plavec i sur., 2013.), a ubrzo nakon toga, objavljen je i nalaz ove fitoplazme u samoniklim šumskim jabukama (*Malus sylvestris* L. Mill.; Ježić i sur., 2016). U manjem broju uzoraka jabuke te jednom uzorku vrste *Cacopsylla picta* genotipiziran je gen *ace*F '*Ca*. P. mali' (Križanac i sur., 2017.). Činjenica da su lisne buhe *C. picta* i *C. melanoneura* u visokoj brojnosti prisutne u voćnjacima od Istre do istočne Slavonije (Budinšćak 2008.) ukazuje na dugotrajnu prisutnost i bolesti i vektora na području Republike Hrvatske.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Uzorci jabuka prikupljeni su od 2011. do 2014. na više lokacija u važnijim voćarskim regijama Republike Hrvatske (Tablica P-2.1 u Prilogu 2). Dio uzoraka jabuka prikupila je fitosanitarna inspekcija. Dodatni uzorci jabuka prikupljeni su 2016. godine u Jastrebarskom, a uzorci lisnih buha na dvije lokacije (Jastrebarsko i Mičevec). Uzorke vektora, lisnih buha iz roda *Cacopsylla*, prikupio je i determinirao dr. sc. Željko Budinšćak (Tablica P-2.2 u Prilogu 2).

3.1.2. Referentni sojevi fitoplazmi i sekvence odabranih molekularnih markera

Kao referentne sojeve u pokusima PCR–metodom i analizama polimorfizma restrikcijskih fragmenata (RFLP) koristila sam sojeve AP-15 i AT '*Ca*. P. mali' (*apple proliferation*, ribosomska podskupina 16SrX-A). Referentni sojevi fitoplazmi održavaju se u domaćinskoj biljci, madagaskarskom zimzelenu (*Catharantheus roseus* (L.) G. Don) uzgojenoj u kulturi *in vitro* na Sveučilištu u Bologni (DiSTA, Patologia vegetale; http://www.ipwgnet.org/doc/phyto_collection/collection-august2010.pdf). Dobiveni su kao izolirani ekstrakt DNA ili kao biljke u kulturi *in vitro* ljubaznošću prof. dr. sc. Assunte Bertaccini.

U filogenetskim analizama korištene su referentne sekvence iz baze podataka GenBank. Popis korištenih referentnih, kao i svih drugih korištenih sekvenci iz baze podataka, nalazi se u Prilogu 3, Tablica P-3.1.

3.1.3. Puferi i otopine

Navedene otopine i puferi čuvaju se pri sobnoj temperaturi ukoliko nije drukčije navedeno.

3.1.3.1. Puferi i otopine za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina (TNA, od engl. *total nucleic acid*) iz biljnog tkiva

a) CTAB (3 %) pufer za ekstrakciju, za 100 ml pufera:

CTAB	3 g
Tris baza	12,11 g
NaCl	8,18 g
EDTA 0,5 M	4 ml

Podesila sam pH pufera na vrijednost 8 dodavanjem koncentrirane HCl, nadopunila redestiliranom vodom do ukupnog volumena od 100 ml i autoklavirala. Prije upotrebe, a prema potrebnoj količini pufera, dodala sam 2- merkaptoetanol u konačnoj koncentraciji 0,2 %.

b) EDTA (0,5 M, pH 8), za 100 ml:
   EDTA 18,61 g

Podesila sam pH na vrijednost 8 dodavanjem koncentrirane HCl, nadopunila redestiliranom vodom do ukupnog volumena od 100 ml i autoklavirala.

c) Tris-HCl (1 M, pH 8), za 100 ml:
   Tris baza 12,1 g

Podesila sam pH na 8 dodavanjem peleta NaOH, nadopunila redestiliranom vodom do ukupnog volumena od 100 ml i autoklavirala.

d) TE-pufer (1M, pH 8,0), za 100 ml:
   Tris-HCl (1M, pH 8) 1 ml
   EDTA (0,5 M, pH 8) 0,2 ml

Nadopunila sam redestiliranom vodom do ukupnog volumena od 100 ml i autoklavirala.

e) kloroform/izoamilni alkohol 24:1

f) izopropanol (2-propanol)

Drži se u zamrzivaču na -20 ˚C.

g) etanol, 70 % (v/v)

Drži se u zamrzivaču na -20 ˚C.

3.1.3.2. Komercijalni kompleti za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina iz tkiva kukaca

a) *OmniPrep™ for Plant* (G-Biosciences, SAD)

3.1.3.3. Puferi i otopine za elektroforezu u gelu agaroze

a) 1 × TAE–pufer , pH 8,3

Pufer sam pripremila razrjeđivanjem UltraPure™ 10X TAE–pufera (ThermoFisher Scientific; sastava 40 mM Tris-acetate i 1 mM EDTA, pH 8,3) redestiliranom vodom.

b) gel agaroze

Gel agaroze (1 %) priređivala sam otapanjem 1 g agaroze u 100 ml 1 x TAE–pufera, odnosno 2,5 % gel agaroze otapanjem 2,5 g agaroze u 100 ml 1 x TAE–pufera.

c) 6x pufer za nanošenje uzoraka na gel ("*loading buffer*")

Za nanošenje uzoraka na gel agaroze koristila sam komercijalno dostupni pufer za nanošenje spreman za uporabu (sastav: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.03 % bromofenol–modro; 0.03 % ksilen cijanol FF; 60 % glicerol; 60 mM EDTA).

d) *Olerup SSP® GelRed*™ boja za gel (Olerup SSP AB, Švedska)

U 100 ml gela agaroze dodavala sam 3 – 4 kapi boje (jedna kap približno 30 μL).

3.1.4. Enzimi, PCR reagensi i početnice

3.1.4.1. PCR enzimi i reagensi, restrikcijske endonukleaze

- *Taq*-polimeraza i odgovarajući reakcijski pufer, Promega, SAD
- GoTaq® Colorless Master Mix, Promega, SAD
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, SAD
- *Mse*I (=*Tru*9I), *Rsa*I i *Ssp*I i odgovarajući reakcijski puferi, New England Biolabs, UK

3.1.4.2. Početnice i probe

Tablica 1. Početnice za detekciju i identifikaciju fitoplazmi korištene u metodama PCR, ugnježđeni PCR (nPCR), *real-time* PCR (qPCR) i sekvenciranje.

Gen	Metoda	Početnice	Sekvenca (5' – 3')	Referenca
Univerzalne početnice				
16S rRNA	PCR sekvenciranje	P1 P7	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	Deng i Hiruki 1991. Smart i sur., 1996.
Početnice i probe specifične za '*Ca*. P. mali'				
16S rRNA	nPCR	R16(X)F1 R16(X)R1	GACCCGCAAGTATGCTGAGAGATG CAATCCGAACTGAGACTGT	Lee i sur., 1995.a
'*Ca*.P.mali' 16S rRNA	qPCR	qAP-16S-F qAP-16S-R	CGAACGGGTGAGTAACACGTAA CCAGTCTTAGCAGTCGTTTCCA	Baric i Dalla-Via 2004.
		qAP-16S-FAM	FAM-TAACCTGCCTCTTAGACG	
M. domestica cpLeu		qMd-cpLeu-F qMd-cpLeu-R	CCTTCATCCTTTCTGAAGTTTCG AACAAATGGAGTTGGCTGCAT	
		qMd-cpLeu-HEX	HEX-TGGAAGGATTCCTTTACTAAC	

Tablica 2. Specifične početnice korištene za multigensku tipizaciju gena *imp*, *ace*F, *pnp* i *sec*Y '*Candidatus* Phytoplasma mali' osmišljene u sklopu ove disertacije.

Gen	Metoda	Početnice	Sekvenca (5' – 3')
imp	PCR i sekvenciranje	imp F imp R	CGTAGAACCAAATGATAAAG GACATAGACATCGTTACGA
***ace*F**	PCR i sekvenciranje	acoB F lpd R0m	CTGCTCCATCTAGAGTTAC GCTAGCTTTTATAGCAGCT
pnp	PCR	pnp F pnp R	GCTCAGTTGGTAGAGCAT AGACACAAACACTACATACAT
	nPCR i sekvenciranje	pnp F1 pnp R1	GGTAGAGCATCTGACTGTT CCCTCGATCGCCTTCTAT
	sekvenciranje	pnp F2	GCTAATCAAATCGGTAAAAC
***sec*Y**	PCR i sekvenciranje	secY F1 secY R	CAGAGAATTCCTAAACGTG GAATACCGTGAACAACTAC
	nPCR i sekvenciranje	secY F2 secY R2	GTTAATCTAGGTGCTTTAGA GTGAACAACTACTTCATTAAC
		secY F3 secY R3	AGTTGGTGGCAATATTGA CTACTTCATTAACAGAAGTACA

3.1.5. Standardi za određivanje molekularne mase DNA

- ϕX174 - *Hinc*II (Takara, Japan) - smjesa fragmenata dobivena razgradnjom DNA faga X174 restrikcijskim enzimom *Hinc*II. Sadrži 13 fragmenata duljine (u bp): 79, 162, 210, 291, 297, 335, 341, 345, 392, 495, 612, 770 i 1057.
- M9 = ϕX174 - *Hae*III (Takara, Japan) - smjesa fragmenata dobivena razgradnjom DNA faga X174 restrikcijskim enzimom *Hae*III. Sadrži 11 fragmenata duljine (u bp): 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078 i 1353.
- M8 = DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche, Švicarska) - smjesa fragmenata dobivena razgradnjom pUCBM21 DNA restrikcijskim enzimima *Hpa*II, *Dra*I i *Hind*III. Sadrži 18 (15 vidljivih) fragmenata duljine (u bp): 37/34/26/19, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, 489/501, 692, 900, 1114.
- 100 bp DNA ladder (Takara, Japan) – DNA marker sadrži 11 fragmenata duljine (u bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 i 1500.
- 200 bp DNA ladder (Takara, Japan) – DNA marker sadrži 13 fragmenata duljine (u bp): 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000 i 4000.
- 1 kb DNA Ladder GeneRulerTM (Fischer scientific, SAD) - DNA marker sadrži 14 fragmenata duljine (u bp): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000.

3.1.6. Kemikalije

CTAB, Sigma Chemical Co., SAD
EDTA, J.T.Baker, SAD
2-merkaptoetanol, Sigma Chemical Co., SAD
etanol, Badel, Hrvatska
izopropanol (2-propanol), J.T.Baker, SAD
kloroform, J.T.Baker, SAD
izoamilni alkohol, Sigma Chemical Co., SAD
Tris, Kemika, Hrvatska
HCl, J.T.Baker, SAD
NaCl, Kemika, Hrvatska
agaroza, Lonza, SAD
Molecular Biology Water AccuGene, Lonza, SAD
UltraPure™ 10X TAE–pufer, ThermoFisher Scientific, SAD

6 x loading buffer (pufer za nanošenje), Thermo Fisher Scientific, SAD

3.1.7. Oprema i programi

Oprema

- Gel documentation system UVIDOC HD2 (UVITEC)
- UV transiluminator T2202 (BioRad)
- Digitalni monochrome printer P93DW (Mitsubishi)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf)
- Centrifuga Universal 320 i rotor 1460 (Hettich)
- Combi-Spin PCV-2400 (Grant Instruments)
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Mx3000P Real-time PCR (Agilent)
- pH metar PP-20 (Sartorius)
- analitička vaga PB303-S (Mettler Toledo)
- vaga Exacta 300EB (Tehtnica)
- Genova Nano (Jenway)
- NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)
- Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad)
- Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad)
- PowerPac™ Basic (Bio-Rad)
- Mikropipete (Eppendorf) varijabilnog volumena (0.5-2, 1-10, 1-10, 10-100, 100-1000 i 1000 - 5000 µl)
- Elektronska pipeta StarPet E 10-200 µl (Starlab)

Programi

- UVIDOC 1D software
- MxPro ET qPCR Software
- Sequencher™ 5.0. Demo
- Geneious 10.1.3.
- ExPasy
- ClustalX 2.0.11.

- MEGA 7.0
- PhyloViz online
- PhyloViz 2.0

3.2. Metode

3.2.1. Prikupljanje i pohrana uzoraka jabuke i kukaca

Listovi i grančice jabuka prikupljani su od rujna do sredine listopada, što je optimalno razdoblje za uzorkovanje (OEPP/EPPO, 2016.). Uzeti su uzorci sa stabala jabuka koja su pokazivala simptome nalik na one proliferacije jabuke, dok je na lokacijama gdje nije bilo vidljivih simptoma nasumično uzet manji broj uzoraka kako bi se isključila mogućnost latentne zaraze. Lokacije prikupljenih uzoraka su prema njihovim osnovnim agroekološkim i klimatološkim značajkama grupirane u tri uzgojne regije: sjeverozapadna kontinentalna Hrvatska (oznaka CW), istočna kontinentalna Hrvatska (CE) i Dalmacija (AD). Tako regija CW obuhvaća uzorke prikupljene na lokacijama u Zagrebačkoj, Sisačko-moslavačkoj, Koprivničko-križevačkoj, Varaždinskoj i Međimurskoj županiji; regija CE obuhvaća uzorke prikupljene na lokacijama u Osječko-baranjskoj, Brodsko-posavskoj, Požeško-slavonskoj i Virovitičko-podravskoj županiji, a regija AD obuhvaća uzorke prikupljene na lokacijama u Splitsko-dalmatinskoj i Dubrovačko-neretvanskoj županiji.

Iz prikupljenih listova jabuke izrezala sam lisne žile, odnosno floemske elemente, približno 1 g svježeg tkiva po uzorku. Pripremljeno tkivo za ekstrakciju ukupnih nukleinskih kiselina (TNA) koristila sam svježe ili smrznuto na -20 ° C.

Uzorci prezimljene generacije lisnih buha prikupljani su od 2012. godine u vrijeme pojave u voćnjacima jabuke (u ožujku ili travnju), na odabranim lokacijama na kojima je u prethodnim godinama potvrđena zaraza na stablima jabuka. Uzorke lisnih buha iz roda *Cacopsylla* je entomološkom mrežom prikupio te morfološki identificirao dr. sc. Željko Budinšćak. Nakon određivanja vrste i spola uzorci lisnih buha su do ekstrakcije ukupnih nukleinskih kiselina pohranjeni u 70 % etanolu na -20 °C.

3.2.2. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina iz biljnog tkiva

Ekstrakciju ukupnih nukleinskih kiselina iz biljnog tkiva radila sam prema već opisanom protokolu (Šeruga Musić i sur., 2003.). Homogenizirala sam približno 1 g tkiva u steriliziranom

tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. Homogeniziranom tkivu dodala sam 3 ml 3 % CTAB–pufera u koji sam prije korištenja dodala 0,2 % 2-merkaptoetanola. Jednokratnom pipetom prebacila sam 1 ml homogenata u epruvetu od 2 ml i inkubirala u termobloku (60 min pri 65 ˚C i 300 rpm). Nakon inkubacije u uzorke sam dodala 1 ml kloroforma, vorteksirala, a zatim centrifugirala 10 min na 11000 rpm. Vodenu fazu prebacila sam u nove epruvete te im dodala 1 ml ledenog izopropanola i pažljivo promiješala. Taloženje u izopropanolu odvijalo se 30–60 min pri -20 ˚C. Nakon centrifugiranja 15 min na 14000 rpm na taloge sam dodala 1 ml ledenog 70 % etanola te ponovno centrifugirala 10 min na 14000 rpm. Dobivene taloge sam nakon odlijevanja etanola osušila na zraku (30-60 min) te ih potom otopila u 100 µl TE–pufera.

3.2.3. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina iz kukaca

Ekstrakciju TNA iz kukaca radila sam pomoću komercijalnog kompleta *Omniprep*™ (G-biosciences) prema priloženim uputama proizvođača. Prije postupka, kukce sam izvadila iz etanola kako bi ih razvrstala i osušila. Ekstrakciju sam radila iz pojedinačnih kukaca. Zbog manje tkiva i manjih taloga TNA, taloge sam otopila u 30-50 µl TE–pufera.

3.2.4. Spektrofotometrijsko mjerenje nukleinskih kiselina

Koncentraciju i čistoću DNA mjerila sam na Genova Nano (Jenway) ili NanoDrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific). Za procjenu koncentracije i čistoće izolirane DNA koristila sam omjer apsorbancija A260/A280 i A260/A230.
Ovisno o koncentraciji DNA u uzorku te zahtjevima pojedinih metoda analize, PCR vodom razrijedila sam uzorke na 10, 20 i 100 ng/µl (korišteno razrjeđenje navedeno je uz pojedinu metodu). Uzorak i razrjeđenja sam do korištenja pohranila na -20 ˚C.

3.2.5. Lančana reakcija polimerazom

3.2.5.1. Lančana reakcija polimerazom za detekciju fitoplazmi

Za detekciju fitoplazmi u uzorku umnažanjem fitoplazmatskog gena za 16S rRNA lančanom reakcijom polimerazom koristila sam univerzalne parove početnica P1/P7 (za direktni PCR) i par početnica R16(X)F1/R1 (za ugniježđeni, nPCR) specifičnih za skupinu 16SrX (Tablica 1). Za PCR i nPCR reakcijska je smjesa bila ista, a pripremila sam je prema sljedećem receptu (za 1 uzorak):

11,8 µl vode za molekularnu biologiju (UPW)

5 µl reakcijskog pufera za PCR (5x)

1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM)

0,5 µl dNTPs (10 mM)

1 µl pojedine početnice (5 µM)

0,125 µl polimeraze GoTaq Flexi (5 U/µl)

1 µl uzorka (20 ng/µl)

25 µl ukupni volumen

Za nPCR koristila sam 0,5 µl produkta iz direktne PCR–reakcije te sam prema tome povećala volumen vode na 12,3 µl. Reakcija se za direktni PCR provodila prema sljedećem obrascu: početna denaturacija 4 min (94 °C), zatim 35 reamplifikacijskih ciklusa - denaturacija 1 min (94 °C), sparivanje početnica i kalupa 2 min (52 °C) i produljenje lanca 3 min (72 °C) te na kraju završno produljenje lanca 7 min (72 °C). U nPCR reakcijama broj i trajanje ciklusa su isti, osim što se sparivanje početnica i kalupa odvija na 50 °C.

Sve PCR–reakcije odvijale su se u uređaju Applied Biosystems 2700 Thermal Cycler. U svakom pokusu bile su uključene negativna kontrola (sterilna voda umjesto uzorka TNA) i pozitivna kontrola (referentni soj fitoplazme), koje sam tretirala jednako kao i uzorke.

3.2.5.2. Lančana reakcija polimerazom za multigensku tipizaciju

Za umnažanje pojedinih gena '*Ca*. P. mali' koristila sam parove početnica navedene u Tablici 2. Novo konstruiranim početnicama umnaža se fragment koji je nekoliko stotina baza veći od samog gena, odnosno kodirajuće regije. Za sve reakcije koristila sam istu reakcijsku smjesu (za 1 uzorak):

19 µl vode za molekularnu biologiju (UPW)

25 µl GoTaq® Colorless Master Mix (2x)

2 µl pojedine početnice (5 µM)

2 µl uzorka (100 ng/µl)

50 µl ukupni volumen

Za nPCR (za *pnp* i *sec*Y) koristila sam 1 µl produkta iz direktne PCR reakcije te sam prema tome povećala volumen vode na 20 µl. Reakcija se za direktni i nPCR za umnažanje gena *ace*F,

pnp i *sec*Y provodila prema sljedećem obrascu: početna denaturacija 4 min (94 °C), zatim 35 reamplifikacijskih ciklusa - denaturacija 1 min (94 °C), sparivanje početnica i kalupa 2 min (52 °C) i produljenje lanca 3 min (68 °C) te na kraju završno produljenje lanca 7 min (68 °C). Za umnažanje gena *imp* broj i trajanje ciklusa su isti, osim što se sparivanje početnica i kalupa odvija na 51 °C, a produljenje lanca na 66 °C.
Sve lančane reakcije polimerazom odvijale su se u uređaju Applied Biosystems 2700 Thermal Cycler. U svakom pokusu bila je uključena pozitivna kontrola.

3.2.6. Elektroforeza u gelu agaroze

Sve fragmente umnožene PCR–metodom analizirala sam elektroforezom u 1 %-tnom gelu agaroze dimenzija 100×150×5 mm u uređaju Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad,Hercules CA, SAD). Gel sam pripremala u 1× TAE–puferu kojeg sam koristila i kao pufer za elektroforezu, a bojala sam ga *Olerup SSP*® *GelRed*™ bojom. U jažice sam nanosila 5 µl PCR–produkta pomiješanog s 1 µl pufera za nanošenje uzorka. Elektroforeza se odvijala pri sobnoj temperaturi 45 minuta pri konstantnom naponu od 100 V. Ovisno o očekivanoj veličini produkta, koristila sam jedan od navedenih standarda za određivanje molekularne mase DNA. Nakon elektroforeze, gel sam fotografirala koristeći UVIDOC HD2 dokumentacijski sustav.

3.2.7. Cijepanje amplikona restrikcijskim enzimima

Umnožene fragmente fitoplazmatskog gena za 16S rRNA cijepala sam pojedinačno restrikcijskim enzimima *Rsa*I i *Ssp*I prema uputama proizvođača. Restrikcijska smjesa bila je sljedećeg sastava (za 1 uzorak):

2 µl pufera za restrikciju
0,5 µl restrikcijskog enzima
7 µl PCR produkta
sterilna voda do ukupnog volumena od 20 µl

Inkubacija se odvijala 16 sati pri temperaturi od 37 ˚C.

Nakon cijepanja umnoženih fragmenata restrikcijskim enzimima, dobivene DNA–fragmente analizirala sam elektroforetski u 2,5 %-tnom gelu agaroze.

3.2.8. Lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (*Real-time* PCR)

Za analizu uzoraka jabuka, a s ciljem povećanja osjetljivosti detekcije i potvrde rezultata konvencionalnog PCR/RFLP–sustava detekcije i identifikacije '*Ca*. P. mali', koristila sam multipleks *real-time* PCR–metodu. U reakcijskoj smjesi se istovremeno umnaža fragment 16S rDNA '*Ca*. P. mali' i gen za leucinsku tRNA iz kloroplasta jabuke kao endogena kontrola.

Pripremu uzorka, reakcijske smjese i uvjete reakcije opisali su Baric i Dalla-Via 2004. Korištene početnice i probe navedene su u Tablici 1. Svaki uzorak testirala sam dva puta koristeći razrjeđenje od 10 i 100 ng/µl. Za sve reakcije koristila sam istu reakcijsku smjesu (navedena je smjesa za 1 uzorak):

2,4 µl vode za molekularnu biologiju (UPW)
10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (1x)
1,8 µl svake qAP-16S početnice (900 nM)
0,2 µl svake qMd-cpLeu početnice (100 nM)
0,8 µl svake probe (200 nM)
2 µl uzorka (10 ili 100 ng/µl)
20 µl ukupni volumen

Reakcija se provodila prema sljedećem obrascu: početna inkubacija 2 min (50 °C) i 10 min (95 °C), zatim 50 reamplifikacijskih ciklusa - denaturacija 15 sekundi (95 °C), sparivanje i produljenje 1 min (60 °C). U svakoj sam reakciji paralelno uz uzorke koristila najmanje 4 negativne kontrole (2 puta kontrola bez DNA – voda i 2 puta DNA zdrave jabuke) te dvije pozitivne kontrole (referentni soj fitoplazme).

3.2.9. Sekvenciranje i analiza sekvenci

Umnožene fragmente gena *ace*F, *pnp*, *sec*Y i *imp* fitoplazme '*Ca*. P. mali', kao i fragmente 16S rDNA umnožene univerzalnim početnicama P1/P7, poslala sam na određivanje primarne strukture molekule DNA (sekvenciranje) u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska https://dna.macrogen.com/). Za direktno sekvenciranje u dva smjera za sve su gene korištene početnice kako je navedeno u Tablicama 1 i 2. Umnoženi je fragment gena *pnp* zbog veličine dodatno sekvenciran internom početnicom pnpF2, a umnoženi je fragment gena *sec*Y zbog

varijabilnosti za jedan dio uzoraka dodatno sekvenciran početnicama secYF2, secYR2 i secYF3 (navedeno u Tablici 2).

Nakon što je određena primarna struktura molekule DNA, dobiveni nukleotidni sljedovi sastavljeni su pomoću računalnog programa Sequencher™ 5.0. Demo (http://www.genecodes.com/) ili Geneious 10.1.3. (Kearse i sur., 2012.; http://www.geneious.com). Budući da su dobiveni nukleotidni sljedovi duži od samog gena, sekvence sam skratila na duljinu gena, a valjanost okvira čitanja uređenih sekvenci provjerila sam translacijom pomoću online programa ExPasy (http://web.expasy.org/translate/). Kako bi bila moguća usporedba s referentnim sekvencama za opisane genotipove europskih sojeva AP-fitoplazme (Danet i sur., 2011.), dobivene su nukleotidne sekvence gena *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y za svaki pojedini gen skraćene na odgovarajuću dužinu fragmenta referentnog soja (Prilog 3. Tablica P-3.1). Sekvence su višestruko sravnjene pomoću računalnog programa ClustalX 2.0, čime je omogućeno pronalaženje polimorfizma među sekvencama (Thompson i sur., 1997.; Larkin i sur., 2007.; http://www.clustal.org), a uz dobivene nukleotidne sljedove uzoraka korištene su referente sekvence gena iz baze podataka GenBank (Prilog 3. Tablica P-3.1; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Filogenetske analize radila sam korištenjem programa MEGA7.0 (Kumar i sur., 2016.; http://www.megasoftware.net) metodom *maximum parsimony* za kraći fragment gena *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y te metodom *neighbour joining* za cijele gene te za 16S rRNA gen. Za računanje udaljenosti nukleotidnih sljedova koristila sam model *number of differences*, a za procjenu pogreške modela iterativnu statističku metodu *bootstrap* (Felsenstein 1985.) uz 500 ponavljanja.

Osim analize nukleotidnih sekvenci, analizirala sam i aminokiselinski slijed sva 4 kodirajuća gena kako bi dodatno analizirala utjecaj promjene nukleotida. Sljedovi su translatirani *in silico* i filogenetski analizirani korištenjem programa MEGA7.0 (Kumar i sur., 2016.; http://www.megasoftware.net), metodom *neighbour joining*. Za računanje udaljenosti amniokiselinskih sljedova koristila sam model *number of differences*, a za procjenu pogreške modela iterativnu statističku metodu *bootstrap* (Felsenstein 1985.) uz 500 ponavljanja.

3.2.10. Analiza alelnih profila i ulančanih sekvenci

Kako bi dodatno analizirala rezultate dobivene sekvenciranjem i filogenetskim analizama svakog pojedinog gena korištenog u multigenskoj analizi (*ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y), novim

genotipovima iz ovog istraživanja dodijelila sam oznake koje se nastavljaju na oznake prije opisanih genotipova (Danet i sur., 2011.; osobna komunikacija X. Foissac, Tablica 5).

Za svaki uzorak dobivena je kombinacija genotipova koja čini alelni profil, odnosno tip sekvenci (ST; *sequence type*). Alelnim profilima, odnosno pojedinom ST-u sam također dodijelila oznake, redoslijedom učestalosti pojedinog profila (Prilog 3. Tablica P-3.3). Za analizu ovako dobivenog seta podataka koristila sam online program PhyloViz. Program baziran na algoritmu eBURST (Feil i sur., 2004.) daje grafički prikaz međusobne povezanosti, odnosno umreženosti (*minimum spanning tree network*), genotipova ili alelnih profila (Ribeiro-Gonçalves i sur., 2016.; https://online.phyloviz.net).

Pomoću programa Geneious 10.1.3. (http://www.geneious.com; Kearse i sur., 2012.) ulančala sam sravnjene sekvence svih gena uzoraka i referentnih sekvenci potpuno genotipiziranih referentnih sojeva '*Ca*. P. mali' (Prilog 3. Tablica P-3.1) te ih analizirala pomoću programa PhyloViz 2.0 (Francisco i sur., 2012.). Ulančavanjem sekvenci moguća je istovremena i sveukupna analiza varijabilnosti korištenih molekularnih markera ciljanih u MLST−analizama. Ovakva analiza rezultira finijim razlučivanjem od analize alelnih profila, a program omogućuje dobru i intuitivnu vizualizaciju evolucije i filogenetskih odnosa među analiziranim izolatima. Uzimaju se u obzir sve razlike u nukleotidnim sljedovima te se, osim međusobne povezanosti, uzima u obzir i broj sojeva istog profila koji je grafički iskazan veličinom čvorišta (*node*). Učestalost pojedinog profila koristi se i za odabir temeljnog (*founder*) ST-a za pojedino grananje.

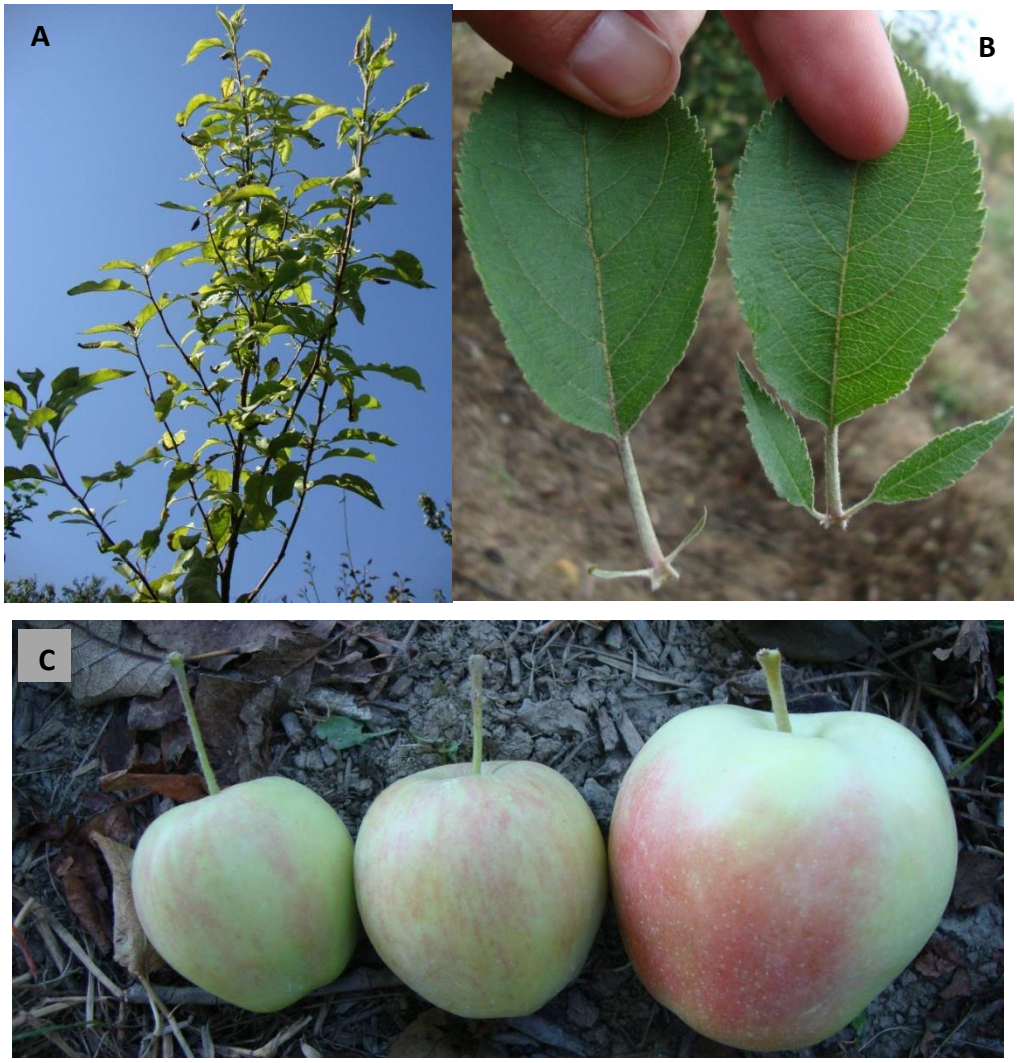
4. REZULTATI

4.1. Simptomatologija proliferacije jabuke i prikupljanje uzoraka

U četverogodišnjem razdoblju sustavnog nadzora proliferacije jabuke (2011. – 2014.), kao i prilikom dodatnog uzorkovanja 2016. godine, na stablima jabuke zaraženim fitoplazmom uočen je niz simptoma karakterističnih za ovu bolest, kao što su vještičine metle, povećani palistići i manji plodovi s dugim peteljkama (Slika 7). Simptomi su kroz sve četiri godine pregleda bili vidljivi i izrazito uočljivi na lokacijama Donji Mihaljevec i Sveta Marija (CW, Slika 11). Upravo zbog toga je na ove dvije lokacije u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske i prikupljen najveći broj uzoraka, gotovo polovica uzoraka prikupljenih u CW–regiji (Prilog 2, Tablica P-2.1). Osim navedenih prepoznatljivih simptoma koji su karakteristični za proliferaciju, na ovim lokacijama je na pojedinim stablima došlo i do pojave lisnih rozeta na vrhovima izboja ili iz dormantnih pupova na starijim granama. Lisne rozete su vrlo osjetljive na uzročnika pepelnice jabuke, vrstu *Podosphaera leucotricha* (Ellis & Everh.) E.S. Salmon, kojom budu vrlo brzo i zahvaćene, a na njima su vidljivi i povećani palistići. Uz vještičine metle i povećane palistiće, na mnogim stablima u kontinentalnom dijelu Hrvatske bili su vidljivi i simptomi na plodovima. Plodovi su na zaraženim stablima znatno manji nego na zdravim stablima, a peteljke su neuobičajeno izdužene (Slika 7). Prilikom dodatnog uzorkovanja 2016. u Jastrebarskom, također su uočeni opisani karakteristični simptomi. Na lokacijama u CE–regiji, simptomi na stablima jabuke bili su vidljivi, ali na znatno manjem broju stabala u odnosu na lokacije u sjeverozapadnom dijelu. Broj se stabala s vidljivim simptomima, a u skladu s tim i broj uzetih uzoraka, kroz četiri godine smanjivao. U zadnjoj je godini uzorkovanja (2014.) u CE–regiji uzeto samo 11 uzoraka jabuke od kojih niti jedan nije bio zaražen fitoplazmom '*Ca*. P. mali' (Prilog 2, Tablica P-2.1).

U AD–regiji, simptomi su bili vidljivi samo na nekoliko stabala u prvoj godini pregleda i uzorkovanja (2011.) te su gotovo svi uzorci, osim dva u Opuzenu, prikupljeni nasumično. Simptomi nisu bili karakteristični te nisu ukazivali na zarazu fitoplazmom, već su bile vidljive kloroze na lišću te su stabla općenito imala slabiji porast. U Dalmaciji je tako uzeto najmanje uzoraka, ukupno 27 kroz četiri godine, od kojih je u samo dva uzorka identificirana vrsta '*Ca*. P. mali' u prvoj godini nadzora. U sljedeće tri godine nije bilo stabala s istaknutim simptomima proliferacije.

Dinamika pojave simptoma promjenjiva je zbog povezanosti s kretanjem i razmnožavanjem fitoplazme u stablu, što opet ovisi o klimatskim prilikama. Usprkos varijabilnosti pojave i razvoja simptoma unutar vegetacijske sezone te prema različitim godinama pregleda i uzorkovanja, rezultati su testiranja kasnije potvrdili relativno dobru korelaciju pojave karakterističnih simptoma i zaraženosti stabla.



Slika 7. Simptomi proliferacije jabuke: A) vještičine metle, Donji Mihaljevec; B) povećani palistići, Osijek; C) manji plodovi s dugim peteljkama, Donji Mihaljevec. Fotografirao Dario Ivić.

Uzorci lisnih buha prikupljeni su samo na četiri odabrane lokacije u Svetoj Mariji, Jastrebarskom, Mičevcu i u Osijeku (Prilog 2, Tablica P-2.2). Prva pojava prezimjele generacije lisnih buha u voćnjacima ovisi o klimatskim prilikama i varira od početka ožujka do sredine travnja. Period pogodan za uzorkovanje u komercijalnim voćnjacima relativno je kratak, svega nekoliko dana, između prve pojave lisnih buha do prve primjene insekticida. Stoga je na lokacijama na kojima zbog udaljenosti od Zagreba (Osijek, Sv. Marija) nije bilo moguće

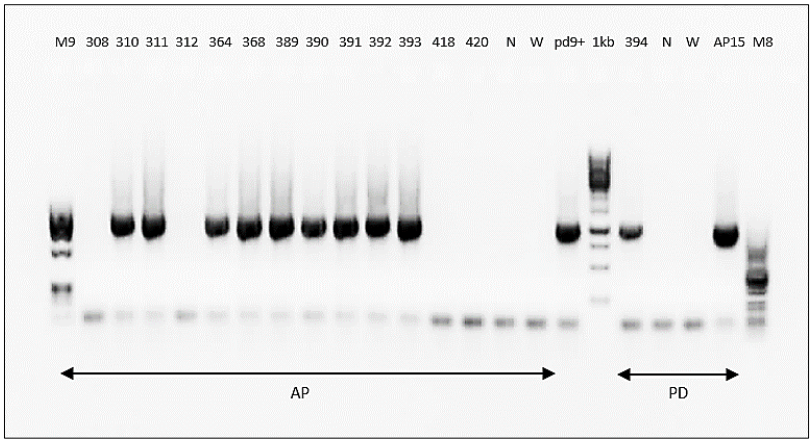
učestalo pratiti pojavu prezimjele generacije, prikupljeno značajno manje uzoraka lisnih buha nego na lokacijama u blizini (Mičevec, Jastrebarsko) na kojima se pojava mogla pratiti i više puta tjedno. Vrsta *C. picta* je u Jastrebarskom, gdje je i prikupljeno najviše uzoraka vektora, bila znatno brojnija u odnosu na vrstu *C. melanoneura* (Prilog 2, Tablica P-2.2).

4.2. Detekcija i identifikacija '*Ca*. P. mali'

U petogodišnjem istraživanju, ukupno su testirana 423 uzorka: 204 uzorka jabuke i 219 uzoraka kukaca – vektora, i to 182 uzorka vrste *C. picta* te 37 uzoraka vrste *C. melanoneura*.

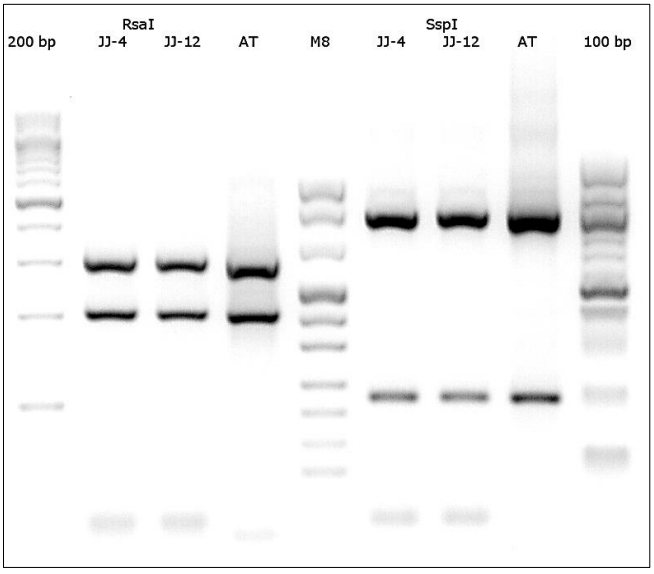
Od ukupnog broja testiranih uzoraka jabuke u čak 62 uzorka identificirana je prisutnost fitoplazme '*Ca*. P. mali', što čini više od 30 %. Najmanje je uzoraka prikupljeno u Dalmaciji, samo 27 u četiri godine te je u samo dva uzorka dokazana prisutnost '*Ca*. P. mali'. Od 61 testiranog uzorka jabuke s lokacija u CE–regiji Hrvatske, samo njih 11 bilo je zaraženo fitoplazmom '*Ca*. P. mali'. Broj pozitivnih uzoraka bio je u padu te su svi uzorci testirani 2014. godine bili negativni. Više od polovice testiranih (116), ali i u visokom postotku zaraženih uzoraka jabuke (ukupno više od 42 %) bilo je iz CW–regije (Tablica 3), a najviše ih je bilo s dvije lokacije u Međimurskoj županiji (Sveta Marija i Donji Mihaljevec). Suprotno opisanoj simptomatologiji, broju i postotku zaraženih uzoraka u druge dvije regije, ovdje je broj simptomatičnih stabala, prikupljenih uzoraka, ali i uzoraka u kojima je dokazana prisutnost '*Ca*. P. mali' stalno bio u porastu te je od 25 % zaraženih uzoraka 2011. porastao do više od 60 % 2014. godine (Tablica 3; Prilog 2, Tablica P-2.1). Uzorci jabuka testirani su nPCR/RFLP metodom te dodatno metodom *real-time* PCR 2013. i 2014. godine.

Od testirane 182, čak 12 jedinki vrste *C. picta* bilo je zaraženo AP–fitoplazmom, dok niti u jednom od 37 uzoraka lisne buhe *C. melanoneura* nije dokazano prisustvo fitoplazmatskog gena za 16S rRNA (Tablica 3; Prilog 2, Tablica P-2.2). Sve jedinke vrste *C. picta* u kojima je dokazana prisutnost '*Ca*. P. mali' prikupljene su na lokacijama u CW–regiji, na lokacijama u Jastrebarskom i Svetoj Mariji. Uzorci vektora testirani su nPCR/RFLP–metodom, pojedinačno, kako bi kasnije bila moguća multigenska tipizacija '*Ca*. P. mali'.



Slika 8. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze u 1 % gelu agaroze fragmenata fitoplazmatske 16S rDNA veličine 1,1 kbp umnožene metodom nPCR početnicama R16(X)F1/R1. Na gelu se nalaze uzorci jabuke iz 2012. godine: 308, 310 – 312, 364, 368, 389 – 393, 418 i 420; 394 - uzorak kruške 2012; negativne kontrole (N – zdrava jabuka; W – voda); pozitivne kontrole (pd9+ i AP15 referentni sojevi) te DNA–markeri M9, M8 i 1kb.

Nakon direktnog umnažanja lančanom reakcijom polimerazom korištenjem univerzalnog para početnica P1/P7 te ugniježđene lančane reakcije polimerazom (nPCR) uz korištenje početnica R16(X)F1/R1 specifičnih za fitoplazme iz skupine 16SrX i analize elektroforezom u gelu agaroze, kod pozitivnih uzoraka bio je vidljiv produkt veličine 1,1 kbp (Slika 8).

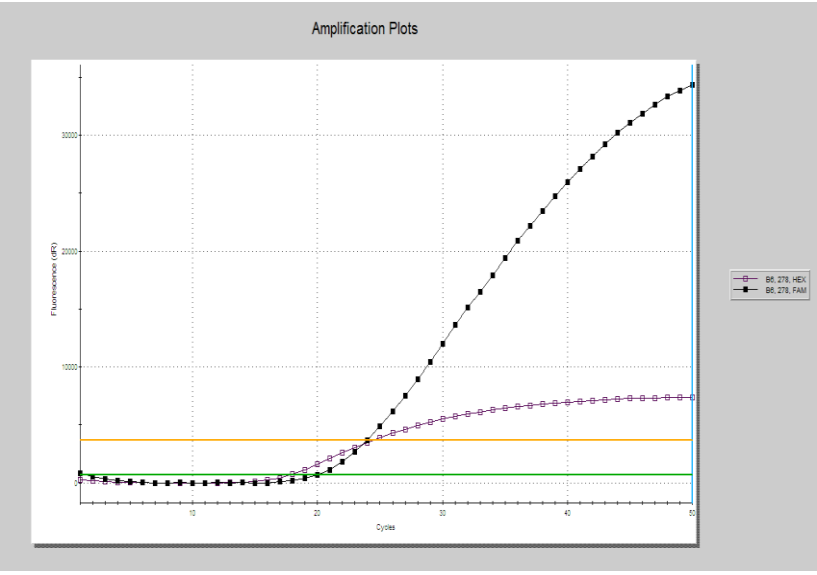


Slika 9. Reprezentativni prikaz restrikcijskih obrazaca uzoraka JJ4 i JJ12 (Jastrebarsko) i standardnog soja AT razdvojenih elektroforezom u 2,5 % gelu agaroze. Produkti veličine 1,1 kbp umnožene nPCR–metodom početnicama R16(X)F1/R pocijepani su enzimima *Rsa*I i *Ssp*I. Korišteni su 200 bp, 100 bp i M8 markeri.

Nakon cijepanja dobivenih produkata restrikcijskim enzimima *Rsa*I i *Ssp*I te elektroforeze u 2,5 %-tnom gelu agaroze, restrikcijske obrasce uzoraka usporedila sam s obrascem standardnog soja AT vrste '*Ca*. P. mali'. Restrikcijski obrasci svih pozitivnih uzoraka bili su jednaki onome standardnog soja '*Ca*. P. mali' (Slika 9).

Kako bi se povećala osjetljivost detekcije fitoplazmi u analizi uzoraka dobivenih iz tkiva jabuka, 2013. i 2014. koristila sam i metodu *real-time* PCR (Baric i Dalla-Via 2004). Osim osjetljivosti reakcije, kod ovakvog testiranja lakša je i eliminacija lažno negativnih rezultata zbog istovremenog umnažanja fragmenta 16S rDNA AP-fitoplazme i fragmenta gena za Leu–tRNA jabuke (endogene kontrole).

Zbog veće osjetljivosti, ovom je metodom AP–fitoplazma detektirana u dodatna tri uzorka jabuke (391, 397 i 437; Tablica P-2.1 u prilogu 2) u odnosu na nPCR/RFLP sustav detekcije. Do umnažanja endogene kontrole došlo je u svim testiranim uzorcima jabuke, s Ct–vrijednostima između 17,2 i 24,4 ciklusa. Prosječna je Ct–vrijednost endogene kontrole u uzorcima zdravih jabuka korištenih u reakcijama za negativnu kontrolu iznosila 22,4. Iz analiziranih uzoraka zaraženih jabuka, Ct–vrijednosti za AP–fitoplazmu iznosile su između 19,7 i 26,2 ciklusa (Slika 10), a prosječna Ct–vrijednost za endogenu kontrolu iznosila je 25,6 ciklusa.



Slika 10. Reprezentativna amplifikacijska krivulja uzorka jabuke iz Sv. Marije (278) u kojem je dokazana prisutnost gena za 16S rRNA fitoplazme *'Ca.* P. mali'. Crni kvadratići označavaju qAP-16S-FAM; ljubičasti kvadratići označavaju qMd-cpLeu-HEX.



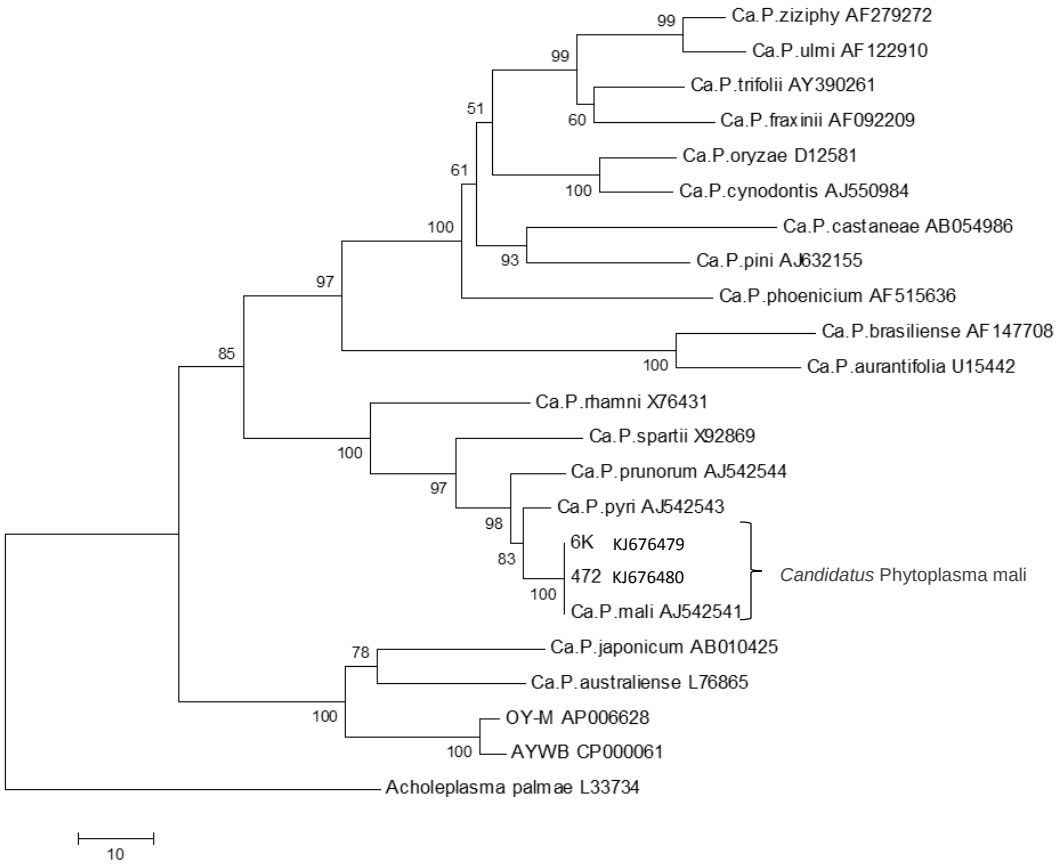
Slika 11. Karta s prikazom lokacija uzoraka jabuke i uzoraka vektorske vrste *C. picta* u kojima je potvrđena prisutnost fitoplazme '*Ca*. P. mali'.

Tablica 3. Zbirni prikaz ukupnog broja testiranih uzoraka (u zagradama) i broj uzoraka u kojima je dokazana prisutnost gena za 16S rRNA fitoplazme '*Ca.* P. mali' prema godini uzorkovanja, regiji i domaćinu. Svi uzorci testirani su nPCR/RFLP–metodom, a uzorci jabuka su 2013. i 2014. godine dodatno testirani i *real-time* PCR–metodom. Simbol ø označava regije i godine kada nije bilo uzorkovanja za pojedine vrste biljaka i kukaca domaćina.

Regija	**Domaćin**	**Broj pozitivnih uzoraka (ukupan broj testiranih uzoraka)**				
		2011	**2012**	**2013**	**2014**	**2016**
Sjeverozapadna kontinentalna Hrvatska (CW)	jabuka	7 (28)	8 (26)	24 (37)	8 (13)	2 (12)
	C. melanoneura	ø	0 (6)	0 (4)	0 (7)	0 (17)
	C. picta	ø	5 (51)	1 (2)	0 (36)	6 (91)
Ukupno		**7** (28)	**13** (83)	**25** (43)	**8** (56)	**8** (120)
Istočna kontinentalna Hrvatska (CE)	jabuka	5 (16)	1 (16)	5 (18)	0 (11)	ø
	C. melanoneura	ø	0 (3)	ø	ø	ø
	C. picta	ø	0 (2)	ø	ø	ø
Ukupno		**5** (16)	**1** (21)	**5** (18)	**0** (11)	ø
Dalmacija (AD)	jabuka	2 (8)	0 (10)	0 (6)	0 (3)	ø
Ukupno		**2** (8)	**0** (10)	**0** (6)	**0** (3)	ø
Sveukupno		**74** (423)				

4.2.3. Filogenetska analiza gena za 16S rRNA

Fragment fitoplazmatskog gena za 16S rRNA umnoženog početnicama P1/P7, približne veličine 1,8 kb sekvenciran je kako bi dodatno potvrdila identifikaciju '*Ca.* P. mali' u dva reprezentativna uzorka, 472 (jabuka, Sv. Marija) i 6K (*C. picta*, Sv. Marija). Dobivene sekvence deponirane su u bazu podataka GenBank, a pristupni brojevi navedeni su u Tablici P-3.2 (Prilog 3), kao i na slici 9. U analizi su korištene reprezentativne sekvence različitih vrsta fitoplazmi, odnosno različitih 16S–skupina, uz nukleotidni slijed gena za 16S rRNA vrste *Acholeplasma palmae* korištenog za ukorjenjivanje stabla (*outgroup*). Filogenetska analiza dobivenih sekvenci dodatno je potvrdila pripadnost vrsti '*Ca.* P. mali' s 99 % istovjetnosti s nukleotidnim slijedom gena za 16S rRNA referentnog soja AP15 '*Ca.* P. mali' (Slika 12).



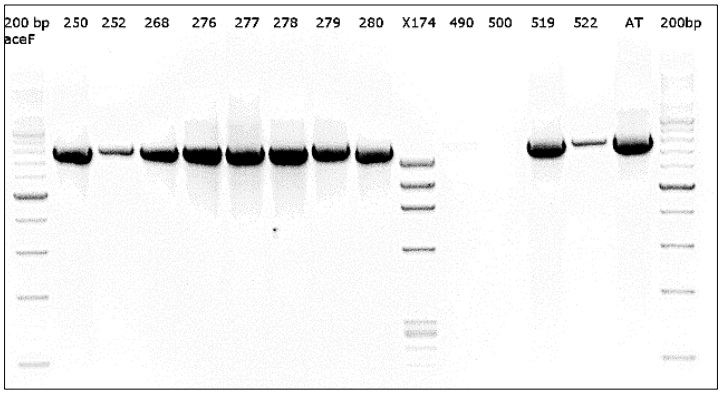
Slika 12. Ukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci gena za 16S rRNA, uz korištenje metode *neighbour-joining* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statitičkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. Za ukorjenjivanje stabla korišten je nukleotidni slijed gena za 16S rRNA vrste *A. laidlawii*, a u analizu su uvrštene sekvence reprezentativne za različite 16S–skupine, odnosno različite vrste fitoplazmi. Pristupni brojevi za sve korištene sekvence vidljivi su na stablu, a oznake uzoraka jabuke i lisne buhe *C. picta* iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4.

4.3. Multigenska analiza (*multilocus sequence typing*; MLST)

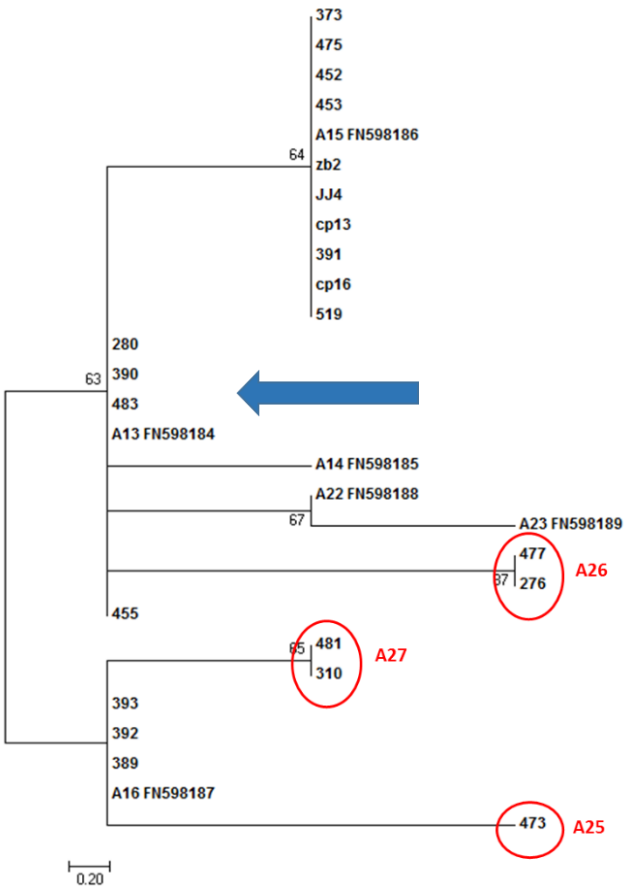
Iz uzoraka u kojima je potvrđena prisutnost fitoplazme '*Ca*. P. mali' umnoženi su i fragmenti gena *ace*F, *imp* i *sec*Y PCR–metodom te gena *pnp* nPCR–metodom uz korištenje specifičnih početnica osmišljenih u sklopu ove disertacije. Umnoženi fragmenti analizirani su elektroforezom u 1 %–tnom gelu agaroze. U nekim uzorcima jabuke u kojima je dokazana prisutnost gena za 16S rRNA fitoplazme *'Ca.* P. mali' nije bilo moguće umnožiti fragmente ciljanih gena u direktnoj ili ugniježđenoj PCR–reakciji. Tako je za tri uzorka (399, 451 i 490) umnožen samo fragment gena *pnp* metodom nPCR, dok za tri uzorka (397, 437 i 500) nije umnožen fragment niti jednog od 4 gena (Tablica P-2.1, Prilog 2). Neki od navedenih uzoraka (npr. 490 i 500) su testirani 2011. godine te postoji mogućnost da je došlo do degradacije nukleinskih kiselina. U uzorcima jabuke 397 i 437 prisutnost gena za 16S rRNA fitoplazme '*Ca.* P. mali' dokazana je samo metodom *real-time* PCR te je razlog vjerojatno manja koncentracija fitoplazmatske DNA u odnosu na ostale uzorke. Za multigensku su analizu tako uzeta u obzir 64 uzorka u kojima su uspješno umnoženi i sekvencirani fragmenti sva četiri ciljana gena te su u potpunosti genotipizirani (Tablica 4).

4.3.1. Gen *ace*F

Fragment približne veličine 1500 bp koji obuhvaća čitavu regiju gena *ace*F (Slika 13) umnožen je u direktnoj PCR–reakciji. Sekvence gena *ace*F analizirane su računalnim metodama te su dobivena filogenetska stabla koja prikazuju grananje sojeva fitoplazmi uslijed nastalih nukleotidnih promjena.



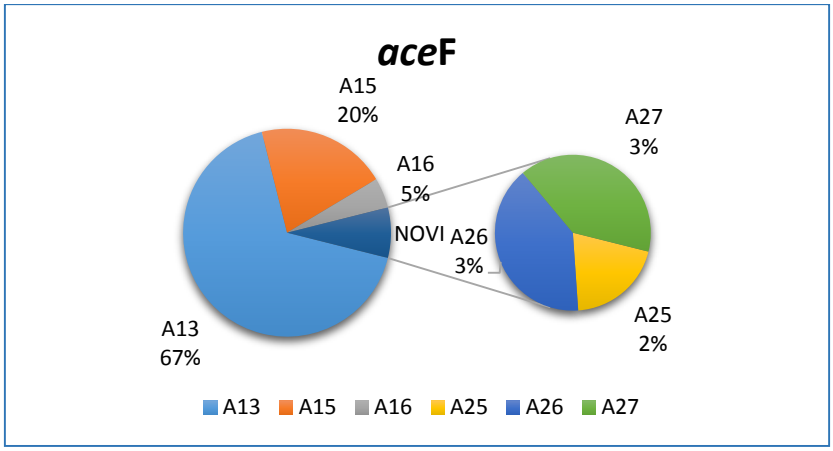
Slika 13. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze u 1 %–tnom gelu agaroze fragmenata fitoplazmatskog gena *ace*F približne veličine 1,5 kb umnoženog metodom PCR. Uz uzorke jabuke (250, 252, 268, 276, 277, 278, 279, 280, 490, 500, 519, 522; oznake u Tablici 4) na gelu je i referentni soj AT '*Ca*. P. mali' kao pozitivna kontrola te 200bp i ϕX174 - *Hae*III DNA markeri.



Slika 14. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta gena *ace*F fitoplazme '*Ca*. P. mali' približne veličine 790 bp, uz korištenje metode *maximum parsimony* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu su uvrštene referentne sekvence gena *aceF* fitoplazme '*Ca*. P. mali' za genotipove opisane u Danet i sur., (2011.). Dominantni genotip A13 označen je plavom strelicom, a 3 nova genotipa (A25 – A27) opisana u Hrvatskoj zaokružena su crveno. Pristupni brojevi za referentne sekvence vidljivi su na stablu, a nalaze se i u Prilogu 3, Tablici P-3.1. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za sekvence reprezentativnih te uzoraka novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

Za fragment gena *ace*F fitoplazme '*Ca*. P. mali' približne veličine 790 bp je na temelju promjene u nukleotidnom slijedu prethodno opisano šest genotipova (A13 – A16 i A22 – A23). Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno filogenetskom analizom fragmenta gena koji omogućuje usporedbu s referentnim sekvencama promatrano unutar izolata istraživanih uzoraka za gen *aceF* pokazuje grananje u devet genotipova zbog promjena nukleotidnog slijeda (Slika 14; Tablica 4).

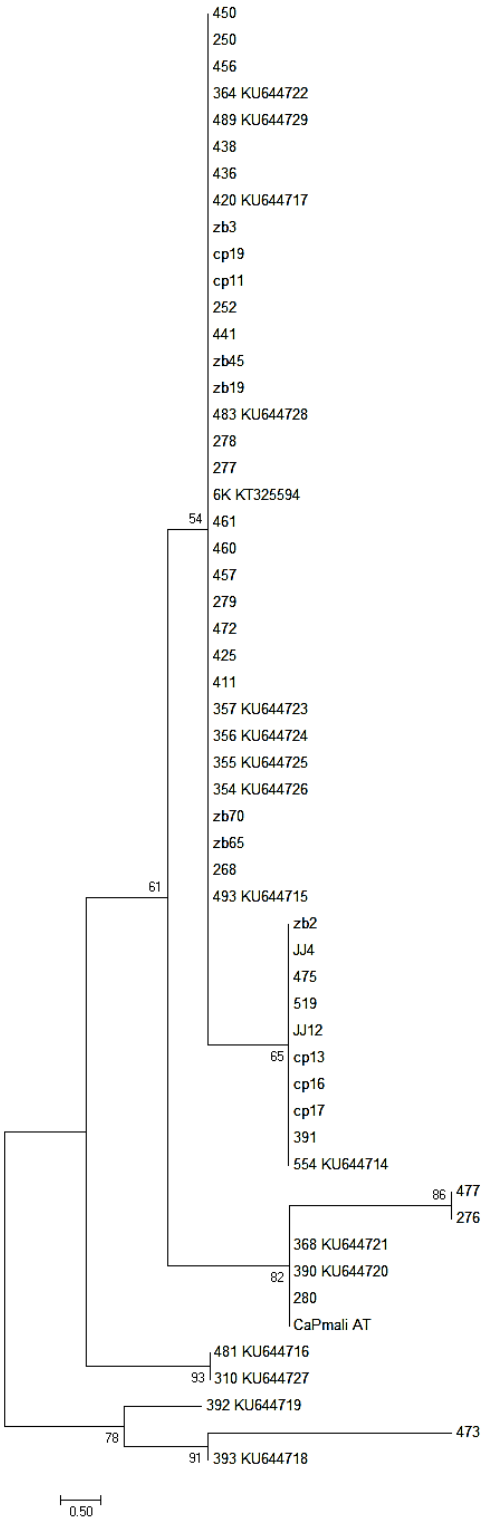
Od prethodno opisanih i zabilježenih šest genotipova prema Danet i sur., (2011), tri su prisutna u Hrvatskoj (A13, A15 i A16). Dominantni genotip A13 utvrđen je u čak 43 od 64 uzorka (67 %), a kao i genotip A15, prisutan je u uzorcima iz obje kontinentalne regije, kao i u svim uzorcima vrste *C. picta*. Genotip A16 zabilježen je samo u dva uzorka u Svetoj Mariji. Identificirana su i 3 nova *ace*F–genotipa kojima su dodijeljene oznake A25, A26 i A27 (Tablica 4, Slika 14), sva tri u uzorcima jabuka iz Donjeg Mihaljevca i Svete Marije (CW).



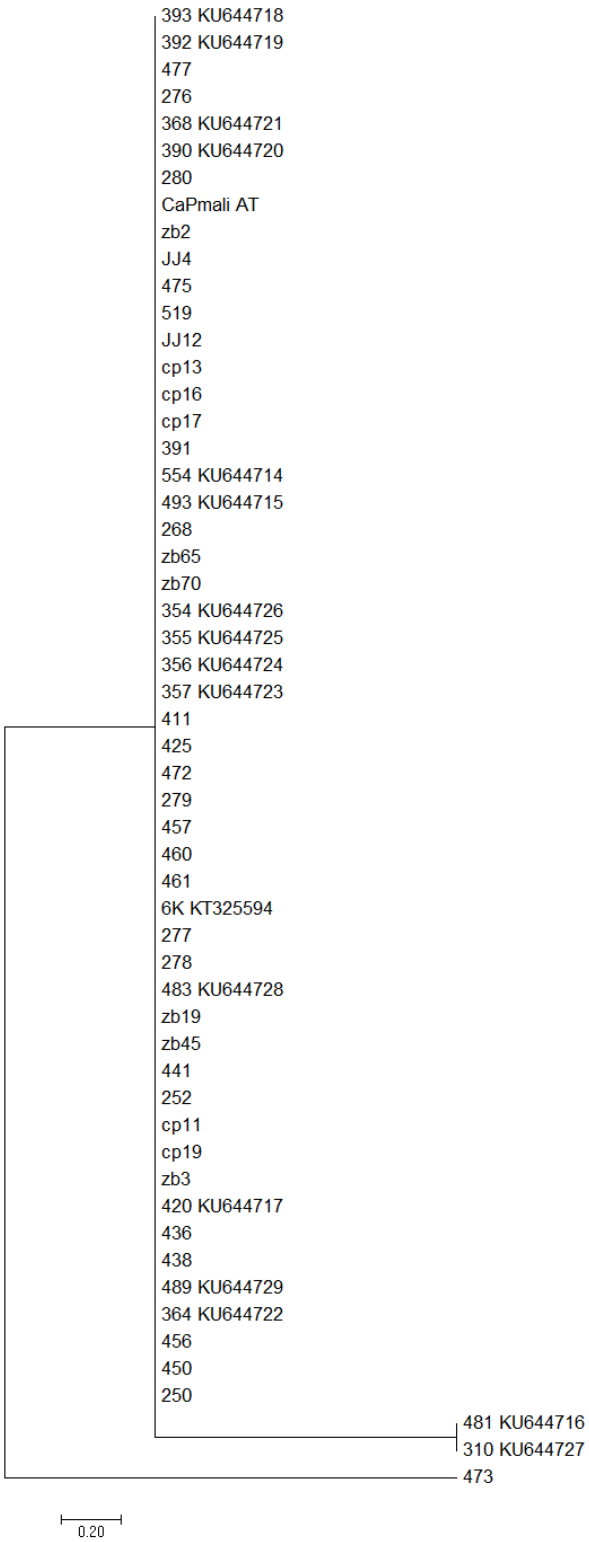
Slika 15. Grafički prikaz zastupljenosti prethodno opisanih (A13, A15 i A16) i novih *ace*F–genotipova (A25, A26 i A27) u Hrvatskoj.

Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci cijelog gena *aceF* od približno 1260 bp, promatrano unutar izolata ispitivanih uzoraka i referentne sekvence soja AT '*Ca*. P. mali', pokazuje grananje u osam genotipova zbog promjena nukleotidnog slijeda na ukupno 14 pozicija (Slika 16). Za većinu se uzoraka grupiranje na temelju kraćeg fragmenta gena i cijelog gena poklapa, a samo su se dva uzorka (392 i 393 – genotip A16 na Slici 11) izdvojila zbog nukleotidnih promjena u dijelu gena izvan fragmenta korištenog za usporedbu s referentnim genotipovima.

Analizom slijeda aminokiselina čitavog proteina kodiranog genom *ace*F '*Ca*. P. mali' dobiveno filogenetsko stablo pokazuje grupiranje u tri grane zbog izmjene koda za sintezu aminokiseline (Slika 17). Od 420 aminokiselina, tri pozicije su varijabilne: 51, 210 i 244. Izdvajaju se samo uzorci dva nova genotipa A25 i A27. U uzorku 473 (genotip A25 na Slici 14) došlo je do dvije promjene: izoleucin (Ile, I) u valin (Val, V) na poziciji 51 i asparaginska kiselina (Asp, D) u asparagin (Asn, N) na poziciji 244 slijeda aminokiselina. Uzorci 481 i 310 (genotip A27 na Slici 14) izdvajaju se zbog jedne promjene koda koji umjesto za glutamin (Gln; Q) kodira za lizin (Lys, K) na poziciji 210 slijeda aminokiselina.



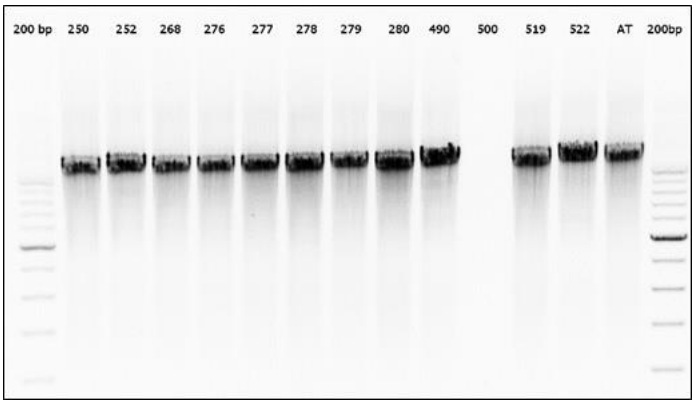
Slika 16. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci gena *aceF* fitoplazme '*Ca*. P. mali' od približno 1260 bp, uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu je uvrštena referentna sekvenca gena *ace*F soja AT fitoplazme '*Ca*. P. mali', čiji se pristupni broj nalazi u Tablici P-3.1 Priloga 3. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za reprezentativne uzorke i uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.



Slika 17. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom slijeda od približno 420 aminokiselina koje kodira gen *ace*F fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. U analizu je uvrštena referentna sekvenca gena *ace*F soja AT fitoplazme '*Ca*. P. mali', čiji se pristupni broj nalazi u Tablici P-3.1 Priloga 3. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za reprezentativne uzorke i uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

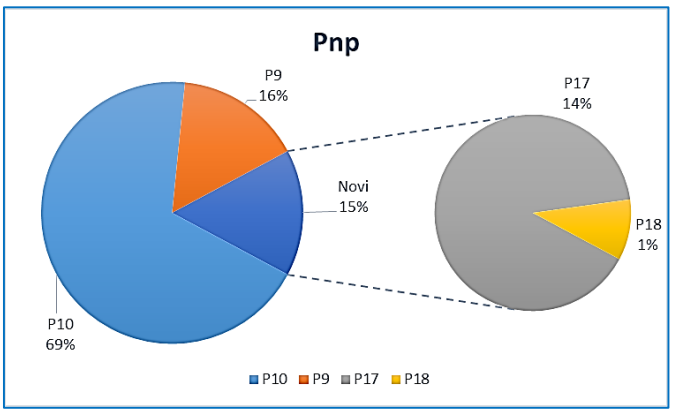
4.3.2. Gen *pnp*

U reakciji nPCR umnožen je fragment koji obuhvaća cjelokupnu regiju gena *pnp*, približne veličine 2400 bp (Slika 18).

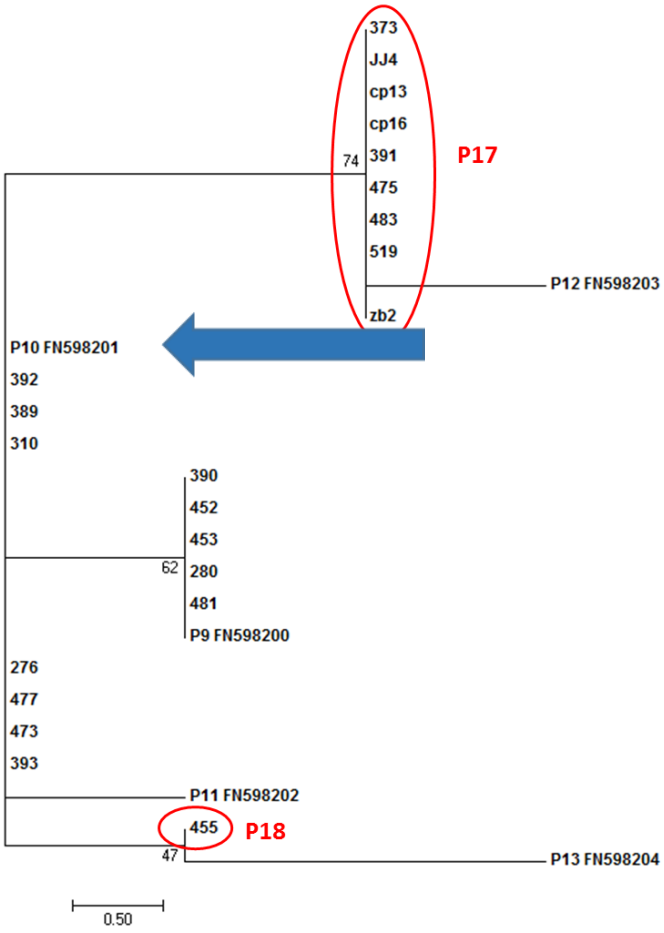


Slika 18. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze umnožene regije fitoplazmatskog gena *pnp* približne veličine 2,4 kb dobivene u reakciji nPCR. Uz uzorke jabuke (250, 252, 268, 276, 277, 278, 279, 280, 490, 500, 519, 522; oznake u Tablici 4) na gelu je i referentni soj AT '*Ca*. P. mali' kao pozitivna kontrola te 200bp DNA marker.

Analizom dobivenih sekvenci fragmenta gena *pnp* od 512 nukleotida dobiveno je neukorijenjeno filogenetsko stablo koje pokazuje grananje u sedam zasebnih genotipova zbog promjena nukleotidnog slijeda (Slika 20). Od pet prethodno opisanih genotipova, dva su prisutna i u Hrvatskoj, a dominantni genotip P10 utvrđen je u 44 uzorka (Slika 19). U uzorcima su utvrđena i 2 nova genotipa - P17 i P18 (Slika 20), od kojih je novi genotip P17 identificiran u tri uzorka vektora *C. picta* i čak šest uzoraka jabuka iz obje kontinentalne regije, a genotip P18 u samo jednom uzorku jabuke iz Sv. Marije (Tablica 4; Slika 19).



Slika 19. Grafički prikaz zastupljenosti prethodno opisanih (P9 i P10) i novih (P17 i P18) *pnp*–genotipova u Hrvatskoj.

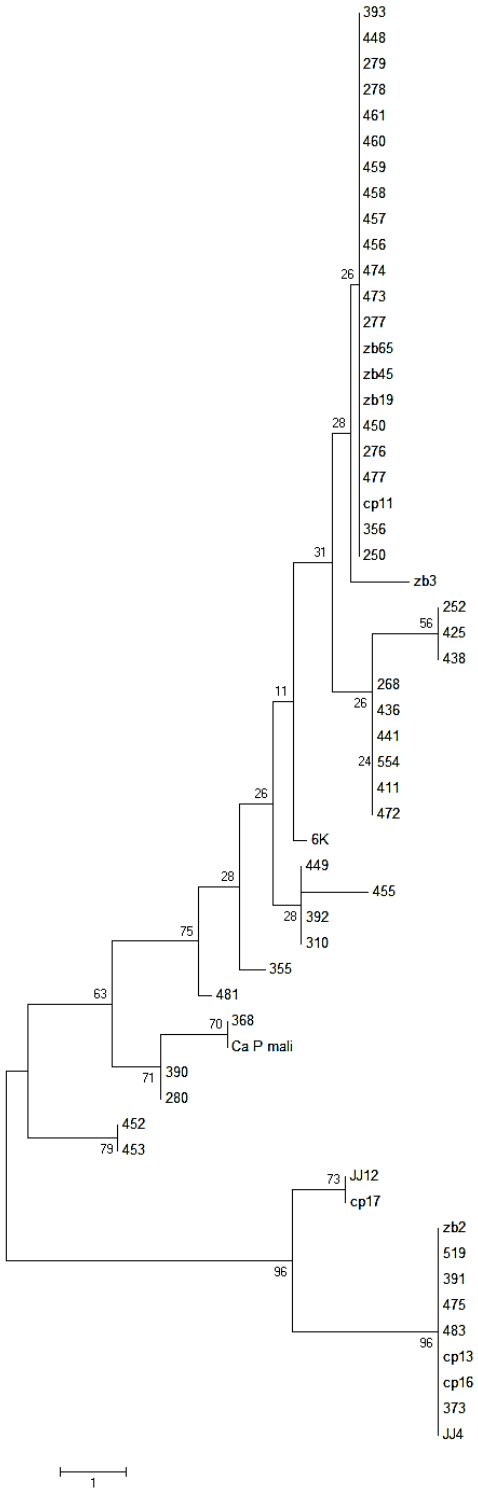


Slika 20. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta gena *pnp* fitoplazme '*Ca*. P. mali' od 512 nukleotida, uz korištenje metode *maximum parsimony* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu su uvrštene referentne sekvence gena *pnp* fitoplazme '*Ca*. P. mali' za genotipove opisane u Danet i sur., (2011.). Dominantni genotip P10 označen je plavom strelicom, a 2 nova genotipa (P17 i P18) opisana u Hrvatskoj zaokružena su crveno. Pristupni brojevi za referentne sekvence vidljivi su na stablu, a nalaze se i u Prilogu 3, Tablici P-3.1. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za sekvence uzoraka novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

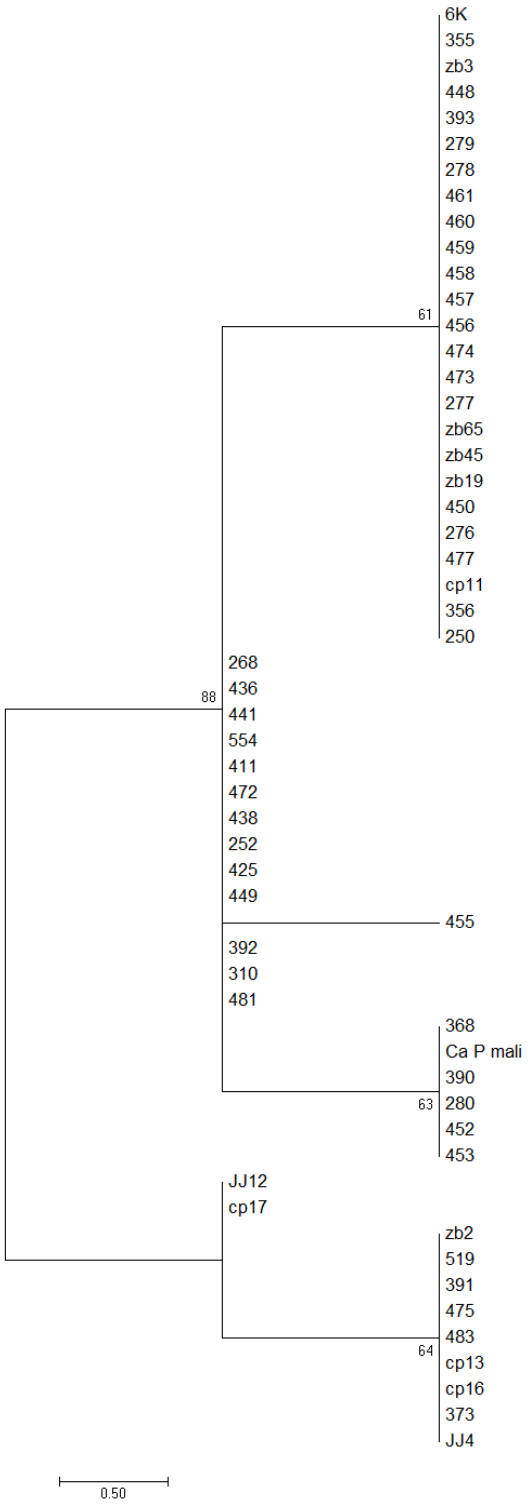
Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci cijelog gena *pnp* od 2187 bp promatrano unutar izolata ispitivanih uzoraka i referentne sekvence soja AT '*Ca*. P. mali' pokazuje grananje u 14 zasebnih genotipova zbog promjena nukleotidnog slijeda izvan fragmenta korištenog za usporedbu s referentnim genotipovima, ukupno 16 varijabilnih nukleotidnih pozicija (Slika 21). Uzorci koji su se usporedbom značajno kraćeg fragmenta (512 u odnosu na 2187 bp; Prilog 3, Popis (b) Reprezentativne sekvence gena *pnp*) grupirali unutar genotipova P9 i P10 razdvojili su se u 11 zasebnih grana. Tako je većina uzoraka kojima je određen genotip P10 ostala u istom klasteru, unutar kojeg su se izdvojile 4 grupe uzoraka: 310,

392 i 449; 6K; 268, 436, 441, 554, 411 i 472; 252, 425 i 438. Uzorci genotipa P9 razdvojili su se na sedam grana: JJ12 i cp17; 452 i 453; 390 i 280; 481; 355; zb3 te zasebno uzorak 368 s referentnom sekvencom AT '*Ca*. P. mali', koja je ujedno i referentna za ovaj genotip.

Analizom slijeda aminokiselina koje kodira gen *pnp* '*Ca*. P. mali' dobiveno je neukorijenjeno filogenetsko stablo koje pokazuje grupiranje u šest grana zbog izmjene koda za sintezu aminokiseline (Slika 22). Svih devet uzoraka genotipa P17 (zb2 – JJ4) i ovdje se izdvaja od ostalih te se grupiraju u zaseban klaster zajedno s uzorcima JJ12 i Cp17 genotipa P9 s kojima dijele neke od izmjena u slijedu aminokiselina. Promjene u slijedu aminokiselina koje su karakteristične za genotip P17 su: serin (Ser, S) u asparagin (Asn, N) na poziciji 125, lizin (Lys, K) umjesto glutaminske kiseline (Glu, E) na 152 (promjena koju dijele s uzorcima JJ12 i Cp17) i alanin (Ala, A) umjesto treonina (Thr, T) na poziciji 638. Promjena karakteristična za genotip P18 (uzorak 455) je asparagin (Asn, N) umjesto lizina (Lys, K) na poziciji 559. Na poziciji 238 može biti izoleucin (Ile, I) ili asparagin (Asn, N), ali ova promjena nije specifična ni za genotip P9 niti P10, iako uzorci oba nova genotipa, P17 i P18, na ovom mjestu imaju izoleucin.



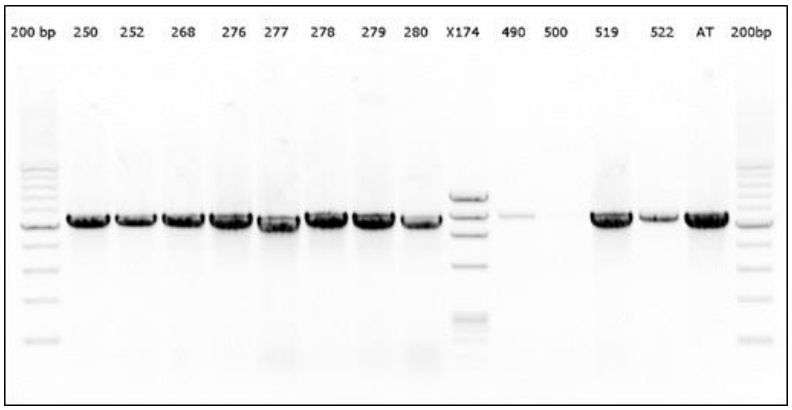
Slika 21. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci gena *pnp* fitoplazme '*Ca*. P. mali' od 2187 bp, uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu je uvrštena referentna sekvenca gena *pnp* AT soja fitoplazme '*Ca*. P. mali', čiji se pristupni broj nalazi u Tablici P-3.1 Priloga 3. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za reprezentativne uzorke i uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.



Slika 22. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom slijeda od 729 aminokiselina koje kodira gen *pnp* fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. U analizu je uvrštena referentna sekvenca gena *pnp* soja AT fitoplazme '*Ca*. P. mali', čiji se pristupni broj nalazi u Tablici P-3.1 Priloga 3. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za reprezentativne uzorke i uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

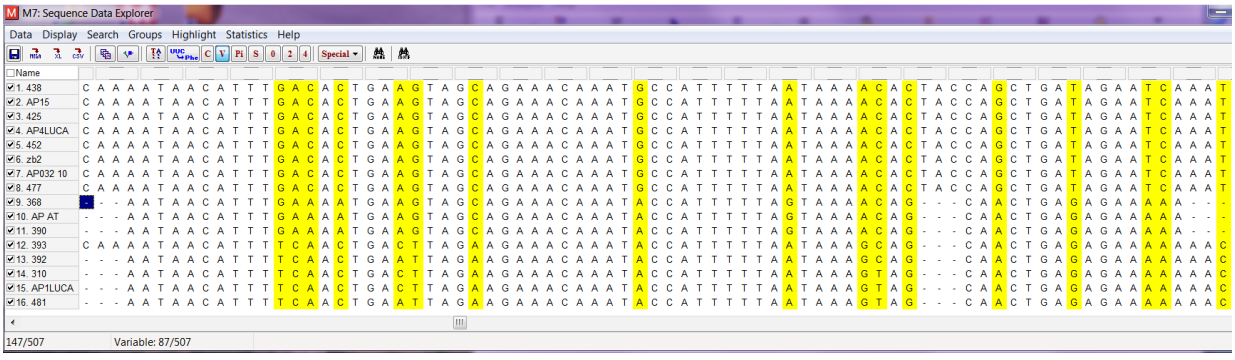
4.3.3. Gen *imp*

U uzorcima korištenim u MLST analizama u direktnoj je reakciji PCR umnožen produkt približne veličine 1000 bp (Slika 23).



Slika 23. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze fragmenata fitoplazmatskog gena *imp* približne veličine 1 kb umnoženog u direktnoj PCR reakciji. Uz uzorke jabuke (250, 252, 268, 276, 277, 278, 279, 280, 490, 500, 519, 522; oznake uzoraka u Tablici 4) na gelu je i referentni soj AT '*Ca*. P. mali' kao pozitivna kontrola te 200 bp i ϕX174 - *Hae*III DNA ljestvice.

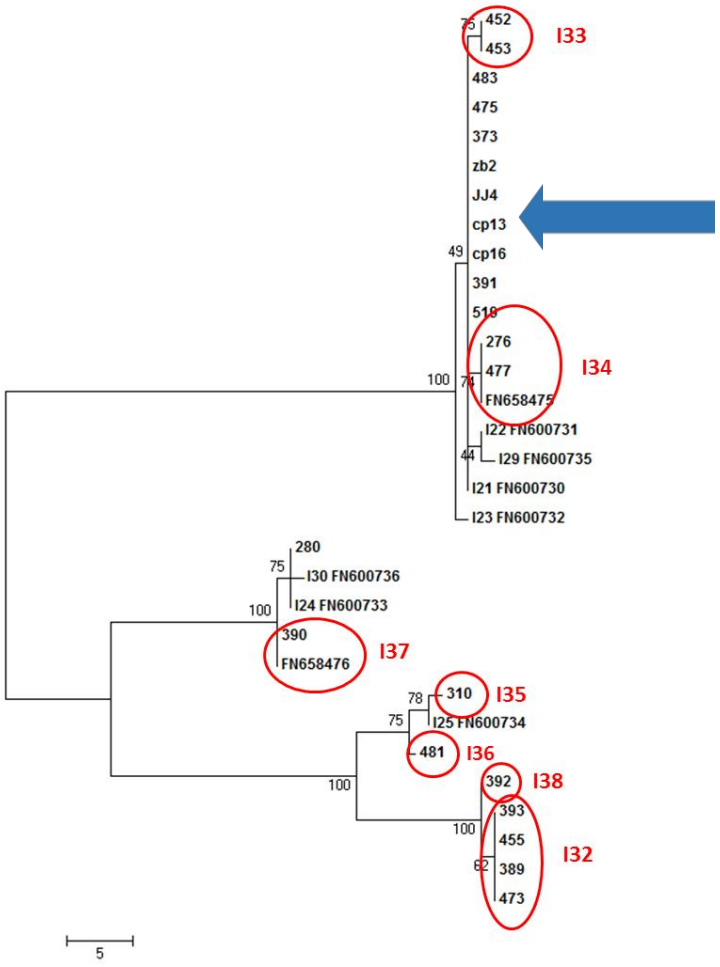
Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci gena *imp* pokazuje grananje u 15 genotipova zbog promjena nukleotidnog slijeda koji se grupiraju u četiri klastera (Slika 25). Pretraživanjem (BLAST) sekvenci novih genotipova u bazi podataka GenBank pronađene su sekvence gena *imp* koje su identične novim genotipovima I34 i I37 te su uključene u filogenetske analize (Seemüller i sur., 2010.; FN658475 i FN658476 na Slici 25; Prilog 3, Tablica P-3.1).



Slika 24. Prikaz poravnanja nukleotidnog slijeda reprezentativnih uzoraka za svaki genotip gena *imp* (oznake uzoraka u Tablici 4). Na slici je prikazana izrazito varijabilna regija unutar koje je došlo do delecija (147-149; 203-205; 221-223/507) zbog kojih veličina gena varira od 498 do 507 bp.

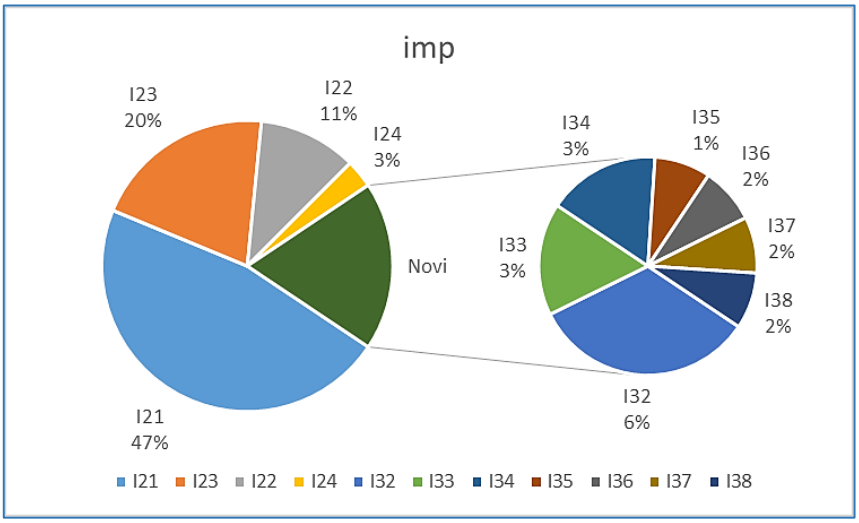
Čak je 87 od 507 pozicija nukleotidnog slijeda gena *imp* varijabilno, a jednu od najvećih razlika čine delecije unutar nukleotidnog slijeda zbog kojih veličina gena varira od 498 bp (I24 i I37) do 507 bp (Slika 24).

Tri genotipa identificirana u najvećem broju uzoraka (I21, I22 i I23) grupiraju se u isti klaster s dva nova genotipa, I33 i I34. Od do sada poznatih sedam genotipova, u hrvatskim izolatima su potvrđena četiri (I21 – I24) te još sedam novih genotipova: I32 – I38 (Slika 25).



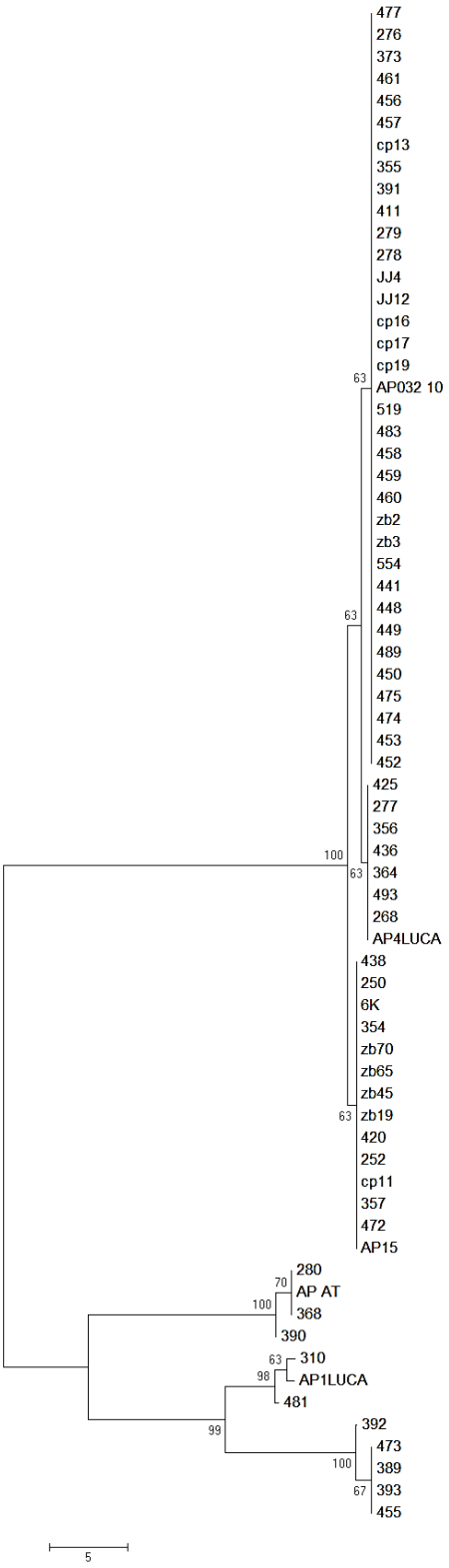
Slika 25. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom reprezentativnih nukleotidnih sekvenci gena *imp* fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *maximum parsimony* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu su uvrštene referentne sekvence gena *imp* fitoplazme '*Ca*. P. mali' za genotipove opisane u Danet i sur., (2011.). Dominantni genotip I21 označen je plavom strelicom, a sedam novih genotipova opisanih u Hrvatskoj (I32 – I38) zaokruženo je crveno. Pristupni brojevi za referentne sekvence vidljivi su na stablu, a nalaze se i u Prilogu 3, Tablici P-3.1. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za sekvence uzoraka novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

Dominantni genotip u Hrvatskoj, I21, utvrđen je u 30 uzoraka (47 %), a zajedno s još četiri genotipa iz istog klastera (I22, I23, I33 i I34) čini čak 84 % genotipiziranih uzoraka (Slika 26). U uzorcima vektora *C. picta* identificirana su samo dva genotipa, I21 i I23, svaki u točno 50 % uzoraka. Svih sedam novih genotipova (I32 – I38) potvrđeno je u čak 12 uzoraka jabuka, isključivo s lokacija Donji Mihaljevec i Sv. Marija, tijekom sve četiri godine (Tablica 4).



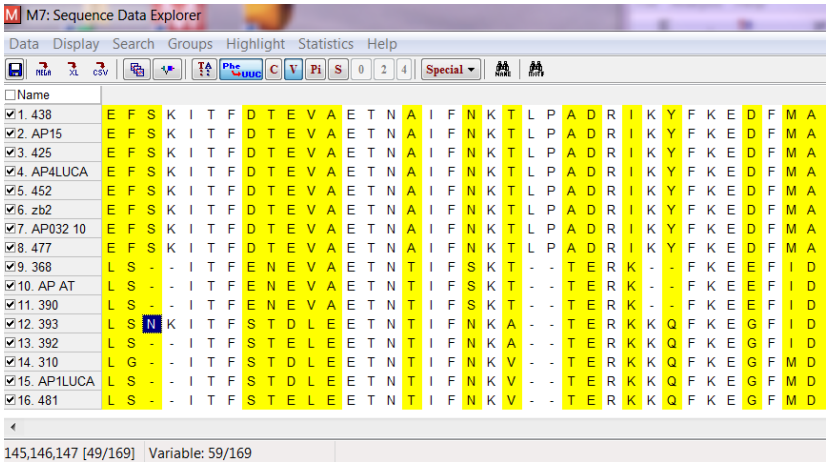
Slika 26. Grafički prikaz zastupljenosti prethodno opisanih (I21 – I24) i novih *imp*–genotipova opisanih u Hrvatskoj (I32 – I38).

Filogenetskom analizom slijeda od približno 169 aminokiselina kodiranih genom *imp* '*Ca*. P. mali' dobiveno je neukorijenjeno filogenetsko stablo koje pokazuje grupiranje u 10 grana zbog izmjene koda za sintezu aminokiselina (Slika 27). U ovu analizu nisu bile uključene referentne sekvence za genotipove I29 i I30. N-terminalna regija kodiranog proteina je konzervirana, od pozicije 1 do 37, dok je u hidrofilnom dijelu proteina koji je izložen na površini stanice čak 59 mjesta u slijedu aminokiselina varijabilno (Slika 28). Razlika u odnosu na grupiranje na temelju slijeda nukleotida je što su dva nova genotipa, I33 i I34 (redom uzorci 452 i 477 na Slici 27), na razini aminokiselina identična dominantnom genotipu I21 (referentna sekvenca AP032_10, na Slici 27).



Slika 27. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom slijeda aminokiselina koje kodira gen *imp* fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. U analizu su uvrštene referentne sekvence genotipova I21 (AP032-10), I22 (AP4LUCA), I23 (AP15), I24 (AP AT) i I25 (AP1LUCA), čiji se pristupni brojevi nalaze u Tablici P-3.1 Priloga 3. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

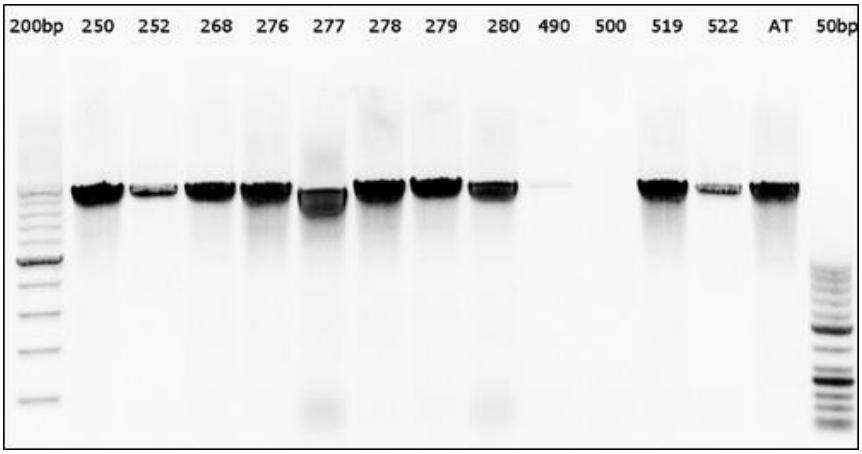
Klaster u kojem se grupiraju dominantni genotipovi, kako je opisano i za grupiranje na temelju promjena u nukleotidnom slijedu, izdvaja se zbog čak 23 promjene u slijedu aminokiselina u odnosu na ostale. Za klaster u kojem su grupirani uzorci genotipova I24 (AP_AT) i I37 (390), osim promjena aminokiselina, karakteristična je delecija od dvije aminokiseline, i to lizin (Lys, K) na poziciji 74 i tirozin (Tyr, Y) na poziciji 75 slijeda aminokiselina (Slika 28).



Slika 28. Prikaz poravnanja slijeda aminokiselina kodiranog genom *imp* reprezentativnih uzoraka i referentnih sekvenci za pojedine genotipove (Tablici 4; Tablica P-3.1 u Prilogu 3). Na slici je prikazan izrazito varijabilni dio u slijedu aminokiselina te zbog delecija protein kodiran genom *imp* veličinom varira od 166 do 169 aminokiselina.

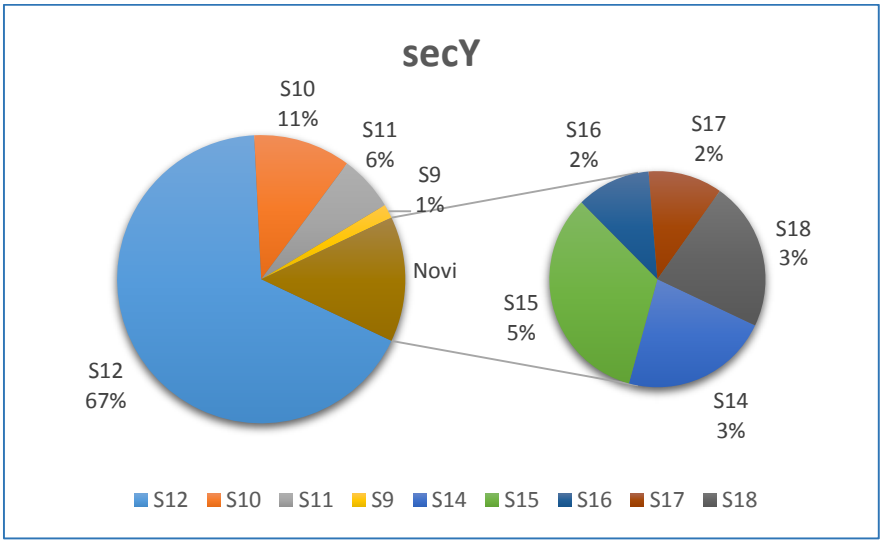
4.3.4. Gen *sec*Y

Kod većine uzoraka u direktnoj reakciji PCR dobiven je produkt približne veličine 1800 bp (Slika 29). Za neke od uzoraka (npr. Cp16, JJ12, 252, 279, 452; oznake u Tablici 4) u direktnoj reakciji uopće nije dobiven produkt ili nije dobivena zadovoljavajuća koncentracija produkta potrebna za sekvenciranje te ih je bilo potrebno dodatno umnožiti metodom nPCR. Za neke od uzoraka, a posebno one za koje su kasnije određeni novi genotipovi (280, 390, 392; oznake u Tablici 4), je zbog dijela gena od gotovo 100 bp unutar kojeg je došlo do više delecija i insercija, bilo potrebno i dodatno sekvenciranje početnicama unutar umnoženog fragmenta kako bi se dobila veća pokrivenost (3 ili 4 puta) i pouzdani rezultati.



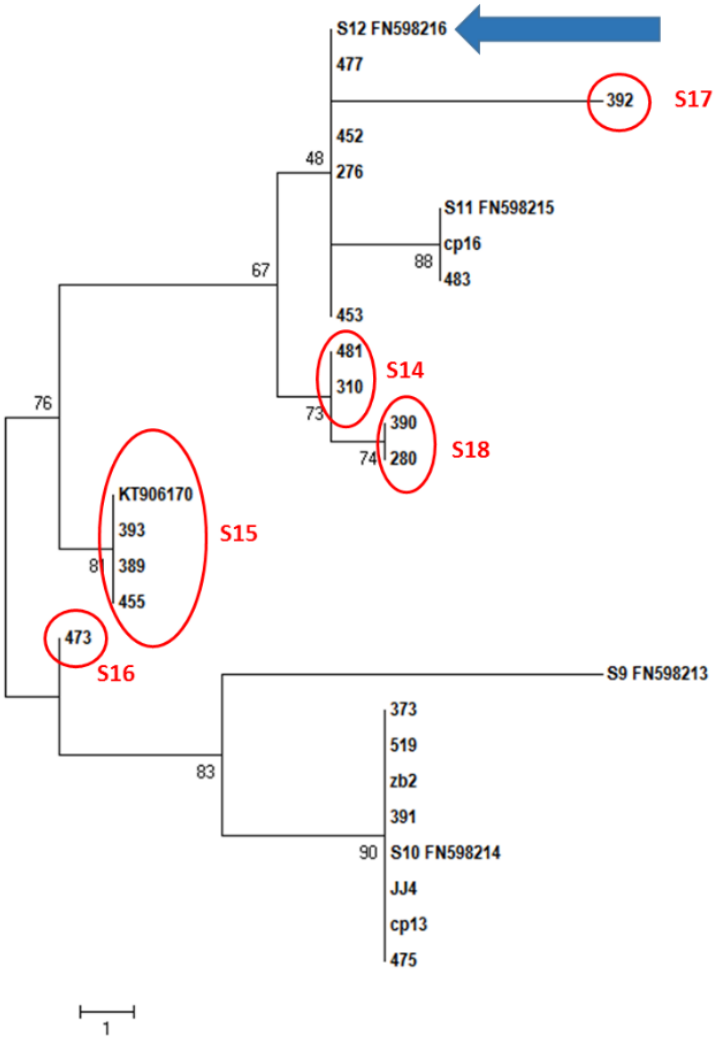
Slika 29. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze fragmenata fitoplazmatskog gena *sec*Y približne veličine 1,8 kb umnoženog u direktnoj PCR reakciji. Uz uzorke jabuke (250, 252, 268, 276, 277, 278, 279, 280, 490, 500, 519, 522) na gelu je i referentni soj AT '*Ca*. P. mali' kao pozitivna kontrola te 200 bp i 50 bp DNA–markeri.

Analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta gena *sec*Y veličine između 646 i 667 bp dobiveno je filogenetsko stablo koje se grana u devet genotipova zbog promjena nukleotidnog slijeda (Slika 31). Uz četiri poznata genotipa (S9 – S12) u uzorcima je utvrđeno još pet novih genotipova (S14 – S18), a dominantan je genotip S12 u 43 uzorka (67 %; Slika 30). Usporedbom sekvenci novih genotipova *sec*Y sa sekvencama fitoplazmatskog gena *sec*Y u bazi podataka GenBank pronađena je sekvenca koja je identična novom genotipu S15 te je uključena u filogenetske analize (KT906170 na Slici 31; Prilog 3, Tablica P-3.1).



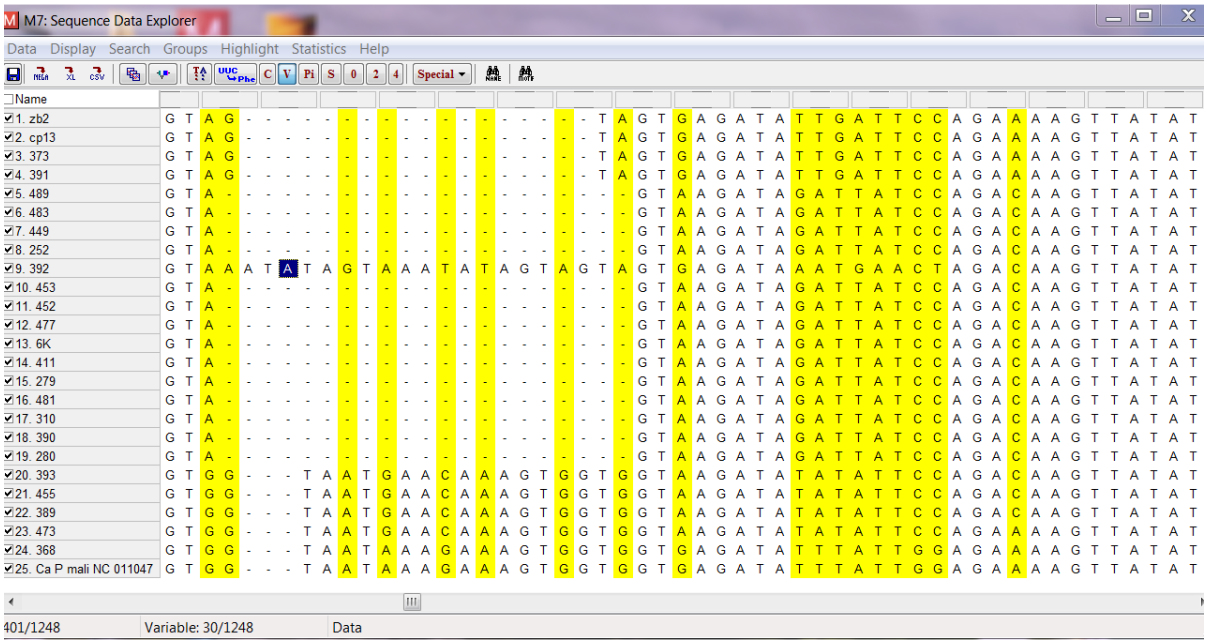
Slika 30. Grafički prikaz zastupljenosti prethodno opisanih (S9 – S12) i novih (S14 – S18) genotipova *sec*Y u Hrvatskoj.

Svih pet novih genotipova (S14 – S18) identificirano u 10 uzoraka jabuka s lokacija Donji Mihaljevec i Sv. Marija nisu bili prisutni niti na jednoj drugoj lokaciji. U uzorcima vektora *C. picta* identificirana su tri najčešća genotipa (S10, S11 i S12) s približno istom učestalošću kao i za ukupni broj uzoraka.



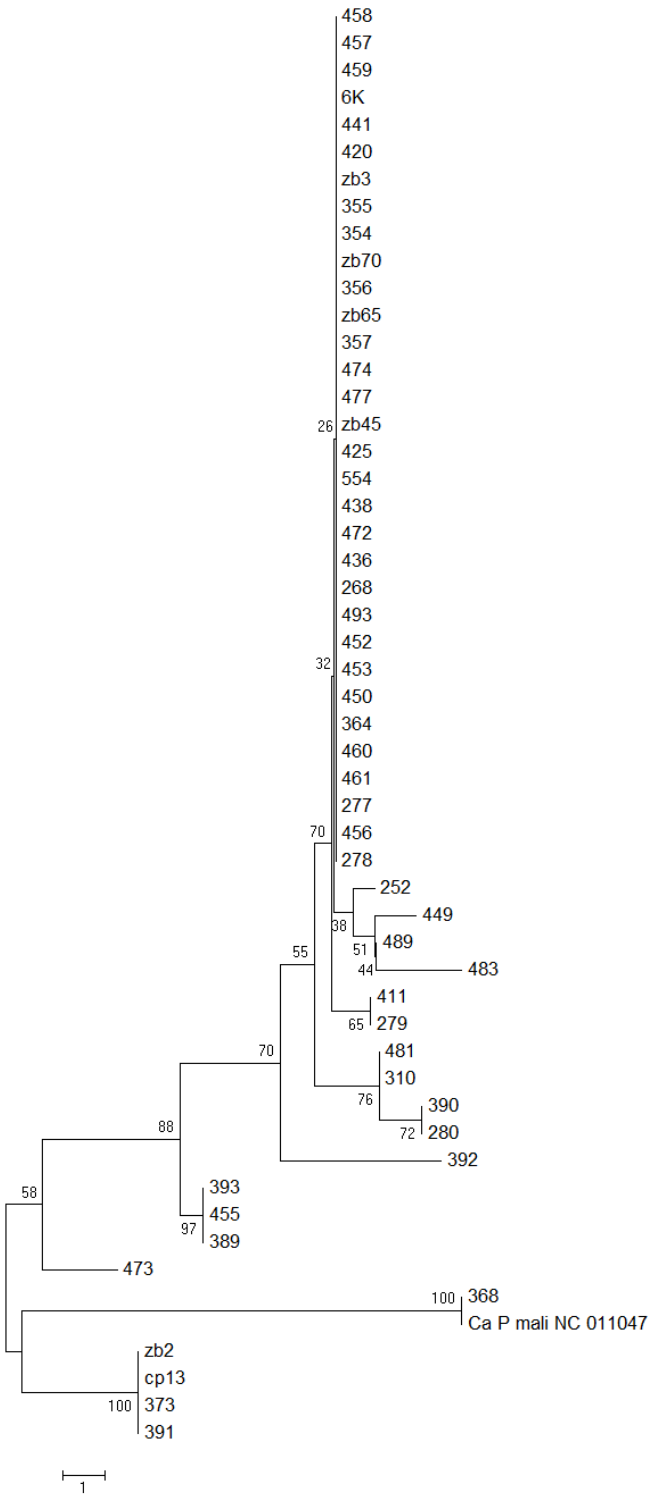
Slika 31. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta gena *sec*Y od približno 667 bp fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *maximum parsimony* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu su uvrštene referentne sekvence gena *sec*Y fitoplazme '*Ca*. P. mali' za genotipove opisane u Danet i sur., (2011.). Dominantni genotip S12 označen je plavom strelicom, a zaokruženo je 5 novih genotipova (S14 – S17). Pristupni brojevi za referentne sekvence vidljivi su na stablu, a nalaze se i u Prilogu 3, Tablici P-3.1. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

Unutar varijabilne regije gena *sec*Y (Slika 32), u odnosu na referentnu sekvencu soja AT '*Ca*. P. mali' duljine 1245 bp, došlo je do insercije od tri nukleotida (S17, uzorak 392) ili delecija više nukleotida (15 nukleotida za uzorke genotipa S10 ili čak 18 nukleotida za uzorke genotipa S12) zbog čega dužina gena varira od 1227 bp (S11, S12, S14 i S18) do 1248 bp (novi genotip S17). Izvan ove izrazito varijabilne regije, samo je kod nekoliko uzoraka došlo do jedne (uzorci 411, 279, 252 i 489) ili dvije promjene (uzorak 449).



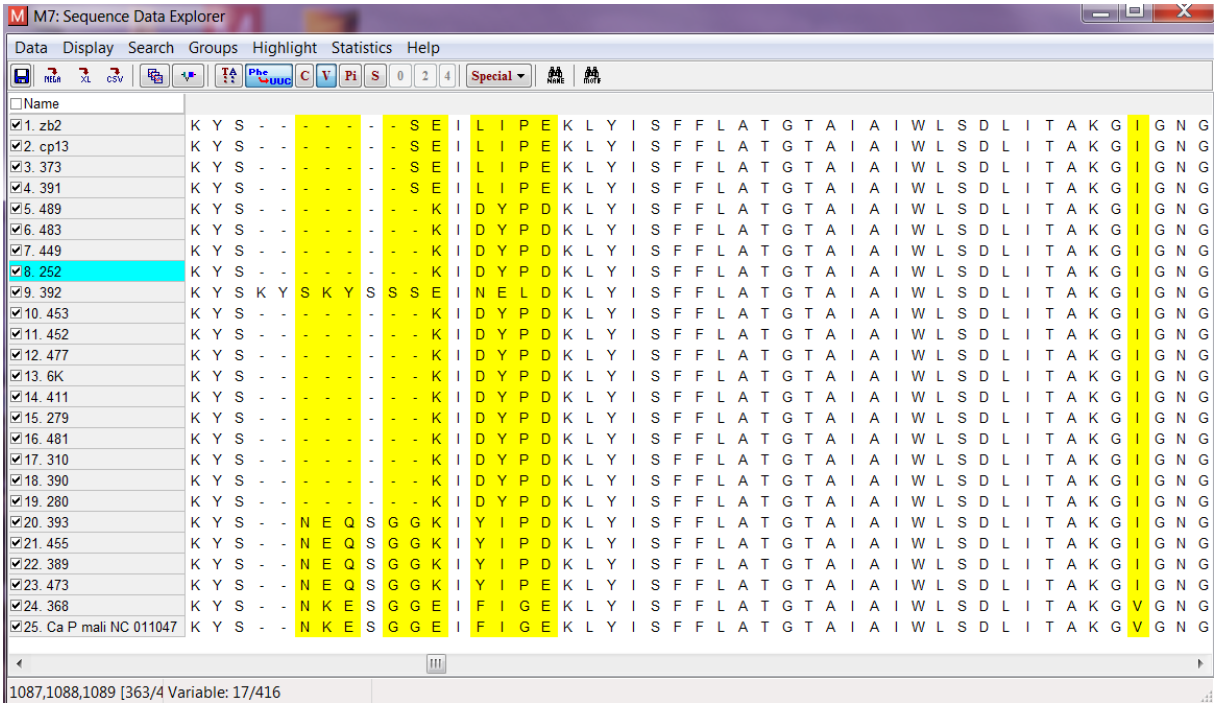
Slika 32. Prikaz poravnanja nukleotidnog slijeda gena *sec*Y reprezentativnih uzoraka za pojedine genotipove (oznake uzoraka u Tablici 4). Na slici je prikazana izrazito varijabilna regija (397 – 438/1248 bp) unutar koje je u odnosu na referentnu sekvencu gena *sec*Y soja AT '*Ca*. P. mali' došlo do insercije (genotip S17, uzorak 392) ili delecija (genotip S12, npr. uzorak 477).

Kraći fragment gena *sec*Y od približno 667 bp, korišten u filogenetskim analizama za usporedbu s referentnim sekvencama genotipova *sec*Y, zahvaća dio gena najveće varijabilnosti (397 – 438/ 1248 bp; Slika 32), dok izvan nje ima samo manji broj značajnih promjena nukleotida. Stoga se neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci cijelog gena *sec*Y najvećim dijelom poklapa sa stablom dobivenim filogenetskom analizom fragmenta gena (Slika 33).

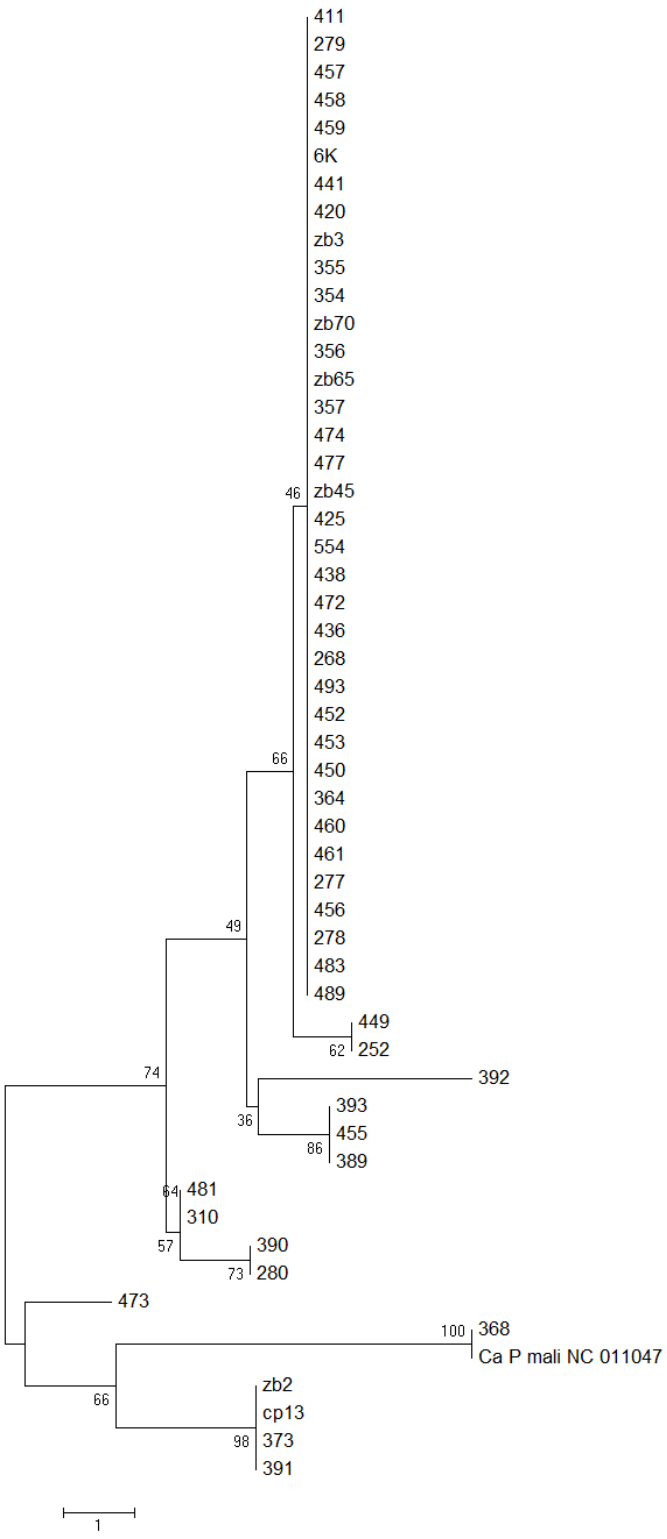


Slika 33. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci gena *sec*Y fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu je uvrštena referentna sekvenca gena *sec*Y AT soja fitoplazme '*Ca*. P. mali', čiji je pristupni broj vidljiv na stablu, a nalazi se i u Tablici P-3.1 Priloga 3. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

Analizom slijeda od približno 416 (409 – 416) aminokiselina kodiranog genom *sec*Y '*Ca*. P. mali' dobiveno je filogenetsko stablo koje pokazuje grupiranje u devet grana zbog izmjene koda za sintezu aminokiselina (Slika 35). Iako je broj isti kao kod usporedbe fragmenta gena, na ovom se stablu uzorci genotipova S11 (uzorak 483 na slici 31) i S12 grupiraju zajedno, a kao i kod usporedbe nukleotidnog slijeda cijelog gena uzorci 252 i 449 izdvajaju se zbog dodatne promjene na poziciji 363/416 aminokiseline valin (Val, V) u izoleucin (Ile, I) do koje je došlo zbog promjene nukleotidnog slijeda (G u A) na poziciji 1087 (Slika 34).



Slika 34. Prikaz poravnanja slijeda aminokiselina kodiranog genom *sec*Y reprezentativnih uzoraka za pojedine genotipove (oznake uzoraka u Tablici 4). Na slici je prikazana izrazito varijabilna regija u slijedu aminokiselina (133 – 140/ 416 aminokiselina) te protein kodiran genom *sec*Y veličinom varira od 409 do 416 aminokiselina. Slijed kodiran *sec*Y genom soja AT '*Ca*. P. mali' je duljine 415 aminokiselina.



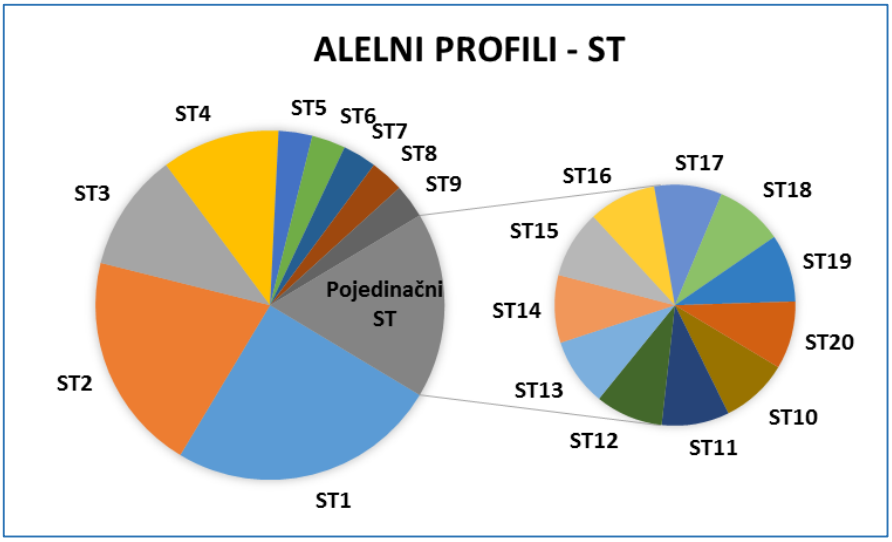
Slika 35. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom slijeda aminokiselina koje kodira gen *sec*Y fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. U analizu je uvrštena referentna sekvenca gena *sec*Y soja AT fitoplazme '*Ca*. P. mali', čiji je pristupni broj vidljiv na stablu, a nalazi se i u Tablici P-3.1 Priloga 3. Oznake uzoraka iz Hrvatske nalaze se u Tablici 4, a pristupni brojevi za uzorke novih genotipova u Prilogu 3, Tablici P-3.2.

4.4. Dodjela oznaka i analiza alelnih profila (ST; *sequence type*)

Kako bi se omogućila lakša usporedba, a i s ciljem poboljšanja i dopune postojećeg MLST–sustava, oznake dodijeljene novim genotipovima iz ovog istraživanja nastavljaju se na već opisane (Danet i sur., 2011.; Prilog 3. Tablica P-3.1; Tablica 4; osobna komunikacija X. Foissac).

Sekvence uzoraka koje predstavljaju nove genotipove pohranjene su u bazi podataka GenBank (Prilog 3. Tablica P-3.2) i to cijela kodirajuća regija za gene *ace*F i *imp*, dok su za gene *pnp* i *sec*Y pohranjeni fragmenti kraći od čitavog gena koji su korišteni za usporedbu s prije opisanim genotipovima. Reprezentativne sekvence uzoraka koje nisu deponirane u bazi podataka nalaze se u Prilogu 3. te su uz njih navedene i oznake uzoraka iz kojih je dobiven 100 % identičan nukleotidni slijed. Popis referentnih sekvenci za svaki genotip, kao i drugih sekvenci iz baze podataka GenBank korištenih u računalnim analizama nalazi se u Prilogu 3, Tablici P-3.1.

Nakon tipizacije pojedinih gena te dodjele oznaka novim genotipovima, dodijelila sam brojčane oznake i generiranim alelnim profilima (ST; *sequence type*), redom prema njihovoj učestalosti u Hrvatskoj (Tablica 4, Slika 36). Ukupno gledano, od 20 različitih alelnih profila u Hrvatskoj prevladavaju ST1 i ST2, dok su ST3 i ST4 jednako brojni, s nešto više od 10 %. Profil ST4 jedini je koji je značajno zastupljen, a sadrži novi genotip, P17 gena *pnp*. Više od polovice alelnih profila, njih 11, zastupljeno je pojedinačno u samo jednom uzorku, najvećim dijelom zbog varijabilnosti gena *sec*Y i *imp*.



Slika 36. Grafički prikaz zastupljenosti alelnih profila (ST) u Hrvatskoj.

Tablica 4. Zbirni rezultati genotipizacije uzoraka za sva četiri ciljana gena, alelni profil i dodijeljena oznaka alelnog profila (ST). Novi genotipovi iz ovog istraživanja su osjenčani.

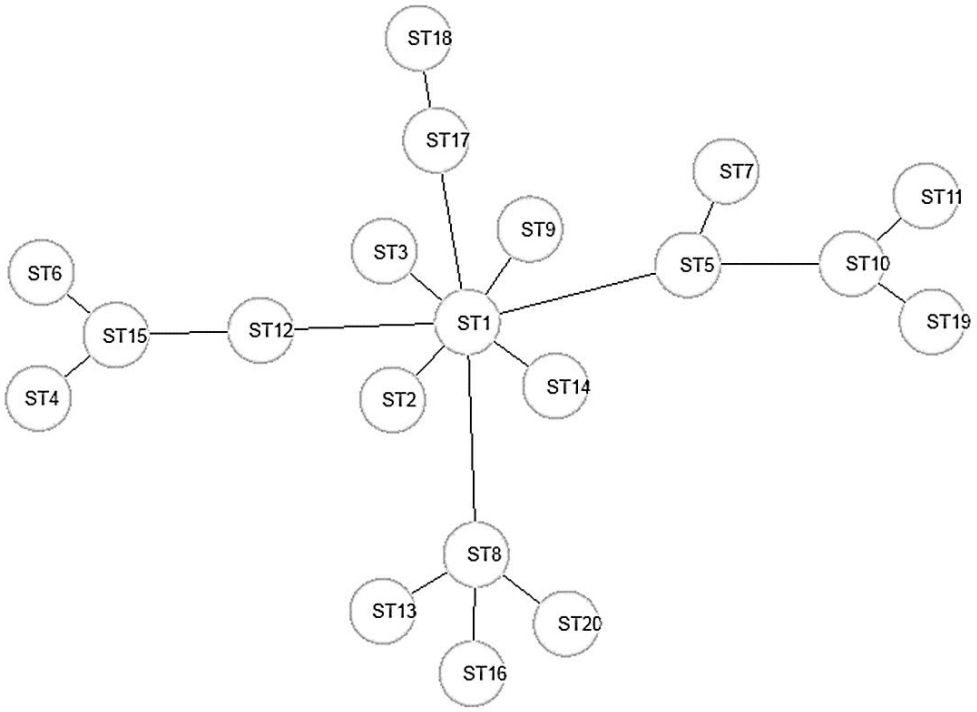
Oznaka uzorka	Godina	Lokacija	Domaćin	*ace*F	*pnp*	*imp*	*sec*Y	Alelni profil	ST
Dalmacija (AD)									
493	2011	OPUZEN	Jabuka	A13	P10	I22	S12	A13-P10-I22-S12	ST3
Kontinentalna istočna regija (CE)									
354	2011	OSIJEK	Jabuka	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
355	2011	OSIJEK	Jabuka	A13	P9	I21	S12	A13-P9-I21-S12	ST5
356	2011	OSIJEK	Jabuka	A13	P10	I22	S12	A13-P10-I22-S12	ST3
357	2011	OSIJEK	Jabuka	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
391	2013	OSIJEK	Jabuka	A15	**P17**	I21	S10	A15-P17-I21-S10	ST4
411	2013	OSIJEK	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
368	2012	ST.PETROVO SELO	Jabuka	A13	P9	I24	S9	A13-P9-I24-S9	ST11
554	2011	ŽUBRICA	Jabuka	A15	P10	I21	S12	A15-P10-I21-S12	ST14
425	2013	ŽUBRICA	Jabuka	A13	P10	I22	S12	A13-P10-I22-S12	ST3
Kontinentalna zapadna regija (CW)									
268	2014	VELIKA LUDINA	Jabuka	A13	P10	I22	S12	A13-P10-I22-S12	ST3
489	2011	VELIKA LUDINA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
364	2012	VELIKA LUDINA	Jabuka	A13	P10	I22	S12	A13-P10-I22-S12	ST3
373	2013	VELIKA LUDINA	Jabuka	A15	**P17**	I21	S10	A15-P17-I21-S10	ST4
436	2013	MIČEVEC	Jabuka	A13	P10	I22	S12	A13-P10-I22-S12	ST3
438	2013	MIČEVEC	Jabuka	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
250	2014	MIČEVEC	Jabuka	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
zb2	2016	MIČEVEC	*C. picta*	A15	**P17**	I21	S10	A15-P17-I21-S10	ST4
zb3	2016	MIČEVEC	*C. picta*	A13	P9	I21	S12	A13-P9-I21-S12	ST5
420	2011	ŠUŠNJARI	Jabuka	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
441	2013	ŠUŠNJARI	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
252	2014	ŠUŠNJARI	Jabuka	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
JJ4	2016	JASTREBARSKO	Jabuka	A15	**P17**	I21	S10	A15-P17-I21-S10	ST4
JJ12	2016	JASTREBARSKO	Jabuka	A15	P9	I21	S11	A15-P9-I21-S11	ST6
Cp11	2012	JASTREBARSKO	*C. picta*	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23- S12	ST2
Cp13	2012	JASTREBARSKO	*C. picta*	A15	**P17**	I21	S10	A15-P17-I21-S10	ST4
Cp16	2012	JASTREBARSKO	*C. picta*	A15	**P17**	I21	S11	A15-P17-I21-S11	ST15
Cp17	2012	JASTREBARSKO	*C. picta*	A15	P9	I21	S11	A15-P9-I21-S11	ST6
Cp19	2012	JASTREBARSKO	*C. picta*	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
zb19	2016	JASTREBARSKO	*C. picta*	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
zb45	2016	JASTREBARSKO	*C. picta*	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
zb65	2016	JASTREBARSKO	*C. picta*	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
zb70	2016	JASTREBARSKO	*C. picta*	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2

Nastavak **Tablice 4**.

Oznaka uzorka	Godina	Lokacija	Domaćin	*ace*F	*pnp*	*imp*	*sec*Y	Alelni profil	ST
Kontinentalna zapadna regija (CW)									
472*	2013	DONJI MIHALJEVEC	Jabuka	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
473	2013	DONJI MIHALJEVEC	Jabuka	**A25**	P10	**I32**	**S16**	A25-P10-I32- S16	ST16
474	2013	DONJI MIHALJEVEC	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
475	2013	DONJI MIHALJEVEC	Jabuka	A15	**P17**	I21	S10	A15-P17-I21-S10	ST4
477	2013	DONJI MIHALJEVEC	Jabuka	**A26**	P10	**I34**[b]	S12	A26-P10-I34-S12	ST9
276	2014	DONJI MIHALJEVEC	Jabuka	**A26**	P10	**I34**[b]	S12	A26-P10-I34-S12	ST9
481	2011	SVETA MARIJA	Jabuka	**A27**	P9	**I36**	**S14**	A27-P9-I36- S14	ST18
483	2011	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	**P17**	I21	S11	A13-P17-I21-S11	ST12
519	2011	SVETA MARIJA	Jabuka	A15	**P17**	I21	S10	A15-P17-I21-S10	ST4
310	2012	SVETA MARIJA	Jabuka	**A27**	P10	**I35**	**S14**	A27-P10-I35- S14	ST17
389	2012	SVETA MARIJA	Jabuka	A16	P10	**I32**	**S15**[a]	A16-P10-I32-S15	ST8
390	2012	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P9	**I37**[c]	**S18**	A13-P9-I37- S18	ST19
392	2012	SVETA MARIJA	Jabuka	A16	P10	**I38**	**S17**	A16-P10-I38- S17	ST20
393	2012	SVETA MARIJA	Jabuka	A16	P10	**I32**	**S15**[a]	A16-P10-I32-S15	ST8
448	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
449	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
450	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
452	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A15	P9	**I33**	S12	A15-P9-I33-S12	ST7
453	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A15	P9	**I33**	S12	A15-P9-I33-S12	ST7
455	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	**P18**	**I32**	**S15**[a]	A13-P18-I32-S15	ST13
456	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
457	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
458	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
459	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
460	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
461	2013	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
6K*	2013	SVETA MARIJA	*C. picta*	A13	P10	I23	S12	A13-P10-I23-S12	ST2
277	2014	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I22	S12	A13-P10-I22-S12	ST3
278	2014	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
279	2014	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P10	I21	S12	A13-P10-I21-S12	ST1
280	2014	SVETA MARIJA	Jabuka	A13	P9	I24	**S18**	A13-P9-I24- S18	ST10

*16S rDNA; [a]KT906170; [b]FN658475; [c]FN658476

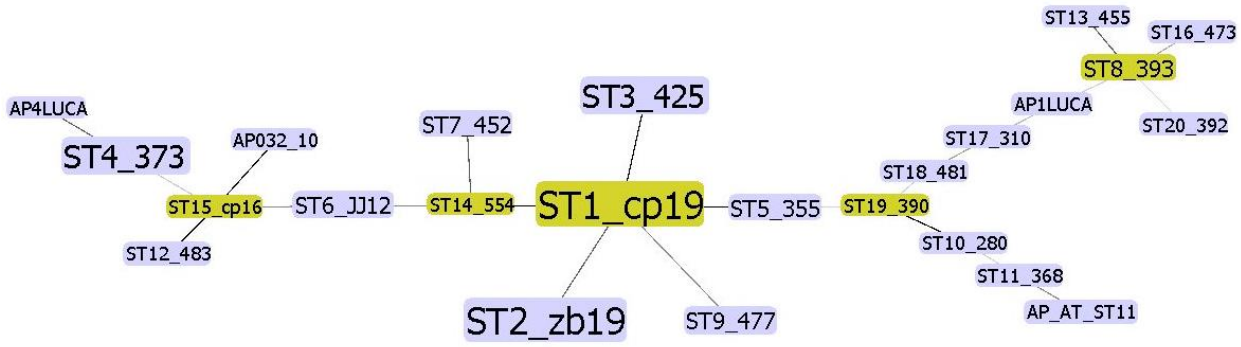
Za grafički prikaz međusobne povezanosti alelnih profila online programom PhyloViz (https://online.phyloviz.net) pripremila sam set podataka temeljen isključivo na genotipovima pojedinih gena i dodijeljenoj ST−oznaci (prikaz pripremljenog seta podataka se nalazi u Prilogu 3, Tablica P-3.3). Svako čvorište (*node*) predstavlja jedan alelni profil (ST), a svaka poveznica (*link*) predstavlja razliku u jednom alelu, odnosno genotipu (*locus variant*, LV). Dobivena mreža prikazana je na slici 37. ST1 predstavlja ishodišni alelni profil (A13-P10-I21-S12) iz kojeg se neposredno granaju alelni profili ST2 i ST3 koji se u odnosu na ST1 razlikuju samo u *imp*−genotipu (redom I23 i I22), odnosno jednom alelu (SLV, *single locus variant*). Kao primjer, ST11 (A13-P9-I24-S9) se od ishodišnog ST1−profila razlikuje u tri alela (TLV, *triple locus variant*) te im je zajednički samo *ace*F−genotip A13.



Slika 37. Grafički prikaz međusobne povezanosti alelnih profila (ST) dobiven korištenjem programa PhyloViz. Svaka poveznica (*link*) predstavlja razliku u jednom alelu (*locus variant*, LV).

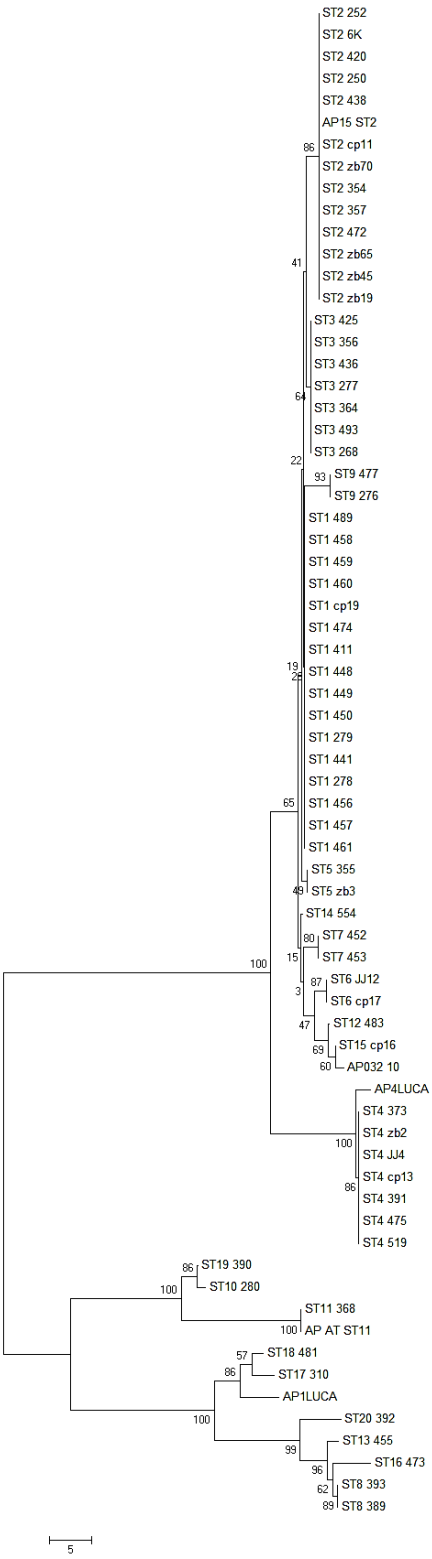
4.5. Analiza ulančanih sekvenci

Za razliku od online programa PhyloViz koji prikazuje samo međusobnu povezanost alelnih profila, programom Phyloviz 2.0. mogu se analizirati ulančane sekvence sva četiri ciljana genska markera te program, osim razlike u nukleotidnim sljedovima, uzima u obzir i broj uzoraka istog profila. Broj uzoraka istog profila grafički je iskazan veličinom čvorišta (Slika 38). Učestalost pojedinog profila koristi se i za odabir temeljnog („*founder*“) ST-a za pojedino grananje. Tako je ST1 odabran za ishodišno čvorište oko kojeg su grupirana i druga dva česta profila – ST2 i ST3. Ova analiza dodatno potvrđuje da ST1 (A13-P10-I21-S12) može biti ishodišni profil '*Ca*. P. mali'. Ako se uzme u obzir i grupiranje s ST2 (A13-P10-I23-S12) i ST3 (A13-P10-I22-S12) s kojima se razlikuje samo u varijabilnom *imp*–genotipu, ishodišni haplotip je A13-P10-S12-I21/22/23.



Slika 38. Filogenetska mreža dobivena analizom ulančanih nukleotidnih sekvenci sva četiri gena korištena u multigenskoj tipizaciji fitoplazme '*Ca*. P. mali' (geni *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y). Korišten je program Phyloviz 2.0. Temeljni alelni profil je ST1, a temeljni ST za svako račvanje prikazan je zelenom bojom. Veličina čvorišta je proporcionalna brojnosti pojedinog alelnog profila.

Analizom ulančanih nukleotidnih sekvenci dobiveno je neukorijenjeno filogenetsko stablo koje se poklapa s dodijeljenim ST–oznakama i grana se na 20 alelnih profila (Slika 39). U analizama su korištene i sekvence tri referentna izolata (AP032, AP4Luca, AP1Luca; Tablica P-3.1; Prilog 3) kojima nije dodijeljena ST–oznaka, a ne poklapaju se s niti jednim alelnim profilom, dok je AP-AT referentni izolat alelni profil ST11.



Slika 39. Neukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno analizom ulančanih nukleotidnih sekvenci sva četiri gena korištena u multigenskoj tipizaciji - gena *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y fitoplazme '*Ca*. P. mali', uz korištenje metode *neighbour joining* i modela *number of differences*. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom *bootstrap* uz 500 ponavljanja. U analizu su uvrštene ulančane referentne sekvence onih izolata koji su potpuno genotipizirani. Oznake alelnih profila (ST−oznake) i oznake uzoraka nalaze se u Tablici 4.

5. RASPRAVA

Fitoplazme ('*Candidatus* Phytoplasma') su fitopatogeni prokarioti iz razreda Mollicutes. Dok su u biljkama domaćinima ograničene na floemske provodne elemente, u kukcima – vektorima nalaze se u hemolimfi te različitim organima uključujući i reproduktivne (Lee i sur., 2000.). Usprkos prilagodbi na život u različitim domaćinima, genomi fitoplazmi izrazito su reducirani i jedni su od najmanjih dosad opisanih bakterijskih genoma. Iako još uvijek nije moguće uzgojiti fitoplazme u čistoj kulturi u uvjetima *in vitro*, što otežava dobivanje visoko kvalitetne genomske DNA, sekvencirano je i anotirano šest fitoplazmatskih genoma (Oshima i sur., 2004.; Bai i sur., 2006.; Tran-Nguyen i sur., 2008.; Andersen i sur., 2013.; Orlovskis i sur., 2017.), među kojima se onaj '*Ca*. P. mali' ističe linearnim ustrojem kromosoma (Kube i sur., 2008.).

Upravo je '*Ca*. P. mali', po mnogim značajkama zanimljiva fitoplazma, uzročnik proliferacije jabuke, bolesti rasprostranjene većinom u Europi (EPPO 2017.). Karakteristični simptomi obuhvaćaju formiranje „vještičinih metli“, plodovi su manji s izduženim peteljkama, dok su palistići povećani. Molekularna patologija bolesti i mehanizmi koji uzrokuju ove simptome velikim su dijelom još uvijek nepoznati, ali se posljednjih desetak godina intenzivno radi na njihovom razjašnjavanju. Nekoliko je anotiranih proteina efektora koji bi mogli imati ključnu ulogu u infekciji, a jedan od prvih je SAP11 (Bai i sur., 2009.). Ove godine su u jabuci po prvi puta okarakterizirana dva transkripcijska faktora TCP na koja se veže SAP11 – like protein '*Ca*. P. mali' (Janik i sur., 2017.), a objavljeni su rezultati višegodišnjeg praćenja bioloških svojstava više sojeva '*Ca*. P. mali' i povezanosti s genotipom gena *imp* i *hfl*B (Seemüller i sur., 2010.; Seemüller i sur., 2013.). Opisani simptomi zamijećeni su na stablima jabuke, u voćnjacima na sjeverozapadu Hrvatske, prije više od trideset godina (Šarić i Cvjetković 1985.). Nakon početka sustavnog istraživanja pojave i proširenosti proliferacije jabuke u Hrvatskoj 2011. godine te tijekom pet godina pregleda i uzorkovanja, simptomi su bili primjetni na stablima jabuka na gotovo svim pregledanim lokacijama. U razdoblju od 2011. do 2016. prikupljena su i testirana 204 uzorka jabuke (Tablica 3; Tablica P-2.1 u Prilogu 2). Najmanje uzoraka (27) prikupljeno je u Dalmaciji, čiji je veći dio nepovoljan za uzgoj jabuke zbog niza faktora (plitka tla, jaki vjetrovi u vrijeme cvatnje) (Miljković 1991.). Na potencijalno povoljnim lokacijama primarno se uzgajaju agrumi, vinova loza i maslina. Jabuka je ipak poljoprivredna kultura koja je najbolje prilagođena umjerenom kontinentalnom klimatu pa je tako i njena zastupljenost u kontinentalnom dijelu Hrvatske puno veća. Pritom u Hrvatskoj regija CW po broju voćnjaka prednjači u odnosu na istočni dio zemlje. Na lokacijama u regiji CE je tako prikupljen 61

uzorak, a u zapadnoj čak 116 uzoraka jabuke. Broj uzoraka po regijama tako približno odražava površine na kojima je zasađena jabuka i popularnost jabuke kao poljoprivredne kulture. Osim navedenih razlika po regijama, broj uzoraka ovisio je i o prisutnosti simptoma u voćnjacima. Tako je uzorkovanje bilo preferencijalno sa stabala na kojima su bili jasno vidljivi simptomi karakteristični za proliferaciju, dok je samo manji dio uzoraka uzet kako bi se otklonila mogućnost latentne zaraze. Testiranjem je dokazana prisutnost gena za 16S rRNA fitoplazme '*Ca.* P. mali' u više od 30 % uzoraka jabuke. Postotak zaraženih stabala zbog opisanog preferencijalnog načina uzorkovanja ne predstavlja ukupnu zaraženost jabuka u Hrvatskoj, a između ostalog upućuje na dobru korelaciju zabilježenih simptoma i kasnije detekcije '*Ca.* P. mali' u uzorcima jabuke.

Opsežna istraživanja kukaca – vektora fitoplazmi vinove loze i voćaka u Hrvatskoj provedena su od 2005. do 2007. godine (Budinšćak 2008.). Dio istraživanja odnosio se i na lisne buhe iz roda *Cacopsylla*, vrste *C. picta* i *C. melanoneura*, koje su vektori '*Ca.* P. mali'. Obje su vrste prisutne u kontinentalnom dijelu Hrvatske, a nisu bile prisutne u jedinom voćnjaku u Dalmaciji gdje je praćena njihova pojava (Zadarska županija). Nastavno na rezultate istraživanja rasprostranjenosti vektora, na odabranim lokacijama gdje je u uzorcima jabuka dokazana prisutnost gena za 16S rRNA fitoplazme '*Ca.* P. mali', za testiranje zaraženosti prikupljeni su i uzorci kukaca–vektora. Najviše jedinki lisnih buha (198) prikupljeno je u voćnjacima u Jastrebarskom, od toga 174 uzorka vrste *C. picta* i 24 uzorka vrste *C. melanoneura*, dok je na lokacijama u Svetoj Mariji, Mičevcu i Osijeku prikupljen samo manji broj (redom 6, 10 i 5 jedinki; Tablica 3; Tablica P-2.2 u Prilogu 2). Od ukupnog testiranog broja uzoraka, više od 6 % uzoraka *C. picta* bilo je zaraženo fitoplazmom, dok u niti jednom uzorku vrste *C. melanoneura* nije bio detektiran gen za 16S rRNA fitoplazme '*Ca.* P. mali'. Vrsta *C. picta* je, u odnosu na vrstu *C. melanoneura*, na jabuci u vegetaciji prisutna dulje vrijeme prije zimske migracije (Budinšćak 2008.), a dokazan je i transovarijski prijenos fitoplazme na potomstvo, čime fitoplazma zaobilazi proces akvizicije iz zaražene biljke te multiplikacije u vektoru (Mittelberger i sur., 2017.). Ova se slika zaraženosti vektora podudara s rezultatima istraživanja u Njemačkoj, Švicarskoj i Francuskoj (Jarausch i sur., 2011.) iz kojih proizlazi zaključak da je baš *C. picta* epidemiološki značajan vektor proliferacije jabuke u kontinentalnim klimatskim uvjetima Europe i Hrvatske.

Uzorci u kojima je potvrđena prisutnost fitoplazme '*Ca*. P. mali' korišteni su u daljnjim multigenskim analizama s ciljem istraživanja varijabilnost četiri gena, *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y,

te procjene njihovog značaja i informativnosti za razjašnjavanje epidemiologije '*Ca*. P. mali'. Od 74 uzorka, za 64 su uspješno umnoženi i sekvencirani fragmenti sva četiri gena te se multigenska analiza temeljila na rezultatima ovih potpuno genotipiziranih uzoraka (Tablica 4). Fragmenti gena *ace*F, *pnp, imp* i *sec*Y umnoženi su uz korištenje specifičnih početnica osmišljenih u sklopu ove disertacije (Tablica 2), a koje omogućavaju umnažanje fragmenta koji je nekoliko stotina baza veći od samog gena, odnosno kodirajuće regije. Kako bi bila moguća usporedba s referentnim sekvencama za opisane genotipove europskih sojeva AP-fitoplazme (Danet i sur., 2011.; Tablica P-3.1 u Prilogu 3), za određivanje genotipa korištene su nukleotidne sekvence skraćene na odgovarajuću dužinu fragmenta referentnog soja za svaki pojedini gen.

Za gen *ace*F, otkriveno je šest genotipova, od čega su tri prethodno opisana (A13, A15 i A16; Danet i sur., 2011.), a tri nova (A25, A26 i A27) određena su u sklopu ove doktorske disertacije. Dominantni genotip u Hrvatskoj je A13 (67 %), što približno odgovara postotku na europskoj razini (65 %) koji je identificiran u izolatima porijeklom iz Francuske, Italije i Njemačke (Slika 14 i Slika 15). Kao i genotip A15, A13 je prisutan u uzorcima iz obje kontinentalne regije, a samo ova dva najbrojnija genotipa prisutna su u uzorcima vrste *C. picta*. Za većinu se uzoraka grupiranje na temelju kraćeg fragmenta gena i cijelog gena podudara (Slika 16). U filogenetskim analizama slijeda aminokiselina kodiranog genom *ace*F (Slika 17) samo je za dva nova genotipa, A25 i A27, promjena nukleotidnog slijeda rezultirala promjenom jedne (A27) odnosno dvije kodirane aminokiseline (A25). Za vrstu '*Ca*. P. prunorum' dva su genotipa *ace*F, A6 i A8 (Danet i sur., 2011.), povezani s prethodno opisanim hipovirulentnim sojevima fitoplazmi (Kison i Seemüller 2001.) korištenim u genotipizaciji. Protein kodiran ovim genom, dihidrolipoamid–acetiltransferaza, uključen je u proces glikolize te je moguće da su hipovirulentna svojstva ovih sojeva fitoplazmi na neki način povezana s oslabljenim metabolizmom ugljikohidrata (Danet i sur., 2011.). Kako biološka svojstva sojeva '*Ca*. P. mali' iz ova tri uzorka prikupljena u voćnjacima u Svetoj Mariji i Donjem Mihaljevcu nisu dobro poznata (oznake uzoraka 473, 481 i 310), trenutno nije moguće doći do sličnih zaključaka.

Filogenetskom analizom dobivenih sekvenci fragmenta gena *pnp* utvrđeno je da su u uzorcima prisutna četiri genotipa, P9 i P10 koji su prethodno opisani u izolatima porijeklom iz Francuske, Njemačke i Italije (Danet i sur., 2011.) te dva nova genotipa, P17 i P18 (Slika 20). Daleko najbrojniji genotip u gotovo 70 % uzoraka bio je P10, za razliku od rezultata genotipizacije europskih izolata gdje je najbrojniji bio genotip P11 koji prema rezultatima ovog istraživanja

nije prisutan u Hrvatskoj (Slika 19). Novi genotip P17 zastupljen je u približno istom broju uzoraka kao i genotip P9. Sva tri genotipa prisutna su u kontinentalnim regijama, i u uzorcima jabuka i uzorcima vrste *C. picta*, dok je jedino P18 zabilježen u samo jednom uzorku jabuke iz Sv. Marije. Uzorci koji su se usporedbom značajno kraćeg fragmenta grupirali unutar genotipova P9 i P10, analizom cijelog gena razdvojili su se u 11 zasebnih grana (Slika 21). Ova činjenica ne iznenađuje, obzirom da je fragment korišten u genotipizaciji znatno kraći od čitavog gena *pnp* (512 u odnosu na 2187 bp). Polinukleotid fosforilaza kodirana ovim genom ima pretpostavljenu ulogu u degradaciji mRNA i moguće u procesiranju ostalih malih RNA molekula. Iz filogenetskog stabla dobivenog analizom slijeda aminokiselina vidljivo je da je broj promjena mali (Slika 22), kako je i očekivano obzirom da je *pnp* konstitutivni gen.

Gen *imp* koji kodira imunodominantni membranski protein očekivano je bio najvarijabilniji od četiri tipizirana gena. IMP je smješten na površini stanice te je time izložen pozitivnom selekcijskom pritisku, a zbog uloge u interakcijama s oba domaćina, jabukom i kukcem – vektorom relevantan je u molekularnoj patologiji bolesti (Konnerth i sur., 2016.; Kakizawa i sur., 2010.). Uz već poznata četiri genotipa (I21 – I24) u Hrvatskoj je identificirano čak sedam novih genotipova (I32 – I38), svi iz uzoraka jabuke na lokacijama Sv. Marija i Donji Mihaljevec (Slika 25). Dominantan genotip je I21, jednako kao i na europskoj razini (Danet i sur., 2011.), a u uzorcima *C. picta* su od 11 genotipova prisutna samo dva – I21 i I23. Tri genotipa identificirana u najvećem broju uzoraka (I21, I22 i I23) grupiraju se u isti klaster s dva nova genotipa, I33 i I34, koji su analizom aminokiselinskog slijeda identični dominantnom genotipu I21 (Slika 27). Suprotno konzerviranoj N-terminalnoj regiji, u hidrofilnom dijelu kodiranog proteina čak je 59 mjesta u slijedu aminokiselina varijabilno (Slika 28), što je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja imunodominantnih membranskih proteina iz fitoplazmi *Aster Yellows* (Barbara i sur., 2002.; Kakizawa i sur., 2004.). Jasno je da promjene gena *imp*, zbog funkcija proteina kojeg kodira, nose određene prednosti, kao što je izbjegavanje imunog odgovora domaćina. Osim toga, moguće je da zbog uloge adhezina, specijalizacija na domaćina poboljšava vezanje za stanice domaćina i osigurava bolju translokaciju kroz različita tkiva i organe, posebno u kukcu – vektoru gdje fitoplazma mora proći kroz gotovo sva tkiva i uspješno se umnožiti u dovoljnu koncentraciju za prijenos (Weintraub i Beanland 2006.; Kakizawa i sur., 2004.; Rashidi i sur., 2015.). U višegodišnjem istraživanju istražena je moguća povezanost virulentnosti i drugih bioloških svojstava '*Ca*. P. mali' s genotipovima gena *hfl*B i *imp* (Seemüller i sur., 2010.). Iako je za gen *hfl*B uspješno pokazana korelacija genotipa i jačine izazvanih simptoma (Seemüller i sur., 2013.), za gen *imp* nije jasno dokazana takva povezanost.

Svejedno, zbog funkcije kodiranog proteina, ovaj gen je svakako zanimljiv za daljnja istraživanja.

Gen *sec*Y koji kodira centralnu podjedinicu membranskog transportnog sustava se, uz gen za 16S rRNA, već duže vrijeme koristi kao dodatni filogenetski marker za bolju diferencijaciju blisko srodnih fitoplazmi unutar istih 16S RFLP−grupa (Lee i sur., 2010.). Velika varijabilnost koju su pokazale filogenetske analize dobivenih sekvenci nije bila očekivana, pošto je multigenskom analizom izolata europskih fitoplazmi voćaka ovaj gen bio manje varijabilan od gena *ace*F i *pnp* (Danet i sur., 2011.). Prije opisani genotip S12, koji je bio dominantan i u izolatima '*Ca*. P. mali' iz pet europskih zemalja (Danet i sur., 2011.), u Hrvatskoj je zastupljen u daleko najvećem broju uzoraka u odnosu na ostale genotipove (gotovo 70 %; Slika 30). U okviru ove doktorske disertacije opisano je još pet novih genotipova (S14 – S18) uz četiri poznata (S9 – S12). Kao i za gen *imp*, svi novi genotipovi prisutni su isključivo u uzorcima jabuka s lokacija Sv. Marija i Donji Mihaljevec. Slijed aminokiselina kodiran genom *sec*Y '*Ca*. P. mali' identičan je za uzorke genotipova S11 i S12 (Slika 35), dok se slijed aminokiselina razlikuje za ostale opisane genotipove. Ovakva varijabilnost gena *sec*Y unutar vrste '*Ca*. P. mali' nije jednoznačna i nije bila očekivana, osobito za ovaj konstitutivni gen koji je za mnoge skupine fitoplazmi korišten kao dodatni filogenetski marker uz gen za 16S rRNA (Lee i sur., 2010.).

Iz rezultata genotipizacije, a posebno iz analiza slijeda aminokiselina za sva četiri gena proizlazi pitanje imaju li genotipovi dodijeljeni na osnovi nukleotidnih sekvenci, posebno samo kraćeg fragmenta gena, neku važnost i daju li informaciju koja se može povezati s biologijom i epidemiologijom patogena. Korištenje specifičnih početnica osmišljenih u sklopu ove disertacije kojima se umnažaju fragmenti veći od samog gena, omogućilo je analizu čitavog slijeda aminokiselina. Time je dobivena nova razina informacija o značaju pojedinih promjena u nukleotidnom slijedu. Mnoge promjene u nukleotidnom slijedu neće biti značajne ako se promatraju kao slijed aminokiselina uzimajući u obzir da ista aminokiselina može biti kodirana s više kodona. Čak i kada zbog promjene kodona dođe do promjene slijeda aminokiselina, ona ne mora utjecati na strukturu i funkciju proteina (Schneider i Cannarozzi 2012.). Ipak, genotipizacija je osnova za daljnja istraživanja strukture i funkcionalnosti proteina *in silico*.

Nakon genotipizacije svakog pojedinog genskog markera, moguće je analizirati dobiven skup podataka na dva načina: kao alelne profile i kao ulančane sekvence sva četiri gena. Tako je generirano 20 različitih alelnih profila, od kojih u Hrvatskoj prevladava ST1 te je kao ishodišni

profil (A13–P10–I23–S12) zastupljen u 25 % uzoraka. Zanimljivo je da je profil ST2 (A13–P10–I21–S12) najčešći u vektorima vrste *C. picta*, u čak 50 %uzoraka. Alelni profil ST4 jedini je koji sadrži novi genotip, P17, a zastupljen je u više od 10 % uzoraka. Više od polovice alelnih profila zastupljeno je tek pojedinačno, najviše zbog varijabilnosti gena *imp* i *sec*Y.

Uz samo 18 ranije potpuno genotipiziranih izolata iz Austrije, Švicarske, Njemačke, Francuske, Italije i Rumunjske (Danet i sur., 2011.) te 64 u sklopu ove doktorske disertacije, skup podataka još uvijek nije dovoljan za stvaranje jasne slike o geografskoj rasprostranjenosti i porijeklu te virulentnosti pojedinih sojeva. Kako prema do sad dostupnim podacima nije bilo niti jednog genotipiziranog izolata iz uzoraka vektora, lisnih buha iz roda *Cacopsylla*, rezultati ove doktorske disertacije su prilog razumijevanju zastupljenosti pojedinih genotipova u odnosu na domaćina. Možda neočekivano, najveća je varijabilnost izolata iz uzoraka jabuka s dvije lokacije, Sveta Marija i Donji Mihaljevec. Zanimljivo je da su upravo u blizini ovih lokacija u Međimurskoj županiji, simptomi proliferacije opisani prije više od 30 godina (Šarić i Cvjetković 1985.), što ukazuje na dugogodišnju prisutnost ove fitoplazme u regiji. Ova dugotrajna koevolucija domaćina i patogena je jedno od mogućih objašnjenja za varijabilnost i specijalizaciju fitoplazme.

Rezultati ovog istraživanja mogu biti temelj za postavljanje MLST–sustava za fitoplazmu '*Ca*. P. mali'. Kako bi se dostigao standard za genotipizaciju ljudskih patogena od sedam lokusa (Urwin i Maiden 2003.), potrebno je uključiti i gene koji su se u pojedinim istraživanjima pokazali kao vrlo informativni. Osim korištena četiri genska markera, još je niz pogodnih gena koji su korišteni za finiju karakterizaciju sojeva '*Ca*. P. mali', ali i razlučivanje blisko srodnih vrsta fitoplazmi koje uzrokuju bolesti u europskim voćnjacima, '*Ca*. P. pyri' i '*Ca*. P. prunorum' (Seemüller i Schneider 2004.). Kandidati su geni za ribosomske proteine (Martini i sur., 2007.) i *hfl*B gen za koji je eksperimentalno dokazana korelacija bioloških svojstava i genotipa (Seemüller i sur., 2013.). Genotipizacija sedam lokusa i kreiranje baze podataka sa sekvencama reprezentativnih genotipova prema jedinstvenim kriterijima i protokolima omogućila bi usporedbu sve više izolata iz cijele Europe. Genom '*Ca*. P. mali' je sekvenciran i anotiran (Kube i sur., 2008.), što olakšava potragu za genima koji potencijalno kodiraju proteine efektore i druge epidemiološki zanimljive proteine. Stvaranje ovakve baze podataka zasigurno bi unaprijedilo buduća primijenjena istraživanja, primjerice selekciju kultivara jabuke otpornih ili tolerantnih na bolest proliferacije jabuke.

6. ZAKLJUČCI

- Proliferacija jabuke koju uzrokuje fitoplazma '*Candidatus* Phytoplasma mali' prisutna je u kontinentalnom dijelu Hrvatske.
- Simptomi proliferacije su u razdoblju od 2011. do 2014. godine bili najviše izraženi na lokacijama Sveta Marija i Donji Mihaljevec u Međimurskoj županiji. Na ovim je lokacijama fitoplazma '*Ca*. P. mali' kroz sve četiri godine detektirana u više od 40 % testiranih uzoraka jabuke .
- Lisna buha *Cacopsylla picta* u Hrvatskoj je jedini efikasan i epidemiološki značajan vektor fitoplazme '*Ca*. P. mali'. U niti jednom uzorku vrste *C. melanoneura* nije detektirana '*Ca*. P. mali'.
- Genotipizirana su četiri genska markera: *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y:
    - Konstitutivni geni *ace*F i *pnp* su neočekivano varijabilni i za svaki od njih su uz prije poznate opisana i redom tri (A25 – A27), odnosno dva (P17 i P18) nova genotipa. Genotip P17 jedini je novi genotip zabilježen u uzorcima vektora *C. picta*.
    - Gen *imp* koji kodira imunodominantni membranski protein je očekivano bio najvarijabilniji. Uz četiri već poznata genotipa u Hrvatskoj je identificirano čak sedam novih genotipova (I32 – I38) u uzorcima jabuka s lokacija u Međimurskoj županiji.
    - Gen *sec*Y je isto tako izrazito varijabilan, u uzorcima s gore navedenih lokacija. Opisano je pet novih genotipova (S14 – S18). Ipak, kao i na europskoj razini, genotip S12 prisutan je u najviše uzoraka.
- Prvi su puta uopće genotipizirani i sojevi '*Ca*. P. mali' izolirani iz kukca – vektora vrste *Cacopsylla picta*.
- Zanimljiva je velika varijabilnost fitoplazme '*Ca*. P. mali' na izrazito malom području Hrvatske, dvije lokacije u Međimurskoj županiji. Osim genotipa *pnp* P17, svi ostali novi genotipovi *ace*F, *imp* i *sec*Y gena prisutni su samo u uzorcima jabuka s ovih lokacija.
- Ukupnom multigenskom analizom u uzorcima utvrđeno je dvadeset alelnih profila (ST1–ST20).
- Ukupno, u Hrvatskoj je dominantan alelni profil ST1 (A13–P10–I23–S12) koji je ujedno i ishodišni alelni profil '*Ca*. P. mali' zastupljen u 25 % uzoraka.
- Alelni profil ST2 (A13–P10–I21–S12) najčešći je u uzorcima vrste *C. picta*, u 50 % uzoraka.

- Rezultati ovog istraživanja mogu biti temelj za uspostavu sustava multigenske analize (MLST) za fitoplazmu '*Ca*. P. mali'. Kako bi se unaprijedio sustav multigenske analize potrebno je uključiti genotipizaciju još barem tri gena.

7. POPIS LITERATURE

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

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. Appl Environ Microb 73: 4001 – 4010

Bai X, Zhang J, Ewings A, Miller SA, Jansco Radek A, Scevchenko 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. J Bacteriol 188: 3682 – 3696

Bai X, Correa VR, Toruno TY, Ammar ED, Kamoun S, Hogenhout SA (2009) AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. Mol Plant Microbe 22: 18 – 30

Barbara DJ, Morton A, Clark MF, Davies DL (2002) Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorante aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. Microbiology 148: 157 – 167

Baric S, Dalla-Via J (2004) A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. J Microbiol Meth 57: 135 – 145

Beanland L, Hoy CW, Miller SA, Nault LR (2000) Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). Ann Entomol Soc Am 93: 271–276

Bertaccini A, Duduk B (2009) Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a review of recent research. Phytopathol Mediterr 48: 355 – 378

Bertamini M, Nedunchezhian N, Tomasi F, Grando MS (2002) Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. Physiol Mol Plant Pathol 61: 357 – 366

Bertamini M, Grando MS, Nedunchezhian N (2003) Effects of phytoplasma infection on pigments, chlorophyll–protein complex and photosynthetic activities in field grown apple leaves. Biol Plant 47: 237 – 242

Boonrod K, Munteanu B, Jarausch B, Jarausch W, Krczal G (2012) An Immunodominant Membrane Protein (Imp) of '*Candidatus* Phytoplasma mali' Binds to Plant Actin. Mol Plant Mincrobe Int 25: 889 – 895

Bressan A, Giorlami V, Boudon-Padieu E (2005) Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. Entomol Exp Appl 115: 283 – 290

Budinšćak Ž (2008) Vektori fitoplazmi voćaka i vinove loze u Republici Hrvatskoj. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, pp 174

Carginale V, Maria G, Capasso C, Ionata E, La Cara F, Pastore M, Bertaccini A, Capasso A (2004) Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. Gene 332: 29 – 34

Carginale V, De Luca V, Capasso C, Baldi MR, Maria G, Pastore M, Bertaccini A, Carraro L, Capasso A (2007) Effect of pear decline phytoplasma on gene expression in *Catharanthus roseus*. Bull Insectol 60: 213 – 214

Carraro L, Loi N, Ermacora P (2001) Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. Eur J Plant Pathol 107: 695 – 700

Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A (2004) Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by Real-Time PCR and bioimaging. Mol Plant Microbe Interact 17: 1175 – 1184

Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. Trends Plant Sci 10(11): 526 – 535

Ciccotti AM, Bianchedi PL, Bragagna P, Deromedi M, Filippi M, Forno F, Mattedi L (2008) Natural and experimental transmission of '*Candidatus* Phytoplasma mali' by root bridges. Acta Hort 781: 459 – 464

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. Mol Plant Pathol 4: 99 – 108

Cvjetković B (1976) Decay of pears in Dalmatia. Biljna zaštita: 104 – 105

Čermak V, Lauterer P (2008) Overwintering of psyllids in South Moravia (Czech Republic) with respect of the vectors of the Apple Proliferation cluster phytoplasmas. Bull Insectol 61: 147 – 148

Danet JL, Balakishiyeva G, Cimerman A, Sauvion N, Marie-Jeanne V, Labonne G, Lavina A, Battle A, Križanac I, Škorić D, Ermacora P, Ulubas Serce Ç, Çaglayan K, Jarausch W, Foissac X (2011) Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and the existence of inter species recombination. Microbiology 157(2): 438 – 450

Deng S, Hiruki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culurable Mollicutes. J Microbiol Meth 14: 53 – 61

Doi Y, Teranaka M, Yora K, Asuyama H (1967) Mycoplasma – or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom, aster yellows or paulownia witches'-broom. Ann Phytopathol Soc Jap 33: 259 – 266

EPPO (2017) PQR - EPPO database on quarantine pests (available online). http://www.eppo.int

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol 186: 1518 – 1530

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783 – 791

Firrao G, Garcia Chapa M, Marzachì C (2007) Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. Front Biosci 12: 1352 – 1375

Fischer A, Santana-Cruz I, Wambua L, Oldsb C, Midega C, Dickinson M, Kawichag P, Khana Z, Masigaa D, Jores J, Schneider B (2016) Draft Genome Sequence of "*Candidatus*

Phytoplasma oryzae" Strain Mbita1, the Causative Agent of Napier Grass Stunt Disease in Kenya. Genome Announ 4: doi: 10.1128/genomeA.00297-16

Francisco AP, Vaz C, Monteiro P, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carrico J (2012) PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. BMC Bioinformatics 13:87, DOI: 10.1186/1471-2105-13-87

Frisinghelli C, Delaiti L, Grando MS, Forti D, Vindimian ME (2000). *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. J Phytopathol 148: 425 – 431

Galetto L, Marzachì C (2010) Real-time PCR Diagnosis and Quantification of Phytoplasmas. In: Weintraub PG, Jones P (eds.) Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. Wallingford, CABI, 1-18

Garcia-Chapa M, Medina V, Viruel MA, Laviña A, Batlle A (2003) Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. Plant Pathol 52: 513 – 520

Gundersen DE, Lee IM, Rehner SA, Davis RE, Kingsbury DT (1994) Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. J Bacteriol 176: 5244 – 5254

Hanboonsong Y, Choosai C, Panyim S, Damak S (2002) Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). Insect Mol Biol 11: 97 – 103

Hodgetts J, Ball T, Boonham N, Mumford R, Dickinson M (2007) Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. Plant Pathol 56: 357 – 365

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'. Int J Syst Evol Micr 58: 1826 – 1837

Hogenhout SA, Šeruga Musić M (2010) Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics – what have we learnt? In: Weintraub PG, Jones P (eds.) Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. Wallingford, CABI, 19 – 36

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. Proc Natl Acad of Sci USA 106: 6416 – 6421

Hren M, Boben J, Rotter A, Kralj P, Gruden K, Ravnikar M (2007) Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. Plant Pathol 56 (5): 785 – 796

ICSB (International Comitee on Systematic Bacteriology), Subcomitee on the Taxonomy of Mollicutes (1993) Minutes of the interrim meeting, 1-2 August, 1992, Ames, Iowa. Int J Syst Bacteriol 43: 394 – 397

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004): '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int J Syst Evol Microbiol 54: 1243 – 1255

Janik K, Mithöfer A, Raffeiner M, Stellmach H, Hause B, Schlink K (2017) An effector of apple proliferation phytoplasma targets TCP transcription factors — a generalized virulence strategy of phytoplasma?. Mol Plant Pathol 18: 435 – 442. doi:10.1111/mpp.12409

Jarausch B, Schwind N, Fuchs A, Jarausch W (2011) Characteristics of the Spread of Apple Proliferation by Its Vector *Cacopsylla picta*. Phytopathology 101: 1471 – 1480

Ježić M, Poljak I, Šafarić B, Idžijotić M, Ćurković – Perica M (2013) '*Candidatus* Phytoplasma pini' in pine species in Croatia. J Plant Dis Protect 120: 160 – 163

Ježić M, Poljak I, Šafarić B, Idžijotić M, Ćurković – Perica M (2016) First Report on Phytoplasmas infecting wild apples and wild pears in Croatia. Plant Dis 100: 207

Jomantiene R, Davis RE (2006) Clusters of diverse genes existig as multiple, sequence-variable mosaics in the phytoplasma genome. FEMS Microbiol Lett 255: 59 – 65

Kakizawa S, Oshima K, Nighigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Tanaka M, Miyata S, Ugaki M, Namba S (2004) Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein – translocation system in *Escherichia coli*. Microbiology 150: 135 – 142

Kakizawa S, Oshima K, Namba S (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. Trends Microbiol 14: 254 – 256

Kakizawa S, Oshima K, Namba S (2010) Functional genomics of phytoplasmas. In: Weintraub PG, Jones P (eds.) Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. Wallingford, CABI, 37 – 50

Kakizawa S, Makino A, Ishii Y, Tamaki H, Kamagata Y (2014) Draft Genome Sequence of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' Strain OY-V, an Unculturable Plant-Pathogenic Bacterium Genome Announc 2(5): e00944-14.

Katanić Z, Krstin LJ, Ježić M, Zebec M, Ćurković – Perica M (2016) Molecular characterization of elm yellows phytoplasmas in Croatia and their impact on *Ulmus* spp. Plant Pathol 65: 1430 – 1440

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 sellatiformis*. Phytopathology 90: 909 – 914

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28: 1647 – 1649

Khan AJ, Botti S, Paltrinieri S, Al-Subhi AM, Bertaccini AF (2002) Phytoplasmas in alfalfa seedlings: contaminated or infected seeds? Abstract Book of the 14th International Congress of the IOM, Vienna, Austria: 148

Kison H, Seemüller E (2001) Differences in Strain Virulence of the European Stone Fruit Yellows Phytoplasma and Susceptibility of Stone Fruit Trees on Various Rootstocks to this Pathogen. J Phytopath 149: 533 – 541

Konnerth A, Krczal G, Boonrod K (2016) Immunodominant Membrane Proteins of Phytoplasmas. Microbiol 162: 1267 – 1273

Križanac I, Mikec I, Budinščak Ž, Šeruga Musić M, Krajačić M, Škorić D (2008) Pomaceous fruit tree phytoplasmas and their potential vectors in Croatia. Acta Hort 781: 477 – 482

Križanac I, Budinščak Ž, Šeruga Musić M, Škorić D (2010) Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. J Plant Dis Protect 117 (5): 206 – 213

Križanac I, Plavec J, Budinščak Ž, Ivić D, Škorić D, Šeruga Musić M (2017) Apple proliferation disease in Croatian orchards: a molecular characterization of '*Candidatus* Phytoplasma mali'. J Plant Pathol 99: 95 – 101

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, doi: 10.1186/1471-2164-9-306

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 33: 1870 – 1874

Langer M, Maixner M (2004) Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non ribosomal DNA. Vitis 43: 191 – 199

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947 – 2948

Lee IM, Davis RE (1992) Mycoplasmas which infect plants and insects. U: Maniloff J, McElhansey RN, Finch LR, Baseman JB (ed.) Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Washington, DC, Am Soc Microbiol: 379 – 390

Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organism. Phytopathology 83: 834 – 842

Lee IM, Bertaccini A, Vibio M, Gundersen DE (1995a) Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. Phytopathology 85: 728 – 735

Lee IM, Tiffany M, Gundersen DE, Klopmeyer M (1995b) Phytoplasma infection: A beneficial factor for production of commercial branching poinsettia cultivars? Phytopathology 85: 1179

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. Int J Syst Bacteriol 48: 1153 – 1169

Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000a) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annu Rev Microbiol 54: 221 – 254

Lee IM (2000b) Phytoplasma casts a magic spell that turns the fair poinsettia into a christmas showpiece. Plant Health Progress, doi:10.1094/PHP-2000-0914-01-RV

Lee IM, Bottner-Parker KD, Zhao Y, Davis RE, Harrison NA (2010) Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on the secY gene. Int J Syst Evol Microbiol 60: 2887 – 2897

MacLean AM, Sugio A, Makarova OV, Findlay KC, Grieve VM, Toth R, Nicolaisen M, Hogenhout SA (2011) Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. Plant Physiol 157: 831 – 841

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Nat Acad Sci USA 95: 3140 – 3145

Maixner M, Ahrens U, Seemüller E (1994) Detection of mycoplasmalike organisms associated with a yellows disease of grapevine in Germany. J Phytopathol 142: 1 – 10

Marcone C, Neimark A, Ragozzino A, Lauer U, Seemüller E (1999) Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. Phytopathology 89: 805 – 810

Marcone C, Schneider B, Seemüller E (2004) '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. Int J Syst Evol Microbiol 54: 1077 – 1082

Martini M, Lee IM, Bottner KD, Zhao Y, Botti S, Bertaccini A, Harrison NA, Carraro L, Marcone C, Khan J, Osler R (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. Int J Syst Evol Microbiol 57: 2037 – 2051

Maust BE, Espadas F, Talavera C, Aguilar M, Santamaria JM, Oropeza C (2003) Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. Phytopathology 93: 976 – 981

McCoy RE, Caudwell A, Chang CJ, Chen TA, Chiykowski LN, Cousin MT, Dale JE, de Leeuw GTN, Golino DA, Hackett KJ, Kirkpatrick BC, Marwitz R, Petzold H, Sinha RC, Sugiura M, Whitcomb RF, Yang IL, Zhu B, Seemüller E (1989) Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. U: Whitcomb RF, Tully JG (eds.) The Mycoplasmas. Acad Press, New York, 545 – 640

Mikec I, Križanac I, Budinščak Ž, Šeruga Musić M, Krajačić M, Škorić D (2006) Phytoplasmas and their potential vectors in vineyards of indigenous Croatian varieties. U: Proceedings of the 15th Meeting of the ICVG 2006, Stellenbosch, Republic of South Africa

Miljković I (1991) Suvremeno voćarstvo. Znanje, Zagreb, pp. 547

Mitrović J, Contaldo N, Paltrinieri S, Mejia JF, Mori N, Bertaccini A, Duduk B (2011) The use of groEL gene for characterisation of aster yellows phytoplasmas in field collected samples. Bule Insectol 64: S17 – S18

Mitrović J, Siewert C, Duduk B, Hecht J, Mölling K, Broecker F, Beyerlein P, Büttner C, Bertaccini A, Kube M (2014) Generation and analysis of draft sequences of 'stolbur' phytoplasma from multiple displacement amplification templates. J Mol Microbiol Biotec 24: 1 – 11

Mittelberger C, Obkircher L, Oettl S, Oppedisano T, Pedrazzoli F, Panassiti B, Kerschbamer C, Anfora G, Janik K (2017) The insect vector *Cacopsylla picta* vertically transmits the bacterium '*Candidatus* Phytoplasma mali' to its progeny. Plant Pathol: doi:10.1111/ppa.12653

Moller-Jensen J, Lowe J (2005) Increasing complexity of the bacterial cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol 17: 75 – 81

Murray RGE, Stackebrandt E (1995) Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. Int J Syst Bacteriol 45: 185 – 186

Nečas T, Maškova V, Krška B (2008) The possibility of ESFY phytoplasma transmission: through flowers and seeds. Acta Hort 781: 443 – 448

Neimark HC, Kirkpatrick BC (1993) Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. Mol Microbiol 7: 21 – 28

OEPP/EPPO (2016) PM 3/76(1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. – inspection of places of production. Bull OEPP/EPPO 46: 28 – 39

Orlovskis Z, Canale MC, Haryono M, Lopes JRS, Kuo CH, Hogenhout SA (2017) A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. Ann Botany 119: 869 – 884

Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. Nature Genet 36: 27 – 29

Oshima K, Ishii Y, Kakizawa S, Sugawara K, Neriya Y, Himeno M (2011) Dramatic Transcriptional Changes in an Intracellular Parasite Enable Host Switching between Plant and Insect. PLoS ONE 6(8): e23242. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023242

Panjan M (1957) Stolbur virus. Glasnik zaštite bilja 5: 51 – 54

Panjan M, Šarić A, Wrischer M (1970) Mycoplasmanliche gebilde in tomatenpflanzen nach infektion mit kartoffelgelbsucht. Phytopatologische Zeitschrift 69: 31 – 35

Pelletier C, Salar P, Gillet J, Cloquemin G, Very P, Foissac X, Malembic Maher S (2009) Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. Vitis 48: 87 – 95

Plavec J, Križanac I, Budinščak Ž, Ivić D, Škorić D, Šeruga Musić M (2013) *'Candidatus* Phytoplasma mali' - a new phytoplasma species molecularly characterized in Croatia. COST Action FA0807 Final Meeting Abstract Book, Bertaccini A (ur.), Lisabon, 2013. 31 – 32

Plavec J, Križanac I, Budinšćak Ž, Škorić D, Šeruga Musić M (2015) A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. Eur J Plant Pathol 142: 591. doi:10.1007/s10658-015-0637-4

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. Mol Plant Microbe Interact 19: 62 – 68

Prince JP, Davis RE, Wolf TK, Lee IM, Mogen BD, Dally EL, Bertaccini A, Credi R, Barba M (1993) Molecular detection of diverse mycoplasmalike organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. Phytopathology 83: 1130 – 1137

Rashidi M, Galetto L, Bosco D, Bulgarelli A, Vallino M, Veratti F, Marzachì C (2015) Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. BMC Microbiol 15: doi 10.1186/s12866-015-0522-5

Ribeiro-Gonçalves B, Francisco AP, Vaz C, Ramirez M, Carriço JA (2016) PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. Nucleic Acids Res 44 (W1): W246-W251. doi: 10.1093/nar/gkw359

Saccardo F, Martini M, Palmano S, Ermacora P, Scortichini M, Loi N, Firrao G (2012) Genome drafts of four phytoplasma strains of the ribosomal group 16SrIII. Microbiology 158: 2805-2814. doi: 10.1099/mic.0.061432-0

Schneider A, Cannarozzi GM (2012) Empirical and semi – empirical models of codon evolution. In: Cannarozzi GM, Schneider A (eds.) Codon Evolution: Mechanisms and Models. Oxford, Oxford University Press, 34 – 44

Schneider B, Gibb KS, Seemüller E (1997) Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. Microbiology 143: 3381 – 3389

Seemüller E (1990) Apple proliferation. Pear decline. U: Jones AL, Aldwinckle HS (ed.) Compendium of apple and pear diseases. APS press, USA, 67 – 69

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. Int J Syst Evol Microbiol 54: 1217 – 1223

Seemüller E, Kiss E, Sule S, Schneider B (2010) Multiple infection of apple trees by distinct strains of '*Candidatus* Phytoplasma mali' and its pathological relevance. Phytopathology 100: 863 – 870

Seemüller E, Sule S, Kube M, Jelkmann W, Schneider B (2013) The AAA+ ATPases and HflB/FtsH Proteases of '*Candidatus* Phytoplasma mali': Phylogenetic Diversity, Membrane Topology, and Relationship to Strain Virulence. Mol Plant Microbe Int 26: 367 – 376

Siller W, Kuhbandner B, Marwitz R, Petzold H, Seemüller E (1987) Occurrence of mycoplasma-like organisms in parenchyma cells of *Cuscuta odorata* (Ruiz-Et-Pav). J Phytopathol 119: 147 – 159

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 16S rRNA spacer region. Appl Environ Microbiol 62: 2988 – 3033

Sugio A, MacLean AM, Kingdom HN, Grieve VM, Manimekalai R, Hogenhout SA (2011a) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. Ann Rew Phytopathol 49: 175 – 195

Sugio A, Kingdom HN, MacLean AM, Grieve VM, Hogenhout SA (2011b) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defence hormone biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 108: E1254 – E1263

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. Proc Natl Acad Sci USA 103: 4252 – 4257

Šarić A, Cvjetković B (1985) Mycoplasma-like organism associated with apple proliferation and pear decline – like disease of pears. Agric Conspec Sci 68: 61 – 65

Šarić A, Škorić D, Bertaccini A, Vibio M, Murari E (1997) Molecular detection of phytoplasmas infecting grapevines in Slovenia and Croatia. Proc 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal: 77 – 78

Šeruga M, Ćurković Perica M, Škorić D, Kozina B, Mirošević N, Šarić A, Bertaccini A, Krajačić M (2000) Geographic distribution of Bois Noir phytoplasmas infecting grapevines in Croatia. J Phytopathol 148: 239 – 242

Šeruga M, Škorić D, Botti S, Paltrinieri S, Juretić N, Bertaccini FA (2003) Molecular characterization of a phytoplasma from the aster yellows (16SrI) group naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. Forest pathology 33: 113 – 125

Šeruga Musić M, Vršek I, Škorić D (2004): *Dianthus croaticus* Borb. – a new host for phytoplasmas from ribosomal groups 16SrI and 16SrIII. Abstract book of the 15th International Congress of the IOM, Athens, Georgia, USA: 122 – 123

Šeruga Musić M, Škorić D, Haluška I, Križanac I, Plavec J, Mikec I (2011) First Report of Flavescence Dorée-Related Phytoplasma Affecting Grapevines in Croatia. Plant Dis 95: 353

Šeruga Musić M, Duc Nguyen H, Černi S, Mamula Đ, Ohshima K, Škorić D (2014) Multilocus sequence analysis of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' strain and the genome analysisi of Turnip mosaic virus co-infecting oilseed rape. J Appl Microbiol 117: 774 – 785

Škorić D, Šarić A, Vibio M, Murari E, Krajačić M, Bertaccini A (1998) Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. Vitis 37: 171 – 175

Tedeschi R, Bosco D, Alma A (2002) Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. J Econ Entomol 95: 544 – 551

Tedeschi R, Visentin C, Alma A, Bosco D (2003) Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). Ann Appl Biol 142: 285–290. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00252.x

Tedeschi R, Alma A (2006) *Fieberiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of "*Candidatus* Phytoplasma mali". Plant Dis 90: 284 – 290

Tedeschi R, Ferrato V, Rossi J, Alma A (2006) Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. Plant Pathol 55: 18 – 24

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 24: 4876 – 4882

Tomlinson JA, Boonham N, Dickinson M (2010) Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. Plant Pathol 59: 465 – 71

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. J Bacteriol 190: 3979 – 3991

Urwin R, Maiden MCJ (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 11: 479 – 487

Webb DR, Bonfiglioli RG, Carraro L, Osler R, Symons RH (1999) Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. Phytopathology 89: 894 – 901

Wei W, Kakizawa S, Suzuki S, Jung H-Y, Nishigawa H (2004) In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. Phytopathology 94: 244 – 250

Wei W, Davis RE, Lee IM, Zhao Y (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. Int J Syst Evol Microbiol 57: 1855 – 1867

Weintraub PG, Beanland L (2006) Insect vectors of phytoplasmas. Ann Rev Entomol 51: 91 – 111

Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221 – 271

Zamorano A, Fiore N (2016) Draft Genome Sequence of 16SrIII-J Phytoplasma, a Plant Pathogenic Bacterium with a Broad Spectrum of Hosts. Genome Announcements 4: e00602-16. doi:10.1128/genomeA.00602-16

Zhao Y, Davis RE, Wei W, Lee IM (2015) Should '*Candidatus* Phytoplasma' be retained within the order Acholeplasmatales? IJSEM 65: 1075 – 1082 doi: 10.1099/ijs.0.000050

Zhao Y, Davis RE (2016) Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. IJSEM 66: 2121 – 2123

8. PRILOZI

8.1. Prilog 1. Popis korištenih kratica i oznaka

ak	aminokiselina
AP	proliferacija jabuke, od engl. *apple proliferation*
BN	žutica vinove loze, od fr. *bois noir*
bp	bazni par, od engl. *base pairs*
'*Ca.* P.	'*Candidatus* Phytoplasma'
Ct	*cycle threshold*
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid (heksadeciltrimetilamonijev bromid)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, od engl. *deoxyribonucleic acid*
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina, od engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*
ELISA	*Enzyme – linked immunosorbent assay*
engl.	engleski jezik
ESFY	Europske zutice kostunicavog voca, od engl. *European stone fruit yellows*
FD	zlatna žutica vinove loze, od fr. *flavescence doreé*
fr.	francuski jezik
IF	*Indirect immunofluorescence*
kbp	kilobaznih parova, od engl. *kilobase pairs*
LAMP	*loop mediated isothermal amplification*
MLO	mikoplazmama slični organizmi, od engl. *mycoplasma – like organisms*
MLST	multigenska tipizacija, od engl. *multilocus sequence typing*
ORF	otvoreni okvir citanja, od engl. *open reading frame*
PCR	lančana reakcija polimerazom, od engl. *polymerase chain reaction*
nPCR	ugniježđena lančana reakcija polimerazom, od engl. *nested polymerase chain reaction*
PD	propadanje kruške, od engl. *pear decline*
PMU	potencijalno mobilna jedinica, od engl. *potential mobile units*
RFLP	analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata, od engl. *restriction fragment lenght polymorphism*
RNA	ribonukleinska kiselina, od engl. *ribonucleic acid*
rRNA	ribosomska RNA
rpm	broj okretaja u minuti, od engl. *revolutions per minute*
ST	oznaka za alelni profil, od engl. *sequence type*
TIR	*terminal inverted repeats*
TNA	ukupne nukleinske kiseline, od engl. *total nucleic acid*
T-RFLP	*terminal restriction fragment length polymorphism*
tRNA	*transfer* RNA

8.2. Prilog 2. Popis prikupljenih i testiranih uzoraka

Tablica P-2.1. Popis svih testiranih uzoraka jabuke po regijama i po godinama. Uzorci u kojima je potvrđena prisutnost fitoplazme '*Ca*. P. mali' označeni su oznakom (+) u stupcu rezultat. (*) označava uzorke korištene za multigensku analizu.

REGIJA: DALMACIJA (AD)				
Godina	**Oznaka**	**Vrsta, sorta**	**Lokacija**	**Rezultat**
2011	491	JABUKA	ČIBAČA	-
	492	JABUKA	ČIBAČA	-
	493*	JABUKA	OPUZEN	**+**
	494	JABUKA	OPUZEN	-
	497	JABUKA	KOMIN	-
	498	JABUKA	KOMIN	-
	499	JABUKA	KOMIN	-
	500	JABUKA	KOMIN	**+**
	Ukupno	**8 uzoraka**	**3 lokacije**	**2 (+)**
2012	483	JABUKA	OPUZEN	-
	484	JABUKA	OPUZEN	-
	485	JABUKA	OPUZEN	-
	486	JABUKA	OPUZEN	-
	487	JABUKA, IDARED	OPUZEN	-
	488	JABUKA, IDARED	OPUZEN	-
	489	JABUKA, IDARED	OPUZEN	-
	490	JABUKA	ČIBAČA	-
	493	JABUKA, IDARED	TURJACI	-
	494	JABUKA, ZLATNI DELIŠES	TURJACI	-
	Ukupno	**10 uzoraka**	**3 lokacije**	**0 (+)**
2013	354	JABUKA	OPUZEN	-
	355	JABUKA	OPUZEN	-
	356	JABUKA	OPUZEN	-
	357	JABUKA	OPUZEN	-
	368	JABUKA, IDARED	TURJACI	-
	369	JABUKA, GLOSTER	TURJACI	-
	Ukupno	**6 uzoraka**	**2 lokacije**	**0 (+)**
2014	370	JABUKA	OPUZEN	-
	371	JABUKA	METKOVIĆ	-
	372	JABUKA	METKOVIĆ	-
	Ukupno	**3 uzorka**	**2 lokacije**	**0 (+)**
Sveukupno AD		**27 uzoraka**	**5 lokacija**	**2 (+)**

Nastavak Tablice P-2.1.

REGIJA: ISTOČNA KONTINENTALNA (CE)				
Godina	**Oznaka**	**Sorta**	**Lokacija**	**Rezultat**
2011	**354***	JABUKA, SLAVONSKA SRČIKA	OSIJEK	**+**
	355*	JABUKA, SLAVONSKA SRČIKA	OSIJEK	**+**
	356*	JABUKA, FRANCUSKA KOŽARKA	OSIJEK	**+**
	357*	JABUKA, PRIMA	OSIJEK	**+**
	363	JABUKA, GRANNY SMITH	OSIJEK	-
	364	JABUKA, BRAEBURN	OSIJEK	-
	369	JABUKA, GOLDRUSH	MIHOLJAČKI POREČ	-
	370	JABUKA, MANTET	MIHOLJAČKI POREČ	-
	467	JABUKA, HIEARLY	ERDUT	-
	468	JABUKA, PINK LADY	ERDUT	-
	540	JABUKA, GRIWE	STARO PETROVO SELO	-
	541	JABUKA, FLORINA	STARO PETROVO SELO	-
	542	JABUKA	PAKRAC	-
	543	JABUKA	PAKRAC	-
	553	JABUKA, RED ROME BEUTY	ŽUBRICA	-
	554*	JABUKA, ENTERPRISE	ŽUBRICA	**+**
	Ukupno	**16 uzoraka**	**6 lokacija**	**5 (+)**
2012	**368***	JABUKA, LJEPOCVJETKA	STARO PETROVO SELO	**+**
	369	JABUKA, MUTSU	STARO PETROVO SELO	-
	407	JABUKA, KANADSKA RENETA	OSIJEK	-
	408	JABUKA, GRANNY SMITH	OSIJEK	-
	418	JABUKA, RED ELSTAR	OSIJEK	-
	419	JABUKA	OSIJEK	-
	420	JABUKA, SUMMER RED	OSIJEK	-
	421	JABUKA, GALA MUST	OSIJEK	-
	422	JABUKA, RED ELSTAR	OSIJEK	-
	423	JABUKA, FREEDOM	OSIJEK	-
	424	JABUKA, GRANNY SMITH	OSIJEK	-
	425	JABUKA, JOHNATAN	OSIJEK	-
	481	JABUKA, GRANNY SMITH	ŽUBRICA	-
	482	JABUKA, ELSTAR	ŽUBRICA	-
	497	JABUKA, PINK LADY	ERDUT	-
	498	JABUKA, FLORINA	ERDUT	-
	Ukupno	**16 uzoraka**	**4 lokacije**	**1 (+)**
2013	**391***	JABUKA, IDARED	MIHOLJAČKI POREČ	**+**
	392	JABUKA, IDARED	MIHOLJAČKI POREČ	-
	397	JABUKA, MUTSU	STARO PETROVO SELO	**+**
	398	JABUKA, MAŠANKA	STARO PETROVO SELO	-
	399	JABUKA, TOPAZ	STARO PETROVO SELO	**+**
	410	JABUKA	ERDUT	-
	411*	JABUKA	ERDUT	**+**

Nastavak Tablice P-2.1.

REGIJA: ISTOČNA KONTINENTALNA (CE)				
Godina	**Oznaka**	**Sorta**	**Lokacija**	**Rezultat**
2013	412	JABUKA, GOLDEN DELICIOUS	OSIJEK	-
	413	JABUKA, GOLDEN DELICIOUS	OSIJEK	-
	422	JABUKA, GRANNY SMITH	OSIJEK	-
	423	JABUKA, GOLDEN DELICIOUS	OSIJEK	-
	424	JABUKA, GLOSTER	OSIJEK	-
	425*	JABUKA, PRIMA	OSIJEK	**+**
	426	JABUKA, BRAEBURN	OSIJEK	-
	427	JABUKA, JAMES GRIEVE	OSIJEK	-
	499	JABUKA, M9015	ŽUBRICA	-
	500	JABUKA, MS0257	ŽUBRICA	-
	501	JABUKA, MS0269	ŽUBRICA	-
	Ukupno	**18 uzoraka**	**5 lokacija**	**5 (+)**
2014	357	JABUKA, SLAVA SVIJETA	STARO PETROVO SELO	-
	358	JABUKA, MELROSE	STARO PETROVO SELO	-
	373	JABUKA, REINDERS	OSIJEK	-
	374	JABUKA, RED SPUR	OSIJEK	-
	375	JABUKA, PRIMA	OSIJEK	-
	376	JABUKA, BRAEBURN	OSIJEK	-
	379	JABUKA, MS0263	ŽUBRICA	-
	388	JABUKA, GOLDRUSH	ERDUT	-
	389	JABUKA, IMPERATORE	ERDUT	-
	391	JABUKA, STARK EARLIEST	MIHOLJAČKI POREČ	-
	392	JABUKA, JONADEL	MIHOLJAČKI POREČ	-
	Ukupno	**11 uzoraka**	**5 lokacija**	**0 (+)**
Sveukupno CE		**61 uzorak**	**6 lokacija**	**11 (+)**
REGIJA: ZAPADNA KONTINENTALNA (CW)				
Godina	**Oznaka**	**Sorta**	**Lokacija**	**Rezultat**
2011	374	JABUKA, IDARED	OBOROVO	-
	375	JABUKA, IDARED	OBOROVO	-
	419	JABUKA, ZLATNA PARMENKA	ŠUŠNJARI	-
	420*	JABUKA, ZLATNA PARMENKA	ŠUŠNJARI	**+**
	425	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	-
	426	JABUKA, JONAGOLD	MIČEVEC	-
	458	JABUKA, LONDON PEPING?	DONJA BISTRA	-
	459	JABUKA, JONAGOLD	DONJA BISTRA	-
	477	JABUKA, BOŽIČNICA	KRUŠLJEVEC	-
	478	JABUKA, MANTET	KRUŠLJEVEC	-
	479	JABUKA, GLOSTER	SVETA MARIJA	-
	480	JABUKA, STARK DELIŠES	SVETA MARIJA	-
	481*	JABUKA, GALA	SVETA MARIJA	**+**

Nastavak Tablice P-2.1.

REGIJA: ZAPADNA KONTINENTALNA (CW)				
Godina	**Oznaka**	**Sorta**	**Lokacija**	**Rezultat**
2011	482	JABUKA, GALA	SVETA MARIJA	-
	483*	JABUKA, FRANCUSKA KOŽARKA	SVETA MARIJA	**+**
	484	JABUKA, RED MELBA	SVETA MARIJA	-
	485	JABUKA, MELROSE	CESTICA	-
	486	JABUKA, GLOSTER	CESTICA	-
	487	JABUKA, PODLOGA	VELIKA LUDINA	-
	488	JABUKA, PODLOGA	VELIKA LUDINA	-
	489*	JABUKA, PLEMKA	VELIKA LUDINA	**+**
	490	JABUKA, PLEMKA	VELIKA LUDINA	**+**
	519*	JABUKA, JONAGOLD	SV. MARIJA	**+**
	520	JABUKA, GLOSTER	SV. MARIJA	-
	521	JABUKA, MAŠANKA	SV. MARIJA	-
	522	JABUKA, JONADEL	SV. MARIJA	**+**
	589	JABUKA	DELOVI	-
	590	JABUKA	DELOVI	-
	Ukupno	**28 uzoraka**	**9 lokacija**	**7 (+)**
2012	307	JABUKA, MELROSE	VARAŽDIN	-
	308	JABUKA, MAŠANKA	CESTICA	-
	309	JABUKA, STARK DELIŠES	CESTICA	-
	310*	JABUKA, IDARED	SVETA MARIJA	**+**
	311	JABUKA, PRIMA	SVETA MARIJA	**+**
	312	JABUKA, GALA	SVETA MARIJA	-
	345	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	-
	346	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	-
	347	JABUKA, JONAGOLD	OBOROVO	-
	348	JABUKA, BOBOVEC	OBOROVO	-
	354	JABUKA, HARMONY	ŠUŠNJARI	-
	355	JABUKA, FLORINA	ŠUŠNJARI	-
	356	JABUKA, RED CHIEF	ŠUŠNJARI	-
	357	JABUKA, LONDON PIPING	DONJA BISTRA	-
	358	JABUKA, ZELENIKA	DONJA BISTRA	-
	363	JABUKA, MUTSU	VELIKA LUDINA	-
	364*	JABUKA, MUTSU	VELIKA LUDINA	**+**
	365	JABUKA, GOLDEN DELICIOUS	VELIKA LUDINA	-
	366	JABUKA, GOLDEN DELICIOUS	VELIKA LUDINA	-
	367	JABUKA, GOLDEN DELICIOUS	VELIKA LUDINA	-
	388	JABUKA, MUTSU	SVETA MARIJA	-
	389*	JABUKA, STARK EARLIEST	SVETA MARIJA	**+**
	390*	JABUKA, ELSTAR	SVETA MARIJA	**+**
	391	JABUKA, STAYMAN	SVETA MARIJA	**+**
	392*	JABUKA, MUTSU	SVETA MARIJA	**+**
	393*	JABUKA, JONADEL	SVETA MARIJA	**+**
	Ukupno	**26 uzoraka**	**8 lokacija**	**8 (+)**

Nastavak Tablice P-2.1.

REGIJA: ZAPADNA KONTINENTALNA (CW)				
Godina	**Oznaka**	**Sorta**	**Lokacija**	**Rezultat**
2013	372	JABUKA, JONAGOLD	VELIKA LUDINA	-
	373*	JABUKA, JONAGOLD	VELIKA LUDINA	**+**
	374	JABUKA, GALA	VELIKA LUDINA	-
	375	JABUKA, GOLDEN DELICIOUS	VELIKA LUDINA	-
	376	JABUKA, SUMMERRED	VELIKA LUDINA	-
	377	JABUKA, SUMMERRED	VELIKA LUDINA	-
	382	JABUKA, ONTARIO	DONJA BISTRA	-
	383	JABUKA, JONAGORED	DONJA BISTRA	-
	436*	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	**+**
	437	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	**+**
	438*	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	**+**
	439	JABUKA, JONAGOLD	MIČEVEC	-
	440	JABUKA, ECOLET	ŠUŠNJARI	-
	441*	JABUKA, ECOLET	ŠUŠNJARI	**+**
	445	JABUKA, MAŠANKA	CESTICA	-
	446	JABUKA, ZLATNI DELIŠES	CESTICA	-
	447	JABUKA, MAŠANKA	KRUŠLJEVEC	-
	448*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	449*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	450*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	451	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	452*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	453*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	454	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	455*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	456*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	457*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	458*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	459*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	460*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	461*	JABUKA	SVETA MARIJA	**+**
	472*	JABUKA, GALA	DONJI MIHALJEVEC	**+**
	473*	JABUKA	DONJI MIHALJEVEC	**+**
	474*	JABUKA	DONJI MIHALJEVEC	**+**
	475*	JABUKA	DONJI MIHALJEVEC	**+**
	476	JABUKA	DONJI MIHALJEVEC	-
	477*	JABUKA	DONJI MIHALJEVEC	**+**
	Ukupno	**37 uzoraka**	**8 lokacija**	**24 (+)**

Nastavak Tablice P-2.1.

REGIJA: ZAPADNA KONTINENTALNA (CW)				
Godina	**Oznaka**	**Sorta**	**Lokacija**	**Rezultat**
2014	**250***	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	**+**
	251	JABUKA, GRANNY SMITH	MIČEVEC	-
	252*	JABUKA, RED ELSTAR	ŠUŠNJARI	**+**
	253	JABUKA, JONAGOLD	CESTICA	-
	267	JABUKA, JONAGORED	VELIKA LUDINA	-
	268*	JABUKA, SUMMERRED	VELIKA LUDINA	**+**
	275	JABUKA, KANADSKA RENETA	DONJI MIHALJEVEC	-
	276*	JABUKA, KRIVOPETELJKA	DONJI MIHALJEVEC	**+**
	277*	JABUKA, STAR DELICIOUS	SVETA MARIJA	**+**
	278*	JABUKA, SUPER STAR DELICIOUS	SVETA MARIJA	**+**
	279*	JABUKA, JONAGOLD	SVETA MARIJA	**+**
	280*	JABUKA, ELSTAR	SVETA MARIJA	**+**
	323	JABUKA, ROYAL GALA	DONJA BISTRA	-
	Ukupno	**13 uzoraka**	**6 lokacija**	**8 (+)**
2016	JJ1	JABUKA, ELSTAR	JASTREBARSKO	-
	JJ2	JABUKA, ELSTAR	JASTREBARSKO	-
	JJ3	JABUKA, ELSTAR	JASTREBARSKO	-
	JJ4*	JABUKA, ELSTAR	JASTREBARSKO	**+**
	JJ5	JABUKA, ELSTAR	JASTREBARSKO	-
	JJ6	JABUKA, IDARED	JASTREBARSKO	-
	JJ7	JABUKA, IDARED	JASTREBARSKO	-
	JJ8	JABUKA, IDARED	JASTREBARSKO	-
	JJ9	JABUKA, IDARED	JASTREBARSKO	-
	JJ10	JABUKA, ZLATNI DELIŠES	JASTREBARSKO	-
	JJ11	JABUKA, ZLATNI DELIŠES	JASTREBARSKO	-
	JJ12*	JABUKA, ZLATNI DELIŠES	JASTREBARSKO	**+**
	Ukupno	**12 uzoraka**	**1 lokacija**	**2 (+)**
Sveukupno CW		**116 uzoraka**	**12 lokacija**	**49 (+)**
Sveukupno sve regije i godine		**204 uzorka**	**23 lokacije**	**62 (+)**

Tablica P-2.2. Popis svih testiranih uzoraka kukaca – vektora iz roda *Cacopsylla* po lokacijama i po godinama. Uzorci u kojima je potvrđena prisutnost AP-fitoplazme '*Ca*. P. mali' označeni su oznakom (+) u stupcu rezultati. (*) označava uzorke korištene za multigensku analizu.

REGIJA: ZAPADNA KONTINENTALNA (CW)				
Godina	**Vrsta**	**Lokacija**	**Broj testiranih jedinki**	**Broj zarazenih jedinki**
2012	*Cacopsylla picta*	JASTREBARSKO	51	**5***
	Cacopsylla melanoneura	JASTREBARSKO	6	0
	***OZNAKE ZARAZENIH UZORAKA: Cp11, Cp13, Cp16, Cp17, Cp19**			
2013	*Cacopsylla picta*	SVETA MARIJA	2	**1***
	Cacopsylla melanoneura	SVETA MARIJA	4	0
	***OZNAKE ZARAZENIH UZORAKA: 6K**			
2014	*Cacopsylla picta*	JASTREBARSKO	36	0
	Cacopsylla melanoneura	JASTREBARSKO	7	0
	0 zaraženih			
2016	*Cacopsylla picta*	JASTREBARSKO	87	**4***
	Cacopsylla melanoneura	JASTREBARSKO	11	0
	***OZNAKE ZARAZENIH UZORAKA: zb19, zb45, zb65, zb70**			
	Cacopsylla picta	MIČEVEC	4	**2***
	Cacopsylla melanoneura	MICEVEC	6	0
	***OZNAKE ZARAZENIH UZORAKA: zb2, zb3**			
Ukupno zaraženih	Jastrebarsko: 10 *C. picta*	**Cp11, Cp13, Cp16, Cp17, Cp19, zb19, zb45, zb65, zb70**		
	Sveta Marija: 1 *C. picta*	**6K**		
	Mičevec: 2 *C. picta*	**zb2, zb3**		
REGIJA: ISTOCNA KONTINENTALNA (CW)				
2012	*Cacopsylla picta*	OSIJEK	2	0
	Cacopsylla melanoneura	OSIJEK	3	0
	0 zaraženih			
	SVEUKUPNO	**LOKACIJE**	**Broj testiranih jedinki**	**Broj zarazenih jedinki**
2012. – 2016.	*Cacopsylla picta*	**4**	182	**12**
	Cacopsylla melanoneura		37	**0**
	Cacopsylla spp.		219	**12**

8.3. Prilog 3. Sekvence korištene i dobivene u ovom istraživanju

Tablica P-3.1. Sekvence gena *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y iz baze podataka GenBank korištene u računalnim analizama sekvenci uzoraka. Referentne sekvence za pojedine genotipove su osjenčane. Sekvence identične novim genotipovima (oznake dodijeljene u ovoj disertaciji) su podcrtane.

(Referentni) soj	*ace*F	acc.No.	*pnp*	acc.No.	*imp*	acc.No.	*sec*Y	acc.No.
AP-AT	**A13**	FN598184	**P9**	FN598200	**I24**	FN600733	**S9**	FN598213
AP13	**A14**	FN598185	**P11**	X	**I22**	FN600731	**S12**	X
AP032-10	**A15**	FN598186	**P12**	FN598203	**I21**	FN600730	**S11**	FN598215
AP1Luca	**A16**	FN598187	**P13**	FN598204	**I25**	FN600734	**S12**	X
TN/1	**A22**	FN598188	X	X	X	X	X	X
NW/2	**A23**	FN598189	X	X	**I24**	X	X	X
AP15	**A13**	X	**P10**	FN598201	**I23**	FN600732	**S12**	FN598216
AP28	**A13**	X	**P11**	FN598202	X	X	**S9**	X
AP4Luca	**A15**	X	**P12**	X	**I22**	X	**S10**	FN598214
TN2	X	X	X	X	**I29**	FN600735	X	X
HD/1	X	X	X	X	**I30**	FN600736	X	X
32_2014	X	X	X	X	X	X	**S15**	KT906170
3/93-2.6b	X	X	X	X	**I34**	FN658475	X	X
3/93-2.6a	X	X	X	X	**I37**	FN658476	X	X

Tablica P-3.2. Pristupni brojevi iz baze podataka GenBank za sekvence uzoraka koji predstavljaju nove genotipove te ostale reprezentativne sekvence iz ove doktorske disertacije (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Gen	Genotip	Oznaka uzorka	Pristupni broj	Napomena
16S rRNA	**n.p.***	472	KJ676480	*n.p. – nije primjenjivo
		6K	KJ676479	
***ace*F**	**A13**	493	KU644715	100% identične sekvence uzoraka 411, 425, 268, 436, 438, 250, zb3, 441, 252, Cp11, Cp19, zb19, zb45, zb 65, zb 70, 472,
		354	KU644726	
		355	KU644725	
		356	KU644724	
		357	KU644723	
		489	KU644729	
		364	KU644722	
		420	KU644717	
		483	KU644728	
		6K	KT325594	
		390	KU644720	100% identična sekvenca uzorka 280
		368	KU644721	
	A15	554	KU644714	100% identične sekvence uzoraka 391, zb2, JJ4, JJ12, Cp13, Cp16, Cp17, 475, 519
	A16	392	KU644719	
		393	KU644718	
	A25	473	MF489187	
	A26	477	MF489185	
		276	MF489186	
	A27	481	KU644716	
		310	KU644727	
pnp	**P17**	391	MF489193	Fragment gena od 512 bp
		373	MF489188	
		zb2	MF489189	
		JJ4	MF489190	
		cp13	MF489191	
		cp16	MF489192	
		475	MF489194	
		483	MF489195	
		519	MF489196	
	P18	455	MF489197	
imp	**I32**	473	MF489198	
		393	MF489206	
		389	MF489203	
	I33	452	MF489207	
		453	MF489208	
	I34	477	MF489199	
		276	MF489200	
	I35	310	MF489202	
	I36	481	MF489201	

Nastavak Tablice P-3.2.

Gen	Genotip	Oznaka uzorka	Pristupni broj	Napomena
imp	**I37**	390	MF489204	
	I38	392	MF489205	
secY	**S14**	481	MF489211	Fragment gena od približno 646 bp
		310	MF489212	
	S15	389	MF489213	
		393	MF489216	
		455	MF489217	
	S16	473	MF489210	
	S17	392	MF489215	
	S18	390	MF489214	
		280	MF489218	

Tablica P-3.3. Set podataka pripremljen za analizu online programom PhyloViz.

ST	*ace*F	*pnp*	*imp*	secY
1	A13	P10	I21	S12
2	A13	P10	I23	S12
3	A13	P10	I22	S12
4	A15	P17	I21	S10
5	A13	P9	I21	S12
6	A15	P9	I21	S11
7	A15	P9	I33	S12
8	A16	P10	I32	S12
9	A26	P10	I34	S12
10	A13	P9	I24	S18
11	A13	P9	I24	S9
12	A13	P17	I21	S11
13	A13	P18	I32	S15
14	A15	P10	I21	S12
15	A15	P17	I21	S11
16	A25	P10	I32	S16
17	A27	P10	I35	S14
18	A27	P9	I36	S14
19	A13	P9	I37	S18
20	A16	P10	I38	S17

Reprezentativne sekvence *ace*F, *pnp*, *imp* i *sec*Y gena iz ovog istraživanja koje se ne nalaze u bazi podataka GenBank.

(a) Sekvence fragmenta gena *ace*F od približno 747 bp korištene za usporedbu s referentnim sekvencama za pojedini genotip.

>448_A13
TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGCTTTTATTATGAAGGC
GATTGTTATTGTTTTAAAAGAATT

>449_A13
TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGCTTTTATTATGAAGGC
GATTGTTATTGTTTTAAAAGAATT

>455_A13
TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGCTTTTATTATGAAGGC
GATTGTTATTGTTTTAAAAGAATT

>458_A13
TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGC

>459_A13
TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGCTTTTATTATGAAGGC
GATTGTTATTGTTTTAAAAGAATT

>373_A15

TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGTAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGCTTTTATTATGAAGGC
GATTGTTATTGTTTTAAAAGAATT

>452_A15

TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGTAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGCTTTTATTATGAAGGC
GATTGTTATTGTTTTAAAAGAATT

>453_A15

TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
AGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGTAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATG

>389_A16

TTTAAAAGTATATTTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGCGATATTTTAGTTACAGTAGAAACAGATAAAGTAAATGCAGATTTACC
GGCTCCAATAAATGGTGTTATTACTAAATTAGGAGTTAAAGAAGGTGAAATGATCCATGTTGGTGATATGGTAGCTATAATAGGTGATG
AAATTCATGAAACTGAATTAAAAAAAGCAGATAAAGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATTCTTCTCAAATTATAGAA
ACATTTAATGATAACCATGTTTTAAATGAAATTAATTTAAGTGAAAAAAAAAATTCTAACCACTCCTTTAGTACGTTCTATGGCTAAGAAGTT
AGGAATAGATTTAAATAATGTTAATGGTAGTGGGATTAATGGCAAAATCTTGAAAGAAGATGTCGAAAGATATCAAAATGAAAATTTAA
AAAATTCAACTTCAACAATACAAAAACAAAATATAAAAGAACAACAATCATTAAATAATCTTGATTTTAGTAGTTTTGATAGTGAAGTTAT
TAAAATTTCTCGTTTAAGAAAAGCTATTTCAGAACAAATGAAAATTTCAAAAAATGCTATTGTTCCTACTACTTTATTAAATGAAATTAATA
TTGATAATTTGATAGCATTTAGGAAAAAATTAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAACTTACATGGCTTTTATTATGAAAGC
GATTGTTATTGTTTTAAAAGAATT

(b) Reprezentativne sekvence gena *pnp* od 2187 bp. Ispod reprezentativne sekvence navedeni su uzorci iz kojih su dobivene 100 % identične sekvence, a fragment od 512 bp korišten za usporedbu s referentnim sekvencama za pojedini genotip je osjenčan.

>356_P10

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAAATCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGTGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT

AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identične: 250, Cp11, zb19, zb45, zb65, 473, 474, 477, 276, 393, 448, 450, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 277, 278, 279

>268_P10
ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGTGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identične: 411, 554, 436, 441, 472

>425_P10
ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCCCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGTGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA

AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identične: 252, 438

>310_P10
ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identične: 392,449

>6K_P10
ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAAATCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

>368_P9

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCGTTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCCCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGCAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTGCGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

>390_P9

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCGTTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCCCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTGCGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identična: 280

>**452_P9**

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCGTTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCCCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA

GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCGGTGGGTAGATATTTAGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCATG
GAATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCATTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTGCGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identična: 453

>cp17_P9
ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAATGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTAAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCCCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCGGTGGGTAGATATTTAGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCATG
GAATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCATTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTGCGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identična: JJ12

>481_P9
ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT

AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTGCGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

>355_P9

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAAATCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGTGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTGCGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

>zb3_P9

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAAATCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGTGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTGCGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

>391_P17

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAATGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTAAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCCCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCGGTGGGTAGATATTTAGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCATG
GAATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCATTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGGAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTGCTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

100% identične: 373, zb2, JJ4, Cp13, Cp16, 475, 483, 519

>455_P18

ATGGATTTAAATACTAAAAATAATAATAAAAAAGTTTTTGAAATTATTTTTGAAAATAACGTTTTAAGAATTGAAATTGGTGAAATATCAA
GACAAGCTAATGGATCTGTAATGTTATTTTATAAGGATACTGTTATTTTAAGTGTTGCTGTTTGTGGAGATAAAAAAAAATTCTTTAAATTTT
TTACCTTTAACTGTTAATTATCAAGAAAAATTATATGCTGCTGGTAAAATACCTGGAGGTTTTTTAAGAAGAGAAGGAAAACCTTCGGATC
AAGAAATTCTTTGTTCTCGTTTAATTGATCGTACAATAAGACCATTATTTTCTAAAAATTTTAAAAATGAAGTTCAATTGATAAATATGGTT
TTAAGTAGTGATCCAGATGGCAACAACGAAAATATTGCTTTATTAGGTAGTTCTTTAGCTTTATTAATTTCTGATATTCCTTTTTTTGAACCA
GTTTCTAGTGTTTGCATTGGTAAGATTGGTGATAATTTGATTATTAATCCTACATTATCTCAAAGAGAAAATTCTTCATTTTTTTTAATTTTA
GCAGGAACTAAAGATAGTTTGAATATGGTTGAAATGAGTTCTAAAGAAATTAGCGAAAATAATTTTTTAGAATCTATTAAGTTTGGTCAT
GAAATTATTAAAAAACTTTGCTTGTTTCAAACAGAAATTGCTAATCAAATCGGTAAAACCAAAATAAAAATTCCCTTACATAATGTTAATA
ATTTATTAGAAGTAGAAATAAAAGATAAATATTTTTCTGAAATAGAGATGATTTTAAAAAACAAATGTAATGTTAATAATGTAAAAAAATC
TGATATTTTAAAAAAATTAAAAGAAAATGTATTAGAAAATTATAAAGAAAAATTTTTAAATAATAAAAAAGATAATTTTAATTTACTAGAT
TTAGAAAATCAAAAATTATATTTAAATGAAGTTGAGATTATATTTGATTTTTTAGTTAGAACTATAATTAGGGAAACAATTTTGAAAGAAA
ATATTAGACCTGATGGAAGAAATTCTTCAGAAATTCGATCAATTACATCTCGTATTGATATTTTACCTAGAACTCATGGTTCAGCTTTGTTT
ACTCGCGGAGGAACTCAAAGTTTAGCTATTGTTACTTTAGGAACTTTAAGAGAAAGTAAAATTATTGATGATTTATCAGATGAAGTTGAT
AAACGTTTTATGCTTCATTATAATTTTCCTGCTTTTGCTGTTGGTTCAGTGGGTAGATATTTGGCCCCCAGTAGAAGAGAAATAGGGCACG
GCATGTTAGCAGAAAAAGCCTTAGAATGTGTTTTACCATCTGAAAACGATTTTCCTTATTCTATTCGTGTAGTTTCAGAAATTTTAGATTCA
AATGGTTCATCTTCTCAAGCTACTATTTGTGCTTCTTCTATGGCCTTAATGTCTGCTGGAGTACCTTTAAAATCTTTAGTTGCAGGAGTAGC
TATGGGTTTAATTGTTGATGATATTGATAAAATAAATCATTATACTATTTTAAGTGATATCGAAGGGTTAGAAGATTATCAAGGTGATATA
GATTTTAAAATTGCTGGTACTAAAGTTGGTATTACTGCTTTACAATTAGATATTAAAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAG
TTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAATATTTTAAATGAAATGGAAAAAGTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATG
CTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTGGTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAA
AACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGCATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTA
CATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAATTTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTT
GGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTT
TAAAAATAGGTCAAATTATTTTAGTAAAATGTATTAAAATTAATGAACGCGGTCAAATTGATTTATCCAAAAAAGATGTATTTAAATAA

(c) Sekvence fragmenta gena *pnp* od 512 bp korištene za usporedbu s referentnim sekvencama.

>493_P10

AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT

TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>354_P10
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>357_P10
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>489_P10
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>364_P10
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>**420_P10**
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>cp19_P10
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>zb70_P10
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG
GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

>389_P10
AAATTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTTGAAAAAGTTTTAGAACAAGCAAAAAAAGATAGAATAAAGATTTTAAATGAAATGGAAAAA
GTAATTAATAAGTCTCGCAATGAAGTTTCCAAATATGCTCCTAAAGTAAAGATGATTTTAATTAAACCAGAAAAAATACGCGATATTATTG

GTAGTGGTGGTAAAATAATTAATCAAATTATTGAAAAACATGATAATGTTAAAATTGACATTATGCAAGATGGAAAAATTTATATTATGC
ATCAAAATATGGAAATTGTTGATTTAACAGTTACTTACATTCAAAATTTTTTAAAAAAAATTAAAGTAGAAAATGTATATGAAGTAAAAAT
TTTACGTTTTGTTAAAGATAAAATGGATAAAACATTTGGAGCTATAGCAGAAATTTTTCCAGGTATTGAAGGTTTTATTCATATTAGTAAA
TTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTAAAAATAGGTCAAATTATTTTA

(d) Reprezentativne sekvence gena *imp* od približno 507 bp. Sekvence uzoraka unutar istog genotipa (Tablica 4) su 100 % identične.

>355_I21
ATGGAAGCAAATCAACAAAAAAAAATACTTATAGGTGTTGGTTCAGTTGTTGGTGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTA
GTTTCTGGCCTTTTTCATCAAAAAGTAAACAACAAATTTTTACTGATGAATTTAGCAAAATAACATTTGACACTGAAGTAGCAGAAACAAA
TGCCATTTTTAATAAAACACTACCAGCTGATAGAATCAAATATTTTAAAGAAGATTTTATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTGGTCGAATGG
GCTGATCAATTAATTGAACCAAAAATTACTGAAGGCGATAAAAAAGCATCTTTTGATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAATTAAAGTC
AACCAAGAATTATTAGCAAAACATGACGAATCTTTTTTGAAAGCAGACACTAATAAAGCCACAGTTCAAGGTGAAATAAAAATTATCATT
GACGAATACCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAACTGCTTTAAATTTGCAATAA

>493_I22
ATGGAAGCAAATCAACAAAAAAAAATACTTATAGGTGTTGGTTCAGTTGTTGGTGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTA
GTTTCTGGCCTTTTTCATCAAAAAGTAAACAACAAATTTTTACTGATGAATTTAGCAAAATAACATTTGACACTGAAGTAGCAGAAACAAA
TGCCATTTTTAATAAAACACTACCAGCTGATAGAATCAAATATTTTAAAGAAGATTTTATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTGGTCGAATGG
GCTGATCAATTAATTGAACCAAAAATTACTGAAGGCGATAAAAAAGCATCTTTTGATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAATTAAAGTC
AACCAAGAATTATTAGCAAAACATGACGAATCTTTTTTGAAAGCAGACACTAATAAAGCCACAGTTCAAGGTGAAATAAAAATTATCATT
GACGAATACCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAACTGCTTTAAATTTGCAATAA

>354_I23
ATGGAAGCAAATCAACAAAAAAAAATACTTATAGGTGTTGGTTCAGTTGTTGGTGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTA
GTTTCTGGCCTTTTTCATCAAAAAGTAAACAACAAATTTTTACTGATGAATTTAGCAAAATAACATTTGACACTGAAGTAGCAGAAACAAA
TGCCATTTTTAATAAAACACTACCAGCTGATAGAATCAAATATTTTAAAGAAGATTTTATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTGGTCGAATGG
GCTGATCAATTAATTGAACCAAAAATTACTGAAGGCGATAAAAAAGCATCTTTTGATTCAGCCCTTGAATCATTGGGAAAAATTAAAGTC
AACCAAGAATTATTAGCAAAACATGACGAATCTTTTTTGAAAGCAGACACTAATAAAGCCACAGTTCAAGGTGAAATAAAAATTATCATT
GACGAATACCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAACTGCTTTAAATTTGCAATAA

>368_I24
ATGGAAGCAAATCAACAAAAAAAAATACTTATAGGTGTTGGTTCAGTTGTTGGTGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTA
GTTTCTGGCCTTTTTCATCACAAAGTAAACAAGAAATTTTTGATGATCTTAGCAAAATAACATTTGAAAATGAAGTAGCAGAAACAAATAC
CATTTTTAGTAAAACAGCAACTGAGAGAAAAAAATTTAAAGAAGAATTTATAGATAAAAAAGTTAATAAATTGGTCGAATTGGCTAATAA
ATTAATAACACCAAAAATTACTGAAGGCGATAAAACAACATCTTATAATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAAATTACAGACAACCAAAA
ATCATTAGTAGAACATAACGACGATTTTTGGAAAGCAGACACTAATAAAACCGCAGTTCAAAATGAAATAAAAATTATCATTGAAGAATA
CCCAAAATTTAAAACACAAATAAAAACTGCTTTAGATTTGAAATAA

(e) Reprezentativne sekvence gena *sec*Y od približno 1245 bp. Ispod reprezentativne sekvence navedeni su uzorci iz kojih su dobivene 100 % identične sekvence, a fragment od približno 646 bp korišten za usporedbu s referentnim sekvencama za pojedini genotip je osjenčan.

>368_S9
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTGGTAATAAAGAAAGTGGTGGTGAGATATTTATTGGAGAAAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTAC
CGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGGTTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGT
AGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAAAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTT
TAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATTCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAA
AAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTAATC
AATTAAAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTT
TTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCCGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGACCAGGTAAAC
AGACTGTGGAAAAAATATCTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGATTTTTTTATTTGTATTACCTCTGTTAATTAG
TAAAGGTTTTGATTTTAAGGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGT
TCTACTGCCAATAAAGAAGATTATGCAAAAATTTTTTAA

>391_S10

ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAGTGAGATATTGATTCCAGAAAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCT
ATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTA
CTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAAAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTCTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATA
GTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGT
GTATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTGATAAATTAAAATGTAAAGAT
AAAATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAAT
TGTAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAAAT
ATCTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTA
AGGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGA
AGATTATGCAAAAATTTTTTAA

100% identične: 373, zb2, cp13

>483_S11

ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT
TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAA
AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTTTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCCGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGACCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAA
GGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAA
GATTATGCAAAAATTTTTTAA

>493_S12

ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT
TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAA
AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTTTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAA
GGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAA
GATTATGCAAAAATTTTTTAA

100% identične: 354, 355, 356, 357, 554, 425, 268, 364, 436, 438, zb3, 420, 441, zb45, zb65, zb70, 472, 474, 477, 450, 452, 453, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 6K, 277, 278

>252_S12

ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT
TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAA

AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGATTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAAG
GAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAAG
ATTATGCAAAAATTTTTTAA

>449_S12
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT
TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAA
AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGACCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGATTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAAG
GAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAAG
ATTATGCAAAAATTTTTTAA

>489_S12
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT
TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAA
AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGACCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAA
GGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAA
GATTATGCAAAAATTTTTTAA

>411_S12
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT
TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAA
AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTCTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAA
GGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAA
GATTATGCAAAAATTTTTTAA

100% identična: 279

>481_S14
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT

TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTGATAAATTAAAATGTAAAGATAA
AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAA
GGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAA
GATTATGCAAAAATTTTTTAA

100% identična: 310

>393_S15
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTGGTAATGAACAAAGTGGTGGTAAGATATATATTCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTAC
CGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGT
AGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTT
TAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAA
AAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAA
ATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTT
TTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAACA
GACTGTGGAAAAAATATCTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGT
AAAGGTTTTGATTTTAAGGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTT
CTACTGCCAATAAAGAAGATTATGCAAAAATTTTTTAA

100% identične: 455, 389

>473_S16
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTGGTAATGAACAAAGTGGTGGTAAGATATATATTCCAGAAAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTAC
CGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGT
AGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTT
TAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAA
AAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTGATA
AATTAAAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTT
TTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAAC
AGACTGTGGAAAAAATATCTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGATTTTTTTATTTGTATTACCTCTGTTAATTAG
TAAAGGTTTTGATTTTAAGGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGT
TCTACTGCCAATAAAGAAGATTATGCAAAAATTTTTTAA

>392_S17
ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAAATATAGTAAATATAGTAGTAGTGAGATAAATGAACTAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGC
TACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATG
AGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTT
ATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCT
TTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTT
ATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCT
CTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGT
AAACAGACTGTGGAAAAAATATCTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAA
TTAGTAAAGGTTTTGATTTTAAGGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAAT
TAGTTCTACTGCCAATAAAGAAGATTATGCAAAAATTTTTTAA

>390_S18

ATGTTAAAAAAAATAAAATTAATTTTTAATAGTAAATTAATTTTCAGATTCATTTTCACTTTATTTATTATTTTTATTTTTATTTTAGGACGTA
GTATACAAATCCCTTTTTTAAATGTACAAATACAAACTATTATTCAATTATTGAAAGGTTTGACTACATCTGATAAATTTTTAATTAATTTTG
ATCTTAATAATTTTAATTTATTATCTTTAAGCATATATCCTTATATTACTATTTCTATTTTTATTCAATTGGTTCAAAAATTCATTCCTCATTTG
AAAGAATGGCGTGAACAAGGCGAAGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTT
ATTTAATGATTAATAAATATAGTAGTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATT
TGGTTATCTGATTTAATTACAGCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTT
TTCAAAAAATATTTGCATTTTGGAATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTCTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGT
TTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGT
ATTGCCAATTATTTTAACATCCACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTGATAAATTAAAATGTAAAGATAA
AATTATAGAGTTTATTAGTATATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTG
TAAATACTAATGATATTGCTGAACATTTATCTAAACAAGATGCTTATATTGAAAATTGTAGGCCAGGTAAACAGACTGTGGAAAAAATAT
CTTATGATTTTTTCAGAATTACTATTATTGGTGTTTTTTTTATGGTTTTTTTATTTGTATTACCTTTGTTAATTAGTAAAGGTTTTGATTTTAA
GGAATTTAAAATAGGGGGAACAGGATTTTTAATTATTGTTGGTGTTTCTATTGAAACTTTACAACAAATTAGTTCTACTGCCAATAAAGAA
GATTATGCAAAAATTTTTTAA

100% identična: 280

(c) Sekvence fragmenta gena *sec*Y od približno 646 bp korištene za usporedbu s referentnim sekvencama.

>JJ4_S10
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAGTGAGATATTGATTCCAGAAAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACA
GCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTT
GGAATACAGACAAAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTCTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAAT
CCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATC
CACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTGATAAATTAAAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTA
TATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCT

>JJ12_S11
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCC
AAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGA
ATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCT
ATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCAC
AATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATC
TACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTTTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCC

>cp16_S11
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCC
AAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGA
ATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCT
ATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCAC
AATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATC
TACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTTTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCC

>cp17_S11
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCC
AAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGA
ATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCT
ATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCAC
AATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATC
TACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTTTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCC

>cp19_S12
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCC
AAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGA
ATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCT

ATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCAC
AATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATC
TACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCT

>zb19_S12
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCC
AAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGA
ATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCT
ATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCAC
AATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATC
TACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCT

>475_S10
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAGTGAGATATTGATTCCAGAAAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACA
GCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTT
GGAATACAGACAAAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTCTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAAT
CCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATC
CACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTGATAAATTAAAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTA
TATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCT

>276_S12
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCC
AAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGA
ATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCT
ATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCAC
AATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATC
TACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCT

>519_S10
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAGTGAGATATTGATTCCAGAAAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACA
GCCAAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTT
GGAATACAGACAAAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTCTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAAT
CCCTATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATC
CACAATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTGATAAATTAAAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTA
TATCTACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCT

>448_S12
AGTTGGAAAACAAAAATTAAATCGTTTAACTCGTTTTTTAGCTATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAATATAGTA
GTAAGATAGATTATCCAGACAAGTTATATATATCGTTTTTTTTAGCTACCGGAACAGCTATTGCTATTTGGTTATCTGATTTAATTACAGCC
AAAGGGATTGGTAATGGAACTTCAATTTTAATTATGGTTGGAATGAGTAGTGGAGTAATTACTACTTTTCAAAAAATATTTGCATTTTGGA
ATACAGACAGAATTAAATTTTTTGCTTTATTGTTTTTTTTATTATTTATTTTAATATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAAAAATCCCT
ATTATTTATCCTAATAAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCCTGGTGTATTGCCAATTATTTTAACATCCAC
AATGCAAGCATTTTTTATGTTTTGTATTAATAATATACCATTTTTTTATAAATTAGAATGTAAAGATAAAATTATAGAGTTTATTAGTATATC
TACTAATTTAGGAATTATTTTTTTTGTTTGTTTAATAATTTTCTTCTCTTTTTTAACTGCTTTTTTAATTGTAAATACTAATGATATTGCT

9. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivana Križanac

Datum i mjesto rođenja:1.1.1976., Zagreb, Hrvatska

Adresa: Rakitje, Novačka cesta 15

E-mail: ivca_0101@yahoo.com; ivana.krizanac@hcphs.hr

Obrazovanje

2013. – danas	Doktorski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2009.	Magistar znanosti; Postdiplomski studij molekularne i stanične biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2000.	Diplomirani biolog – ekolog; Diplomski studij biologije – smjer ekologija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Radno iskustvo

2015. – danas	Rukovoditeljica laboratorija za molekularnu biologiju, Zavod za zaštitu bilja, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo
2013. – 2015.	Rukovoditeljica odjela za dijagnostiku i analitiku, Zavod za zaštitu bilja, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo
2009. – 2013.	Rukovoditeljica laboratorija za bakteriologiju, Zavod za zaštitu bilja, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo
2002. – 2013.	Stručni suradnik, Zavod za zaštitu bilja u poljoprivredi i šumarstvu

Dodatne edukacije i specijalizacije

2011	INRA, Bordeaux, Francuska - Metode detekcije i identifikacije '*Candidatus* Liberibacter' vrsta
2010	Netherlands Plant Protection Service, Wageningen, Nizozemska - Detekcija i identifikacija fitopatogenih bakterija iz roda *Xanthomonas*
2008	INRA, Bordeaux, Francuska – Multigenska tipizacija fitoplazmi
2007	Netherlands Plant Protection Service, Wageningen, Nizozemska - Detekcija i identifikacija fitopatogenih bakterija *Ralstonia solanacearum* i *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
2003	Institute for Plant Protection and Soil Conservation, Pečuh, Mađarska i Gödölõ, Mađarska - Detekcija i identifikacija fitopatogenih bakterija i fitoplazmi vinove loze
2002	Nacionalni institut za biologiju, Ljubljana, Slovenija - Detekcija i identifikacija karantenskih fitopatogenih bakterija i fitoplazmi

Projekti i suradnje

Domaći znanstveni projekti:

GenoPhyto UIP-2014-09-9744 Komparativna i funkcionalna genomika fitoplazmi – emergentnih biljnih patogena u Hrvatskoj

Međunarodni znanstveni projekti:

COST Action FA0807 Integrated Managment of Phytoplasma Epidemics in Different Crop System (2009. – 2013.)

SEE-ERA.NET 10724 Global epidemiology of phytoplasma diseases of economic importance in Southeast Europe. (Network PHYTOPLASMA-EPIDEMIO)

Bilateralni hrvatsko-mađarski projekt "The role of wild plant species in the epidemiology of grapevine phytoplasmoses"

Izdvojene publikacije

Križanac I, Plavec J, Budinščak Ž, Ivić D, Škorić D, Šeruga Musić M (2017) Apple proliferation disease in Croatian orchards: a molecular characterization of '*Candidatus* Phytoplasma mali'. J Plant Pathol 99: 95 – 101

Plavec J, Križanac I, Budinšćak Ž, Škorić D, Šeruga Musić M (2015) A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. Eur J Plant Pathol 142: 591. doi:10.1007/s10658-015-0637-4

Danet JL, Balakishiyeva G, Cimerman A, Sauvion N, Marie-Jeanne V, Labonne G, Lavina A, Battle A, Križanac I, Škorić D, Ermacora P, Ulubas Serce Ç, Çaglayan K, Jarausch W, Foissac X (2011) Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and the existence of inter species recombination. Microbiology 157(2): 438 – 450

Šeruga Musić M, Škorić D, Haluška I, Križanac I, Plavec J, Mikec I (2011) First Report of Flavescence Dorée-Related Phytoplasma Affecting Grapevines in Croatia. Plant Dis 95: 353

Križanac I, Budinščak Ž, Šeruga Musić M, Škorić D (2010) Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. J Plant Dis Protect 117: 206 – 213

Križanac I, Vukadin A, Đermić E, Cvjetković B (2008) First Report of Fire Blight caused by *Erwinia amylovora* on *Cotoneaster dammeri* cv. Skogholm in Croatia. Plant Dis 92: 1468

Popis svih publikacija (28) dostupan je na: https://bib.irb.hr/lista-radova?autor=315592

Ostale publikacije (6) dostupne na: http://www.hcphs.hr/zzb/publikacije/

Članstva: Hrvatsko mikrobiološko društvo (HMD) i Hrvatsko društvo biljne zaštite (HDBZ)