MOLEKULARNA DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA VRSTE

„*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Jelena Menković, Aleksa Obradović

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd

E-pošta: jelena.menkovic@agrif.bg.ac.rs

Izvod

„*Candidatus Liberibacter solanacearum*”¹ je gram-negativna, fastidiozna bakterija koja naseljava i umnožava se u floemu biljaka domaćina. Proizrokovala je ekonomski značajnih oboljenja gajenih biljaka iz familije Solanaceae i Apiaceae, kao što su „zebrasti čips” krompira i hlorotično slabljenje štitonoša. Osim krompira, ovaj patogen može prouzrokovati značajne ekonomske gubitke u proizvodnji duvana, paprike i paradajza. Važnu ulogu u epidemiologiji ovog patogena igraju insekti vektori iz familije Trioizidae. Oni prenose bakterijske ćelije iz zaraženih u zdrave biljke hraneći se sokom iz sudova floema. Pretpostavlja se da se na veće udaljenosti ova bakterija prenosi zaraženim semenom. Do sada je na osnovu analize jednonukleotidnog polimorfizma (single nucleotide polymorphism - SNP) opisano devet haplotipova (A, B, C, D, E, F, G, H, U) iz različitih geografskih regiona, biljaka domaćina i insekata vektora. Obzirom na nemogućnost izolacije ove bakterije na hranljivu podlogu, metode detekcije i identifikacije se oslanjaju na primenu molekularnih metoda (konvencionalni PCR, real-time PCR, multipleks PCR, nested PCR i LAMP PCR). Uzimajući u obzir sve učestalije širenje bakterije „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” u Evropi, kao i skorašnju detekciju na teritoriji Srbije, cilj ovog rada je da se ukaže na značaj patogena i predstave metode detekcije i identifikacije ove bakterije.

Ključne reči: Solanaceae, Apiaceae, „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, molekularna detekcija, konvencionalni PCR, multipleks PCR, real-time PCR, nested PCR, LAMP PCR

¹ Naziv vrste „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” se piše između znakova navođenja zbog privremenog taksonomskog statusa, usled nemogućnosti gajenja na hranljivim podlogama. Na osnovu analize 16S rRNK genske sekvence, ova bakterija je priključena rodu *Liberibacter* (International Code of Nomenclature of Prokaryotes, 2019).

UVOD

Sredinom 90-tih godina prošlog veka u Meksiku se pojavilo do tada nepoznato oboljenje krompira (*Solanum tuberosum*). Simptomi su se ispoljavali na nadzemnim organima u vidu žutila, hloroze, povijanja listova i zaostajanja u porastu, dok je na podzemnim organima dolazilo do izumiranja stolona, uvećanja lenticela kao i formiranja sitnijih krtola nepravilnog oblika i hrapave pokožice (Crosslin i sar., 2010; Obradović i sar., 2014). Karakterističan simptom uočavao se na poprečnom preseku zaraženih krtola u vidu radialno raspoređenih mrkih pruga i šara u zoni sprovodnih sudova. Nakon termičke obrade, usled promenjenog hemijskog sastava krtola, infestirane zone bi postajale još uočljivije, a ovakav krompir zbog lošeg ukusa bio je nepogodan za ishranu. Zbog sličnosti simptoma sa šarama zebre, bolest je dobila naziv „zebrasti čips” krompira (Obradović i sar., 2016). U godinama koje su sledile, pojava navedenih simptoma uočavala se i na drugim biljkama iz familije Solanaceae (*Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Solanum melongena*, *Nicotiana tabacum*, i nekim korovskim vrstama) u različitim proizvodnim regionima (Severna Amerika, Novi Zeland). Međutim, prouzrokovatelj bolesti je ostao nepoznat do 2008. godine. Zbog sličnosti sa simptomima fitoplazmozni i viroznih oboljenja, ispitivanja su težila detekciji ovih vrsta patogena. Deceniju kasnije posmatranjem zaraženog lisnog tkiva paradajza pod transmisijom elektronskim mikroskopom došlo je do otkrića bakterija prisutnih u floemu (Crosslin i sar., 2010).

Nemogućnost izolacije i gajenja na hranljivim podlogama otežavala je detekciju ovog patogena. Međutim, molekularnom analizom je otkrivena nova vrsta bakterije - „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (u daljem tekstu CaLsol). Ova gram-negativna bakterija naseljava floemsko tkivo biljaka i dovodi do narušavanja njegove funkcije, usled čega dolazi do pojave simptoma na zaraženim domaćinima.

Značajnu ulogu u epidemiologiji ove bakterije igraju lisne buve iz familije Trioziidae. Vektor CaLsol na biljkama iz familije Solanaceae je krompirova lisna buva *Bactericera cockerelli*. Seme ima značajnu ulogu u širenju ove bakterije u nova područja. Skoriji podaci do kojih su došli Monger i Jeffries (2018), otkrivaju prisustvo CaLsol u semenu biljaka iz familije Apiaceae iz sedamdesetih godina prošlog veka, poreklom iz zemalja gde nije bilo zabeleženo prisustvo ove bakterije. Međutim, utvrđeno je da se iz zaraženog semena ne razvija uvek i zaražena biljka (Loiseau i sar., 2017).

U Finskoj je 2010. godine detektovano prisustvo CaLsol u biljkama mrkve (*Daucus carota*) sa simptomima holorotičnog slabljenja. To je bio prvi nalaz CaLsol kako u Evropi tako i u biljkama izvan familije pomoćnica. U narednim godinama usledilo je širenje ove bakterije po zemljama Severne Evrope i Mediterana, kao i širenje kruga domaćina u okviru familije Apiaceae (*Apium graveolens*, *Petroselinum crispum*). Kao vektori ove bakterije među biljkama familije Apiaceae utvrđene su *Trioza apicalis* i *Bactericera trigonica*. Od skoro se i biljke familije Urticaceae ubrajaju među domaćine ove bakterije, a *Trioza urticae* se pominje kao njen preno-

silac (Haapalainen i sar., 2018). Neke biljke spontane flore familije Polygonaceae su najskorije potvrđeni domaćini CaLSol (Haapalainen i sar., 2019).

Ono što čini ovu vrstu dodatno interesantnom za proučavanje jeste postojanje haplotipova koji su izolovani iz različitih geografskih područja, biljaka domaćina i vektora. Haplotipovi se determinišu na osnovu jednonukleotidnog polimorfizma (single nucleotide polymorphism - SNP) u okviru nekoliko gena na hromozomu (16S rRNK geni, međugenski region između 16S i 23S rRNK gena, rplJ i rplL geni za ribozomalni protein) (Nelson i sar., 2011; Alfaro-Fernández i sar., 2017). Do skoro je bilo poznato šest haplotipova (A, B, C, D, E, U), a najnoviji podaci govore o otkriću još tri haplotipa, haplotipova F, G i H. Haplotipovi A i B su patogeni biljaka familije Solanaceae, dok su haplotipovi C, D i E patogeni biljaka familije Apiaceae (Wang i sar., 2017). Haplotip F je takođe ispoljio patogenost prema biljkama iz familije Solanaceae u Sjedinjenim Američkim Državama (Swisher Grimm i Garczynski, 2019). U Kaliforniji je otkriven haplotip G u vrsti familije Solanaceae iz spontane flore, *Solanum umbelliferum* (Mauck i sar., 2019). Otkriće haplotipa U, izolovanog iz biljaka familije Urticaceae (*Urtica dioica*) i vektora *Trioza urticae* (Haapalainen i sar., 2018), pokazuje da krug domaćina ove bakterije još uvek nije definisan. Najnoviji podaci navode otkriće novog haplotipa, haplotipa H u biljkama gajene mrkve i paškanata u Finskoj. Isti haplotip je otkriven i u vrstama spontane flore familije Polygonaceae, *Fallopia convolvulus* i *Persicaria lapathifolia* (Haapalainen, i sar., 2019).

Na godišnjem nivou gubici u proizvodnji krompira i paradajza prouzrokovani bakterijom CaLSol izražavaju se u milionima dolara, pa je brza i precizna detekcija važan korak u preduzimanju odgovarajućih fitosanitarnih i agrotehičkih mera zaštite od ovog patogena. Mogućnost detekcije ove bakterije svodi se na primenu molekularnih metoda. Razvijeno je više protokola za lančano umnožavanje specifičnog fragmenta DNK (polymerase chain reaction - PCR) pomoću kojih se brzo i lako utvrđuje prisustvo ove bakterije u zaraženom biljnom materijalu. Od PCR metoda u primeni su konvencionalni PCR, real-time PCR, nested PCR, multipleks PCR i LAMP PCR (Mirmajlessi i sar., 2019).

Molekularna detekcija vrste „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Uzimajući u obzir fastidizonu prirodu bakterije „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, detekcija je zasnovana na primeni postupka lančane reakcije polimeraze (PCR). Dizajnirani su prajmeri specifični za CaLSol i razvijeno nekoliko PCR metoda kao što su konvencionalni PCR, real-time PCR, nested-PCR, multipleks PCR i LAMP PCR. Zbog svoje visoke osetljivosti najčešće je u primeni real-time PCR (Li i sar., 2009).

Konvencionalni PCR. U detekciji bakterije „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” često je u primeni konvencionalni PCR. Lančana reakcija polimeraze se

odvija u termosajkleru koji kontroliše zadatu temperaturu i dužinu trajanja pojedinih ciklusa amplifikacije. U reakcionoj smeši, pored DNK ekstrahovane iz uzorka biljnog materijala, moraju biti prisutni i prajmeri (uzvodni prajmer koji se vezuje za 3' kraj, i nizvodni koji se vezuje za 5' kraj lanca dezoksiribonukleinske kiseline), nukleotidi, reakcioni pufer (najčešće sa dodatkom $MgCl_2$) koji obezbeđuje odgovarajuću pH vrednost sredine za delovanje DNK polimeraze i enzim DNK polimeraza. Prajmeri definišu koji deo molekula DNK će se umnožiti. Vezivanjem prajmera za komplementarne krajeve DNK lanca aktivira se enzim DNK polimeraza. DNK polimeraza je termostabilan enzim koji fosfodiesteraskim vezama ugrađuje komplementarne nukleotide u novi lanac DNK od 3'-kraja prajmera. Postoji nekoliko vrsta DNK polimeraza. Najčešće korišćeni enzim je *Taq* DNK polimeraza izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*.

PCR reakcija se odvija kroz više ciklusa koji se sastoje od nekoliko faza. U prvoj fazi dolazi do inicijalne denaturacije u kojoj se pri temperaturama 94-95°C raskidaju vodonične veze i razdvajaju DNK lanci. Sledi faza hibridizacije ili vezivanja prajmera za specifična mesta na lancu DNK. Do vezivanja prajmera će doći ukoliko je u izolovanoj DNK prisutan segment za koji su prajmeri specifični. Ovaj korak se odvija pri temperaturama 50-60°C. U fazi elongacije, aktivnošću *Taq* polimeraze, sintetiše se novi lanac DNK ugrađivanjem komplementarnih nukleotida prema rasporedu na matričnoj DNK. Elongacija se odvija pri temperaturi 72°C koja je optimalna za funkcionisanje *Taq* polimeraze. U svakom ciklusu se broj amplifikovanih delova DNK udvostručuje. Broj ciklusa između 30 i 40 se smatra najoptimalnijim. Nakon 40. ciklusa dolazi do potrošnje komponenti za sintezu i gubi se efikasnost reakcije.

Nakon umnožavanja u termosajkleru, PCR proizvodi se prenose na agarozni gel radi detekcije umnoženog proizvoda pomoću elektroforeze. Elektorforezom se umnoženi fragmenti DNK razdvajaju i može se utvrditi njihova veličina. Agarozni gel sa unetim PCR proizvodima se postavlja u posudu za elektroforezu ispunjenu puferom (TAE pufer). Pufer obezbeđuje kretanje DNK između dva pola naelektrisanja, kao i zaštitu DNK od hidrolize i enzima DNaza. Uključenjem na izvor napajanja električnom energijom, PCR proizvodi se kreću u smeru negativnog ka pozitivnom naelektrisanju. Ovakvo kretanje je posledica negativno naelektrisane DNK usled prisustva fosfatnih grupa koje ulaze u njenu građu. Delovi DNK, sa većim brojem baznih parova, kreću se sporije i prelaze manju putanju kroz perforacije u gelu, dok se manji DNK fragmenti kreću brže i prelaze dužu putanju nošeni naelektrisanjem. Nakon elektroforeze, agarozni gel se potopi u rastvor etidijum-bromida (EtBr). EtBr je interkalirajući agens koji se vezuje za molekul DNK. Nakon inkubacije u EtBr, agarozni gel se prenosi na transiluminator – izvor UV svetla, pod čijim talasima umnoženi proizvodi PCR reakcije - fragmenti DNK postaju vidljivi. Veličina umnožene DNK sekvence se određuje poređenjem sa fragmentima definisanih veličina sadržanih u DNK standardu (markeru).

Različiti setovi prajmera ispoljavaju različit nivo osetljivosti u zavisnosti od protokola i hemijskih komponenti koje ulaze u sastav reakcione smeše (Mirmajlesi i sar., 2019). Prajmeri mogu biti dizajnirani na osnovu 16S rRNK gena, na osnovu intergenskog segmenta između 16S rRNK i 23S rRNK gena CaLsol, ili na osnovu gena za ribozomalni protein što takođe utiče na njihovu specifičnost detekcije.

Zvanični protokoli nude više alternativa u pogledu detektovanja CaLsol. Različite kombinacije prajmera uspešno umnožavaju DNK CaLsol izolovane iz biljnog materijala, a takođe se mogu primenjivati u identifikaciji haplotipova ove bakterijske vrste. LsoF/OI2s prajmeri su proizvedeni na nivou 16S rRNK gena. Uzvodni prajmer LsoF, dizajniran za potrebe real-time PCR metode (Li i sar., 2009), vezuje se za DNK region specifičan za vrstu CaLsol dok nizvodni prajmer OI2c (Jagoueix i sar., 1996) predstavlja univerzalni prajmer za detekciju *Liberibacter* vrsta. Pomoću ovih prajmera umnožava se amplikon veličine 1163 baznih parova (EPPO PM 7/143 (1), Appendix 7).

Ravindran i saradnici su 2011. godine dizajnirali prajmere na osnovu specifičnih regiona u okviru intergenskog segmenta 16S – 23S rRNK. Prajmeri Lso TX 16/23 F i Lso TX 16/23 R ispoljili su veću osetljivost od LsoF/OI2 para prajmera. Isti autori su pokazali da je ispoljen nivo detekcije ovim prajmerima bio četiri puta niži (0,65 ng DNK CaLsol) od limita detekcije LsoF/OI2 prajmerima (2,5 ng DNK CaLsol). Veličina amplikona koji se umnožava ovim prajmerima je 383bp. Kada je reč o specifičnosti ovih prajmera u razlikovanju CaLsol od drugih *Liberibacter* vrsta, za proučavanje je korišćena DNK *Ca. L. asiaticus* izolovana iz citrusa. Prilikom PCR umnožavanja došlo je do nespecifične amplifikacije čija veličina fragmenta umnožene DNK nije iznosila 383bp što je veličina koja upućuje na CaLsol (Ravindran i sar, 2011).

U primeni je takođe i protokol za CL514F/CL514R prajmere sintetisane na osnovu 50S rRNK gena za ribozomalni protein. Amplikon dobijen umnožavanjem ovim prajmerima je veličine 669bp (Munyanza i sar., 2009).

Fujiwara i Fujikawa su 2016. godine dizajnirali još šest parova prajmera. Ovi prajmeri određuju umnožavanje specifičnih sekvenci u okviru 3'- terminalnog dela 16S rRNK gena. Veličina umnoženih sekvenci ovim prajmerima je 145 bp (LsoLSS-F/LsoOI2-R), 187 bp (LsoLSS-F/Lso-1274R), 137 bp (Lso-972F/LsoLSS), 178 bp (Lso-931F/ LsoLSS), 302 bp (Lso-807F/LsoLSS), i 323 bp (Lso-786F/LsoLSS). Od ovih parova prajmera, četiri se mogu primenjivati i u konvencionalnoj i u real-time PCR metodi (Lso-972F/LsoLSS, Lso-931F/LsoLSS, Lso-807F/LsoLSS i Lso-786F/ LsoLSS). Set prajmera Lso-931F/LsoLSS ispoljio je najveću specifičnost i pouzdanost u odnosu na ostale prajmere i u konvencionalnoj i u real-time metodi (Fujiwara i Fujikawa, 2016).

Nedostatak konvencionalne PCR metode je manja osetljivost u odnosu na real-time PCR. Osetljivost konvencionalnog PCR-a se može modifikovati upotre-

bom high-fidelity² enzima polimeraze koji povećava specifičnost umnožavanja cilj-
ne genske sekvence u prisustvu velike količine neciljane DNK ili inhibitora PCR
reakcije. Niska stopa greške DNK polimeraze obezbeđuje visoku stopu tačnosti
replikacije ciljane DNK bakterije, čime se osetljivost metode povećava, a time i
mogućnost detekcije CaLsol (Mirmajlessi i sar., 2019).

Multipleks PCR. Multipleks PCR umnožava nekoliko različitih DNK sekvenci
istovremeno korišćenjem više parova prajmera u jednoj reakcionoj smeši. Ovim se
povećava specifičnost PCR reakcije, a takođe se može detektovati i više bakterija
istovremeno.

Jedan od neophodnih uslova da bi ova metoda funkcionisala je da se različiti
prajmeri mogu vezivati za ciljne sekvence DNK pri istoj temperaturi hibridizacije.
Za očitavanje rezultata amplifikacije može biti dovoljan agarozni gel nakon elek-
troforeze, na kome se mogu uočiti PCR proizvodi različite veličine.

U multipleks PCR detekciji pored prajmera koji detektuju prisustvo bakterijske
DNK, učestvuju i prajmeri interne kontrole biljke domaćina, čime se dobija uvid u
kvalitet izolacije DNK. U multipleks PCR reakciji primenjuju se prajmeri u kom-
binacijama Btub1F/R i ZCf/OI2c ili Btub2F/R i OA2/OI2c. Uslovi umnožavanja u
ovim PCR reakcijama oponašaju uslove PCR reakcija gde se primenjuju ili ZCf/
OI2c ili OA2/OI2c prajmeri. Btub1F/R i Btub2F/R prajmeri detektuju gen za bio-
sintezu β -tubulina kod biljaka. U multipleks PCR reakciji se koriste radi provere
kvaliteta izolacije DNK iz biljnog materijala, a takođe je smanjena učestalost lažno
negativnih rezultata. Nivo detekcije iznosio je 32,9% prajmerima Btub1F/R i ZCf/
OI2c i 22,2% sa Btub2F/R i OA2/OI2c prajmerima, u uzorcima zaraženih krtola
krompira (Wen i sar. 2009).

U multipleks real-time PCR metodi primenjuju se LsoF/HLBr prajmeri specifič-
ni za CaLsol, TaqMan HLBp hidrolizujuća proba, kao i COX-F, COX-R prajmeri
za detektovanje biljnog genoma i COX-P hidrolizujuća proba. TaqMan real-time
multipleks PCR je ispoljio deset do sto puta veću osetljivost od konvencionalne
multipleks PCR metode. Kada je specifičnost detekcije u pitanju, obe metode ispo-
ljile su isti nivo specifičnosti.

Real-time PCR. Real-time PCR metoda se zasniva na detekciji fluorescencije
signalnih molekula čiji se intenzitet uvećava tokom reakcije ukoliko je prisutna
ciljna DNK. Real-time PCR protokoli mogu biti korišćeni za utvrđivanje prisustva
patogena ili za kvantifikaciju količine DNK u uzorku (kvantitativni ili qPCR).

Vodeće studije pokazuju da je 16S rRNA genski region najkorišćeniji za dizajni-
ranje prajmera i proba za real-time PCR detekciju CaLsol iz biljnog tkiva pre i na-
kon nastanka simptoma. Ova metoda takođe zahteva upotrebu hidrolizujućih proba
kako bi došlo do fluorescencije ukoliko u uzorku postoji ciljna DNK. Primenjuju

2 High fidelity polimeraza enzimi – enzimi koji se primenjuju u PCR metodama sa ciljem dobijanja
veoma preciznih amplikona kojiće se potom podvrgnuti nekoj od genetskih analiza (SNP, NGS
analiza).

se real-time PCR protokoli koji se baziraju na SYBR Green interkalirajućoj boji ili TaqMan hidrolizujućim probama.

Real-time PCR metoda koja koristi SYBR Green interkalirajuću boju može detektovati CaLsol u veoma niskoj koncentraciji u mladim listovima biljaka krompira bez simptoma. U ovakvim biljkama moguće je detektovati bakterije primenom konvencionalnog PCR-a tek tri nedelje nakon infekcije (Levy i sar., 2011). SYBR Green real-time PCR metoda se pokazala do 50 puta osetljivijom u odnosu na konvencionalni PCR (Beard, 2013). SYBR Green se ugrađuje između nukleotida dvostrukog lanca emitujući fluorescenciju. Kada nema vezivanja, odnosno kada nema amplifikacije specifičnim prajmerima, tada nema ni fluorescencije. Ovaj efekat je iskorišćen za praćenje broja nastalih PCR proizvoda odnosno broja novosintetisanih sekvenci.

Real-time PCR na bazi TaqMan probe je u široj upotrebi. Proba se sastoji od jedinjenja koja emituju svetlosnu energiju prilikom vezivanja sa ciljnom DNK, kao i od jedinjenja koja blokiraju fluorescenciju. Tokom reakcije se meri porast energije fluorescencije. U semenu mrkve je kvantifikovana niska vrednost bakterijskih ćelija ($1,4 \times 10^4$ ćelija/gram semena) korišćenjem TaqMan real-time PCR metode (Bertolini i sar., 2015). Poređenjem SYBR Green real-time PCR metode sa TaqMan real-time PCR metodom, dobijaju se slični rezultati u detekciji CaLsol (Beard, 2013).

Pozitivna reakcija se može pratiti na računaru preko specijalizovanog programa i ima oblik sigmoidne krive. Tačka na sigmoidnoj krivi gde se intenzitet fluorescencije naglo povećava naziva se „granični ciklus” (the threshold cycle, Ct value). U početku, količina PCR proizvoda eksponencijalno raste, međutim u poslednjim ciklusima usled iscrpljivanja komponenti PCR-a (DNK, prajmeri, nukleotidi), izostaje umnožavanje novih proizvoda te nastupa takozvana „plato” faza. Nakon PCR reakcije moguće je dobiti podatke o specifičnosti reakcije i mogućoj pojavi prajmer-dimera. Prajmer-dimeri nastaju kada je količina DNK vrlo mala, prajmeri su tada u višku i zbog nespecifičnosti vezuju se jedni za druge stvarajući nespecifičan PCR proizvod. Postupak pomoću kojih se dobijaju podaci o specifičnosti reakcije se naziva „kriva topljenja” (melting curve). Da bi se PCR proizvodi mogli kvantifikovati, neophodno je imati DNK standard (plazmidna DNK ili drugi oblik DNK), čija je apsolutna koncentracija poznata.

U multipleks real-time PCR metodi, pored specifičnih prajmera za CaLsol, koristi se i set prajmera dizajniran na osnovu gena za citohrom oksidazu biljke (COX), koji služi kao pozitivna interna kontrola za biljke domaćine, čime se ujedno kontroliše kvalitet ekstrakcije DNK i meri količina bakterijske DNK u uzorku.

Real-time PCR metoda je brza, specifična i pouzdana, kojom se detektuje minimum 20 kopija CaLsol 16S rRNK gena po reakciji za uzorke sakupljene u polju. Ovako visok nivo detekcije pokazuje da je real-time PCR 10 do 100 puta osetljiviji od konvencionalnog PCR-a sa LsoF/OI2c parom prajmera (Li i sar., 2007).

Nested PCR. U slučajevima kada se raspolaže malom inicijalnom količinom DNK, efikasnost umnožavanja može biti niska, a proverom na agaroznom gelu se

ne mogu uočiti PCR proizvodi. Nested-PCR je metoda kojom se umnožava prvobitno mala količina DNK u uzorku.

Nested-PCR se izvodi u dve faze i uključuje interne i eksterne prajmere dizajnirane da ciljaju 16S rRNK genski region. Prva faza započinje sa eksternim parom prajmera i malom količinom ciljane DNK. U drugoj fazi, PCR proizvodi prve faze koriste se kao model za sintezu novih PCR proizvoda pomoću internog para prajmera. U odnosu na prajmere iz prve faze, novi par prajmera se vezuje unutar PCR proizvoda prve faze, zbog čega ova metoda i nosi naziv „nested“, što bi značilo „ugnježdjeni“ ili „umetnuti“. Nested-PCR je metoda koja se može primeniti za povećanje osetljivosti detekcije i redukciju uticaja PCR inhibitora. Ovom metodom se može detektovati CaLsol i kada je titar bakterija u biljkama nizak (Pitman i sar., 2011).

U prvoj fazi nested PCR metode koriste se prajmeri OA2/OI2c koji određuju umnožavanje DNK fragmenta veličine 1160bp. U drugoj fazi umnožavanje se vrši pomoću Lib16S01F/Lib16S01R para prajmera kojim se amplifikuje DNK fragment veličine 580bp u okviru proizvoda iz prve faze (Liefiting i sar., 2009b). Prajmeri korišćeni u prvoj fazi su univerzalni prajmeri za detekciju *Liberibacter* vrsta, dok su prajmeri druge faze specifični za CaLsol. Nested-PCR obezbeđuje veću osetljivost u odnosu na konvencionalni PCR (20-50 puta), ali se time povećava rizik od dobijanja lažno pozitivnih rezultata usled kontaminacije reakcione smeše (Mirmajlessi i sar., 2019).

LAMP PCR (Loop-mediated isothermal amplification). LAMP PCR metoda, ili metoda izotermalne amplifikacije nukleinskih kiselina, se opisuje kao brza i jeftina metoda za pouzdanu detekciju CaLsol u zaraženom biljnom materijalu. Amplifikacija se može izvršiti za kraće vreme od jednog časa. Specifični prajmeri ciljaju nekoliko housekeeping gena istovremeno (*rpoB*, *rpoD*, *gyrB*, *akd*, *recA*, *dnaG*, *fumC*, *pyrE*, *kdo*, *ftsA*, *gnd*, *mdh*, *sucC*), kao i gene duž intergenske sekvence između 16S rRNK i 23S rRNK gena, i 16S rRNK gena. Housekeeping geni su konstitutivni geni, odgovorni za održavanje osnovnih ćelijskih funkcija neophodnih za opstanak ćelije. Ovi geni su visoko stabilni jer se nisu značajno menjali tokom evolucije.

Šest posebno dizajniranih prajmera ciljaju osam različitih genskih sekvenci u istoj reakcionoj smeši. Za razliku od drugih PCR metoda gde se amplifikacija odvija pri seriji različitih temperatura, za izvođenje LAMP PCR metode neophodna je konstantna temperatura. Stoga LAMP PCR ne zahteva upotrebu termosajklera i može se koristiti termo blok ili vođeno kupatilo. Proizvodi umnožavanja mogu se posmatrati nakon elektroforeze u gelu ili se njihova količina može meriti pomoću turbidimetra.

Ovom metodom, ciljne sekvence se umnožavaju pri konstantnoj temperaturi, koja iznosi oko 60°C, pomoću tri seta prajmera i polimeraze. Uglavnom se koriste tri para prajmera koji ciljaju osam različitih regiona na genu, što dodatno doprinosi specifičnosti. Zbog specifične prirode delovanja ovih prajmera, LAMP PCR metodom se može umnožiti značajno veća količina DNK u odnosu na konvencionalnu metodu. Detekcija proizvoda umnožavanja može se vršiti fotometrijom u turbidimetru, zahvaljujući taloženju magnezijum-pirofosfata koji nastaje kao nusproizvod umnožavanja. Reakcija se takođe može pratiti u realnom vremenu, merenjem fluo-

rescencije pomoću interkalirajućih boja. SYBR Green se koristi kao interkalirajuća boja koja se vezuje za molekul DNK i fluorescira. Pomoću posebnog softvera se prati količina umnožene DNK, što znači da LAMP PCR može biti i kvantitativna metoda (Tomita i sar., 2008).

F3, B3, FIP, BIP, LF, LB su prajmeri dizajnirani za LAMP PCR metodu od strane Ravindran i sar., 2012. Poređenjem konvencionalne i LAMP PCR metode utvrđeno je da LAMP PCR može biti 100 puta osetljivija od konvencionalne PCR metode. Prajmerima LsoTX16/23 F/R prajmerima se detektuje od 100 do 1ng DNK. LAMP PCR metodom se detektuje od 100 do 0,01ng DNK bakterije (Ravindran i sar., 2012).

IDENTIFIKACIJA „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Da bi se vrsta identifikovala kao „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” neophodno je da se za početak, prilikom analize uzorka nekom od PCR metoda, dobije potvrda prisustva patogena. Nakon toga, neophodno je umnožiti željeni fragment PCR metodom i izvršiti sekvenciranje genoma. Da bi se za umnoženu gensku sekvencu moglo tvrditi da pripada vrsti CaLsol, njena sličnost sa sekvencom referentnog soja iz genske baze (GenBank accession number EU834130) mora biti $\geq 99\%$ (DP 21, 2017).

CaLsol karakteriše postojanje više haplotipova. Do skoro je pomoću analize genskih regiona: 16S rRNK, 16S/23S rRNK ISR i 50s *rplJ* i *rplL*, bilo opisano pet haplotipova (A, B, C, D, E) (Alfaro-Fernández i sar., 2017). Međutim, najnovija istraživanja ukazuju na postojanje još četiri nova haplotipa (F, G, H i U).

Genetske razlike između haplotipova utvrđene su na nivou jednog nukleotida (SNP³). Haplotipovi se međusobno razlikuju po geografskom poreklu, a takođe su izolovani iz različitih biljaka i insekata domaćina (Obradović i sar., 2016). Haplotipovi A i B su paraziti biljaka familije Solanaceae, a prenosi ih lisna buva krompira i paradajza *Bactericera cockerelli* (Šulc). Oba haplotipa su prisutna na području Meksika i Severne Amerike, dok je haplotip A detektovan u Centralnoj Americi i na Novom Zelandu (Nelson i sar., 2011). Nedavno je u Severnoj Americi otkriven haplotip F koji prouzrokuje bolest „zebrastog čipsa” krompira. Analizom genskih sekvenci nije utvrđeno poklapanje sa bilo kojim poznatim CaLsol haplotipom (Swisher Grimm i Garczynski, 2019). Najnoviji rezultati pokazuju da je u Kaliforniji detektovan haplotip G u vrsti familije Solanaceae iz spontane flore *Solanum umbelliferum* (Mauck i sar., 2019).

3 SNP (single nucleotide polymorphism) jednonukleotidni polimorfizam podrazumeva zamenu mesta jednog nukleotida nekim drugim nukleotidom (Barreiro i sar., 2008).

	Real-time PCR, Teresani <i>et al.</i> (2014) (Appendix 4)	Real-time PCR adapted from Li <i>et al.</i> (2009) (see Appendix 5)	PCR, Li <i>et al.</i> (2009) and Jagoueix <i>et al.</i> (1996) (Appendix 6)	PCR, Ravindran <i>et al.</i> (2011) (Appendix 7)	PCR, Munyaneza <i>et al.</i> (2009) (Appendix 8)
Accuracy	97.3%	96.3%	93.7%	96.0%	97.3%
Diagnostic sensitivity	96.2%	100.0%	89.2%	93.4%	94.7%
Diagnostic specificity	98.5%	92.6%	98.0%	98.5%	100.0%
Analytical sensitivity*					
7.9×10^4	95%	100%	60%	88%	74%
1.7×10^4	93%	98%	45%	80%	56%
8.2×10^3	90%	100%	33%	78%	35%
1.6×10^3	17%	98%	8%	40%	6%
2.1×10^2	7%	50%	3%	8%	3%
Average repeatability	96.8%	97.5%	95.2%	97.1%	96.2%
Reproducibility	88.3%	94.3%	78.7%	84.2%	83.8%

Tabela 1. Karakteristike PCR testova (EPPO PM 7/143 (1)
„*Candidatus* Liberibacter solanacearum”)

Ostala četiri haplotipa vezana su za Evropski kontinent i sever Afrike. Haplotip C je detektovan u državama Severne Evrope (Finska, Norveška, Nemačka, Švedska). Ovaj haplotip je poreklom iz mrkve (*Daucus carota*), kao i iz vektora, mrkvine lisne buve *Trioza apicalis* (Munyanza i sar., 2010). Prisustvo D i E haplotipova zabeleženo je u Južnoj Evropi (Francuska i Španija) i u Maroku. CaLsol D haplotip poreklom je iz celera i mrkve kao i iz vektora, mrkvine lisne buve *Bactericera trigonica* (Hodkinson) (Alfaro-Fernández i sar., 2017). Haplotip E je otkriven u semenu mrkve (Bertolini i sar., 2015; Obradović i sar., 2016). Najnoviji haplotipovi na Evropskom kontinentu izolovani su iz biljaka koprive (*Urtica dioica*) i iz vektora ove bakterije na koprivi (*Trioza utricae*) (Haapalainen i sar., 2018). Haapalainen i sar., 2019. godine publikuju rezultate o postojanju haplotipa H u biljkama gajene mrkve i paškanata u Finskoj kao i u vrstama spontane flore familije Polygonaceae, *Fallopia convolvulus* i *Persicaria lapathifolia*.

Identifikacija na nivou 16S rRNK gena. Najčešće korišćeni genetički marker u taksonomiji i filogenetskoj analizi bakterija je 16S rRNK gen, a njegova funkcija se tokom vremena nije mnogo menjala (Janda i Abbott, 2007). Region 16S rRNK gena veličine 1163 bazna para umnožen je korišćenjem istog prajmera koji se primenjuje u real-time PCR metodi, a koji je specifičan za CaLsol vrstu. U kombinaciji sa ovim prajmerom koristi se univerzalni prajmer za detekciju *Liberibacter* vrsta. Uzvodni prajmer specifičan za vrstu je dizajniran na osnovu jedinstvenih genskih regiona 16S rRNK sekvence za CaLsol (Li i sar., 2009).

LsoF: 5'-GTC GAG CGC TTA TTT TTA ATA GGA-3' (Li i sar., 2009)

Optimizacija prajmera je išla u smeru kompatibilnosti sa *Liberibacter*-univerzalnom TaqMan probom (HLBp – Huanglongbing probe) kao i sa reverznim prajmerom OI12c koji se primenjuje u konvencionalnoj PCR metodi.

OI2c: 5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3' (Jagoueix i sar., 1996)

Identifikacija na nivou 16S/23S rRNK IGS regiona. U odnosu na 16S rRNK sekvencu koja je konzervativnija, intergenski region između 16S rRNK i 23S rRNK regiona pokazuje veću varijabilnost i može se koristiti za determinisanje filogenetskih veza između bliskih vrsta. Na osnovu ove sekvence dizajnirani su Lso TX 16/23 prajmeri. Pomoću prajmera za konvencionalnu PCR metodu detekcije CaLsol, Lso TX 16/23F i Lso TX 16/23R, amplifikuje se 16S/23S rRNK IGS (intergenic spacer) region (Ravindran i sar., 2011). Prajmeri se zasnivaju na poznatim međugenskim sekvencama između 16S rRNK i 23S rRNK gena na bakterijskom hromozomu (Hoffmann i sar., 2010). Ovaj genski region sadrži pet mesta na kojima je došlo do izmene jednog nukleotida drugim i na osnovu kojih se haplotipovi međusobno razlikuju.

Lso TX 16/23F: 5'-AAT TTT AGC AAG TTC TAA GGG-3'

Lso TX 16/23R: 5'-GGT ACC TCC CAT ATC GC-3'

Identifikacija na nivou *rplJ-rplL* gena za ribozomalni protein. Pomoću CL514 prajmera vrši se umnožavanje 50S *rplJ* i *rplL* gena za ribozomalni protein (Munya-neza i sar., 2009).

CL514F: 5'-CTC TAA GAT TTC GGT TGG TT-3'

CL514R: 5'-TAT ATC TAT CGT TGC ACC AG-3'

Visoko konzervativni housekeeping geni „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” kao što su: *adk*, *grpE*, *kdo*, *fumC*, *gdh* su korišćeni kao filogenetski marker i upotrebljavaju se za razlikovanje „*Candidatus Liberibacter*” vrsta, dok je *rplL* gen, najvarijabilniji.

Analiza sekvenci CaLsol haplotipova. Umnožene genske sekvence nepoznatih haplotipova pomoću prajmera dizajniranih na bazi 16S rRNK gena, 16S/23S rRNK ISR i 50S *rplJ* i *rplL*, analiziraju se tako što se upoređuju sa referentnim genskim sekvencama poznatih haplotipova iz baze podataka. Haplotip se determiniše upoređivanjem genetskih razlika na nivou jednog nukleotida u sekvenci (Nelson i sar., 2013., Teresani i sar., 2014., Swisher Grimm i Garczynski, 2018., Haapalainen i sar., 2018a).

Identifikacija haplotipova se postiže sekvenciranjem navedenih genskih regiona. Da bi se vrsta na osnovu genskih sekvenci identifikovala kao CaLsol mora imati 99-100% sličnosti sa referentnom genskom sekvencom kada se upoređivanje vrši BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizom.

Region (gene/position of reference sequence EU812559, EU834131)	Haplotype						
	A	B	C	D	E	F	U
16S rRNA							
16S rRNA/115	A	A	A	A	G	A	A
16S rRNA/116	C	C	C	T	C	C	C
16S rRNA/151	A	A	A	A	G	G	A
16S rRNA/212	T	G	T	T	T	T	T
16S rRNA/359	A	A	A	A	A	C	A
16S rRNA/524	G	G	G	G	G	A	G
16S rRNA/581	T	C	T	T	T	C	T
16S rRNA/959	C	C	C	C	T	C	C
16S rRNA/1039	A	A	G	G	A	G	G
16S rRNA/1073	G	G	G	A	G	G	G
16S-23S IGS							
16S-23S rRNA IGS/1620	A	A	A	A	G	Unknown	Unknown
16S-23S rRNA IGS/1632	G	G	G	G	A	Unknown	G
16S-23S rRNA IGS/1648	G	G	G	G	A	Unknown	G
16S-23S rRNA IGS/1689	A	A	A	A	A	Unknown	G
16S-23S rRNA IGS/1742	A	A	A	G	A	Unknown	A
16S-23S rRNA IGS/1748	C	C	C	T	C	Unknown	C
16S-23S rRNA IGS/1858	A	G	G	A	A	Unknown	A
16S-23S rRNA IGS/1859delT	T	T	T	-	T	Unknown	T
16S-23S rRNA IGS/1867delT	T	T	-	T	T	Unknown	T
16S-23S rRNA IGS/1873	A	A	A	A	G	Unknown	A
16S-23S rRNA IGS/1920	T	T	C	T	T	Unknown	T
16S-23S rRNA IGS/1943	G	A	G	G	Unknown	Unknown	G
16S-23S rRNA IGS/2055	C	T	C	C	Unknown	Unknown	C
16S-23S rRNA IGS/2081	G	G	G	A	Unknown	Unknown	G
16S-23S rRNA IGS/2220	G	A	G	G	Unknown	Unknown	G
16S-23S rRNA IGS/2262	C	T	C	C	Unknown	Unknown	C
50S rplJ-rplL							
50S rplJ-rplL/558	T	T	T	T	T	G	T
50S rplJ-rplL/583	G	G	C	G	G	G	G
50S rplJ-rplL/622	A	A	A	G	A	A	A
50S rplJ-rplL/640	C	C	T	C	C	C	C
50S rplJ-rplL/669	G	C	G	G	G	G	G
50S rplJ-rplL/689	C	C	C	T	T	C	T
50S rplJ-rplL/691	G	T	T	G	G	T	G
50S rplJ-rplL/695	G	G	G	G	G	A	G
50S rplJ-rplL/697	A	A	A	A	A	G	A
50S rplJ-rplL/700	A	A	A	G	A	A	A
50S rplJ-rplL/712	G	T	G	G	G	T	G
50S rplJ-rplL/722	G	G	G	G	A	G	G
50S rplJ-rplL/749	C	C	C	A	C	C	C
50S rplJ-rplL/779_780delA	A	A	A	A	A	-	A
50S rplJ-rplL/780_781insA	-	-	A	A	A	-	A
50S rplJ-rplL/785	G	A	G	G	G	G	G
50S rplJ-rplL/7849	T	T	T	C	C	T	T
50S rplJ-rplL/909	T	C	C	C	C	C	C
50S rplJ-rplL/919_920ins(C/T)TTG	-	-	CTG	-	-	TTG	-
50S rplJ-rplL/938	C	C	C	C	C	C	T
50S rplJ-rplL/955	G	G	T	G	G	G	G
50S rplJ-rplL/961	G	G	G	G	G	G	T
50S rplJ-rplL/987	T	G	G	G	G	G	G
50S rplJ-rplL/993	A	A	G	A	A	A	A
50S rplJ-rplL/1005	T	T	T	T	T	C	T
50S rplJ-rplL/1041	G	A	A	G	G	A	A

Tabela 2 (1). Razlike na nivou jednog nukleotida (SNP) među haplotipovima „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” prema Nelson i sar., 2013., Teresani i sar., 2014., Swisher Grimm i Garczynski, 2018., Haapalainen i sar, 2018a (OEPP/EPPO, PM 7/143 (1)).

Region (gene/position of reference sequence EU812559, EU834131)	Haplotype									
	A	B	C	D	E	F				U
50S <i>rplJ-rplL</i> /1042	A	A	A	A	A	G				A
50S <i>rplJ-rplL</i> /1049	A	G	A	A	A	A				A
50S <i>rplJ-rplL</i> /1068	C	C	C	T	C	C				C
50S <i>rplJ-rplL</i> /1107	G	A	G	G	G	A				G
50S <i>rplJ-rplL</i> /1110	C	C	C	C	C	C				T
50S <i>rplJ-rplL</i> /1111_1112insC	-	-	C	-	-	-				-
50S <i>rplJ-rplL</i> /1122	G	A	A	A	A	A				A
50S <i>rplJ-rplL</i> /1137	A	A	A	A	A	G				A
50S <i>rplJ-rplL</i> /1143	G	A	G	G	G	A				G

Tabela 2 (2). Razlike na nivou jednog nukleotida (SNP) među haplotipovima „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” prema Nelson i sar., 2013., Teresani i sar., 2014., Swisher Grimm i Garczynski, 2018., Haapalainen i sar., 2018a (OEPP/EPPO, PM 7/143 (1)). (nastavak prethodne tabele)

„Single Sequence Repeat” (SSR) analiza. Ova analiza obuhvata kratke nekodirajuće sekvence DNK koje se često ponavljaju u genomu bakterije. Koristi se za detekciju i identifikaciju veoma bliskih sojeva CaLsol bakterije koji zaražavaju biljke iz familije Solanaceae. Biljke krompira, sa simptomima koje prouzrokuje CaLsol, analizirane su korišćenjem SSR markera i rezultati su pokazali prisustvo haplotipa A, ili haplotipa B, ili prisustvo oba haplotipa. SSR PCR se kao i konvencionalni PCR bazira na upotrebi prajmera 16S rRNK gena, a limit detekcije je 100 kopija DNK za haplotip A, i 10 kopija za haplotip B (Wen i sar., 2013). Međutim ovom metodom nije moguće identifikovati sve haplotipove.

Kombinacijom ove filogenetske analize korišćenjem 16S rRNK gena i 50S rplJ-rplL gena za ribozomalni protein sa analizom polimorfizma restrikcionih fragmenata (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) potvrđeno je prisustvo CaLsol haplotipa D u uzorcima mrkve.

„**Multi-locus sequence typing**“ (MLST) analiza. Ovim postupkom se analiziraju housekeeping geni (*adk*, *grpE*, *kdo*, *fumC*, *gdh*, *rplL*) i meri se genetička sličnost između CaLsol populacija. Umnožavanje DNK PCR metodom, prati sekvenciranje više housekeeping gena lokalizovanih u genomu bakterije. Ovom analizom se analiziraju aleli duž odabranih housekeeping gena, sekvenciranjem 500-600 bp tih gena. Dobijeni podaci prikazuju sličnost između sojeva. Korišćenjem MLST analize, identifikovan je novi haplotip U koji je bio bliskiji haplotipovima A i D nego haplotipu C (Haapalainen i sar., 2018). MLST analizom se može upoređivati genetička struktura populacije biljnih patogena.

Filogenetska analiza. Da bi se konstruisalo filogenetsko stablo, 4 vrste „*Candidatus Liberibacter*” i *Liberibacter crescens* su upoređivane međusobno sa još 12 bliskih Alphaproteobacteria (*Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Bartonella quintana*, *Bartonella bacilliformi*, *Bartonella henselae*, *Bartonella vinsonii*, *Mesorhizobium biumloti*, *Mesorhizobium opportunistum*, i dve *Phyllobacterium* vrste). Geni koji kodiraju sintezu proteina grupisani su u ortologe grupe. Ispitano je ukupno 96 pojedinačnih ortologih grupa poreklom od svih ispitivanih bakterijskih genoma. Svaka ortologa grupa, koja je bila povezana sa nepoznatom funkcijom ili mogućim horizontalnim genskim transferom, je odstranjena pre analize. Najzad je 88 ortologih grupa upoređivano korišćenjem Muscle v3.8.31, a potom su višestruka poravnanja objedinjena u supermatriksu (Wang i sar, 2017).

Grafik 1. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu 88 gena koji kodiraju protein iz 33 bakterijska genoma koji pripadaju rodovima: „*Candidatus Liberibacter*”, *Liberibacter*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Brucella*, *Bartonella*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium* i *Rhodospirillum* (Wang i sar, 2017).

Konstruisano je filogenetsko stablo (maximum-likelihood) roda „*Candidatus Liberibacter*” i ostalih vrsta. Analiza pokazuje da su *Liberibacter* vrste podeljene u dve grupe. *Liberibacter crescens*, koja nije patogena vrsta i može se gajiti na hranljivim podlogama, jedini je član prve grupe, dok su u drugoj grupi fitopatogene vrste „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, „*Candidatus Liberibacter africanus*”, „*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, „*Candidatus Liberibacter americanus*” i druge. Dužina grane ukazuje na evolucionu udaljenost kao i na broj supstituisanih baza.

ZAKLJUČAK

U Srbiji je od skoro potvrđeno prisustvo CaLsol u mrkvi (Trkulja i sar., 2020), dok je 2014. godine u našoj zemlji utvrđeno prisustvo *Bactericera trigonica* (Jeričić-Prodanović, 2014), vektora ove bakterije, na biljkama familije Apiaceae. Lisna buva vektor CaLsol na biljkama familije Solanaceae - *Bactericera cockereli*, još uvek se nalazi na A1 karantinskoj listi štetnih organizama. Prisustvo biljaka domaćina, kao i potencijalnog vektora, povećava zabrinutost za posledice koje bi mogle nastati usled prisustva ove bakterije na području naše zemlje. Do sada je poznato da gubici prouzrokovani ovim patogenom prevazilaze milione dolara na godišnjem nivou, a ogledaju se kroz smanjen prinos i kvalitet useva.

Otkrivanje novih haplotipova ove bakterije, izolovanih iz biljaka i vektora koji do sada nisu bili potvrđeni kao domaćini CaLsol, takođe govori o njenoj brznoj evoluciji. Konačan broj domaćina još uvek nije poznat. Širenjem kruga domaćina, ova bakterija obezbeđuje lakši opstanak u prirodi. Zbog svega navedenog, semenski i sadni materijal osetljivih biljaka bi trebalo kontrolisati na prisustvo ovog patogena prilikom uvoza.

Kao što je već navedeno, izolacija ove bakterije na hranljive podloge još uvek nije uspešno sprovedena. Zbog toga molekularne metode predstavljaju pogodan alat u dijagnostičkim laboratorijama za detekciju latentnog ili prisustva u maloj koncentraciji ove bakterije u biljnom materijalu. Pored više tipova PCR metoda koje su opisane, metoda koja je u najširoj upotrebi je real-time PCR, zbog svoje visoke osetljivosti u detekciji bakterija prisutnih čak i u maloj koncentraciji. Ova jednostavna i brza metoda omogućava nam da u realnom vremenu, pomoću odgovarajućeg softvera pratimo umnožavanje ciljne sekvence DNK kroz cikluse, a ujedno i kvantifikuje količinu umnoženih DNK fragmenata.

Da bi se bakterija identifikovala kao CaLsol neophodno je izvršiti sekvenciranje više delova genoma i utvrditi odgovarajuću sličnost sa referentnim genomom iz baze podataka. Potrebno je da procenat sličnosti između sekvenci koje se porede bude između 99-100%. MLST i SSR markeri su veoma važni u proceni genetičkog diverziteta CaLsol haplotipova u biljkama, kao i u upoznavanju sa epidemiologijom bolesti koje prouzrokuje ova bakterija.

Pravovremena detekcija i identifikacija ove bakterije može sprečiti nastanak velikih gubitaka u usevima biljaka iz familije Solanaceae i Apiaceae. Stoga, treba raditi na pronalaženju načina za njenu izolaciju, unapređenju metoda detekcije, kao i unapređenju laboratorijskih kapaciteta i ekspertize.

ZAHVALNICA

Rad je nastao kao rezultat istraživanja u okviru „Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada u 2021. godini između Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije”, evidencioni broj ugovora: 451-03-9/2021-14/ 200116.

LITERATURA

- Alfaro-Fernández, A., Hernández-Llopis, D., Font, M., I. (2017): Haplotypes of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” identified in Umbeliferous crops in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 149: 127-131.
- Beard, S., S., Pitman, A., R., Krabberger, S., Scott, I., A., W. (2013): SYBR Green real-time quantitative PCR for the specific detection and quantification of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in field samples from New Zeland. *European Journal of Plant Pathology*, 136: 203-215.
- Bertolini, E., Teresani, G., R., Loiseau, M., Tanaka, F., A., O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M., M., Cambra, M. (2015): Transmission of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in carrot seeds. *Plant Pathology*, 64: 276-285.
- Crosslin J., M., Munyaneza, J., E., Brown, J., K., Liefiting, L., W. (2010): Potato Zebra Chip disease: A Phytopathological Tale. *Plant Health progress*. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/rewiev/2010/zebra>
- Crosslin, J., M., Lin, H., Munyaneza, J., E. (2011): Detection of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in the Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) by Conventional and Real-Time PCR. *Southwestern entomologist*, 36(2), 125-135.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2013): „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”. *Bulletin OEPP/EPPO*, 43 (2), 197-201.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2020): „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”. *Bulletin OEPP/EPPO*, 50 (1), 49-68.
- Gilkes, J., M., Frampton, R., A., Smith, G., R., Dobson, R., C., J.: (2018): Potential pathogenicity determinants in the genome of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, the causal agent of zebra chip disease of potato. *Australian Plant Pathology*, 47: 119-134.
- Hajri, A., Cousseau-Suhard, P., Gentit, P., Loiseau, M. (2019): New Insights into the Genetic Diversity of Bacterial Plant Pathogen „*Candidatus Liberibacter*

- solanacearum” as Revealed by a New Multilocus Sequence Analysis Scheme. <http://dx.doi.org/10.1101/623405>
- Haapalainen, M., Wang, J., Latvala, S., Lehtonen, M., T., Pirhonen, M., Nissinen, A., I. (2018): Genetic Variation of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” Haplotype C and Identification of a Novel Haplotype from *Trioza urticae* and Stinging Nettle. *Phytopathology*, 108: 925-934.
- Haapalainen, M., Latvala, S., Wickström A., Wang, J., Pirhonen, M., Nissinen, A., I. (2019): A novel haplotype of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” found in Apiaceae and Polygonaceae family plants. *European Journal of Plant Pathology*, 156: 413-423.
- Ilardi, V., Lumia, V., Di Nivola, E., Tavazza, M. (2019): Identification, Intra- and Inter-laboratory validation of a diagnostic protocol for „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in carrot seeds. *European Journal of Plant Pathology*, 153: 879-890.
- Jagoueix, S., Bové, J., M., Garnier, M. (1996): PCR detection of the two „*Candidatus Liberibacter*” species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*, 10: 43-50.
- Jerinić-Prodanović, D. (2014): *Bactericera trigonica* (Hodkinson, 1981) (Hemiptera, Triozidae) - new pest on carrot in Serbia. VII Congress on plant protection “Integrated Plant Protection Knowledge – Based Step Towards Sustainable Agriculture, Forestry and Landscape Architecture”, 24-28 Novembar 2014, Zlatibor. Book of Abstracts, pp. 321 – 323.
- Jerinić-Prodanović, D., Obradović, A., Ivanović, M., Prokić, A., Zlatković, N., Pavlović, Ž. (2017): Rasprostranjenost, biologija i štetnost mrkvine lisne buve *Bactericera trigonica* (Hodkinson, 1981) (Hemiptera, Triozidae) u Srbiji. *Biljni Lekar*, 45 (4): 375-384.
- Katsir, L., Zhepu, R., Garcia, D., S., Piasezky, A., Jiang, J., Sela, N., Freilich, S., Bahar, O. (2018): Genome Analysis of Haplotype D of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”. *Frontiers in Microbiology*, 9:2933. doi: 10.3389/fmicb.2018.02933.
- Li, W., Hartung, J., S., Levy, L. (2006): Quantitative real-time PCR for detection and identification of „*Candidatus Liberibacter*” species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 104-115.
- Li, W., Abad, J., A., French-Monar, R., D., Rascoe, J., Wen, A., Gudmestad, N., C., Secor, G., A., Le, I., Duan, Y., Levy, L. (2009): Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in potato plants with zebra chip. *Journal of Microbiological Methods*, 78: 59-65.
- Mauck, K., E., Sun, P., Meduri, V., R., S., Hansen, A., K. (2019): New *Ca. Liberibacter psyllae* haplotype resurrected from a 49-year-old specimen of *Solanum umbelliferum*: a native host of the psyllid vector. *Scientific reports*, 9:9530.
- Mirmajlessi, S., M., Sjölund, M., J., Mänd, M., Loiseau, M., Ilardi, V., Haesaert, G., Karise, R., Gottsberger, A., R., Sumner-Kalkun, J., Bertaccini, A. (2019):

- PCR-based diagnostic methods for „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” - Review. Plant Protection Science, 55: 229-242.
- Monger, W., A., Jeffries, C., J. (2018): A survey of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in historical seed from collections of carrot and related Apiaceae species. European Journal of Plant Pathology, 150: 803-815.
- Nelson, W., R., Fisher, T., W., Munyaneza, J., E. (2011): Haplotypes of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” suggest long-standing separation. European Journal of Plant Pathology, 130: 5-12.
- Nwugo, C., C., Sengoda, V., G., Tian, L., Lin., H. (2017): Characterisation of physiological and molecular processes associated with potato response to Zebra chip disease. Horticulture Research, 4: 17069.
- Obradović, A., Prokić, A., Kuzmanović, N., Zlatković, N., Ivanović, M. (2014): Novo destruktivno oboljenje krompira – Zebrasti čips. Biljni Lekar, 42 (1): 14-23.
- Obradović, A., Prokić, A., Zlatković, N., Kuzmanović, N., Jerinić-Prodanović, D. (2016): „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” – Prouzrokovatelj „Zebrastog čipsa” krompira. Biljni lekar, 43 (6): 541-550.
- Obradović, A., Jerinić-Prodanović, D., Ivanović, M., Prokić, A., Kuzmanović, N., Zlatković, N., Pavlović, Ž. (2016): „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” – Novi patogen biljaka iz familije Apiaceae. Biljni Lekar, 44 (2): 180-190.
- Swisher Grimm, K., D. i Garczynski, S., F. (2019): Identification of a New Haplotype of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in *Solanum tuberosum*. Plant disease, 103: 468-474.
- Teresani, G., R., Bertolini, E., Alfaro-Fernández, A., Martínez, C., Tanaka, F., A., O., Kitajima, E., W., Roselló, M., Sanjuán, S., Ferrándiz, J., C., López, M., M., Cambra, M., Font, M., I. (2014): Association of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” with a Vegetative Disorder of Celery in Spain and Development of a Real-Time PCR methods of its Detection. Phytopathology, 104(8): 804-11.
- Teresani, G., R., Hernández, E., Bertolini, E., Siverio, F., Moreno, A., Ferreres, A., Cambra, M. (2017): Transmission of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” by *Bactericera trigonica* Hodgkinson to vegetable hosts. Spanish Journal of Agricultural Research, Vol. 15, No. 4, e1011.
- Thomas, J., E., Geering, A., D., W., Maynard, G. (2018): Detection of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in tomato on Norfolk Island, Australia. Australian Plant Disease Notes, 13: 7.
- Trkulja, V., Mitrović P., Salapura, J. M., Ilić, R., Ćurković, B., Đalović, I., Popović, T. (2020): First report of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on carrot in Serbia. Plant Disease, DOI: 10.1094/PDIS-11-20-2384-PDN
- Wang, J., Haapalainen, M., Schott, T., Thompson, S., M., Smith, G., R., Nissinen, A., I., Pirhonen, M. (2017): Genomic sequence of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” haplotype C and its comparison with haplotype A and B genomes. Plos ONE 12(2): e0171531

Abstract

MOLECULAR DETECTION AND IDENTIFICATION OF „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Jelena Menković, Aleksa Obradović

University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade

E-mail: jelena.menkovic@agrif.bg.ac.rs

„*Candidatus Liberibacter solanacearum*” is a gram-negative, fastidious bacterium that inhabits and multiplies in the phloem of host plants. The bacterium causes economically important diseases of solanaceous crops such as „zebra chips” of potatoes, and chlorotic weakening of cultivated plants of the Apiaceae family. Beside potatoes, this pathogen causes significant economic losses in tobacco, pepper and tomato production. Insect vectors classified in the family Triozidae play an important role in the epidemiology of this bacterium. Insects transfer bacterial cells from infected to healthy plants by feeding on the plant juice from the phloem tissue. This pathogenic bacterium could be transmitted by infected seeds which result in long distance spread. Based on the analysis of single nucleotide polymorphism (SNP), nine haplotypes (A, B, C, D, E, F, G, H, U) from different geographical regions, host plants and insect vectors have been described. Considering the impossibility of isolation of this bacterium on a nutrient medium, detection and identification are based on the application of molecular methods (conventional PCR, real-time PCR, multiplex PCR, nested PCR and LAMP PCR). Taking into consideration the increasing spread of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in Europe, as well as its recent detection in Serbia, the aim of this paper was to raise an awareness about importance of this bacterium and summarize the protocols and molecular methods for its detection and identification.

Keywords: Solanaceae, Apiaceae, „*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, molecular detection, conventional PCR, multiplex PCR, real-time PCR, nested PCR, LAMP PCR