

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Melita ŠTRUKELJ

**RAZNOLIKOST IN INTERAKCIJE MED VIRUSI
ZVIJANJA LISTOV VINSKE TRTE (GLRaV) IN
KAPARJI (Hemiptera: Coccidae IN Pseudococcidae)
TER NJIHOV VPLIV NA ŽLAHTNO VINSKO TRTO
(*Vitis vinifera* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Melita ŠTRUKELJ

**RAZNOLIKOST IN INTERAKCIJE MED VIRUSI ZVIJANJA
LISTOV VINSKE TRTE (GLRaV) IN KAPARJI (Hemiptera: Coccidae
IN Pseudococcidae) TER NJIHOV VPLIV NA ŽLAHTNO VINSKO
TRTO (*Vitis vinifera* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DIVERSITY AND INTERACTIONS AMONG GRAPEVINE
LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUSES (GLRaV) AND SCALE
INSECTS (Hemiptera: Coccidae AND Pseudococcidae) AND THEIR
INFLUENCE ON GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega podiplomskega študija Bioznanosti – znanstveno področje agronomija. Pregledi in vzorčenje je bilo opravljeno v slovenskih vinogradih, poskusi, meritve in laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 5. 6. 2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti v interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje agronomija. Za mentorja je bil imenovan doc. dr. Gregor Urek in za somentorico višja znan. sod. dr. Irena Mavrič Pleško.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Denis RUSJAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Stanislav TRDAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 6. april 2016

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

Melita ŠTRUKELJ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 634.8:632.3:632.752.3:632.914(043.3)
KG virusi/GLRaV/kaparji/Coccidae/Pseudococcidae/genetska raznolikost
/diagnostika/interakcije/vinska trta/*Vitis vinifera*/fiziologija/RT-PCR/qPCR
AV ŠTRUKELJ, Melita, univ. dipl. inž. agr
SA UREK, Gregor (mentor)/MAVRIČ PLEŠKO, Irena (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij
Bioznanosti, področje agronomija
LI 2016
IN RAZNOLIKOST IN INTERAKCIJE MED VIRUSI ZVIJANJA LISTOV VINSKE
TRTE (GLRaV) IN KAPARJI (Hemiptera: Coccidae IN Pseudococcidae) TER
NJIHOV VPLIV NA ŽLAHTNO VINSKO TRTO (*Vitis vinifera* L.)
TD Doktorska disertacija
OP XIII, 114, [15] str., 14 pregl., 25 sl., 12 pril., 254 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Bolezen zvijanja listov vinske trte je ena najpomembnejših in najbolj razširjenih
virusnih boleznih vinske trte. Povzročitelji te bolezni so z zvijanjem listov vinske trte
povezani virusi (*angl.* Grapevine leafroll associated viruses, GLRaVs). Rezultati
testa ELISA so potrdili splošno razširjenost GLRaV-1 in GLRaV-3 v odbranih
slovenskih vinogradih. Z molekularnimi metodami smo dokazali, da obstajajo
razlike v nukleotidni sestavi genoma slovenskih izolatov znotraj omenjenih
virusov. S preučitvijo raznolikosti nukleotidnega zaporedja gena HSP70h smo
ugotovili, da je bil GLRaV-1 prisoten večinoma v odbranih vinogradih v vzhodni in
GLRaV-3 v zahodni Sloveniji. Molekularno smo potrdili prvo najdbo GLRaV-4 v
vinogradu na Primorskem. Z molekularno karakterizacijo slovenskega izolata
055-SI smo dokazali, da se razlikuje od preostalih izolatov GLRaV-4, najdenih
drugod po svetu. Izolat 055-SI je najbolj podoben referenčnemu izolatu GLRaV-4
LR106. Pri učinkovitem širjenju GLRaV imajo pomembno vlogo kaparji. V
slovenskih vinogradih smo na vinski trti potrdili vrste *N. innumerabilis*, *P. corni*,
P. vitis in *P. ficus*. V laboratorijskih razmerah smo za izbrano populacijo *P. ficus*
dokazali, da prva nimfalna stopnja uspešno prenaša izbrani izolat GLRaV-3,
medtem ko drugi stadiji omenjenega kaparja niso prenesli nobenega od virusov
vključenih v poskus. S poskusom v rastlinjaku smo dokazali, da okužba z GLRaV
povzroča značilno zmanjšanje neto fotosinteze, transpiracije, stomatalne
prevodnosti in hitrosti transporta elektronov po tilakoidi v sredini julija. Povečanje
populacij in razširjenost kaparjev lahko pospešita širjenje GLRaV v vinogradih.
Posledica tega bi bila občutna gospodarska škoda zaradi vpliva virusov, pa tudi
zaradi vpliva samih kaparjev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDK 634.8:632.3:632.752.3:632.914(043.3)
CX viruses/GLRaV/scale insects/Coccidae/Pseudococcidae/genetic diversity/
diagnostic/interactions/grapevine/*Vitis vinifera*/physiology/RT-PCR/qPCR
AU ŠTRUKELJ, Melita
AA UREK, Gregor (supervisor)/MAVRIČ PLEŠKO, Irena (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Biotechnical
Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field
Agronomy
PY 2016
PI DIVERSITY AND INTERACTIONS BETWEEN GRAPEVINE LEAFROLL-
ASSOCIATED VIRUSES (GLRaV) AND SCALE INSECTS (Hemiptera:
Coccidae AND Pseudococcidae) AND THEIR INFLUENCE ON GRAPEVINE
(*Vitis vinifera* L.)
DT Doctoral Dissertation
NO XIII, 114, [15] p., 14 tab., 25 fig., 12 ann., 254 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Grapevine leafroll disease is one of the most severe viral diseases of grapevine
caused by Grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs). ELISA results showed
that GLRaV-1 and GLRaV-3 are widespread in the studied vineyards in Slovenia.
Phylogenetic analyses of the HSP70h gene revealed clustering of Slovenian isolates
of GLRaV-1 and GLRaV-3 into two geographically separated groups. GLRaV-1 is
widespread mainly in eastern and GLRaV-3 in western Slovenia. The presence of
GLRaV-4 was confirmed in Slovenian studied vineyards for the first time. The
Slovenian isolate 055-SI is the most similar to reference GLRaV-4 sequence
LR106. Scale insects are known vectors of GLRaVs, which play an important role
in the effective spread of viral infections. We confirmed *N. innumerabilis*, *P. vitis*,
P. corni and *P. ficus* on grapevines in Slovenian vineyards. The results of
laboratory research showed that only the first instars of local *P. ficus* population
successfully transmit the selected isolate of GLRaV-3, while the other stages of
P. ficus did not transmit any of the viruses included in the experiment. In our
research under greenhouse conditions, infection with GLRaV had an impact on neto
photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and electron transport rate in the
middle of July. Increasing populations and prevalence of scale insects can
accelerate the spread of GLRaV in the vineyards. This can result in considerable
economic losses as a result of the impact of viruses, as well as the mealybugs
themselves.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	2
1.2 CILJI NALOGE IN PRISPEVEK K ZNANOSTI	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 BOLEZEN ZVIJANJA LISTOV VINSKE TRTE	4
2.1.1 Bolezenska znamenja	6
2.1.2 Vpliv virusov na vinsko trto in njihov gospodarski pomen	7
2.2 Z ZVIJANJEM LISTOV VINSKE TRTE POVEZANI VIRUSI (GLRaV)	11
2.2.1 Taksonomska uvrstitev	11
2.2.2 Struktura in organizacija genoma GLRaV	13
2.2.3 Genetsko spreminjanje in genetska raznolikost	15
2.2.4 Prenos GLRaV in širjenje po rastlini	17
2.2.5 Omejevanje širjenja okužbe	19
2.3 KAPARJI VINSKE TRTE	22
2.3.1 Morfologija in razvojni krog družine Pseudococcidae	22
2.3.2 Družina Coccidae	27
2.3.3 Škodljivost kaparjev	30
2.4 METODE DOLOČANJA VIRUSOV VINSKE TRTE IN METODE PREUČEVANJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI	30
2.4.1 Encimsko-imunski test ELISA	31
2.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	32
2.4.3 Metoda verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)	32
2.4.4 Molekularno kloniranje in določanje nukleotidnega zaporedja	34
2.5 METODE MERJENJA VPLIVOV VIRUSOV NA FIZIOLOŠKE PROCESE V VINSKI TRTI	35
3 MATERIALI IN METODE	37
3.1 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI VIRUSOV V VINSKI TRTI	37
3.1.1 Rastlinski materiali in detekcija virusov	37
3.1.2 Izolacija RNA	37
3.1.3 Obratno prepisovanje (RT) in verižna reakcija s polimerazo (PCR)	38
3.1.4 Kloniranje in izolacija plazmidov	40

3.1.5	Identifikacija in analiza dobljenih nukleotidnih zaporedij izolatov	41
3.2	KAPARJI VINSKE TRTE IN PRENOS VIRUSOV	43
3.2.1	Prisotnost kaparjev v naključno izbranih slovenskih vinogradih	43
3.2.2	Trte za poskus prenosa GLRaV	43
3.2.3	Gojenje smokvinega volnatega kaparja (<i>P. ficus</i>)	44
3.2.4	Prenos virusov s smokvinim volnatim kaparjem (<i>P. ficus</i>)	44
3.2.5	Ugotavljanje prisotnosti GLRaV v rastlinskem materialu	45
3.2.6	Identifikacija GLRaV v kaparjih	46
3.3	KONCENTRACIJA GLRaV IN FIZIOLOŠKI PROCESI V VINSKI TRTI	47
3.3.1	Material in potek poskusa	47
3.3.2	Dokazovanje prisotnosti GLRaV v poskusnih trtah	48
3.3.3	Določanje koncentracije virusne RNA	49
3.3.4	Merjenje fizioloških parametrov	52
3.3.5	Statistične metode	53
4	REZULTATI	55
4.1	MOLEKULARNE ZNAČILNOSTI GLRaV-4	55
4.1.1	Analiza CP slovenskega izolata 055-SI	55
4.1.2	Analiza p23 gena slovenskega izolata 055-SI	57
4.1.3	Filogenetske analize	57
4.2	GENETSKA RAZNOLIKOST GLRaV-1 IN GLRaV-3	59
4.2.1	Okuženost vinske trte z GLRaV	59
4.2.2	Izbor izolatov	60
4.2.3	Analiza slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3	61
4.2.4	Analiza populacije slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3	63
4.3	RAZŠIRJENOST KAPARJEV IN PRENOS GLRaV	65
4.3.1	Razširjenost kaparjev	65
4.3.2	Razširjenost virusov in kaparjev v izbranem vinogradu	66
4.3.3	Uspešnost prenosa GLRaV z vrsto <i>P. ficus</i>	67
4.4	GLRaV IN FIZIOLOŠKI PROCESI V VINSKI TRTI	69
4.4.1	Prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 v vzorcih vinske trte skozi čas	69
4.4.2	Vrednotenje fizioloških parametrov	70
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	75
5.1	RAZPRAVA	75
5.1.1	Prva molekularna karakterizacija GLRaV-4 v Sloveniji	75
5.1.2	Raznolikost slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3	76
5.1.3	Interakcije med virusi in kaparji	79
5.1.4	Vpliv GLRaV na fiziološke procese v žlahtni vinski trti	83
5.2	SKLEPI	87
6	POVZETEK (SUMMARY)	89

6.1	POVZETEK	89
6.2	SUMMARY	91
7	VIRI	93
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1:	Bolezenska znamenja z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov, GLRaV, na kultivarju 'Refošk' (levo) in 'Vitovska grganja' (desno) (foto: I. Mavrič Pleško)	6
Slika 2:	Bolezenska znamenja z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov (GLRaV) na grozdu rdeče sorte (foto: I. Mavrič Pleško)	8
Slika 3:	Filogenetsko drevo virusov iz družine <i>Closteroviridae</i> , ki okužujejo vinsko trto, izdelano na podlagi gena HSP70h (Naidu in sod., 2015: 615)	12
Slika 4:	Shematski prikaz genetske organizacije z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov (GLRaV) iz družine <i>Closteroviridae</i> (Naidu in sod., 2015: 616)	14
Slika 5:	Kaparji družine Pseudococcidae različnih razvojnih stopenj na krompirjevem kalčku (foto: M. Štrukelj)	23
Slika 6:	Razvojni krog kaparjev družine Pseudococcidae (Sharon in sod., 2013 [levo] in foto: M. Štrukelj [desno])	24
Slika 7:	Samica smokvinega volnatega kaparja <i>P. ficus</i> z jajčno vrečko in jajčeci (foto: M. Štrukelj)	25
Slika 8:	Shematski prikaz trebušnega dela telesa odrasle samice, smokvin volnati kapar <i>P. ficus</i> (levo) in citrusov kapar <i>P. citri</i> (desno) (Miller in sod., 2014)	26
Slika 9:	Samice velikega trtnega kaparja (<i>N. innumerabilis</i>) z jajčno vrečko (foto: I. Mavrič Pleško)	27
Slika 10:	Ličinke navadnega trtnega kaparja <i>P. vitis</i> (foto: M. Štrukelj)	28
Slika 11:	Odrasle samice češpljevega kaparja <i>P. corni</i> (foto: M. Štrukelj)	29
Slika 12:	Gojenje <i>P. ficus</i> na kalčkih krompirja (foto: M. Štrukelj)	44
Slika 13:	Shematični prikaz poskusa prenosov GLRaV s <i>P. ficus</i>	45
Slika 14:	Aminokislinska zaporedja N-terminalnega dela CP GLRaV-4	56
Slika 15:	Filogenetsko drevo narisano iz aminokislinskih zaporedij plaščnega proteina – CP. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Drevo je koreninjeno s PMWaV-1.	58
Slika 16:	Filogenetsko drevo narisano iz homolognih aminokislinskih zaporedij gena p23. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Drevo je koreninjeno s PMWaV-1.	59
Slika 17:	Ugotavljanje prisotnosti GLRaV s testom DAS-ELISA v letih 2011, 2012 in 2013 v vinski trti s 95-odstotnim intervalom zaupanja	60
Slika 18:	Filogenetsko drevo izbranih izolatov GLRaV-1 narisano na podlagi delnega nukleotidnega zaporedja gena HSP70h. Merilo predstavlja	

genetsko razdaljo. Prikazane so le vrednosti bootstrap, ki so ≥ 70 %. Izolati iz zahodnega dela Slovenije so označeni z ▲ in izolati iz vzhodnega dela Slovenije z ●, izolati iz Dobravelj z vijolično in iz Semiča s zeleno barvo. Izolati, ki jih ne reže nobeden od encimov (*BsiWI* in *SaII*), so označeni z *.

- Slika 19: Filogenetsko drevo izbranih izolatov GLRaV-3 je narisano na podlagi delnega nukleotidnega zaporedja gena HSP70h. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Prikazane so le vrednosti bootstrap, ki so ≥ 70 %. Izolati iz zahodnega dela Slovenije so označeni z ▲ in izolati iz vzhodnega dela s ●, izolati iz Dobravelj z vijolično barvo in iz Semiča s zeleno. 62
- Slika 20: Razširjenost štirih vrst kaparjev na žlahtni vinski trti v Sloveniji med letoma 2011 in 2014 64
- Slika 21: Razširjenost kaparjev in virusov v izbranem vinogradu v Dobravljah leta 2012 66
- Slika 22: Okuženost trt z virusi glede na prisotnost kaparjev na trti in linearni regresijski model s 95-odstotnim intervalom zaupanja dobljen na podlagi surovih podatkov sedmih podvzorcev 67
- Slika 23: Delež kaparjev vrste *P. ficus* okuženih z GLRaV po hranjenju na okuženih trtah s 95-odstotnim intervalom zaupanja 68
- Slika 24: Povprečne meritve s standardno napako fizioloških parametrov pri obravnavanjih A, B, C in N v prvem terminu meritev (3. junij) v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014 72
- Slika 25: Povprečne meritve s standardno napako fizioloških parametrov pri obravnavanjih A in C v petih terminih meritev v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014 74

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Seznam glavnih boleznih vinske trte in virusov, povezanih z njimi (Oliver in Fuchs, 2011)	5
Preglednica 2:	Rezultati meritev fizioloških parametrov pri različnih sortah vinske trte cepljenih na različne podlage v vinogradih. Prikazana je primerjava med meritvami pri vinski trti okuženi z GLRaV-3 (samostojne ali v mešani okužbi z drugimi virusi) in z neokuženimi z GLRaV-3 v različnih raziskavah po svetu. Rezultati meritev so podani v %.	10
Preglednica 3:	Nukleotidna zaporedja celotnih genomov tipskih izolatov GLRaV-3 za vsako genetsko skupino po predlogu Maree in sod. (2015)	17
Preglednica 4:	Z zvijanjem listov vinske trte povezani virusi in njihovi prenašalci (Sim in sod., 2003; Mahfoudhi in sod., 2009; Tsai in sod., 2010; Martelli, 2014)	18
Preglednica 5:	Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje posameznih segmentov virusnega genoma GLRaV-4	39
Preglednica 6:	Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje posameznih delov genoma GLRaV-1 in GLRaV-3	40
Preglednica 7:	Seznam GLRaV-4 in njegovih različkov uporabljenih pri filogenetski analizi	42
Preglednica 8:	Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje posameznih segmentov virusnega genoma GLRaV-1 in GLRaV-3 v kaparjih	46
Preglednica 9:	Potek opravljenih del in meritev na vinski trti v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije	48
Preglednica 10:	Seznam začetnih oligonukleotidov uporabljenih za pomnoževanje 3' nekodirajoče regije GLRaV-3	49
Preglednica 11:	Deleži enakosti nukleotidnih (pod diagonalo) in aminokislinskih (nad diagonalo) zaporedij plaščnega proteina med slovenskim izolatom in drugimi izolati GLRaV-4	56
Preglednica 12:	Deleži enakosti nukleotidnih (pod diagonalo) in aminokislinskih (nad diagonalo) zaporedij gena p23 med slovenskim izolatom in drugimi izolati GLRaV-4	57
Preglednica 13:	Število okuženih trt po poskusu prenosa GLRaV-1, -3 in -4 s <i>P. ficus</i> v dveh letih poskusa	68
Preglednica 14:	Prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 ter koncentracija GLRaV-3 (relativno število molekul virusne RNA) glede na vzorčenje med rastno dobo vinske trte v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014.	69

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Seznam delnih genov HSP70h izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3 iz slovenskih vinogradov in njihove aks. številke
- Priloga A2: Seznam delnih genov HSP70h tujih izolatov GLRaV-1, uporabljenih v genetskih analizah
- Priloga A3: Seznam celotnih izolatov tujih GLRaV- 3, uporabljenih v genetskih analizah
- Priloga B1: Relativna kvantifikacija GLRaV-3 v vzorcih vinske trte, ki smo jih vzorčili skozi rastno sezono 2014
- Priloga B2: Primerjava neto fotosinteze (P_n) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev
- Priloga B3: Primerjava dejanske fotokemične učinkovitosti PSII (F_v'/F_m') znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev
- Priloga B4: Primerjava transpiracije (E) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev
- Priloga B5: Primerjava koncentracije CO_2 v listu (C_i) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev
- Priloga B6: Primerjava prevodnosti listnih rež (g_s) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev
- Priloga B7: Primerjava hitrosti transporta elektronov po tilakoidi (ETR) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev
- Priloga B8: Primerjava vrednosti klorofila (meritve SPAD) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev
- Priloga B9: Povprečne vrednosti in standardna napaka fizioloških parametrov znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔCq	povprečna vrednost ciklov kvantifikacije
ArMV	virus mozaika repnjaka (<i>Arabidopsis mosaic virus</i>)
bp	bazni par
BYV	virus rumenice pese (<i>Beet yellow virus</i>)
cDNA	komplementarna DNA
CLRV	virus zvijanja listov češnje (<i>Cherry leaf roll virus</i>)
COX	citokrom oksidaza
CP	plaščni protein (<i>angl.</i> coat protein)
CPm	dodatni plaščni protein (<i>angl.</i> minor coat protein)
Cq	cikel kvantifikacije oziroma točka, v kateri se dvigne signal fluorescence poročevalske molekule nad vrednostjo praga, ki se izraža v številu ciklov (<i>angl.</i> quantification cycle)
DAS-ELISA	metoda dvojnega sendviča ELISA (<i>angl.</i> double antibody sandwich ELISA)
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
E	učinkovitost pomnoževanja v reakciji PCR v realnem času
ELISA	encimskoimunski test (<i>angl.</i> enzyme linked immunosorbent assay)
F ₀	minimalna fluorescenca
FAM	6-karboksifluorescein
Fm	maksimalna fluorescenca
GBLV	bolgarski latentni virus vinske trte (<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i>)
GCMV	virus kromastega mozaika vinske trte (<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>)
GFkV	virus marmoriranosti vinske trte (<i>Grapevine fleck virus</i>)
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte (<i>Grapevine fanleaf virus</i>)
GLD	bolezen zvijanja listov vinske trte (<i>angl.</i> Grapevine leafroll disease)
GLRaV-1	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 1 (<i>Grapevine leafroll associated virus-1</i>)
GLRaV-2	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 2 (<i>Grapevine leafroll associated virus-2</i>)
GLRaV-3	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 3 (<i>Grapevine leafroll associated virus-3</i>)
GLRaV-4	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 4 (<i>Grapevine leafroll associated virus-4</i>)
GLRaV-5	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 5 (<i>Grapevine leafroll associated virus-5</i>)
GLRaV-6	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 6 (<i>Grapevine leafroll associated virus-6</i>)
GLRaV-7	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 7 (<i>Grapevine leafroll associated virus-7</i>)
GLRaV-9	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 9 (<i>Grapevine leafroll associated virus-9</i>)

g_s	prevodnost listnih rež
GVA	virus A vinske trte (<i>Grapevine virus A</i>)
HEL	helikaza (<i>angl.</i> helicase)
HSP70h	homolog 70-kDa proteina toplotnega šoka (<i>angl.</i> 70-kDa heat-shock protein homolog)
IC	tehnika imunske vezave (<i>angl.</i> immunocapture)
L-Pro	papainu podobna proteaza (<i>angl.</i> papain-like leader protease)
LYIV	infektivni virus rumenice solate (<i>Lettuce infectious yellows virus</i>)
MET	metiltransferaza (<i>angl.</i> methyltransferase)
MGB	molekula, ki se veže na DNA (<i>angl.</i> minor groove binder)
NFQ	nefluorescenčni dušilec
NTC	kontrola navzkrižne okužbe reakcijske mešanice (<i>angl.</i> non-template control)
ORF	odprt bralni okvir (<i>angl.</i> open reading frame)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PMWaV-1	s kaparji in uvelostjo ananasa povezani virus 1 (<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus-1</i>)
QGB	petdelni blok genov (<i>angl.</i> quintuple gene block)
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
R	relativna količina virusne RNA
R^2	koeficient linearne regresije
RBDV	virus grmičavosti in pritlikavosti malinjaka (<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>)
rcf	relativna centrifugalna sila
RdRp	od RNA odvisna polimeraza RNA (<i>angl.</i> RNA-dependent RNA polymerase)
RGB	blok genov za pomnoževanje (<i>angl.</i> replication gene block)
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	obrati na minuto
RpRSV	virus obročkaste pegavosti malinjaka (<i>Raspberry ringspot virus</i>)
RT	obratno prepisovanje (<i>angl.</i> reverse transcription)
SLRSV	latentni virus obročkaste pegavosti vrtnega rdečega jagodnjaka (<i>Strawberry latent ringspot virus</i>)
TAMRA	6-karboksi-tetra-metilrodamin
Taq polimeraza	polimeraza iz organizma <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBRV	virus črne obročkavosti paradižnika (<i>Tomato black ring virus</i>)
T_m	temperatura tališča verige DNA
ToRSV	virus obročkaste pegavosti paradižnika (<i>Tomato ringspot virus</i>)
TRSV	virus obročkaste pegavosti tobaka (<i>Tobacco ringspot virus</i>)
ΔR_n	velikost normaliziranega fluorescenčnega signala

1 UVOD

Žlahtna vinska trta (*Vitis vinifera* L.) uspeva v mnogih državah po svetu. Tako kot vse druge rastlinske vrste, je izpostavljena vplivom okolja, boleznim in škodljivcem. Okužbe te gospodarsko pomembne rastline z virusi lahko povzročijo veliko zmanjšanje pridelka in zato veliko gospodarsko škodo. Zato virusne bolezni uvrščamo med gospodarsko najpomembnejše škodljive bolezni vinske trte, saj virusa po okužbi ni več mogoče odstraniti (Credi in Babini, 1997; Martelli in sod., 2002; Endeshaw in sod., 2014; Martelli, 2014). Gospodarska škoda, ki jo povzročajo virusi, je bila povod številnih temeljnih raziskav virusov vinske trte. Diagnostika, epidemiologija in raziskave vpliva povzročiteljev bolezni na rastline so orodja za prepoznavanje in razumevanje virusnih okužb, ki pa se nemalokrat skrivajo za fiziološkimi procesi in številnimi drugimi dejavniki, ki vplivajo na rastlino.

Bolezen zvijanja listov vinske trte je ena najpomembnejših in najbolj razširjenih virusnih bolezni vinske trte na svetu (Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Martelli, 2014). Prizadene lahko vse sorte in podlage, vendar bolezenska znamenja niso nujno značilna oziroma prepoznavna pri vseh sortah vinske trte (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998), kot je na primer zvijanje listov. Bolezen negativno vpliva na morfologijo in fiziološki odziv vinske trte. Z boleznijo je povezana degeneracija floemskih celic v steblih in listih, kar se kaže v zmanjšani fotosintezni aktivnosti in tudi zmanjšanem delovanju drugih fizioloških procesov. Posledica bolezni je velika izguba pridelka, zakasnjeno in neenakomerno dozorevanje jagod in povečana vsebnost skupnih kislin grozdnega soka (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Virusi se iz okužene rastline zelo hitro širijo na druge trte s pomočjo prenašalcev in lahko okužijo vse trte v vinogradu v le nekaj letih (Krake in sod., 1999). Razumevanje vpliva teh virusov na vinsko trto otežuje kompleksnost virusov in spremenljiv fiziološki odziv rastlin na virusne okužbe (Balachandan in sod., 1997).

Martelli (2014) navaja, da lahko vinsko trto okužuje več kot 60 različnih vrst virusov. Bolezen zvijanja listov vinske trte povzročajo z zvijanjem listov vinske trte povezani virusi (Grapevine leafroll-associated viruses; GLRaV) iz družine *Closteroviridae* (Fuchs, 2007; Dolja, 2009; Martelli, 2014). Do danes je bilo opisanih pet z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov: GLRaV-1, -2, -3, -4 in -7 (Martelli, 2014). GLRaV-1 in GLRaV-3 sta najvolj razširjena in povzročata največjo gospodarsko škodo (Sefc in sod., 2000). Treba se je zavedati nevarnosti virusnih okužb tudi v primerih, ko bolezen še ni razvita ter ni značilnih bolezenskih znamenj ali pa so ta komaj opazna (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Bolezenska znamenja so med drugim odvisna tudi od vrste virusa ali različka posameznega virusa v okuženi rastlini (Komar in sod., 2007). Za določanje GLRaVs se rutinsko uporablja serološka metoda dvojnega sendviča ELISA (DAS-ELISA), s katero se okužba ovrže ali potrdi. Molekularne metode, kot je verižna reakcija s polimerazo (PCR),

so bolj občutljive od seroloških metod, z razvojem verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) pa se je ta občutljivost še dodatno povečala.

Z zvijanjem listov vinske trte povezani virusi se iz okuženih trt prenašajo s sadilnim materialom, vegetativnim razmnoževanjem in s kaparji različnih vrst, ki so do danes navedeni, kot edini prenašalci GLRaV (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). S povečanim pretokom trgovanjem z rastlinami se povečuje vnos žuželk in drugih organizmov v njim tujerodno okolje. Kaparji predstavljajo kar 41,1 % (37 vrst) vseh polkrilcev (Hemiptera), ki so bili od sredine 19. stoletja vneseni v Evropo in so se postopno razširili tudi v Slovenijo (Seljak, 2013). Škodljivi so predvsem na sadnem drevju, vinski trti, grmičevju in številnih rastlinskih vrstah v zavarovanih prostorih (Kosztarb in Kozar, 1988). Seljak in Žežlina (2007) izpostavljata štiri vrste kaparjev, ki lahko v Sloveniji povzročajo gospodarsko škodo na vinski trti, to so veliki trtni kapar (*Neopulvinaria innumerabilis* [Rathvon]), navadni trtni kapar (*Pulvinaria vitis* [Linnaeus]), češpljev kapar (*Parthenolecanium corni* [Bouché]) in smokvin volnati kapar (*Planococcus ficus* [Signoret]). Kaparji se hranijo z rastlinskimi sokovi in povzročajo postopno propadanje rastlin. Na svoje gostitelje ne vplivajo le neposredno s sesanjem, ampak tudi posredno, s prenosom virusov vinske trte in izločanjem medene rose, na katero se lahko naselijo glive sajavosti, ki lahko povzročijo precejšnjo gospodarsko škodo.

Bolezni in škodljivci imajo negativen vpliv na življenjsko dobo vinske trte. Njihova prerazmnožitev in posledično širjenje virusnih okužb lahko povzroči nepopravljivo gospodarsko škodo v vinogradništvu. Razumevanje širjenja bolezni zvijanja listov vinske trte ter poznavanje interakcij med boleznijo, njenimi povzročitelji in prenašalci pripomore k učinkovitemu obvladovanju te bolezni.

1.1 HIPOTEZE

- ❖ Predvidevamo, da v Sloveniji obstajajo genetske razlike znotraj GLRaV-1 in GLRaV-3, kar bomo poskušali dokazati s preučitvijo raznolikosti homologa 70-kDa proteina toplotnega šoka (HSP70h).
- ❖ V Sloveniji je bil v preteklih letih s serološko metodo najden tudi GLRaV-4. Na podlagi karakterizacije slovenskega izolata GLRaV-4 na molekularni ravni pričakujemo, da se razlikuje od preostalih genetskih variant najdenih drugod po svetu.
- ❖ Kaparji imajo velik pomen pri učinkovitem širjenju virusnih okužb vinske trte, učinkovitost prenosov virusov pa je odvisen od populacije in vrste kaparjev. Predvidevamo, da so na vinski trti razširjeni po vsej Sloveniji. Na podlagi rezultatov raziskav prenosa rastlinskih virusov z drugimi prenašalci pričakujemo, da bodo nižje razvojne stopnje ličink pri prenosu izbranih virusov vinske trte uspešnejše od višjih razvojnih stopenj ličink in odraslih samic slovenske populacije kaparjev.

- ❖ Virusi zvijanja listov vinske trte se v največji meri nahajajo v floemu okuženih rastlin in v splošnem povzročajo morfološke spremembe ter slabo vplivajo na procese v rastlini. Predvidevamo, da so virusi vzrok zaviranja sprejema vode in hranil, kar ima negativen učinek na proces fotosinteze vinske trte.

1.2 CILJI NALOGE IN PRISPEVEK K ZNANOSTI

Cilji doktorske naloge so:

- ❖ izdelati pregled razširjenosti kaparjev in GLRaV v vinogradih po Sloveniji ter izbrati populacijo kaparjev, ki jo bomo uporabili za poskuse prenosov izbranih GLRaV,
- ❖ ugotoviti genetsko raznolikost GLRaV v Sloveniji in slovenske populacije primerjati z genetskimi variantami, najdenimi drugod po svetu,
- ❖ v skladu z novo taksonomsko uvrstitvijo okarakterizirati slovenski izolat GLRaV-4 na molekularni ravni in ga vključili v poskuse prenosa,
- ❖ ugotoviti, katere GLRaVs prenašajo slovenske populacije kaparjev in katere razvojne stopnje ličink so pri teh prenosih uspešnejše,
- ❖ ovrednotiti vpliv GLRaV na nekatere fiziološke procese v vinski trti.

Za razumevanje interakcij med GLRaV in kaparji je ključno poznavanje obeh vrst. Z doktorsko nalogo smo dobili vpogled v razširjenost kaparjev in njihovo sposobnost prenosa z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov. S tem smo pripomogli k razumevanju širjenja bolezni zvijanja listov vinske trte ter poznavanju interakcij med povzročitelji in prenašalci te bolezni v Sloveniji. S poznavanjem interakcij bomo pripomogli k učinkovitemu obvladovanju bolezni zvijanja listov vinske trte pri nas.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BOLEZEN ZVIJANJA LISTOV VINSKE TRTE

Na žlahtni vinski trti (*Vitis vinifera* L.) se pojavljajo različni škodljivci in povzročitelji bolezni, vključno z virusi, viroidi in fitoplazmami (Martelli, 2014). V trti je bilo doslej najdenih več virusov kakor v kateri koli drugi gojeni lesnati rastlinski vrsti. Po zadnjih podatkih okužuje trto več kot 60 vrst virusov iz 30 rodov (Oliver in Fuchs, 2011; Martelli, 2012, 2015). Na podlagi bolezenskih znamenj, ki jih povzročajo virusi ali so z njimi povezani, uvrščamo vse do zdaj najdene viruse v štiri glavne skupine (preglednica 1). Druge viruse tudi povezujemo z boleznimi, vendar imajo manjši ali zanemarljiv vpliv na vinsko trto (Oliver in Fuchs, 2011; Martelli, 2014).

Bolezen zvijanja listov vinske trte, GLD (*angl.* Grapevine leafroll disease), je ena od najpomembnejših in najbolj razširjenih virusnih bolezni vinske trte po svetu. Prizadene lahko vse sorte in podlage ter neugodno vpliva na količino in kakovost grozdja in vina (Bovey in sod., 1980; Charles in sod., 2006; Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Almeida in sod., 2013; Martelli, 2014; Naidu in sod., 2014). GLD je bila prvič opažena v sredini 19. stoletja v Evropi, pozneje pa še v Afriki, na Novi Zelandiji, v Severni in Južni Ameriki ter v Aziji (Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Martelli, 2014). GLD je zgled, pri katerem različne vrste z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov (GLRaV) povzročajo podobna bolezenska znamenja (Martelli in sod., 2002).

Znano je, da je GLD prisotna tudi v Sloveniji, kjer sta njena povzročitelja najpogosteje GLRaV-1 in GLRaV-3, ki sta pri nas splošno razširjena (Korošec-Koruza, 1990, 1991; Tomažič in sod., 2005; Čepin, 2011; Mavrič Pleško in sod., 2011). S testom ELISA in elektronsko mikroskopijo je bilo potrjenih tudi nekaj primerov okužbe z GLRaV-2 v jugozahodnem delu države (Tomažič in sod., 2005, 2008). S testom ELISA so detektirali tudi GLRaV-6, vendar njegova prisotnost ni bila potrjena z drugimi metodami (Tomažič, 2002; Čepin, 2011).

Preglednica 1: Seznam glavnih boleznih vinske trte in virusov, povezanih z njimi (Oliver in Fuchs, 2011)

Table 1: The list of major diseases of grapevine and viruses associated with them (Oliver and Fuchs, 2011)

S kompleksom zvijanja listov vinske trte povezani virusi (angl. Grapevine leafroll disease complex)		
GLRaV-1	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 1	<i>Grapevine leafroll associated virus 1</i>
GLRaV-2	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 2	<i>Grapevine leafroll associated virus 2</i>
GLRaV-3	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 3	<i>Grapevine leafroll associated virus 3</i>
GLRaV-4	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 4	<i>Grapevine leafroll associated virus 4</i>
	in različki	
GLRaV-7	z zvijanjem listov vinske trte povezani virus 7	<i>Grapevine leafroll associated virus 7</i>
S kompleksom kužne marmoriranosti vinske trte povezani virusi (angl. Fleck disease complex)		
GAMaV	z zvezdastim mozaikom vinske trte povezani virus	<i>Grapevine asteroid mosaic-associated virus</i>
GFkV	virus marmoriranosti vinske trte	<i>Grapevine fleck virus</i>
GRGV	virus vinske trte red globe	<i>Grapevine red globe virus</i>
GRVfV	virus peresavosti žil vinske in skalne trte	<i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i>
GSyV-1	virus 1 vinske trte syrah	<i>Grapevine Syrah virus 1</i>
S kompleksom boleznih razbrazdanja lesa povezani virusi (angl. Rugose wood complex)		
GRSPaV	z razbrazdanjem debla skalne in vinske trte povezani virus	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i>
GVA	virus A vinske trte	<i>Grapevine virus A</i>
GVB	virus B vinske trte	<i>Grapevine virus B</i>
GVD	virus D vinske trte	<i>Grapevine virus D</i>
GVE	virus E vinske trte	<i>Grapevine virus E</i>
GVF	virus F vinske trte	<i>Grapevine virus F</i>
Virusi, vključeni v kompleks kužne izrojenosti vinske trte (angl. Degeneration/decline complex)		
AILV	italijanski latentni virus artičoke	<i>Artichoke italian latent virus</i>
ArMV	virus mozaika repnjaka	<i>Arabis mosaic</i>
BLMoV	virus lisavosti borovnice	<i>Blueberry leaf mottle virus</i>
CLRV	virus zvijanja listov češnje	<i>Cherry leafroll virus</i>
GARSV	anatolski virus obročkaste pegavosti vinske trte	<i>Grapevine anatolian ringspot virus</i>
GBLV	bolgarski latentni virus vinske trte	<i>Grapevine bulgarian latent virus</i>
GCMV	virus kromastega mozaika vinske trte	<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>
GDefV	virus deformacije vinske trte	<i>Grapevine deformation virus</i>
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
GTRSV	tunizijski virus obročkaste pegavosti vinske trte	<i>Grapevine tunisian ringspot virus</i>
PRMV	virus rozetavosti in mozaika breskve	<i>Peach rosette mosaic virus</i>
RpRSV	virus obročkaste pegavosti malinjaka	<i>Raspberry ringspot virus</i>
SLRSV	latentni virus obročkaste pegavosti vrtnega rdečega jagodnjaka	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>
TBRV	virus črne obročkavosti paradižnika	<i>Tomato black ring virus</i>
ToRSV	virus obročkaste pegavosti paradižnika	<i>Tomato ringspot virus</i>
TRSV	virus obročkaste pegavosti tobaka	<i>Tobacco ringspot virus</i>

2.1.1 Bolezenska znamenja

Bolezenska znamenja oziroma simptomi so odvisna od podnebnih razmer, letnega časa, lege in starosti vinograda, tipa tal oziroma lastnosti zemlje, sorte vinske trte, vrste rezi in ne nazadnje od virusa, njegovega različka ali kombinacije različkov ter trajanja okužbe (Cabaleiro in sod., 1999; Sampol in sod., 2003; Naidu in sod., 2008; Mannini in sod., 2012). Bolezenska znamenja se pokažejo le na sortah evrope trte (*V. vinifera*) in nekaterih azijskih (*V. coignetiae* Pulliat) vrstah vinske trte (Saldarelli in sod., 2005), medtem ko so *V. californica* Benth., križanci *V. californica* × *V. vinifera* (88), *V. labruscana* L.H. Bailey 'Concord' in *V. labrusca* L. 'Niagara', *Mirabilis rotundifolia* (Greene) Standley ter podlage *V. riparia* Michx., *V. rupestris* Scheele, *V. berlandieri* Planch., *V. champinii* Plach. gostitelji GLRaV, na katerih se bolezenska znamenja ne razvijejo (Martelli, 1993; Monis in Bestwick, 1996; Ling in sod., 2001; Naidu in sod., 2008).

Najbolj značilno bolezensko znamenje, ki ga opazimo na okuženih trtah, so listi z navzdol zavitim robom (slika 1). Bolezenska znamenja so najbolj vidna pri rdečih sortah vinske trte. Spomladi se okužene trte ne ločijo bistveno od neokuženih, poleti pa se na listih okuženih trt teh sort pojavijo rdeče pike. Rdečenje se razširi po celotnem listu, vendar glavne žile ostanejo zelene. Pozno poleti in jeseni je značilno zvijanje listov. Najizrazitejša znamenja se razvijejo na starejših listih v spodnjem delu trte, mladi listi na vrhu mladik pa so skoraj brez znamenj, pojavijo se šele pozneje (Bovey in sod., 1980; Maček, 1990; Korošec-Koruza, 1992; Martelli in Boudon-Padiou, 2006; Naidu in sod., 2008; Vršič in Lešnik, 2010; Martelli, 2014; Naidu in sod., 2014). Pri belih sortah se bolezenska znamenja razlikujejo od rdečih sort le po tem, da listi ne pordečijo, temveč porumenijo. Znamenja bolezní so pri belih sortah težje opazna (Bovey in sod., 1980; Maček, 1990;



Slika 1: Bolezenska znamenja z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov, GLRaV, na kultivarju 'Refošk' (levo) in 'Vitovska grganja' (desno) (foto: I. Mavrič Pleško)

Figure 1: Symptoms of Grapevine leafroll associated viruses, GLRaVs, in the cultivar 'Refošk' (left) and 'Vitovska grganja' (right) (photo: I. Mavrič Pleško)

Pearson in Goheen, 1998; Naidu in sod., 2008). Pri nekaterih sortah (Modri pinot, Cabernet franc, 'Chardonnay') se lahko znamenja pojavijo šele ob trgatvi oziroma se sploh ne razvijejo ('Sauvignon blanc' in 'Thompson seedles') (Golino in sod., 2008; Naidu in sod., 2008).

Izrazitost bolezenskih znamenj je odvisna tudi od virusa samega, njegovih različkov in njihove razporeditve v vinski trti. Maliogka in sod. (2015) navajajo, da so pri GLRaV-1, GLRaV-3 in večini različkov GLRaV-2 znamenja izrazitejša, medtem ko so pri GLRaV-4 manj opazna (Martelli in sod., 2012). Bolezenska znamenja so pri okužbi vinske trte z GLRaV-2 in GLRaV-7 težje opazna oziroma jih sploh ni (Al Rwahnin in sod., 2012; Jelkmann in sod., 2012; Poojari in sod., 2013; Martelli, 2014). Razlika v izrazitosti bolezenskih znamenj je opazna celo pri okužbi vinske trte s posameznimi različki virusa, kot so dokazali pri GLRaV-2 in GLRaV-3 v Južni Afriki (Bertazzon in sod., 2010; Jooste in sod., 2011; Bester in sod., 2012), kar dodatno kaže na kompleksnost bolezni.

Določanje GLD je lahko zelo zahtevno tudi zaradi temperaturnih razmer, pomanjkanja elementov v tleh (magnezij, kalij, bor) in drugih vplivov na trto (Bovey in sod., 1980; Korošec-Koruza, 1992; Naidu in sod., 2014). Pogosto bolezenska znamenja zamenjujemo z znamenji okužbe s fitoplazemsko povzročiteljico zlate trsne rumenice (*Flevescence dorée*) in fitoplazemsko povzročiteljico počrnelosti lesa pri vinski trti (*Bois noir*), poškodbami, ki jih povzročajo bivolčki (*Ceresa babulus* Fabricius) in škržatki (*Empoasca* sp.) ter poškodbami nepravilne rabe in fitotoksičnosti pesticidov (Bovey in sod., 1980; Naidu in sod., 2014). Pred kratkim odkriti virus imenovan Grapevine red blotch-associated virus (GRBaV) povzroča bolezenska znamenja, ki so zelo podobna bolezenskim znamenjem, ki jih povzročajo GLRaV (Al Rwahnin in sod., 2015). Vse to so razlogi, zakaj je za potrditev povzročitelja bolezni potrebno s primernimi metodami diagnosticirati povzročitelja.

2.1.2 Vpliv virusov na vinsko trto in njihov gospodarski pomen

Poleg naštetih znamenj je z GLD povezana tudi degeneracija floemskih celic v steblih in listih, kar se kaže v zmanjšani fotosintezni aktivnosti. Degeneracija omenjenih celic ovira transport ogljikovih hidratov, kar povzroča kopičenje škroba v listih (Cabaleiro in sod., 1999; Charles in sod., 2006). Bolezen povzroča zapoznelo in neenakomerno dozorevanje grozdnih jagod (slika 2) ter povečuje vsebnost kislin v grozdnem soku, zmanjšuje vsebnost suhe snovi in antocianov (Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Fuchs, 2007; Vega in sod., 2011; Endeshaw in sod., 2014). GLRaV lahko povzročijo tudi slabši prijem po cepljenju in odmiranje mladih trt (Golino in sod., 2002). Obbolele rastline so v splošnem občutljivejše na neugodne vremenske razmere (Fuchs, 2007), še posebej ob okužbi z več virusi hkrati (Kovacs in sod., 2001).



Slika 2: Bolezenska znamenja z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov (GLRaV) na grozdu rdeče sorte (foto: I. Mavrič Pleško)

Figure 2: Symptoms of Grapevine leafroll associated viruses (GLRaVs) on the cluster of red grape (photo: I. Mavrič Pleško)

Izmed virusov, ki so povezani z boleznijo zvijanja listov vinske trte sta GLRaV-1 in GLRaV-3 najpogostejša in najbolj razširjena virusa v Evropi (Martelli in sod., 2002; Sforza in sod., 2003). Pogosto se pojavljata v mešanih okužbah z drugimi GLRaV in tudi s preostalimi virusi vinske trte (Turturo in sod., 2005; Prosser in sod., 2007; Jooste in sod., 2015). V Sredozemlju okužbe vinske trte z GLRaV-3 povzročajo največjo škodo pri pridelavi grozdja (Cabaleiro in Segura, 2006; Douglas in Krüger 2008; Maree in sod., 2013).

Razumevanje vpliva teh virusov na rastline otežuje njihova kompleksnost in zelo raznolik fiziološki odziv rastlin na virusne okužbe (Balachandan in sod., 1997). GLD negativno vpliva na morfologijo in fiziološki odziv vinske trte. Kot že omenjeno se bolezenska znamenja v splošnem kažejo kot medžilne kloroze, rumenenja pri belih in rdečenje pri rdečih sortah vinske trte. Pozno poleti in jeseni je značilno tudi zvijanje listov (Korošec-Koruza, 1992; Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Naidu in sod., 2008; Martelli, 2014). Vse te spremembe na vinski trti so povezane z zmanjšanjem fizioloških procesov, kot so asimilacija CO₂, prevodnost listnih rež, transpiracija in število kloroplastov. Jagode na grozdih okuženih trt običajno dozorevajo počasneje in neenakomerno, posledica česar je manjši in manj kakovosten pridelek zaradi spremenjene vsebnosti sladkorjev, kislin, in fenolnih snovi ter obarvanosti jagod. S tem je zmanjšana kakovost grozdja, posledično pa vina in sadnih sokov (Cabaleiro in sod., 1999; Sampol in sod., 2003; Bertamini in sod., 2004; Tomažič in sod., 2005; Endeshaw in sod., 2014; Martelli, 2014).

Vinska trta je v razmerah *in vitro* modelni sistem preučevanja interakcij med virusom in vinsko trto brez bolezenskih znamenj in drugih vplivov okolja ali patogenov (Christov in sod., 2007). Pred skoraj dvema desetletjema niso našli razlik v fluorescenci klorofila a ali karotenoidih med zdravimi in z GLRaV-3 okuženimi trtami pri *in vitro* gojeni sorti 'Albariño' (González in sod., 1997), ravno tako ne v lončnem poskusu (Cabaleiro in sod., 1997), pri katerem ni bilo razlik v neto fotosintezi, transpiraciji in prevodnosti listnih rež. Pozneje so Hristov in Abrasheva (2001) dokazali manjšo fluorescenco klorofila a in karotenoidov pri *in vitro* gojeni sorti 'Cabernet sauvignon', okuženem z GLRaV-3. Manjša neto fotosinteza (tudi do 45 %, odvisno od starosti lista), prevodnost listnih rež ter vsebnost karotenoidov in fluorescenca klorofila so bile posledica okužbe vinske trte z GLRaV-1, -2 in -3 ter GLFV pri merjenju fizioloških procesov pri sorti 'Malvazija' v lončnih poskusih (Sampol in sod., 2003). Barba in sod. (1989) navajajo, da se bolezenska znamenja v razmerah *in vitro* ne razvijejo, čeprav je bila vsebnost GLRaV-3 v teh trtah 30-krat večja kakor pri trtah v vinogradu. Manjše aktivnosti fizioloških procesov so potrdili tudi pri okužbi z GLRaV-1 pri sorti 'Marzemino' v razmerah *in vitro* (Bertamini in sod., 2005).

Mnogokrat dobimo z laboratorijskimi raziskavami le delen vpogled v dejansko stanje procesov v rastlinah. V vinogradu na fiziološki odziv vinske trte na virusne okužbe vplivajo interakcije med starostjo trt, sorto in uporabljeno podlago ter ne nazadnje tudi gojenje trt (Cabaleiro in sod., 1999; Sampol in sod., 2003; Mannini in sod., 2012). Čeprav v lončnih poskusih niso izmerili sprememb neto fotosinteze pri kultivarju 'Albariño', pa so se razlike pokazale pri okuženih trtah na prostem. Neto fotosinteza je bila pri trtah, okuženih z GLRaV-3, manjša za od 53 do 65 % v primerjavi z neokuženimi (Cabaleiro in sod., 1997, 1999). Več ugotovitev raziskav o vplivu GLRaV-3 na fiziološke procese v vinski trti je predstavljenih v preglednici 2.

Pri sortah 'Albariño' (Cabaleiro in sod., 1997, 1999) in 'Malvazija' (Sampol in sod., 2003) so dokazali, da je bila neto fotosinteza v simptomatičnih trtah, okuženih z GLRaV-3, v primerjavi z okuženimi trtami brez bolezenskih znamenj manjša za od 48 do 59 %. Sklepamo lahko, da bolezenska znamenja pri okuženih rastlinah zmanjšajo intenziteto neto fotosinteze. Ugotovili so, da GLRV-3 zmanjšujejo fotosintezno delovanje že zgodaj spomladi, še pred pojavom bolezenskih znamenj (Mannini in sod. 1996, 1997; Guidoni in sod., 1997). Po drugi strani pa nekateri avtorji navajajo, da se fluorescenca klorofila a, neto fotosinteza in drugi fiziološki parametri med neokuženimi in z GLRaV-3 okuženimi trtami pred pojavom bolezenskih znamenj niso razlikovali (Gutha in sod., 2012). Ravno tako se v tem času ni razlikovala potencialna učinkovitost fotosistema II, PSII (Fv/Fm) in fluorescenca klorofila a med obravnavanima skupinama (Moutinho-Pereira in sod., 2012; Endeshaw in sod., 2014). Statistično značilno pa se je le-ta zmanjšala po pojavu bolezenskih znamenj (Gutha in sod., 2012; Endeshaw in sod., 2014).

Preglednica 2: Rezultati meritev fizioloških parametrov pri različnih sortah vinske trte cepljenih na različne podlage v vinogradih. Prikazana je primerjava med meritvami pri vinski trti okuženi z GLRaV-3 (samostojne ali v mešani okužbi z drugimi virusi) in z neokuženimi z GLRaV-3 v različnih raziskavah po svetu. Rezultati meritev so podani v %.

Table 2: Results of measured changes of physiological parameters in different cultivar – rootstock combinations of field grown grapevines. Results from different studies of grapevines infected with GLRaV-3 (alone or in mixed infection with other viruses) compared with those not infected with GLRaV-3 are presented. The values are presented as %.

S/P	Pn	E	g _s	Chl	Država	Vir
'Nebbiolo' A in B/Kober 5BB	↓30–50		↓20–60	ns	Italija	1
'Nebbiolo' 415/Kober 5BB	50				Italija	2
'Nebbiolo' 415/Kober 5BB	↓≤ 56				Italija	3
'Albariño'	↓26–65	↑19–0			Španija	4
'Albariño'/SO4 in 197-17C	↓40–50	ns	ns		Španija	5
Legrein/Kober 5BB	↓65	↓48	↓59	↓38	Italija	6
'Malvazija'			↓43,5	↓40,7	Španija	7
'Cabernet franc'/3309C	↓27–70	↓40	↓28–67	↓21–26	Michigan	8
Merlot				↓10,6–24,9	Washington	9

S/P – sorta/podlaga, Pn – neto fotosinteza ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), E – transpiracija ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s – prevodnost listnih rež ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), Chl – klorofil (mg m^{-2}), ↓ – zmanjšanje, ↑ – povečanje, ns – razlike niso bile značilne, – Manninni in sod., 1996; 2 – Manninni in sod., 1997; 3 – Guidoni in sod., 2000; 4 – Cabaleiro in sod., 1997; 5 – Cabaleiro in sod., 1999; 6 – Bertamini in sod., 2004; 7 Sampol in sod., 2003; 8 – Endeshaw in sod., 2014; 9 – Gutha in sod., 2012

Okužbe vinske trte z virusi skrajšujejo življenjsko dobo vinograda, povzročajo veliko zmanjšanje pridelka (v povprečju od 14 do več kot 40 %) in posledično veliko gospodarsko škodo, ki po nekaterih navedbah dosega (Credi in Babini, 1997; Martelli in sod., 2002; Endeshaw in sod., 2014; Martelli, 2014). Pomembno vlogo pri vplivu na fiziološke parametre in pridelek vinske trte imajo virus, različek ali izolat virusa ter sorta, podlaga in starost trt v vinogradu (Cabaleiro in sod., 1999; Kovacs in sod., 2001; Sampol in sod., 2003; Christov in sod., 2007; Rowhani in sod., 2015).

Po naših podatkih do zdaj v Sloveniji še ni bil ovrednoten vpliv GLRaV na žlahtno vinsko trto. Nekaj raziskav je bilo opravljenih le o vplivu GLRaV-1 na sorto 'Refošk', pri kateri so ugotovili, da GLRaV-1 zmanjšuje pridelek in vpliva na prerazporeditev polifenolov iz pečk v kožice, niso pa ugotovili vpliva na vsebnost antocianov v jagodah grozdja (Tomažič in sod., 2003). Kakovost grozdja je bila boljša pri trtah okuženih z GLRaV-1, verjetno tudi zaradi manjšega pridelka in posledično hitrejšega dozorevanja jagod okužene trte. GLRaV-1 ima na pridelek drugačen vpliv kot GLRaV-3 ali GLRaV-1 v mešani okužbi z GVA (Tomažič in sod., 2005).

2.2 Z ZVIJANJEM LISTOV VINSKE TRTE POVEZANI VIRUSI (GLRaV)

Nobena od znanih virusnih boleznih lesnatih rastlin nima tako velikega števila povzročiteljev kakor prav GLD. V zadnjih 30-tih letih so z uporabo najnovejših molekularnih metod okarakterizirali vse do zdaj znane GLRaV iz družine *Closteroviridae* (Martelli in sod., 2002; 2012).

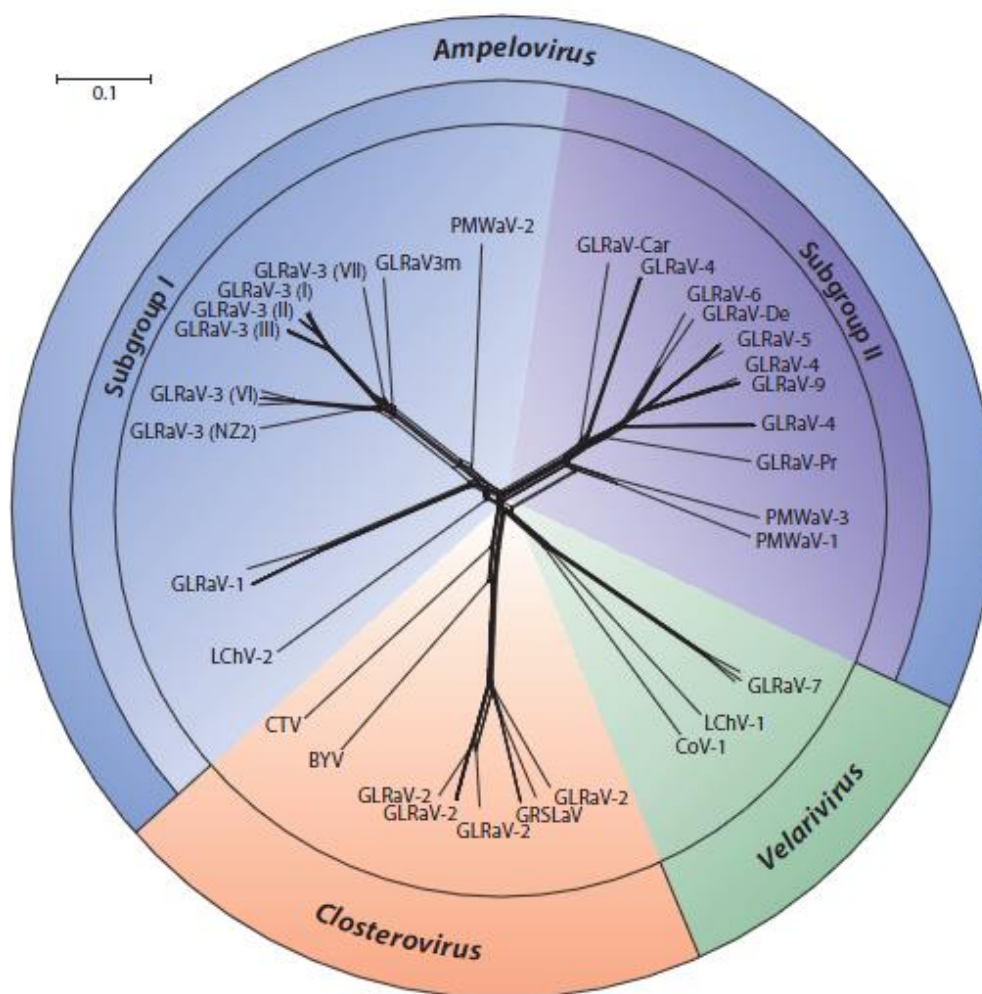
2.2.1 Taksonomska uvrstitev

2.2.1.1 Družina *Closteroviridae*

Virusi iz družine *Closteroviridae* imajo najdaljši genom med pozitivno usmerjenimi RNA-virusi (Fauquet in sod., 2005). Genom predstavnikov te družine je lahko monopartiten ali bipartiten, sestavljen iz linearne pozitivno usmerjene enoverižne RNA [ssRNA (+)]. Dolg je od 15.300 do 19.300 nm, ima premer okoli 12 nm in predstavlja od 5 do 6 % vse mase viriona. Virusne delce pogosto sestavljata dve vrsti plaščnih proteinov – CP (*angl.* coat protein), glavni CP in dodatni CP – CPm (*angl.* minor coat protein), ki enkapsidira od 600 do 700 nukleotidov na 5'-terminalnem delu genoma. Na tem delu genoma je navadno tudi kapa. Virusni omenjene družine na 3'-terminalnem delu genoma navadno oblikujejo zanke in psevdozel, ki je potreben za pomnoževanje, nimajo pa poliA-rep (Karasev, 2000; Peremyslov in sod., 2004; Satyanarayana in sod., 2004; Fauquet in sod., 2005).

Viruse družine *Closteroviridae*, ki okužujejo vinsko trto, delimo v tri rodove (slika 3): *Ampelovirus* (tipski predstavnik: GLRaV-3), *Closterovirus* (tipski predstavnik: virus rumenice pese – *Beet yellow virus*, BYV) in *Velarivirus* (tipski predstavnik: GLRaV-7). V rod *Closterovirus* uvrščamo GLRaV-2, novemu rodu *Velarivirus* pripada GLRaV-7, medtem ko so GLRaV-1, -3 in -4 uvrščeni v rod *Ampelovirus*.

Virusi rodov *Closterovirus*, *Ampelovirus* in *Velarivirus* so dolge nitaste oblike in se v največji meri nahajajo v floemu okuženih rastlin (Fauquet in sod., 2005). Danes je opisanih pet GLRaV, to so GLRaV-1, -2, -3, -4 in -7 (Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012; Martelli, 2012, 2014). Do nedavnega je bil med GLRaV uvrščen tudi GLRaV-8, vendar se je pokazalo, da ni virusnega izvora. Na podlagi nukleotidnega zaporedja virusa so ugotovili, da je ta bolj podobna nukleotidnemu zaporedju žlahtne vinske trte (*V. vinifera*), zato so ga izločili iz skupine virusov (Bertsch in sod., 2009).



Rodovi in podskupini so označeni. Ime skupine ali izolata GLRaV-3 je navedeno v oklepaju. Predstavljeni virusi oziroma različki: z zvijanjem listov vinske trte povezani virusi (GLRaV)-1, -2, -3, -3m, -4, -5, -6, -7, -9, -De, -Car in -Pr; virus majnih češenj (LChV)-1 in -2; s kaparji in uvelostjo ananasa povezan virus (PMWaV)-1, -2 in -3; virus 1 kijeveke (CoV-1); Grapevine rootstock stem lesion-associated virus (GRSLaV); virus rumenice pese (BYV) in virus tristeza citrusov (CTV)

Slika 3: Filogenetsko drevo virusov iz družine *Closteroviridae*, ki okužujejo vinsko trto, izdelano na podlagi gena HSP70h (Naidu in sod., 2015: 615)

2.2.1.1.1 Rod *Ampelovirus*

Rod *Ampelovirus* delimo na podlagi najnovejše taksonomije v dve podskupini (Martelli, 2012), in sicer sta GLRaV-1 in GLRaV-3 uvrščena v podskupino I, GLRaV-4 in njegovi različki pa v podskupino II.

Do nedavnega so bili GLRaV-4, -5, -6, -9, -Car, -De in -Pr samostojni virusi uvrščeni v rod *Ampelovirus*. Pri teh virusih je serološko testiranje v preteklosti privedlo do delitve virusov v navidezne vrste (Weber in sod., 2002; Gugerli, 2009). V raziskavi Besse in sod. (2009) so ugotovili, da so protitelesa za detekcijo GLRaV-4 in GLRaV-5 navzkrižno reagirala tudi z GLRaV-6, -7 in -9, kar je nakazovalo na možnost, da gre za sorodne vrste znotraj rodu

Ampelovirus. Te ugotovitve so bile podprte tudi z molekularnimi metodami (Maliogka in sod., 2009; Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012; Thompson in sod., 2012). Raziskave so na podlagi celotnih nukleotidnih zaporedij genomov GLRaV-4, -5, -6, -9 in -De pokazale veliko sorodnost med njimi (Gugerli 2009; Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012; Martelli in sod., 2012; Thompson in sod., 2012) in zato je bil podan predlog za njihovo združitve v eno vrsto imenovano GLRaV-4 z več različki (različek 5, 6, 9, Car in Pr) (Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012; Martelli in sod., 2012; Thompson in sod., 2012).

Reorganizacija rodu *Ampelovirus* je temeljila na determinacijskih pogojih uvrstitve virusov v rod *Ampelovirus* znotraj družine *Closteroviridae* (Martelli in sod., 2012):

- velikost virusnih delcev,
- struktura in organizacija genoma,
- velikost CP,
- več kot 75 % podobnost aminokislinskega zaporedja CP in HSP70h,
- serološka specifičnost z uporabo diskriminatornih monoklonskih ali poliklonskih protiteles,
- vrste prenašalcev in specifičnost,
- gostiteljske vrste in bolezenska znamenja.

2.2.2 Struktura in organizacija genoma GLRaV

Raznolikost GLRaV se kaže v velikosti, strukturi in organiziranosti genoma (slika 4; Naidu in sod., 2015). Podobno kakor drugi virusi omenjene družine imajo tudi GLRaV blok genov za pomnoževanje RGB (*angl.* replication gene block), ki je odgovoren za pomnoževanje. RGB pokriva 5'-terminalni del genoma in je sestavljen iz s pomnoževanjem povezanih proteinov AlkB, ene ali dveh papainu podobnih proteaz – L-Pro (*angl.* papain-like leader protease), metiltransferaze – MET (*angl.* methyltransferase), helikaze – HEL (*angl.* helicase), in od RNA odvisne polimeraze RNA – RdRp (*angl.* RNA-dependent RNA polymerase). Petdelni blok genov QGB (*angl.* quintuple gene block) je značilen za vse GLRaV in je pomemben za medcelično premikanje. Sestavljajo ga protein 6-kDa (p6 ali njegovi homologi), homolog 70-kDa proteina toplotnega šoka – HSP70h (*angl.* 70-kDa heat-shock protein homolog), protein 60-kDa (p55 ali njegovi homologi), CP in CPm oziroma p23 (pri GLRaV-4) (Dolja in sod., 2006; Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012; Maree in sod., 2013; Martelli in sod., 2012; Thompson in sod., 2012). Virusi iz družine *Closteroviridae* so edini, ki kodirajo HSP70h (Maliogka in sod., 2008).

2.2.2.2 Rod *Closterovirus*

Genom je monopartiten, dolg od 15.500 do 19.300 nukleotidov. Genom GLRaV-2 je dolg 15.528 nukleotidov in vsebuje osem ORF. Struktura genoma GLRaV-2 je enaka tipskemu predstavniku rodu *Closterovirus*, BVY (Zhu in sod., 1998; Martelli in sod., 2002; Fauquet in sod., 2005).

2.2.2.3 Rod *Velarivirus*

Genom je monopartiten, dolg od 15.500 do 19.300 nukleotidov. Genom GLRaV-7 meri v dolžino 16.496 nukleotidov in je sestavljen iz deset ORF (Martelli in sod., 2002, 2012; Fauquet in sod., 2005; Al Rwahnih in sod., 2012).

2.2.3 Genetsko spreminjanje in genetska raznolikost

Virusi so mikroskopsko majhni povzročitelji bolezni, ki se nahajajo v živih in se ne morejo samostojno razmnoževati. Preživijo le tako, da s pomočjo prenašalca okužijo gostiteljsko celico in izrabijo njen metabolni aparat za sintezo novih virusnih delcev.

RNA-virusi se zelo hitro spreminjajo oziroma so genetsko raznoliki predvsem zaradi manjše natančnosti pomnoževanja RNA-polimeraze in neučinkovitosti oziroma odsotnosti popravljalnih mehanizmov. Razlog so tudi kratki generacijski časi, hitro pomnoževanje in zato veliko število virusov v okuženem organizmu (Jerman in Štern, 1999). Populacije RNA in drugih virusov so posledično genetsko heterogene.

V vinski trti je lahko hkrati več različnih GLRaV in/ali njihovih različkov. Te mešane okužbe so posledica nenehnega, več stoletnega vegetativnega razmnoževanja trte ter cepljenja različnih sort in podlag (Prosser in sod., 2007; Fuchs in sod., 2009).

Genetsko spreminjanje virusov povzroča spremenljivost znotraj vrste, pri tem pa igra pomembno vlogo tudi naravni izbor oziroma selekcija. Najpogostejši genetski spremembi pri virusih sta mutacija (sprememba virusnega genetskega materiala) in rekombinacija (izmenjava genetskega materiala med sorodnima virusoma ali genotipskima variantama istega virusa) (Jerman in Štern, 1999). Naravna selekcija vpliva na genetsko strukturo populacije, ki je opredeljena kot proces, v katerem določene lastnosti omogočajo posamezniku, da v določenem okolju lažje preživi in se razmnožuje. Z mutacijo se povečuje spremenljivost populacije in posledično povečuje njena zmožnost prilagoditi se na spremembe v okolju (Okasha, 2008). O verjetnosti za ohranitev mutacije odloča zlasti njen fenotipski učinek, ki bodisi zvišuje zmogljivost organizma za prilagoditev okolju (ugodna oziroma pozitivna selekcija), jo ohranja (nevtralna selekcija) ali jo zmanjšuje (neugodna oziroma negativna selekcija). Ni znano, koliko je neugodnih mutacij, saj se s

selekcijo zaradi onemogočene replikacije ali širjenja virusa izločijo iz populacije (Jerman in Štern, 1999). Do sedaj še niso odkrili, da bi bila vinska trta odporna na GLRaV (Oliver in Fuchs, 2011). Domnevajo, da se GLRaV ohranjajo, ne da bi bili pod vplivom naravne selekcije ali pod vplivom t. i. ozkega grla. Potomce virusov, ki so znotraj rastline, in se genetsko razlikujejo, imenujemo genotipski različki. Ti s svojimi predniki tvorijo t. i. kvazivrste (*angl.* quasispecies). Kvazivrste so torej skupina virusov s skupnim izvorom, ki imajo zaradi mutacije, vpliva selekcije ali genskega zdrsa različna nukleotidna zaporedja genomov. GLRaV so zato skupina različnih, vendar tesno povezanih virusov (Naidu in sod., 2014). Tako je v eni vinski trti lahko mnogo izolatov ali različkov GLRaV (Smith in sod., 1997; Domingo in sod., 2006; Luring in Andino, 2010). Evolucija virusov ni odvisna samo od spreminjanja genoma, ampak tudi od kultivarja in od prenašalcev GLRaV, kaparjev (Naidu in sod., 2014).

V prosto dostopni zbirki podatkov GenBank so na voljo celotna nukleotidna zaporedja genomov skoraj vseh znanih GLRaV. Sorodnost GLRaV temelji na molekularni raznolikosti RdRp, HSP70h in CP. Gen HSP70h so do sedaj našli le pri virusih družine *Closteroviridae* (Dolja in sod., 2006). Raziskovalci poročajo o genetski raznolikosti GLRaV-1 in GLRaV-3 na podlagi celotnih ali delnih zaporedij genov ali genomov. Obstoj gensko različnih, vendar tesno povezanih različkov so dokazali v več vinorodnih deželah (Turturo in sod., 2005; Alabi in sod., 2011; Bester in sod., 2012; Chooi in sod., 2013; Goszczynski 2013; Jooste in sod., 2015).

Trenutno je v zbirki GenBank objavljeno le eno celotno nukleotidno zaporedje GLRaV-1 (JQ023131). Zaradi pomanjkanja zaporedij celotnih genomov je večina filogenetskih analiz GLRaV-1 narejenih na podlagi delnih ali celotnih zaporedij posameznih genov. Prva raziskava je bila narejena pred desetletjem na izolatih iz Češke in Slovaške (Kominek in sod., 2005), pozneje pa še na izolatih iz ZDA (Alabi in sod., 2011), Portugalske (Esteves in sod., 2013) in zadnja na kitajskih izolatih (Fan in sod., 2015). Kominek in sod. (2005) so na podlagi 540 bp dolgega odseka na genu HSP70h razporedili izolate v dve skupini. Eno so poimenovali skupina E in je združevala izolate iz Evrope, drugo pa skupina A, pri čemer so vanjo uvrščeni izolati iz Amerike in Avstralije. Rezultat kasnejših filogenetskih analiz, ki so vključevale različne gene (CP, CPd2, HSP70h in p24) in več izolatov GLRaV-1 iz različnih držav (Češka, Kanada, Kitajska, Portugalska in ZDA - Kalifornija, New York, Washington) so bila drevesa s podobno topološko strukturo. Z analizami gena HSP70h so potrdili tri (Alabi in sod., 2011) ali sedem (Fan in sod., 2015) filogenetsko različnih skupin. Na podlagi CP pa celo osem skupin (Esteves in sod., 2013). Razvejanost filogenetskega drevesa je odvisna od števila in izvora izolatov vključenih v raziskavo in lahko tudi od avtorjevega subjektivnega deljenja oziroma združevanja manjših podskupin v večje filogenetske enote.

Genetska raznolikost GLRaV-3 je bolje raziskana, saj je v GenBank na voljo tudi več zaporedij iz različnih delov sveta. Kljub temu je za HSP70h na voljo precej manj zaporedij kot za CP. Na osnovi analize gena HSP70h so Fuchs in sod. (2009) identificirali pet skupin, kar so potrdili tudi raziskovalci iz Južne Afrike (Jooste in sod., 2010). Maree in sod. (2015) so izolate GLRaV-3 na osnovi zaporedja za CP gen uvrstili v osem skupin, označenih z rimskimi številkami od I do VIII. V okviru svojega dela so identificirali tudi dve novi skupini, skupino VII in skupino VIII. Vse skupine so združili v štiri nadskupine. V nadskupino A so povezali skupine od I do V, v nadskupino B skupino VI in njej podobne nerazvrščene izolate, v nadskupino C izolate skupine VII in v nadskupino D izolate skupine VIII. Zaradi vse večjega števila objavljenih nukleotidnih zaporedij izolatov GLRaV-3 in posledično večjega števila skupin Maree in sod. (2013) predlagajo, da se v filogenetska drevesa za vsako genetsko skupino vključi nukleotidna zaporedja celotnih genomov tipskih izolatov (preglednica 3). Na ta način bi vse filogenetske analize tega virusa bile standardizirane in med seboj lažje primerljive.

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja celotnih genomov tipskih izolatov GLRaV-3 za vsako genetsko skupino po predlogu Maree in sod. (2015)

Table 3: Whole genome sequences of GLRaV-3 isolates for each genetic group as suggested by Maree et al. (2015)

Skupina	GenBank Aks. št.	Izolat/različek	Država izvora
I	GQ352631	621	J. Afrika
I	GU983863	WA-MR	ZDA
II	EU259806	GP18	J. Afrika
II	GQ352632	623	J. Afrika
III	GQ352633	PL-20	J. Afrika
III	JQ423939	LN	Kitajska
VI	JQ655295	GH11	J. Afrika
VI	JQ655296	GH30	J. Afrika
VI	JQ796828	clone 3	ZDA: Kalifornija

2.2.4 Prenos GLRaV in širjenje po rastlini

Vinska trta (*Vitis* spp.) je veljala za edino gostiteljsko rastlino GLRaV (Almeida in sod., 2013), vendar so nedavno našli GLRaV-1 tudi v granatnem jabolku (*Punica granatum* L.) v Turčiji (Çağlayan in sod., 2015). Ti virusi se prenašajo primarno z okuženim sadilnim materialom, cepljenjem trte in okuženimi cepiči, sekundarno pa s kaparji (Coccidae in Pseudococcidae) (Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Martelli in sod., 2002). Prenos s kaparji dodatno poveča možnosti za mešane okužbe (Rubio in sod., 2013), ki so precej bolj uničujoče kakor okužbe s samo enim virusom.

GLRaV se na splošno ne prenašajo mehansko, z mehansko inokulacijo ali semenom (Martelli in sod., 2002; Martelli, 2014), izjemi med obravnavanimi virusi sta le GLRaV-2 in GLRaV-7, ki nimata znanih naravnih prenašalcev (Martelli, 2014). Za GLRaV-2 je znano, da se lahko prenaša z mehansko inokulacijo, medtem ko se GLRaV-7 lahko prenaša s predenico. Navadna predenica (*Custuta europaea* L.) in vrsta *C. reflexa* Roxb. lahko v kontroliranih razmerah preneseta GLRaV-7 na novozelandsko plazečo špinačo (*Tetragonia expansa* [Pallos] Kuntze) in *Nicotiano occidentalis* H.-M.Wheeler (Martelli, 2014).

Prvi zapisi o prenosu virusov s kaparji v vinogradu segajo v zgodnja 80. leta prejšnjega stoletja (Dimitrijevic, 1973). Po do zdaj znanih podatkih GLRaV prenašajo *Ceroplastes rusci* L., *Coccus hesperidum* L., *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon), *Parthenolecanium corni* (Bouche.), *Pulvinaria vitis* (L.) (vsi družina Coccidae) ter vrste *Heliococcus bohemicus* Sulc, *Phenacoccus aceris* Signoret, *Planococcus citri* Risso, *Planococcus ficus* Signoret, *Pseudococcus affinis* Maskell, *Pseudococcus calceolariae* Maskell, *Pseudococcus comstocki* Kuwana, *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti, *Pseudococcus maritimus* Ehrhorn in *Pseudococcus viburni* Signoret (vsi družina Pseudococcidae) (preglednica 4; Sim in sod., 2003; Mahfoudhi in sod., 2009; Tsai in sod., 2010; Martelli, 2014).

Preglednica 4: Z zvijanjem listov vinske trte povezani virusi in njihovi prenašalci (Sim in sod., 2003; Mahfoudhi in sod., 2009; Tsai in sod., 2010; Martelli, 2014)

Table 4: Grapevine leafroll-associated viruses in their vectors (Sim et al., 2003; Mahfoudhi et al., 2009; Tsai et al., 2010; Martelli, 2014)

Vrsta kaparja	GLRaV-1	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-4 različek 5	GLRaV-4 različek 6	GLRaV-4 različek 9
Coccidae	<i>Ceroplastes rusci</i>		●	●		●
	<i>Coccus hesperidum</i>		●			
	<i>Neopulvinaria innumerabilis</i>	●	●			
	<i>Parthenolecanium corni</i>	●	●			
	<i>Pulvinaria vitis</i>	●	●			
Pseudococcidae	<i>Heliococcus bohemicus</i>	●	●			
	<i>Phenacoccus aceris</i>	●	●	●	●	●
	<i>Planococcus citri</i>		●			
	<i>Planococcus ficus</i>	●	●	●	●	●
	<i>Pseudococcus affinis</i>		●			
	<i>Pseudococcus calceolariae</i>		●			
	<i>Pseudococcus comstocki</i>		●			
	<i>Pseudococcus longispinus</i>		●		●	●
	<i>Pseudococcus maritimus</i>		●			

Prenos virusov je odvisen od vrste kaparja in od virusa ozizoma njegovega različka (Tsai in sod., 2010; Le Maguet in sod., 2012). Kaparji iz rodov *Helicococcus*, *Phenacoccus*, *Planococcus*, *Pseudococcus* (vsi *Pseudococcidae*) ter *Pulvinaria*, *Neopulvinaria*, *Parthenolecanium*, *Coccus* in *Ceroplastes* (vsi *Coccidae*) so znani prenašalci GLRaV-1, -3 in -4 (Sim in sod., 2003; Martelli in sod., 2012; Tsai in sod., 2010). Kaparji se z virusi okužijo že po prvem hranjenju, nato pa jih prenašajo semiperzistentno, kar pomeni, da so sposobni prenosa virusa le od nekaj minut do nekaj dni (Krüger in sod., 2015). Kot prenašalci lahko v manj kot desetletju okužijo celotne vinograde (Cabaleiro in Segura, 2006; Le Maguet in sod., 2012).

GLRaV se po okužbi v vinski trti razširijo po vseh njenih nadzemnih in podzemnih organih. Med rastlinskimi celicami se premikajo s pomočjo HSP70h in CP (Maliogka in sod., 2008) ter so po rastlini razporejeni neenakomerno (Monis in Bestwick, 1996). Razlog naj bi bilo počasno pomnoževanje in širjenje virusa po rastlini. V splošnem je koncentracija GLRaV v vinski trti majhna. S časom pa narašča, zato je večja v starejših kakor v mlajših listih, kar se kaže tudi v izrazitosti bolezenskih znamenj (Tsai in sod., 2012).

Povečanje števila kaparjev, predvsem prenašalcev dveh najbolj razširjenih virusov po svetu, GLRaV-1 in GLRaV-3, lahko povzroči veliko škodo v vinogradništvu. V slovenskih vinogradih sta prisotna GLRaV-1 in GLRaV-3 (Tomažič in sod., 2005; Čepin, 2011), pa tudi njuni prenašalci kaparji (Seljak, 2010). Ti imajo pomembno vlogo pri učinkovitem širjenju virusnih okužb v sosednjih državah (Belli in sod., 1994; Zorloni in sod., 2006; Credi in sod., 2009; Bertin in sod., 2010; Le Maguet in sod., 2012), zelo malo pa vemo o njihovi razširjenosti in vlogi pri prenosu virusov v slovenskih vinogradih. Iz literature namreč vemo, da nekatere vrste v eni državi uspešno prenašajo en virus, v drugi državi pa drugega (Mavrič Pleško in sod., 2011; Zorloni in sod., 2006). Predvsem v primeru GLRaV se tudi ne ve, ali je uspešnost prenosa virusa s kaparji odvisna od skupine, v katero je izolat virusa uvrščen. Zato je pomembno, da študije prenosov GLRaV opravljamo z lokalnimi populacijami prenašalcev in virusov. Le na tak način lahko dobimo podatke, ki jih lahko uporabimo za oceno tveganja širjenja okužbe v državi.

2.2.5 Omejevanje širjenja okužbe

Z izmenjavo rastlinskega materiala med državami se je povečala tudi izmenjava z virusi okuženih rastlin (Rowhani in sod., 2005). To je povzročilo globalno širitev GLD. Do danes še niso našli vinske trte odporne proti tej bolezni (Oliver in Fuchs, 2011), zato je pomembno testiranje vinske trte zaradi ugotavljanja morebitnih virusov v sklopu zdravstvene selekcije.

Virusi se največ in najuspešneje prenašajo s sadilnim materialom. Zaradi številnih nejasnih bolezenskih znamenj in latentnih okužb, je preverjanje in testiranje matičnih trt izjemno pomembno. Z velikim napredkom metod, ki omogočajo identifikacijo novih virusov, se seznam novo odkritih virusov daljša. Zato lahko govorimo o nikoli končani zgodbi zdravstvene selekcije (Korošec-Koruza in Tomažič, 2002).

Glavni namen in cilj selekcijskega dela pri gojenju vinske trte je pridobitev potrjenih matičnih rastlin in zagotavljanje cepilnega materiala ustrezne genetske in zdravstvene vrednosti za pridelavo kakovostnega sadilnega materiala v domačih trsnicah. V Sloveniji poteka selekcija vinske trte po priporočilih mednarodnih organizacij EPPO (*angl.* European and Mediterranean Plant Protection Organization), OIV (*angl.* Office International de la Vigne et du Vin) in ICVG (*angl.* International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine), opredeljena pa je tudi s predpisi Evropske zveze (EZ). Z osnovno (pozitivno množično) selekcijo pridobivamo potrjene matične trte za pridelavo standardnega cepilnega materiala. Hkrati odkrivamo nadpovprečne matične trte, ki jih vključujemo v nadaljevalno klonsko selekcijo. Klonski kandidati morajo biti brez vseh bolezni vinske trte (virusi, fitoplazme, bakterije), kar je opredeljeno v normativih (Koruza in sod., 2003). Najpomembnejše je testiranje trsov znotraj zdravstvene selekcije klonov in uporaba zdravega, brezvirusnega sadilnega materiala (Urek in Hržič, 1998). Virusnim okužbam smo začeli posvečati več pozornosti šele po letu 1962. Med letoma 1968 in 1973 so v Sloveniji na podlagi ameriškega projekta pregledali 750.000 trsov (Hrček, 1973). V letih 1984 in 1988 so obsežno testirali lokalne sorte vinorodne Primorske ('Refošk', 'Rebula') in stare klonske linije iz Podravja. V letu 1988 se je začela obsežneje uporabljati serološka metoda (ELISA) pri določanju in odkrivanju okužb z virusi za trte v programu klonske selekcije (Korošec-Koruza in Tomažič, 2002).

S Pravilnikom o trženju materiala za vegetativno razmnoževanje trte (2004) je predpisano obvezno testiranje trt, kandidatk za izvirne matične rastline, in sicer na GLRaV-1, -2, -3 in -4, ArMV, GFLV, GFkV, GVA, GVB, RpRSV, TBRV in ToRSV (Pravilnik o trženju ..., 2004).

Pridelava in uporaba klonsko selekcioniranega in zdravstveno pregledanega razmnoževalnega materiala je uspešna in edina preventivna metoda, ki je na voljo pri nadzoru te bolezni (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Okužbo znotraj vinograda pa lahko nadzorujemo oziroma omejimo s poznavanjem in obvladovanjem njihovih prenašalcev.

Virusi se s pomočjo kaparjev zelo hitro širijo in lahko v le nekaj letih okužijo celotne vinograde. Raziskave v okuženih vinogradih so pokazale, da je vsako leto v povprečju okuženih okoli 10 % več trt kakor v predhodnem letu (Cabaleiro in Segura, 1997; Krake in

sod., 1999; Cabaleiro in sod., 2008; Golino in sod., 2008; Gribaudo in sod., 2009; Le Maguet in sod., 2013).

Z virusi okužene trte ne moremo ozdraviti, zato je za preprečitev širjenja boleznih potrebna odstranitev vseh okuženih trt v vinogradu (Pietersen in sod., 2013). Odstraniti je treba celotno trto, vključno s koreninami. Te so lahko vir okužbe še vsaj eno leto po odstranitvi nadzemnega dela in tako mogoči vir za prenos virusov s kaparji. Pomembno je, da nove zdrave rastline posadimo v zemljo, ki ne vsebuje ostankov predhodne okužene rastline ali prenašalcev virusov (Bell in sod., 2009, Pietersen in Walsh, 2012). Brezvirusne rastline lahko pridobimo z metodami, kot so toplotna terapija, embriogeneza in kulture meristemov (Almeida in sod., 2013).

Poleg prej naštetih ukrepov se širjenje boleznih najlažje in najučinkoviteje omeji z zatiranjem prenašalcev, kaparjev (Almeida in sod., 2013). Zatiranje kaparjev z insekticidi in omejevanje širjenja virusov s tretiranjem ostankov korenin vinske trte s herbicidi se je pokazalo za učinkovito. Vendar pa kljub uporabi herbicidov ne moremo zagotoviti popolne odstranitve ostankov delcev korenin in virusov (Pietersen in sod., 2013).

V splošnem se za omejevanje širjenja okužbe najpogosteje uporabljajo insekticidi, vendar ti negativno vplivajo na naravne sovražnike. Z nepravilno in prepogosto rabo fitofarmaceutskih sredstev se lahko povzroči odpornost kaparjev proti insekticidom, zato moramo nameniti večjo pozornost okoljsko sprejemljivejšim načinom zatiranja teh škodljivcev.

V veljavo prihajajo naravi prijaznejše metode zatiranja škodljivih organizmov, t. i. biotično varstvo. Glavni cilj tega varstva rastlin je oblikovanje naravnega ravnotežja med škodljivci in njihovimi naravnimi sovražniki, tako pa preprečitev močnejše prerazmnožitve škodljivcev (Vrabl, 1990). Biotično varstvo rastlin vključuje plenilce in parazitoide, ki so naravni sovražniki kaparjev in lahko občutno zmanjšajo njihovo populacijo. Naravni sovražniki (Štrukelj in sod., 2012) so navadno škodljivi le nimfam, občasno jajčecem, ptice pa se hranijo tudi z odraslimi kaparji in njihovimi jajčeci. V Sloveniji biotično zatiranje kaparjev še ni dobro raziskano, čeprav se je pri nekaterih kaparjih v srednji Evropi pokazalo za uspešno (Kosztar in Kozar, 1988). Največ tovrstnih raziskav je bilo doslej narejenih v Južni Afriki (Walton in Pringle, 2004a, 2004b), Ameriki (Triapitsyn in sod., 2006) ter v Argentini in Iranu (Walton in Pringle, 2004a, 2004b).

2.3 KAPARJI VINSKE TRTE

S povečanim pretokom trgovanja z rastlinami se povečuje vnos žuželk in drugih organizmov v njim tujerodno okolje. V zadnjih nekaj desetletjih smo v Sloveniji zaznali povečanje števila tujerodnih organizmov (Seljak, 2011), med katere spadajo tudi vse bolj razširjeni kaparji.

Kaparji so tujerodne fitofagne žuželke, ki jih sistematično uvrščamo v red polkrilcev (Hemiptera), čeprav so bili do nedavnega uvrščeni v red enakokrilec (Homoptera), in v naddružino Coccoidea, ki vsebuje 48 družin (Ben-Dov in sod., 2012). Vrsto najštevilnejše so tri družine, in sicer Diaspididae (2479 vrst), Pseudococcidae (2231 vrst) in Coccidae (1133 vrst) (Ben-Dov in sod., 2012).

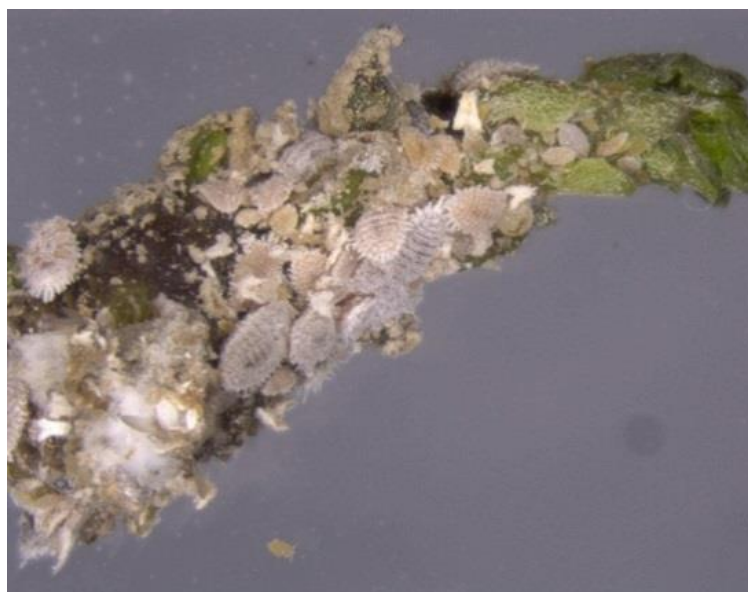
V Sloveniji so bili doslej potrjeni predstavniki iz devetih družin, in sicer skupaj 101 vrsta kaparjev (Seljak, 2010). Na različnih gostiteljskih rastlinah je bilo v Sloveniji potrjenih 43 vrst iz družine Diaspididae, 26 vrst iz družine Coccidae in 18 vrst iz družine Pseudococcidae. V slovenskih vinogradih so bili do zdaj najdeni predstavniki dveh družin kaparjev (Seljak, 2010; Štrukelj in sod., 2015), to so veliki trtni kapar (*N. innumerabilis*), navadni trtni kapar (*P. vitis*), češpljev kapar (*P. corni*) iz družine Coccidae in smokvin volnati kapar (*P. ficus*) iz družine Pseudococcidae.

Vrsti *P. vitis* in *P. corni* sta razširjeni po vsej Sloveniji, vrsta *N. innumerabilis* pa za zdaj le v vinogradih na Primorskem. Vrsta *P. ficus* je tropskega oziroma subtropskega izvora, zastopana zgolj v zavarovanih prostorih, zato so o njeni škodi v Sloveniji le redko poročali (Seljak in Žežlina, 2007). Poleg naštetih je na vinski trti gospodarsko škodljiv in potencialni prenašalec virusov (Fortusini in sod., 1997) kapar *Parthenolecanium persicae* Fabricius (Pellizzari, 1997), vendar ga pri nas na tej rastlinski vrsti še niso potrdili (Seljak, 2010), našli pa so ga leta 2006 na vinski trti v Istri na Hrvaškem (Masten-Milek in sod., 2007).

2.3.1 Morfologija in razvojni krog družine Pseudococcidae

Družina Pseudococcidae je zelo raznovrstna. Odrasle samice so sive, rožnate ali najpogosteje rumenkaste barve, odvisno od vrste. Telo je iz desetih segmentov, navadno ovalne oblike, z dvema paroma dihalnih odprtin (McKenzie, 1967), s cerariji. Cerariji so strukture nameščene ob robu vzdolž hrbtne strani telesa, sestavljene iz por in set. Ti so včasih tudi sklerotizirani, prav tako analni obroč s šestimi ali več setami, ki je na zadnjem segmentu. Tipalke so iz od dveh do devetih segmentov, oči so kupolaste ali pa jih sploh ni (Kosztarb in Kozar, 1988).

Predstavniki družine Pseudococcidae (slika 5) se zaščitijo z voščenim poprhom, ki ga izločajo na hrbtni strani telesa. Odrasle samice te družine prepoznamo po vulvi, ki jo imajo na trebušni strani med osmim in devetim telesnim segmentom (Kosztarb in Kozar, 1988). Jajčeca izlegajo v jajčno vrečko iz voščениh niti, ki so podobne barve kakor samica. Jajčeca so ovalna, rumenkasta, dolga okoli 0,5 mm ter široka med 0,2 in 0,3 mm. Novo izlegle nimfe še ne izločajo voščenege poprha. Če jih ne opazujemo pod mikroskopom, jih lahko velikokrat spregledamo. Na prvi pogled so zelo podobne jajčecem, le da imajo par majhnih oči, dobro razvite dolge noge in šestčlenaste tipalke. Spol se na tej razvojni stopnji ne da določiti (slika 5). Nimfe samic druge razvojne stopnje se od prve razlikujejo le po nekaj že razvitih tubularnih cevkah na obeh straneh telesa in odprtini na zadnjem koncu hrbtne strani. Ta je zastopana pri večini primerkov. Nimfe samic tretje razvojne stopnje imajo razvitih še več por in cevok, odprtina na zadnjem delu je razvita, prav tako dodaten segment na tipalkah, vendar eden manj kakor pri odraslih osebkih.



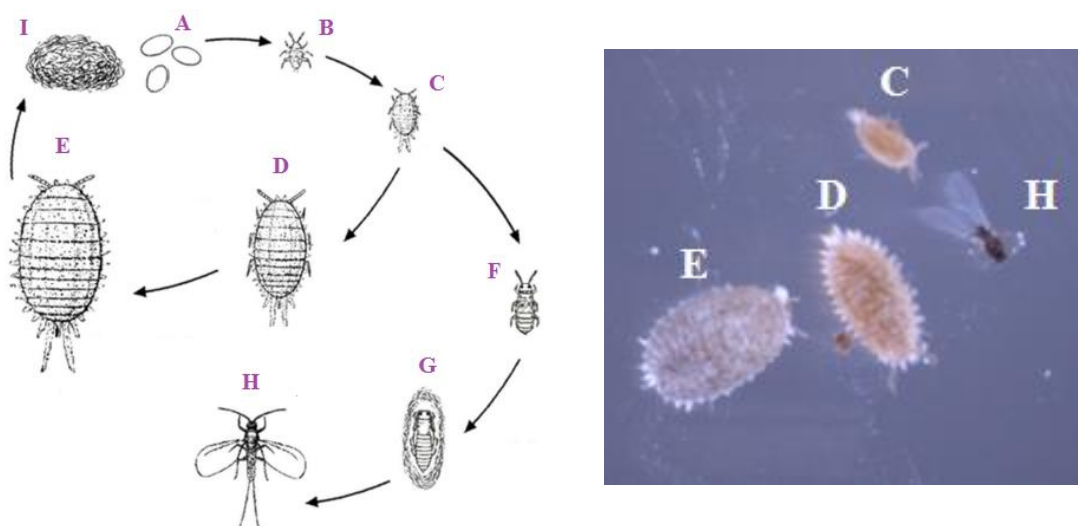
Slika 5: Kaparji družine Pseudococcidae različnih razvojnih stopenj na krompirjevem kalčku (foto: M. Štrukelj)

Figure 5: Different development stages of the family Pseudococcidae on potatoes sprout (photo: M. Štrukelj)

Samci se na prvi nimfalni stopnji ne razlikujejo od samic. Zelo so jim podobni tudi na drugi razvojni stopnji, vendar tu že zaznamo razlikovanje oziroma dimorfizem. Razvije se jim več cevok in dodaten člen na tipalkah. Pri tretji nimfalni stopnji samcev (predbubi) se noge in tipalke zmanjšajo. Imajo le še nekaj kratkih set in kratke zasnove kril. Pri stadiju bube se jim podaljšajo osnove kril, deseti segment telesa sklerotizira, delno pa otrdi tudi predel glave in trupa. Telo odraslega samca je podolgovato vretenasto. Navadno ima dobro razvit par kril na mezotoraksu, dva para enostavnih oči in par lateralnih ocelijev. Tipalke in

noge so dolge s številnimi setami. Znane so najmanj štiri oblike odraslih samcev: krilati, nekrilati, z reduciranimi krili ali telesom, ki spominja na nimfo (Kosztarb in Kozar, 1988).

Samica proti koncu maja in v začetku junija izleže v jajčno vrečko več kot 1800 jajčec, iz katerih se v od treh do šestnajstih dneh razvijejo nimfe. Sprva se aktivno premikajo in iščejo najustreznejše mesto za prehranjevanje. Nimfe druge razvojne stopnje se preselijo v razpoke na veje in debla gostiteljskih rastlin. Tam zbrane v majhnih voščenih kokonih prezimijo (Kosztarb in Kozar, 1988). V tem času lahko preidejo v stadij mirovanja jajčeca, mlade nimfe in odrasle samice (Miller, 2005). Spomladi se nimfe in odrasle samice hranijo na deblih in vejah (Kosztarb in Kozar, 1988).



A – jajčeca; B – nimfa prve stopnje; C – nimfa druge stopnje; D – nimfa tretje stopnje; E – odrasla samica; F – predbuba; G – buba, H – odrasel samec; I – jajčna vrečka

Slika 6: Razvojni krog kaparjev družine Pseudococcidae (Sharon in sod., 2013 [levo] in foto: M. Štrukelj [desno])

Figure 6: Life cycle of the mealybugs of the family Pseudococcidae (Sharon et al., 2013 [left] and photo: M. Štrukelj [right])

Predstavniki družine Pseudococcidae imajo v Evropi na prostem navadno od enega do tri rodove letno, v zavarovanih prostorih pa celo od šest do osem. Nekatere vrste te družine se lahko razmnožujejo partenogenetsko (McKenzie, 1967; Kosztarb in Kozar, 1988). Večina kaparjev omenjene družine, ki živijo na vinski trti, lahko sklene razvojni krog v celoti na tej gostiteljski rastlini (Walton in Pringle, 2004b).

2.3.1.1 Smokvin volnati kapar (*Planococcus ficus* Signoret)

Kraljestvo:	Animalia
Podkraljestvo:	Bilateria
Deblo:	Arthropoda
Razred:	Insecta
Red:	Hemiptera
Podred:	Sternorrhyncha
Družina:	Pseudococcidae
Rod:	<i>Planococcus</i>
Vrsta:	<i>Planococcus ficus</i> Signoret

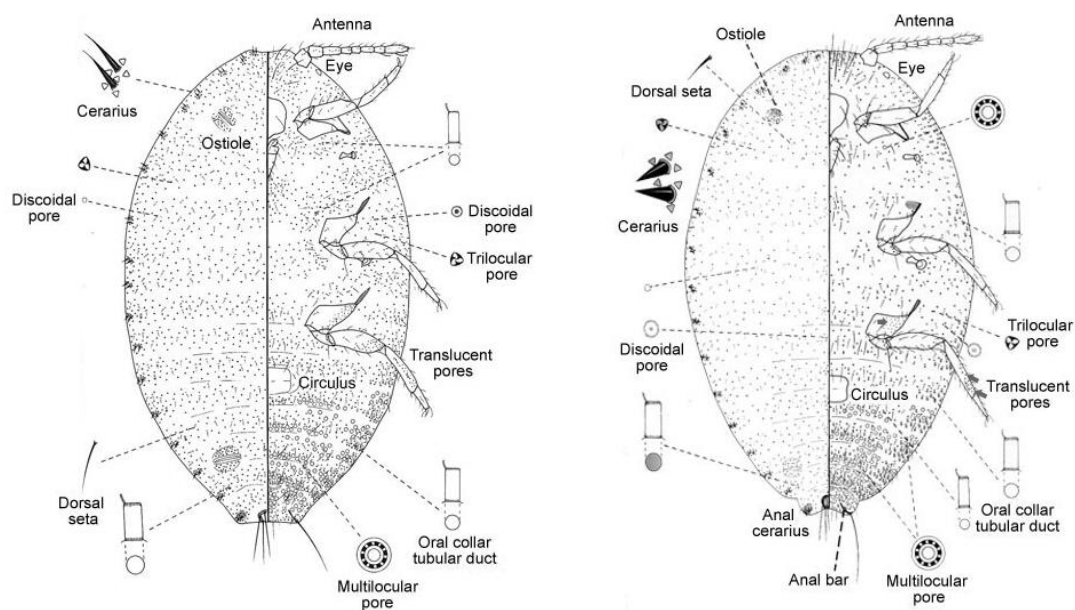
Sinonimi: *Coccus vitis* Lindinger, *Dactylopius ficus* Signoret, *D. vitis* Signoret, *D. subterraneus* Hempel, *Planococcus vitis* Ezzat & McConnell, *Pseudococcus citrioides* Ferris, *Ps. vitis* Bodenheimer.

Telo samic vrste *P. ficus* je svetlo rožnate do svetlo sive barve, pokrito z voščenim poprhom (slika 7). Ta postaja med razvojem vse debelejši in vidnejši. Odrasle samice so ovalne oblike, široke malo več kot dva in dolge približno štiri milimetre (Walton in Pringle, 2004b). Tipalke imajo sestavljene iz osmih segmentov. Za razliko od samic so samci krilati, s tremi pari lateralnih ocelijev in dolgimi filamentoznimi analnimi setami (Kreiger, 1954, cit. po Walton in Pringle, 2004b).



Slika 7: Samica smokvinega volnatega kaparja *P. ficus* z jajčno vrečko in jajčeci (foto: M. Štrukelj)
Figure 7: The adult females of vine mealybug *P. ficus* with egg sac and eggs (photo: M. Štrukelj)

Vrsto *P. ficus* so našli na rastlinah iz družin: Anacardiaceae (*Mangifera indica* L.), Apocynaceae (*Nerium oleander* L.), Arecaceae (*Phoenix dactylifera* L.), Asteraceae (*Dahlia* sp.), Cappariaceae (*Capparis cartilaginea* Decne.), Cistaceae (*Cistus* sp.), Cucurbitaceae (*Citrullus vulgaris* Schrad, *Cucurbita* sp.), Fabaceae (*Dichrostachys glomerata* (DG) (Forssk.). Chiov., *Prosopis farcata* Banks & Sol.) J. F. Macbr, *Tephrosia purpurea* L.), Juglandaceae (*Juglans* sp.), Lauraceae (*Persea americana* Mill.), Lythraceae (*Punica granatum* L.), Moraceae (*Ficus* sp., *F. benjamina* L., *F. carica* L.), Oleaceae (*Olea europaea* L.), Platanaceae (*Platanus orientalis* L.), Poaceae (*Bambusa* sp.), Rhamnaceae (*Zizyphus spina-christi* L.), Rosaceae (*Cydonia oblonga* Mill., *Malus domestica* Borkh., *Malus pumila* auct.), Salicaceae (*Salix* sp.), Solanaceae (*Solanum tuberosum* L.), Sterculiaceae (*Theobroma cacao* L.), Styracaceae (*Styrax officinalis* L.), Tamaricaceae (*Tamarix* sp.) in Vitaceae (*V. californica* Benth., *V. persica*, *V. vinifera*). V Sloveniji je vrsto *P. ficus* leta 2000 našel Seljak (2007) v zavarovanem prostoru na vinski trti (*V. vinifera*) in gumovcu (*Ficus elastica*).



Slika 8: Shematski prikaz trebušnega dela telesa odrasle samice, smokvin volnati kapar *P. ficus* (levo) in citrusov kapar *P. citri* (desno) (Miller in sod., 2014)

Zaradi morfološke podobnosti se vrsto *P. ficus* najpogosteje zamenja s citrusovim kaparjem (*Planococcus citri* [Risso]). V preteklosti so ju celo obravnavali kot eno vrsto. Njuna taksonomska uvrstitev temelji na drobnih podrobnostih v multiprekatastih in tubularnih porah (slika 8). Razlike se opazijo le pod mikroskopom po preparaciji odraslih samic (Cox in Ben-Dov, 1986; Williams in Granara de Willink, 1992). Obe vrsti kaparja sta geografsko zelo razširjeni. Vrsta *P. ficus* se najpogosteje nahaja na vinski trti po vsem svetu, medtem ko so *P. citri* na tej rastlinski vrsti zasledili le v nekaterih državah (Brazilija, Italija in Španija) (Cabaleiro in Segura, 1997; Miller in sod., 2007).

2.3.2 Družina Coccidae

2.3.2.1 Veliki trtni kapar (*Neopulvinaria innumerabilis* [Rathvon])

Veliki trtni kapar je eden največjih in najbolj znanih kaparjev (slika 9). V literaturi je omenjen tudi pod imenom *Pulvinaria innumerabilis* (Koval in sod., 1996). Gre za polifagno žuželko nearktičnega izvora, ki je razširjena po vsej Ameriki in Kanadi (Pellizzari, 1997). V Evropi je razširjena na Hrvaškem (Masten in sod., 2007), v Rusiji, Franciji in Italiji (CABI, 2012), od koder je bila po vsej verjetnosti zanesena tudi v Slovenijo (Seljak, 1995, 2007, 2010). Po trditvah Seljaka in Žežline (2007) je veliki trtni kapar pomemben škodljivec vinske trte, ki lahko tudi v Sloveniji povzroči občutno gospodarsko škodo.

N. innumerabilis je univoltilna vrsta. Oplojena samica prezimi pretežno na enoletnem lesu (Seljak, 1995). V tem času je telo samice precej ploščato, dolgo okoli pet mm (Koval in sod., 1996), rjave barve z ozkim grebenom vzdolž ščitka. Samice ostanejo spomladi prisesane na mestu prezimovanja, kjer začnejo pospešeno rasti (Seljak, 1995). Ščitek postane marmorirano rjavosiv in voščena obloga na hrbtu razpoka v pravokotne ploščice.

Proti koncu maja začne samica izlegati jajčeca v jajčno vrečko, ki je rahlo prečno našlebičena, z osrednjo brazdo in voskastimi lepljivimi vlakni (slika 9). V jajčni vrečki je okoli 3000 (Pellizzari, 1997), po nekaterih podatkih celo okoli 8700 jajčec (Conard, 1966), ki so blede rožnate barve. Razvoj nimf poteka v dveh nimfalnih stopnjah.



Slika 9: Samice velikega trtnega kaparja (*N. innumerabilis*) z jajčno vrečko (foto: I. Mavrič Pleško)
Figure 9: The adult females of *N. innumerabilis* with egg sac (photo: I. Mavrič Pleško)

2.3.2.2 Navadni trtni kapar (*Pulvinaria vitis* [L.]

Navadni trtni kapar je polifagna vrsta, najpogosteje pa se pojavlja na vinski trti. Vrsta je v Evropi splošno razširjena (Ben-Dov in sod., 2012), z gospodarskega stališča pa je precej nepomembna (slika 10) (Masten in sod., 2007).

Samice navadnega trtnega kaparja so manjše od samic velikega trtnega kaparja (Kosztarb in Kozar, 1988). Ščitek imajo enakomerno rjav. Hrbtna stran ne razpoka kakor pri velikem trtnem kaparju, temveč ostane cela. Jajčna vrečka nima prečnih žlebičev in vzdolžnega grebena, voskasta vlakna niso lepljiva. Jajčeca v njej so intenzivnejših barv, od oranžnorumene do blede vinsko rdeče barve.

Mlade samice prezimijo pretežno na dvoletnem, pa tudi starejšem lesu (Seljak, 1995), spomladi pa zelo hitro zrastejo do svoje končne velikosti. Jajčeca odlagajo od konca aprila do začetka junija. Samica v povprečju odloži okoli 3500 jajčec v jajčno vrečko, ki ima bombažni videz in je nameščena pod ali za telesom samice. Proti koncu maja se začno izlegati mlade nimfe. Te se naselijo ob listne žile na spodnji strani lista. Razvoj navadnega trtnega kaparja poteka prek treh nimfalnih stopenj. V septembru (Pellizzari, 1997) in oktobru (Kosztarb in Kozar, 1988) se odrasle samice pariyo in se nato ob koncu oktobra preselijo na veje, kjer prezimijo (Pellizzari, 1997). Vrsta *P. vitis* je univoltilna. Schumutterer (1952) navaja, da se v Evropi navadno razmnožuje spolno, znano pa je, da se lahko razmnožuje tudi partenogenetsko. V Severni Ameriki se razmnožuje le partenogenetsko (Phillips, 1963; Grill, 1988; Kosztarb in Kozar, 1988).



Slika 10: Ličinke navadnega trtnega kaparja *P. vitis* (foto: M. Štrukelj)

Figure 10: The immature stages of cottony maple scale *P. vitis* (photo: M. Štrukelj)

2.3.2.3 Češpljev kapar (*Parthenolecanium corni* [Bouché])

Češpljev kapar ima več poimenovanj, med katerimi sta poleg uradnega imena najpogostejši *Eulecanium corni* Bouche (Janežič, 1954; Hamon, 1984; Kosztarb in Kozar, 1988;) in *Lecanium corni* Bouche (Hamon, 1984; Kosztarb in Kozar, 1988) (slika 11).

Kapar *P. corni* je kozmopolitska in polivoltilna vrsta. Letno ima od enega do tri rodove, v razvoju pa se pojavljata dve nimfalni stopnji (Pellizzari, 1997). Število rodov je odvisno od podnebja in gostiteljskih rastlin. Na severu Madžarske so potrdili en rod, na jugu pa dva rodova na leto. O treh rodovih so poročali iz Kavkaza in srednje Azije (Kosztarb in Kozar, 1988).

Oblika, velikost in obarvanost odraslih samic je odvisna od njihove starosti in gostiteljskih rastlin, na katerih se prehranjujejo. Popolnoma odrasle so dolge okoli šest in široke okoli štiri mm. So rjave barve, hrbtna stran telesa pa je precej konveksna in močno sklerotizirana. Vrsta *P. corni* prezimi v drugi stopnji nimfe. Proti koncu maja se razvijejo odrasli osebki in oplojene samice začnejo odlagati jajčeca. Nov zarod kaparjev se razvije v drugi polovici junija. Mlade nimfe se prehranjujejo na spodnji strani listov, po prehodu na drugo stopnjo pa se preselijo na lesnate dele.



Slika 11: Odrasle samice češpljevega kaparja *P. corni* (foto: M. Štrukelj)

Figure 11: Adult females of brown scale *P. corni* (photo: M. Štrukelj)

O masovnih izbruhih vrste *P. corni* so poročali iz Evrope po letu 1880, pojavljala pa se je v od 10- do 11-letnih presledkih. Od zadnjega masovnega pojava te vrste leta 1955 je njena številčnost močno upadla, predvidoma zaradi parazitiranja vrste *Blastotrix confusa* Erdös. Večji izbruh je bil nato ugotovljen še leta 1975, vendar v precej manjšem obsegu kakor v preteklosti (Kosztarb in Kozar, 1988). V Evropi je češpljev kapar splošno razširjen (Ben-Dov in sod., 2012), v Sloveniji pa je bil prvič najden leta 1954 (Janežič, 1954).

2.3.3 Škodljivost kaparjev

Na splošno so kaparji škodljivi predvsem na sadnem drevju, grmičevju in rastlinah v zavarovanih prostorih (Kosztarb in Kozar, 1988). Hranijo se z rastlinskim sokom in tako oslabijo rastlino, povzročijo razbarvanje in prezgodnje odpadanje listov ter deformacije vej. Oslabljene rastline so dovzetnejše za napade drugih škodljivcev in patogenih organizmov. Kaparji so pomembni tudi kot prenašalci rastlinskih virusov (Kosztarb in Kozar, 1988; Golino in sod., 1999, 2002; Martelli in sod., 2002; Sim in sod., 2003). Posredna škoda, ki jo povzročajo, je izločanje medene rose. Nanjo se naselijo glive sajavosti, ki zmanjšujejo fotosintezo, vplivajo na razvoj ter tržno vrednost rastlin in pridelka (Hamon, 1984; Kosztarb in Kozar, 1988; Gullan in Martin, 2009).

2.4 METODE DOLOČANJA VIRUSOV VINSKE TRTE IN METODE PREUČEVANJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI

Detekcija rastlinskih virusov je mnogokrat zapletena zaradi različnih dejavnikov, kot so mešana virusna okužba, majhna koncentracija virusa pri zgodnjih okužbah, okužba z nesorodnimi virusi, ki kažejo podobna bolezenska znamenja, neenakomerno razporejeni virusi v okuženi rastlini, nejasna oziroma komaj vidna bolezenska znamenja, pri nekaterih kultivarjih in podlagah. Detekcija GLRaV je mogoča v vseh delih rastline (listne žile, korenine, debla, veje). Prisotnost GLRaV najlažje določimo iz floema rastline, saj je tam koncentracija virusa največja (Ling in sod., 2001; Fauquet in sod., 2005).

Za prepoznavo virusov v rastlinskem materialu je na voljo več metod, ki temeljijo na infektivnosti (biološko indeksiranje), fizikalnih (elektronska mikroskopija) in seroloških lastnostih (encimo-immunski test ELISA) ter lastnostih nukleinskih kislin virusa (verižna reakcija s polimerazo – PCR, PCR v realnem času – qPCR in sekvenciranje naslednje generacije – NGS) (Ward in sod., 2004; Boonham in sod., 2014).

Rastlinske viruse največkrat določamo s serološkimi metodami, vendar imajo te nekatere pomanjkljivosti, saj določanje najpogosteje poteka na podlagi virusnega CP, ki je le del celotnega genoma virusa. Zaradi slabše občutljivosti seroloških metod so razvili molekularne metode, ki temeljijo na detekciji nukleinskih kislin virusa. Z njimi določamo viruse na podlagi katerega koli dela virusnega genoma (Boonham in sod., 2014).

2.4.1 Encimsko-immunski test ELISA

Najpogosteje uporabljena serološka metoda identifikacije prisotnosti virusov je encimsko-immunski test ELISA (*angl.* Enzyme Linked Immunosorbent Assay), ki se uporablja vse od leta 1977 (Clark in Adams), ko je bil prvič opisan kot test za določanje rastlinskih virusov. Izvedba testa je razmeroma enostavna, cenovno ugodna in razen spektrofotometra ne potrebujemo druge dražje opreme (Hadidi in sod., 1995). Temelji na vezavi protitelesa z virusom, ki predstavlja antigen. Test odlikuje velika občutljivost, saj v 1 ml vzorca lahko zaznamo že 1 ng virusnega antigena. Zaradi tega in gospodarne uporabe reagentov je test ELISA zamenjal številne druge serološke teste, ki so se v preteklosti uporabljale v rastlinski virologiji (Hadidi in sod., 1995).

Test ELISA se izvaja na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. Po vsaki fazi dodajanja reagentov je zelo pomembno izpiranje, s katerim odstranimo nevezane snovi. Včasih je po adsorpciji prve plasti reagentov koristna uporaba pufra za blokiranje, ki prekrije preostala prosta vezavna mesta v vdolbinicah in tako prepreči nespecifično vezavo reagentov, ki sledijo prvi plasti (Clark in Adams, 1977).

Pri testu ELISA uporabljamo posredno in neposredno metodo. Pri neposredni metodi dokazujemo prisotnost antigena (virusa) s konjugiranim specifičnim protitelesom, na katerega je vezan encim. Pri posrednem postopku pa s sekundarnim encimsko označenim konjugiranim protitelesom zaznavamo primarno, za antigen specifično protitelo. Pri obeh različicah lahko antigen vežemo na trdno površino ali na predhodno vezana specifična protitelesa (Clark in Adams, 1977).

Za dokazovanje rastlinskih virusov se najpogosteje uporablja neposredni sistem dvojnih protiteles, t. i. encimsko-immunska metoda dvojnega sendviča – DAS ELISA (*angl.* Double Antibody Sandwich ELISA) (Clark in Adams, 1977). Pri tej prva neoznačena protitelesa, ki so vezana na trden nosilec, vežejo antigen, ki ga želimo dokazati. Na nastale komplekse protiteles in antigena vežemo druga, z encimom označena protitelesa. Sledi vezava prvih protiteles, proti katerim so usmerjena druga, z encimom označena protitelesa. Po dodajanju primerne substrata le-ta po delovanju encima spremeni barvo in z intenzivnostjo barve zaznamo prisotnost virusa (Ward in sod., 2004; Clark in Adams, 1977; Hadidi in sod., 1995).

Ker so lahko virusni delci dobri antigeni, je mogoče proizvesti specifična protitelesa za posamezen virus. Uporabljena protitelesa pri testu ELISA so tako proteini, ki se sintetizirajo v živalih kot odgovor na vnesene antigene (Crowther, 1998). Test ELISA je v primerjavi z ostalimi serološkimi testi občutljiv, zanesljiv in primeren za hkratno preizkušanje velikega števila vzorcev, a ima tudi omejitve. Na rezultate lahko vpliva majhna koncentracija virusa v testiranem vzorcu ter specifičnost in kakovost protiteles.

2.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Napredek v molekularni biologiji je bil narejen leta 1985 z razvojem/odkritjem *in vitro* pomnoževanja specifičnih zaporedij DNA, tj. verižno reakcijo s polimerazo – PCR (*angl.* Polymerase Chain Reaction) (Mullins in sod., 1986). PCR je nadvse uporabna metoda, ki je v kratkem času postala eno najbolj razširjenih orodij molekularne biologije. Omogoča selektivno pomnoževanje genov oziroma delov genov iz minimalne količine DNA. Del virusnega genoma, ki ga želimo pomnožiti z metodo PCR, izberemo glede na namen poskusa. Za določanje izbranega virusa izberemo mesta, ki se med različnimi virusi čim bolj razlikujejo, med izolati izbranega virusa pa so razlike na teh mestih čim manjše. To omogoča uporabo vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje odseka DNA pri različnih vrstah v skupini rastlinskih virusov.

Pri detekciji RNA-virusov z molekularnimi metodami kot tarčo pomnoževanja uporabimo RNA. Pred izvedbo PCR je potrebno predhodno obratno prepisovanje – RT (*angl.* Reverse Transcription), pri čemer se RNA prepíše v komplementarno DNA – cDNA (Hadidi in sod., 1995).

Pri metodi PCR s termično stabilno DNA-polimerazo v ciklih simultano podaljšujemo začetna oligonukleotida. V procesu PCR najprej poteče denaturacija nukleinskih kislin pri od 92 do 98 °C, kar povzroči razklepanje dvojnih verig v enojne. Sledi ohlajanje, kar omogoča vezavo komplementarnih začetnih oligonukleotidov na enoverižno matrično DNK. Temperatura ohlajanja je odvisna od uporabljenih parov začetnih oligonukleotidov. Sledi podaljševanje pri od 60 do 72 °C, odvisno od optimalne temperature za delovanje polimeraze (Hadidi in sod., 1995). Postopek ciklično ponavljamo od 25- do 40-krat. V vsakem ciklu se izbrani del matrične molekule DNA podvoji in v vsakem ciklu eksponentno narašča. Tako imamo na koncu reakcije na voljo več milijonov kopij originalne matrice za nadaljnje analize. Po končani reakciji velikost produkta DNA ocenimo z gelsko elektroforezo. S tehniko PCR se je nadvse povečala hitrost in učinkovitost v odkrivanju vseh vrst spremenljivosti DNA.

2.4.3 Metoda verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)

Metoda qPCR je nadgradnja klasičnega PCR. Pri klasični PCR nastale produkte vizualiziramo z gelsko elektroforezo, pri qPCR pa detekcija pomnoževanja poteka med samo reakcijo. Tako se izognemo detekciji produkta na koncu pomnoževanja z gelsko elektroforezo. S tem se zmanjša možnost kontaminacije po poteku reakcije, ki je mogoča pri klasičnem PCR. Poleg občutljivejše in zanesljivejše detekcije je mogoča kvantifikacija produkta tarčne molekule v realnem času po vsakem ciklu encimskega pomnoževanja (Bustin, 2004; Bustin in sod., 2005).

Na voljo je več različnih kemij za določanje produktov qPCR. Ne glede na izbrano kemijo je osnovno načelo zaznavanja količine nastalega PCR-produkta enako. Fluorescenca (ΔR_n) je neposredno sorazmerna količini pomnožene DNA. Iz vrednosti izmerjene fluorescence v vsakem ciklu se izriše krivulja, ki prikazuje odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov. Računalniški program, ki se uporablja za izvedbo qPCR, preračuna fluorescenco v kateri koli časovni točki med pomnoževanjem, ki ji je odšteto ozadje. Cq-vrednost je točka, pri kateri se signal fluorescence poročevalske molekule dvigne nad vrednostjo praga. Ta se izraža v številu ciklov, ki so bili potrebni za povečanje signala fluorescence nad prag. Več kopij tarčnega zaporedja pomeni manjši Cq (Bustin, 2004).

Poznamo absolutno in relativno kvantifikacijo podatkov. Z absolutno kvantifikacijo izmerimo točno število kopij gena v vzorcu in da to lahko dosežemo, potrebujemo standardno krivuljo znanega števila kopij gena. Za to lahko uporabimo ampikon iz vzorca ali sintetični oligonukleotid. Standardna krivulja je razmerje med vrednostmi Cq in količino kopij ampikona (Bustin, 2004).

Z metodo relativne kvantifikacije določimo razmerje med številom kopij analiziranega tarčnega gena in referenčnega gena. Vrednost Cq tarčnega gena je tako normalizirana z vrednostjo Cq referenčnega gena v vzorcu. Izbira primerne referenčnega gena je zato nujno potrebna za določitev relativne količine cDNA (Bustin, 2004). Med najbolj standardne referenčne gene spadata gen za citokrom c-oksido – COX in 18S rRNA (Pfaffl, 2004). Relativno količino cDNA lahko izračunamo iz razlik med vrednostjo Cq med vzorcem in kontrolo ($\Delta\Delta Cq$ -metoda) ali iz umeritvene krivulje, kar je natančnejše, ker se upošteva tudi učinkovitost PCR-reakcije (Bustin, 2004).

Obstajata dva osnovna načina metode qPCR glede na uporabljeno kemijo v reakciji. Najpogosteje uporabljeni kemiji sta nespecifično fluorescenčno barvilo (npr. SYBR Green) in modificirana oligonukleotidna sonda (npr. TaqMan). Barvilo SYBR Green se veže v vse dvovertične DNA molekule, torej tako v specifične kot tudi v nespecifične pomnožene produkte in v dimere začetnih oligonukleotidov. Njihova vezava je neodvisna od nukleotidnega zaporedja dvojne verige DNA. V izoginitev nespecifičnim produktom je potrebna popolna optimizacija reakcije. Ob osvetljevanju s svetlobo ustrezne valovne dolžine uporabljeno vezano barvilo fluorescira. Tako lahko jakost fluorescence detektiramo v vsakem ciklu reakcije. TaqMan kemija je bolj specifična in se zato tudi najbolj pogosto uporablja (Gachon in sod., 2004). Njena značilnost je uporaba sond, s katerimi zaznamo le specifične produkte. Sonde so specifične za del ampikona med obema začetnima oligonukleotidoma. Na 5'-terminalnem delu so sonde označene s fluorescenčno poročevalsko molekulo (npr. FAM), na 3'-terminalnem delu pa z dušilec (npr. TAMRA), ki zaduši fluorescenco poročevalske molekule, kadar je v njeni bližini. Ob sintezi specifičnega produkta PCR pa polimeraza DNA sondo razgradi, dušilec in reporter nista več v neposredni bližini, zato z detektorjem lahko zaznamo fluorescenco reporterja.

Sonde z nefluorescenčno molekulo (npr. MGB) imajo lahko vezano še dodatno molekulo, ki stabilizira zadnjih 5–6 baznih parov na 3'-terminalnem delu sonde za vezavo na DNA. Uporabljajo se predvsem za detekcijo zahtevnih spremenljivih tarčnih molekul in so navadno krajše od običajnih sond. Zaradi posledično krajših amplikonov dosežemo z njimi boljšo učinkovitost pomnoževanja. Take sonde imajo tudi od 7 do 10 °C višje temperature prileganja od začetnih oligonukleotidov in so zato bolj specifične (Bustin, 2004).

2.4.4 Molekularno kloniranje in določanje nukleotidnega zaporedja

Molekularno kloniranje se navezuje na prenos celotne DNA ali le dela DNA (geni, promotorska zaporedja, kemično sintetizirani oligonukleotidi, poljubna kodirajoča in nekodirajoča zaporedja) iz izvornega organizma, v katerem je odsek naravno prisoten, in vgraditev v gostiteljsko celico. S kloniranjem ustvarimo identične kopije iz originala.

Po pripravi produktov PCR sledi vključitev (ligacija) le-teh v plazmid ter namnožitev v primernih sevih bakterije *Escherichia coli*. Z razmnoževanjem bakterije se pomnožujejo tudi vključeni plazmidi, kar omogoča pridobitev večjega števila kloniranih odsekov (Sambrook in sod., 1989; Lodge in sod., 2007; Berlec in Štrukelj, 2010). Uspešnost transformacije lahko preverimo s t. i. modro-belim testom na selektivnem gojišču. Bele kolonije vsebujejo plazmid z vključkom, modre pa vključka nimajo. Prisotnost vključkov lahko preverimo s PCR na kolonijah. Plazmide z vključki izoliramo iz bakterij in jih uporabimo za nadaljnje aplikacije, zelo pogosto za določanje njihovega nukleotidnega zaporedja (Sambrook in sod., 1989).

Frederick Sanger je v sedemdesetih letih dvajsetega stoletja razvil metodo določanja oligonukleotidnega zaporedja (sekvenciranja), ki je bila v izpopolnjeni obliki v uporabi tudi pri določitvi človeškega genoma, pa tudi pri določitvi preostalih živalskih in rastlinskih genomov ter je še vedno najpogosteje uporabljena tehnika določanja nukleotidnega zaporedja (Sanger in sod., 1977). Dobljeno nukleotidno zaporedje lahko primerjamo s posameznimi organizmi znotraj vrste in drugimi vrstami (Griffiths in sod., 2005). Za nadaljnje analize genomov lahko uporabimo različne metode bioinformatike, primerjalne genomike (primerjava genomov med vrstami) in funkcijske genomike (študij interakcij genov; Griffiths in sod., 2005).

2.5 METODE MERJENJA VPLIVOV VIRUSOV NA FIZIOLOŠKE PROCESSE V VINSKI TRTI

Fotosinteza in transpiracija sta ključna fiziološka procesa v rastlinah ter zelo občutljiva za biotični in abiotični stres. Razumevanje vpliva GLRaV na rastline otežuje njihova kompleksnost, poleg tega pa je fiziološki odziv rastlin na virusne okužbe zelo različen (Balachandan in sod., 1997).

Fotosinteza je izrednega pomena ne samo za življenje na Zemlji, ampak posredno tudi za vse pridelovalce rastlin, ki jim rastline predstavljajo vir dohodka. Fotosinteza je proces, pri katerem se sončna pretvori v kemično energijo. Pri asimilaciji ogljika se ogljikov dioksid (CO_2) s pomočjo svetlobe v zelenih tkivih rastline reducira do sladkorja. Sočasno voda pri fotolizi oksidira in sprosti se molekularni kisik (O_2) (Vodnik, 2012). Meritve fotosinteze so potrebne za primerjavo in razumevanje produktivnosti vegetacijskih sistemov na ravni lista, rastline ali združbe ter preučevanje njihovega odziva na okoljske strese. V raziskave fotosinteze so vključene različne stroke, od agronomije, biokemije, biotehnologije, genetike, molekularne biologije in fiziologije do okoljskih znanosti in gozdarstva.

Rastlina pri transpiraciji z uravnavanjem odprtosti listnih rež oddaja vodo in tako uravnava vodno bilanco. Tako se doseže najboljša mogoča izmenjava plinov ob čim manjši izgubi vode. Na prevodnost listnih rež vplivajo različni dejavniki, glavni med njimi pa so:

- razpoložljivost vode,
- svetloba,
- koncentracija CO_2 – zmanjšanje koncentracije CO_2 povzroči odpiranje listnih rež,
- temperatura – rastline ob nespremenjenih drugih okoljskih vplivih nad določeno temperaturo odpirajo listne reže in se hladijo s transpiracijo.

Voda je pri sončnih rastlinah najbolj omejujoč dejavnik. Pri njeni zmanjšani vsebnosti v listu se zmanjša tudi vsebnost vode v celicah zapiralkah listnih rež, tako pa pade turgor in listne reže se zaprejo, s čimer se omeji sprejem CO_2 in posledično zmanjša intenziteta fotosinteze (Vodnik, 2005).

Poznamo nestomatalno in stomatalno inhibicijo fotosinteze. Pri prvi je fotosinteza omejena zaradi manjše vsebnosti vode v tleh in absorpcija vode prek korenin je inhibirana, medtem ko je pri drugi vzrok inhibicije zmanjšana prevodnost listnih rež, zaradi česar je omejen sprejem CO_2 skozi listne reže (Vodnik, 2005).

Ob močnejši svetlobi se poveča prevodnost listnih rež, kar je posledica večje porabe CO_2 . Svetloba lahko spodbuja odpiranje listnih rež, pri čemer je dejaven modri del svetlobnega spektra. Ta proces je neodvisen od koncentracije CO_2 . Pri veliki intenziteti svetlobe pride do fotoinhibicije v fotosinteznih procesih. Pri tem se lahko spremenijo procesi prenašanja

elektronov znotraj fotosistema II. Fotoinhibiciji so senčni listi bolj podvrženi kakor pa sončni.

Izmenjava plinov skozi reže poteka z difuzijo, pri čemer je gonilna sila razlika v koncentraciji plina med atmosfero in rastlino. Koncentracijski gradient je poleg upornosti, ki jo plin srečuje na difuzijski poti, odločilen dejavnik hitrosti difuzijskega toka. Lahko ga izrazimo kot razliko parcialnega tlaka vodne pare atmosfere in lista, kar imenujemo deficit tlaka vodne pare (Hladnik in Vodnik, 2007). Večinoma imajo rastline podnevi listne reže odprte in s tem pridobijo iz zraka CO₂ za fotosintezo. Prevodnost listnih rež in transpiracija se prek dneva spreminjata. Ob povečanem primanjkljaju tlaka vodne pare (neugodna vodna bilanca) rastline z zmanjšanjem prevodnosti listnih rež omejijo transpiracijo. To se največkrat dogaja v opoldanskem času, ponoči pa je prevodnost listnih rež minimalna (Vodnik, 2012).

Sprejem in sproščanje CO₂ pri fotosintezi in dihanju ter sproščanje H₂O pri transpiraciji rastlin ali listov merimo s sistemi za merjenje izmenjave plinov. Metoda merjenja izmenjave plinov je trenutno najuporabnejša tehnika za merjenje fotosinteze. Obstaja namreč več komercialnih aparatov za izvajanje meritev na posameznih listih, celih rastlinah, rastlinskih odevah in celo na večjih ekosistemih, kot so gozdovi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI VIRUSOV V VINSKI TRTI

3.1.1 Rastlinski materiali in detekcija virusov

3.1.1.1 Serološko ugotavljanje prisotnosti virusov

Prisotnost virusov v rastlinskem materialu smo preverili s testom DAS-ELISA. Pri tem smo uporabili protitelesa in pufre podjetja Bioreba skladno z navodili proizvajalca (BIOREBA AG, Švica). Poleg GLRaV-1, -3 in -4 smo s testom dokazovali še morebitno prisotnost preostalih virusov, ki najpogosteje okužujejo vinsko trto: GLRaV-2, ArMV, CLRV, GFLV, GFkV, GVA, RBDV, RpRSV, SLRSV, TRSV, TBRV in ToRSV. Vse vzorce smo testirali v dveh tehničnih ponovitvah.

3.1.1.2 Molekularna karakterizacija GLRaV-4

Rastlinski material vinske trte smo nabrali v vinogradu v Škocjanu (jugozahodna Slovenija), kjer je obstajal sum okužbe z GLRaV. S serološkim testiranjem smo od 70 testiranih vzorcev vinske trte v dveh potrdili prisotnost GLRaV-4. Enega od teh okuženih vzorcev smo uporabili za nadaljnjo molekularno karakterizacijo virusa.

3.1.1.3 Genetska raznolikost GLRaV-1 in GLRaV-3

Rastlinski material smo nabrali v različnih vinorodnih okoliših po vsej Sloveniji med letoma 2008 in 2013. Liste trsov različnih sort vinske trte z značilnimi bolezenskimi znamenji, ki jih povzroča GLRaV, smo nabrali v 35 različnih vinogradih. Skupno smo testirali 456 vzorcev. Za nadaljnjo analizo genetske raznolikosti smo izbrali okužene vzorce glede na geografsko lego vinogradov. Izbrali smo vzorce okužene z GLRaV-1, GLRaV-3 in z obema virusoma hkrati (mešana okužba).

3.1.2 Izolacija RNA

3.1.2.1 Molekularna karakterizacija GLRaV-4

RNA smo izolirali z uporabo tehnike imunske vezave (*angl.* immunocapture, IC). Protitelesa specifična za detekcijo GLRaV-4 (BIOREBA AG, Švica) smo redčili v karbonatnem pufru v razmerju 1:1000 in jih po 100 µl odpipetirali v 0,2 ml mikrocentrifugirke. Te smo zaprli in inkubirali čez noč pri 4 °C. Po inkubaciji smo jih 3-krat sprali s pufrom za spiranje ELISA, nato pa vanje odpipetirali 50 µl rastlinskega ekstrakta izbranega vzorca in jih inkubirali čez noč pri 4 °C. V tem času so se v

rastlinskem ekstraktu prisotni virusi vezali na protitelesa. Naslednji dan smo zlili rastlinski ekstrakt iz mikrocentrifugirke ter jih 2-krat sprali s pufrom za spiranje ELISA in 1-krat s destilirano vodo. Viruse, vezane na mikrocentrifugirke smo uporabili v nadaljevanju za obratno transkripcijo in PCR.

3.1.2.2 Genetska raznolikost GLRaV-1 in GLRaV-3

Skupno RNA iz rastlinskega materiala smo izolirali s kompletom MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, ZDA) po priporočilih proizvajalca. Za izolacijo smo uporabili napravo MagMAX Express (Ambion, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Po končanem postopku izolacije smo izolirano RNA shranili pri -80 °C do uporabe.

3.1.3 Obratno prepisovanje (RT) in verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.1.3.1 Molekularna karakterizacija GLRaV-4

Z uporabo spletnega orodja Primer3 (Ye in sod., 2012) smo izbrali pet začetnih oligonukleotidov (preglednica 5), ki pokrivajo celotna gena CP in p23. Začetne oligonukleotide smo načrtovali na podlagi nukleotidnega zaporedja celotnih genomov GLRaV-4 (GenBank FJ467503) in GLRaV-4 različek 9 (GenBank KJ810572). Specifičnost naleganja smo preverili z algoritmom Primer-BLAST (NCBI) na vsa nukleotidna zaporedja GLRaV-4.

3.1.3.1.1 RT

Komplementarno cDNA smo sintetizirali v mikrocentrifugirkah z vezanimi virusi v RT reakcijski mešanici. Za celotno prostornino reakcijske mešanice (20 µl) smo uporabili 50 pmol specifičnega začetnega oligonukleotida LRamp-R (Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012) in reverzno transkriptazo M-MLV po priporočilih proizvajalca (Promega, ZDA). Dobljeno cDNA smo shranili pri -20 °C do uporabe.

3.1.3.1.2 PCR

Izbrani del virusnega genoma smo v verižni reakciji s polimerazo pomnožili s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Za celotno PCR-reakcijsko mešanico (25 µl) smo uporabili 2 µl cDNA, 50 pmol vsakega začetnega oligonukleotida (preglednica 5) in KAPA2G Robust PCR kit (Kapa Biosystems, J. Afrika) po priporočilih proizvajalca.

Pogoji pomnoževanja GLRaV-4:

1 cikel	94 °C, 4 min
40 ciklov	94 °C, 30 s
	50 °C (LRamp-F/R) in 56 °C (vsi preostali pari), 45 s
	72 °C, 1 min
1 cikel	72 °C, 7 min

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje posameznih segmentov virusnega genoma GLRaV-4

Table 5: Primer pairs used for amplification of parts of GLRaV-4

Tarčna regija	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Položaj na genomu	VEL (bp)	Vir
CP	LR4-IR-F1	TCCGRSCCAYATGAACTTCGA	11920-	1001	1
	LR-9-CP-R	TGAGGCGTCGTAACCGAACAATCT	12921		2
	LR4ms-CP-F	CGTCTGGGAAACTGGAAGTGA	12800-	270	1
LR4ms-CP-R	ACGAAAATATGAGAAGTCACAGAC	13070			
CP, p23	LR4-56-MS4-F	GTGGCCATAAACAACCGTC	12946-	424	1
	LR4-56-MS4-R	GGAAAAGGTACCGAACGTTT	13370		
p23	LRamp-F	ATTTAGGTAATGTTGTAGCTAC	13274-	484	3
	LRamp-R	TATCCTCAGWGAGGAARCGG	13758		

CP – plaščni protein, p23 – ORF 6, položaj na genomu – položaj amplicona na genomu GLRaV-4 (FJ467503), VEL – velikost amplicona (bazni pari), vir – vir objavljenih zaporedij: 1 – načrtovani v tej študiji, 2 – Jerugula in sod., 2008, 3 – Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012

Reakcijsko mešanico smo inkubirali v cikličnem termostatu Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Prisotnost specifičnih pomnoženih produktov PCR in njihovo velikost smo preverili na 1 % agaroznem gelu. Elektroforeza je potekala 60 minut pri stalni napetosti 100 V.

Pred kloniranjem smo iz agaroznega gela izrezali specifične produkte PCR in jih očistili z JETQUICK Plasmid Extraction Spin Kit (Genomed, Nemčija) po priporočilih proizvajalca. DNA smo raztopili v 50 µl dH₂O in jo shranili pri –20 °C do uporabe.

3.1.3.2 Genetska raznolikost GLRaV-1 in GLRaV-3

3.1.3.2.1 RT

Komplementarno cDNA smo sintetizirali v 0,2 ml mikrocentrifugirkah z uporabo kompleta High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ZDA) po priporočilih proizvajalca. Za celotno prostornino 25 µl smo uporabili 2 µl izolirane

RNA. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 10 minut pri 25 °C, 120 minut pri 37 °C in končali s pet minutno inkubacijo pri 85 °C. Dobljeno cDNA smo shranili za krajši čas pri 4 °C ali pri –20 °C do uporabe.

3.1.3.2.2 PCR

Izbrani del virusnega genoma smo pomnožili, kot je opisano v točki 3.1.3.1.2, vendar z drugimi pari začetnih oligonukleotidov (preglednica 6) in pri drugačnih pogojih pomnoževanja.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje posameznih delov genoma GLRaV-1 in GLRaV-3

Table 6: Primer pairs used for amplification of parts of GLRaV-1 and GLRaV-3 genome

Virus	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'–3')	VEL (bp)	Vir
GLRaV-1	LR1-HSP-1-F	CAGGCGTCGTTTGTACTGTG	975	1
	LR1hsp70-737	GGTAAACGGGTGTTCTTCAATTC		2
GLRaV-3	LR3-HSP-1-F	AACCTACATACACCGTGAA	1140	3
	LC2R	GTTGTCCCGGTACCAGATAT		4

VEL – velikost amplikona (bazni pari), vir – vir objavljenih zaporedij: 1 – Alabi in sod., 2011; 2 – Osman in sod., 2007; 3 – Kominek in sod., 2004; 4 – Turturo in sod., 2005

Pogoji pomnoževanja GLRaV-1 in GLRaV-3:

1 cikel 95 °C, 5 min
35 ciklov 94 °C, 45 s
 55 °C, 60 s (GLRaV-1) in 56 °C, 45 s (GLRaV-3)
 72 °C, 1 min
1 cikel 72 °C, 10 min

3.1.4 Kloniranje in izolacija plazmidov

Za vstavljanje očiščenega PCR produkta v plazmidni vektor smo uporabili pGEM-T Easy Vector System (Promega, ZDA) po priporočilih proizvajalca. Ligacijsko mešanico smo transformirali v kompetentnih celicah JC-109 *E. coli* (Promega, ZDA) po priporočilih proizvajalca.

Na dve plošči trdnega selektivnega gojišča smo razmazali po 100 µl transformiranih celic. Preostanek smo centrifugirali 5 minut pri 6000 rcf, pelet resuspendirali v tekočem gojišču in 100 µl resuspendiranega peleta razmazali na tretjo ploščo. Plošče smo čez noč inkubirali pri 37 °C.

Po inkubaciji smo preverili prisotnost belih kolonij in jih izbrali po 10 za vsak vzorec v primeru GLRaV-4 ter najmanj 5 za vsak vzorec v primeru GLRaV-1 in GLRaV-3. Prisotnost PCR vključkov v izbranih kolonijah smo preverili s PCR reakcijo (glej poglavji 3.1.3.1.2 in 3.1.3.2.1) s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in gelsko elektroforezo.

Uspešno transformirane celice smo namnožili preko noči pri 37 °C v tekočem LB-gojišču z ampicilinom (150 mg/l). Po namnožitvi klonov izbranih vzorcev smo za izolacijo plazmidne DNA uporabili JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Nemčija) po priporočilih proizvajalca. Izolirane plazmide smo uporabili za določanje nukleotidnega zaporedja vključka.

3.1.5 Identifikacija in analiza dobljenih nukleotidnih zaporedij izolatov

Za identifikacijo nukleotidnega zaporedja izolatov smo v podjetje Macrogen (Nizozemska) poslali najmanj tri klone vsakega vzorca. Nukleotidno zaporedje smo vključkom določili v obe smeri z začetnima oligonukleotidoma T7 (ATACGACTCACTATAGGGCG) in SP6 (ATTTAGGTGACTATAAGAATAC). Prosto dostopni program BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) smo uporabili za preverjanje kakovosti dobljenih zaporedij, sestavo zaporedij DNA, njihovo poravnavo in za izračun matrike identičnosti. Če so se nukleotidna zaporedja klonov istega vzorca razlikovala za več kot 2 %, smo vzorec dopolnili z dodatnimi nukleotidnimi zaporedji klonov. Nukleotidno zaporedje klonov posameznega vzorca smo primerjali z znanimi zaporedji v zbirki podatkov National Center for Biotechnology Information (NCBI) na podlagi programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), pri čemer smo uporabili algoritem megablast. Nukleotidna zaporedja smo prepisali v aminokislinska zaporedja v programu MEGA6 (Tamura in sod., 2013). Vsa nukleotidna in aminokislinska zaporedja smo poravnali z uporabo CLUSTAL W (Thompson in sod., 1994) in MUSCLE (Edgar, 2004) s privzetimi nastavitvami programa.

Filogenetski drevesi smo izrisali v programu MEGA6 z algoritmom The maximum-likelihood (ML). Specifični model za vsak nabor nukleotidnih zaporedij virusov je bil določen na podlagi najmanjše BIC-vrednosti, izračunane s funkcijo Find best DNA/Protein models (ML). Zanesljivost dobljenih filogenetskih odnosov smo ocenili z izvedbo 1000 ponovitev bootstrap. To pomeni, da je program izračunal filogenijo po metodi ML 1000x, na podlagi rezultatov izrisal optimalno filogenetsko drevo in izpisal, v kolikšnem deležu od vseh poskusov je prišlo do prikazanih filogenetskih odnosov.

3.1.5.1 Molekularna karakterizacija GLRaV-4

Za analizo in izris filogenetskega drevesa smo iz baze GenBank izbrali nukleotidna zaporedja vseh GLRaV-4, ki so bila dolga najmanj toliko kot izolat 055-SI (preglednica 7). Poravnano zaporedje smo razdelili na posamezna gena (CP in p23). Drevo je bilo

koreninjeno s filogenetsko različno skupino, ki podpira ločitev preiskovanih izolatov v skupine. Za koreninjenje drevesa smo uporabili s kaparji in uvelostjo ananasa povezani virus 1 - PMWaV-1 (*Pineapple mealybug wilt-associated virus-1*; preglednica 7).

Preglednica 7: Seznam GLRaV-4 in njegovih različkov uporabljenih pri filogenetski analizi

Table 7: List of GLRaV-4 and its strains used for phylogenetic analysis

Virus/različek	Izolat	Št. GenBank	Država izvora
GLRaV-4	LR106	FJ467503	ZDA
GLRaV-4	Y252-IL ^a	AM176759	Izrael
GLRaV-4	Y253-TK ^a	AM162279	Turčija
GLRaV-4	055-SI	KM892778	Slovenija
GLRaV-4	Ru1	AB720874	Japonska
GLRaV-4	Ru2	AB720875	Japonska
GLRaV-4 različek 5	GLRaV-5	AF233934	na
GLRaV-4 različek 5	1050-02	JX513893	Kanada
GLRaV-4 različek 5	Y217	FR822696	Francija
GLRaV-4 različek 6	Estellat	FJ467504	ZDA
GLRaV-4 različek 6	De	AM494935	Grčija
GLRaV-4 različek 9	GLRaV-9	AY297819	na
GLRaV-4 različek 9	Man086	KJ810572	Španija
GLRaV-4 različek Car		FJ907331	ZDA
GLRaV-4 različek Pr		AM182328	Grčija
PMWaV-1		AF414119	na

^a Nukleotidno zaporedje gena p23 ni dostopno v zbirki GenBank, na – ni podatka

3.1.5.2 Genetska raznolikost GLRaV-1 in GLRaV-3

Za identifikacijo genetske raznolikosti smo iz baze GenBank izbrali nukleotidna zaporedja ustreznih izolatov. Za analizo GLRaV-1 smo izbrali večino nukleotidnih zaporedij HSP70h, ki so bila dolga vsaj 500 bp. Za analizo GLRaV-3 smo izbrali večinoma le predstavnike posameznih skupin, ki so jih predlagali Maree in sod. (2013).

Genetsko razdaljo med izolati ter znotraj skupin GLRaV-1 in GLRaV-3 smo izmerili s programom MEGA 6.0. Seleksijski pritisk smo ugotavljali s prosto dostopnim programom Datamonkey web server (2015). Naravno selekcijo (dN/dS) izrazimo z razmerjem nesinonimnih (dN) in sinonimnih substitucij (dS). Seleksijski pritisk je lahko negativen ($dN/dS < 1$), nevtralen ($dN/dS = 1$) ali pozitiven ($dN/dS > 1$).

Za izolate GLRaV-1 smo izvedli še *in silico* restriksijsko analizo z encimoma *Bsi*WI in *Sall*. Kominek in sod. (2005) so na omejenem številu nukleotidnih zaporedij ugotovili, da

je restriksijska analiza s tema endonukleazama ustrezna za razločevanje med skupinama A in E pri GLRaV-1. Obe namreč režeta nukleotidno zaporedje na ohranjenem delu. Izolate iz E-skupine reže le *Bsi*WI (prepoznavno nukleotidno zaporedje C/GTACG), medtem ko reže izolate iz A-skupine le encim *Sal*I (prepoznavno nukleotidno zaporedje G/TCGAC). Želeli smo preveriti primernost omenjene metode za ločevanje obeh skupin izolatov na večjem številu nukleotidnih zaporedij, ki so sedaj dostopna v bazi. Zato smo za našo simulacijo *in silico* restrikcije uporabili enako dolg odsek (500 bp) HSP70h kot Kominek in sod. (2005). Simulacijo smo izvedli s prosto dostopnim programom WebCutter 2.0 software (2015).

3.2 KAPARJI VINSKE TRTE IN PRENOS VIRUSOV

3.2.1 Prisotnost kaparjev v naključno izbranih slovenskih vinogradih

Med letoma 2011 in 2014 smo naredili pregled razširjenosti kaparjev v naključno izbranih slovenskih vinogradih. V posameznem vinogradu smo na vsaj 20 naključno odbranih trtah ugotavljali prisotnost kaparjev. Dobljene kaparje smo s posamezne trte ločeno odstranili in jim rod ter vrsto na podlagi morfologije določili v entomološkem laboratoriju Kmetijsko gozdarskega zavoda Nova Gorica.

3.2.1.1 Razširjenost virusov in kaparjev v izbranem slovenskem vinogradu

V vinogradu v Dobravljah pri Ajdovščini so imeli velike težave z GLD in napadom kaparjev. Liste vinske trte smo nabrali naključno, ne glede na bolezenska znamenja. Za prisotnost kaparjev smo pregledali celoten vinograd. Vsako trto smo natančno preverili prisotnost kaparjev. Dobljene kaparje smo s posamezne trte ločeno odstranili in shranili v 2 ml mikrocentrifugirkah pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do nadaljnjih analiz.

3.2.2 Trte za poskus prenosa GLRaV

Z virusi okužene trte uporabljene za poskus prenosa GLRaV s kaparji so bile nabrane v vinogradu v Škocjanu pri Koprju, kjer je bila predhodno potrjena prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 in kaparjev (Mavrič Plaško in sod., 2011). V letih 2007 in 2010 so bile nabrane rozge okuženih trt in potaknjene v lonce z zemljo v rastlinjaku. Vinske trte, okužene z GLRaV-1, -3 in -4, so bile uporabljene kot izvirne (okužene) trte za študijo prenosa. Za potrditev okužbe so bile vse okužene trte testirane s testom DAS-ELISA (glej točko 3.1.1.1). Okužene trte so bile shranjene v rastlinjaku.

Za trte brez okužb z GLRaV smo uporabili certificirane cepljenke sorte 'Refošk' iz Trsničarske zadruge Vrhpolje. Cepljenke smo posadili v pet litrske lonce z mešanico glinopora in zemlje ter jih gojili v rastlinjaku.

3.2.3 Gojenje smokvinega volnatega kaparja (*P. ficus*)

Populacijo smokvinega volnatega kaparja (*P. ficus*) smo vzpostavili iz samic kaparjev nabranih v vinogradu v Dobravljah. Kolonije kaparjev smo gojili na kalčkih krompirja (slika 12) pri dnevni svetlobi in temperaturi 25 °C. Tako smo jih gojili več rodov in s tem zagotovili brezvirusne populacije kaparjev (Sforza in sod., 2003).



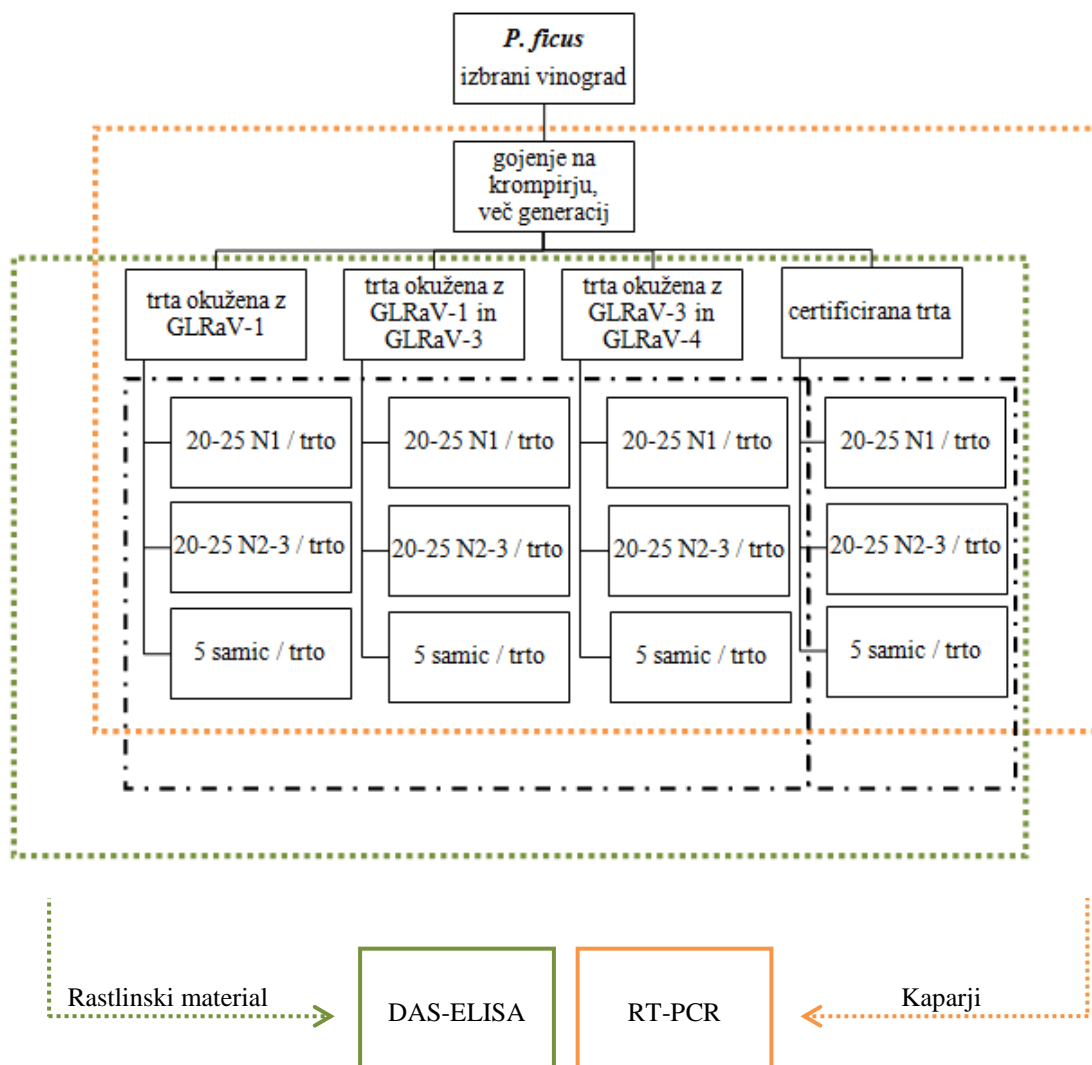
Slika 12: Gojenje *P. ficus* na kalčkih krompirja (foto: M. Štrukelj)

Figure 12: Rearing of *P. ficus* on potato sprouts (photo: M. Štrukelj)

3.2.4 Prenos virusov s smokvinim volnatim kaparjem (*P. ficus*)

Poskus prenosa GLRaV s kaparji (slika 13) je bil izveden v juniju leta 2012 in 2013 v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije pri temperaturi zraka 26 ± 3 °C in brez dodatne osvetlitve. Kaparje smo s finim čopičem prenesli na trte okužene z GLRaV-1, z GLRaV-1 in GLRaV-3 ter z GLRaV-3 in GLRaV-4 (obravnavanja). Za kontrolo smo uporabili certificirano cepljenko sorte 'Refošk'. Kaparje smo pustili na okuženih trtah, da so se prosto premikali in hranili. Po sedmih dneh smo jih prenesli z okuženih trt na certificirane cepljenke. Za vsako obravnavanje (3 obravnavanja z GLRaV kontrola) smo uporabili od sedem do deset trt, v kontroli pa tri trte. Na vsako trto smo prenesli od 20 do 25 kaparjev različnih razvojnih stopenj (nimfe 1. razvojne stopnje, nimfe 2. in 3. razvojne stopnje) ter pet odraslih samic. Trte smo v vseh fazah poskusa osamili v posebnih kletkah z gosto mrežo in vodo, izdelanih za ta namen. Kaparje smo pustili 14 dni na certificiranih trtah, da so se prosto premikali in hranili. Po vsaki stopnji v poskusu (krompir, okužene trte, certificirane trte) smo kaparje shranili v 2 ml mikrocentrifugirke pri -80 °C za nadaljnje analize.

Po končanem poskusu smo trte tretirali z insekticidom in po potrebi s fungicidom. Trte zaščitene v kletkah smo med rastno dobo primerno vzdrževali in le-te so tudi prezimile v rastlinjaku.



Slika 13: Shematični prikaz poskusa prenosov GLRaV s *P. ficus*
 Figure 13: Diagram for transmission experiment of GLRaVs by *P. ficus*

3.2.5 Ugotavljanje prisotnosti GLRaV v rastlinskem materialu

Prisotnost virusov v trtah smo pred poskusom in po njem preverili s testom DAS-ELISA (glej točko 3.1.1.1). Trte smo po poskusu testirali v septembru 2012, 2013 in 2014.

3.2.6 Identifikacija GLRaV v kaparjih

Iz enega kaparja ali iz skupine od treh do petih kaparjev smo izolirali celotno RNA. V mikrocentrifugirke s kaparji smo dodali 100 µl pripravljene ekstrakcijske raztopine iz kompleta MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit in jih ročno homogenizirali z mikropestilom. Za izolacijo smo uporabili 50 µl tako pripravljenega ekstrakta in komplet MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit, brez uporabe PIA (*angl.* Plant RNA Isolation Aid) (Ambion, Thermo Fisher Scientific, ZDA) po priporočilih proizvajalca. Za izolacijo smo uporabili napravo MagMAX Express (Ambion, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Po končanem izolacijskem postopku smo izolirano RNA shranili pri –80 °C do uporabe.

Obratno prepisovanje – RT je potekalo pri pogojih, kot so opisani v točki 3.1.3.2.1. Določen del virusnega genoma smo v PCR pomnožili s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (preglednica 8). Za celotno PCR-reakcijsko mešanico smo uporabili 2 µl cDNA in Thermo Scientific Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, ZDA) za pomnoževanje GLRaV-1 in GLRaV-3 ter KAPA2G Robust PCR kit (Kapa Biosystems, J. Afrika) za pomnoževanje GLRaV-4, oboje po priporočilih proizvajalca. Pogoji pomnoževanja GLRaV-4 so bili, kot je opisano v poglavju 3.1.3.1.2, s temperaturo naleganja 56 °C.

Pogoji pomnoževanja GLRaV-1 in GLRaV-3:

1 cikel	94 °C, 5 min
35 ciklov	94 °C, 30 s
	58 °C, 45 s (GLRaV-1) in 52 °C, 30 s (GLRaV-3)
	72 °C, 1 min (GLRaV-1) in 50 s (GLRaV-3)
1 cikel	72 °C, 7 min

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje posameznih segmentov virusnega genoma GLRaV-1 in GLRaV-3 v kaparjih

Table 8: Primer pairs used for amplification of parts of GLRaV-1 and GLRaV-3 genome in mealybugs

Virus	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'–3')	VEL (bp)	Vir
GLRaV-1	LR1hsp70-417	GAGCGACTTGCGACTTATCGA	320	1
	LR1hsp70-737	GGTAAACGGGTGTTCTTCAATTC		
GLRaV-3	LC1-F	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT	545	2
	LC2R	GTTGTCCCGGGTACCAGATAT		
GLRaV-4	LR4ms-CP-F	CGTCTGGGAACTGGAAGTGA	270	3
	LR4ms-CP-R	ACGAAAATATGAGAAGTCACAGAC		

VEL – velikost amplikona (bazni pari), vir – sklic na objavljena zaporedja začetnih oligonukleotidov: 1 – Osman in sod., 2007; 2 – Turturo in sod., 2005; 3 – načrtovano v tej študiji

Reakcijsko mešanico smo inkubirali v cikličnem termostatu Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Po inkubaciji smo produkte PCR shranili za krajši čas pri 4 °C ali –20 °C do uporabe. Prisotnost specifičnih pomnoženih produktov PCR smo preverili na 1 % agaroznem gelu. Elektroforeza je potekala 45 minut pri stalni napetosti 100 V.

3.3 KONCENTRACIJA GLRaV IN FIZIOLOŠKI PROCESI V VINSKI TRTI

3.3.1 Material in potek poskusa

3.3.1.1 Rastlinski material

Poskus smo začeli v oktobru 2013, ko smo nabrali rastlinski material vinske trte različnih sort, in sicer 'Modra Frankinja', 'Renski rizling' in 'Sivi Pinot' z značilnimi bolezenskimi znamenji, ki jih povzročajo GLRaV, in brez bolezenskih znamenj v vinogradu v Semiču.

V novembru 2013 smo nabrali rozge vinske trte, okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3, ter neokužene trte z omenjenima virusoma za pripravo ključev za potaknjence. Nabrani rastlinski material smo narezali na okrog 40 cm dolge ključe. Te smo povezali v skupine glede na vrsto virusa in jih do ukoreninjenja hranili v plastičnih vrečah v hladilnici pri 4 °C. Potaknjence smo ukoreninili tako, da smo ključe v steklenih vrčih z vodovodno vodo hranili (na svetlobi). Vodo smo redno menjali. Ključi so za ukoreninjenje potrebovali približno en mesec. Preživele ukoreninjene potaknjence smo posadili v petlitrske lonce, napolnjene z mešanico zemlje za pikiranje potaknjencev in vermikulita v razmerju 2 : 1. Tako pripravljene rastline smo vzdrževali v rastlinjaku pod naslednjimi pogoji: dnevna fotoperioda, temperatura od 25 do 30 °C (dnevna) in 15 °C (nočna), zračna vlaga od 40 do 60 %. Trte smo zalivali vsak četrti dan oziroma po potrebi. Zalite so bile tudi 24 ur pred vsakim merjenjem fizioloških procesov. Med rastno dobo smo trte tretirali z sistemičnima pripravkoma z aktivno snovjo heksitiazoks (akaricid) in tebukonazol (fungicid) ter pognojili z raztopino gnojila NPK 6-3-6 z mikrohranili in dodatkom morskih alg proizvajalca Unichem. Zaradi bujne rasti smo nove poganjke ustrezno krajšali. Podrobnejši časovni potek je predstavljen v preglednici 9.

Preglednica 9: Potek opravljenih del in meritev na vinski trti v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije
Table 9: Progress of the work carried out and measurements on grapevine in the greenhouse at the Agricultural institute of Slovenia

Datum	Opravilo
13. 11. 2013	nabiranje materiala, priprava ključev, test ELISA
25. 2. 2014	ukoreninjenje
24. 3. 2014	sajenje ukoreninjenih potaknjencev
27. 5. 2014	tretiranje s sistemičnima pripravkoma
3. 6. 2014	1. meritev fizioloških parametrov in vzorčenje
27. 6. 2014	obrezovanje
14. 7. 2014	2. meritev fizioloških parametrov in vzorčenje
16. 7. 2014	gnojenje
11. 8. 2014	3. meritev fizioloških parametrov in vzorčenje
25. 8. 2014	4. meritev fizioloških parametrov in vzorčenje
8. 9. 2014	5. meritev fizioloških parametrov in vzorčenje

3.3.1.2 Potek meritev

Na podlagi rezultatov testa ELISA smo naredili štiri obravnavanja po osem trt:

- obravnavanje A: okužene z GLRaV-1
- obravnavanje B: okužene z GLRaV-3
- obravnavanje C: okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3
- obravnavanje N: neokužene, kontrola

Meritve fizioloških parametrov smo razporedili skozi celotno rastno sezono. Fiziološke procese smo merili na tretjem polno razvitem listu. Liste smo predhodno ustrezno označili. Meritve so bile opravljene med 9. in 12. uro. Po vsakem merjenju smo odvzeli del lista za preverjanje prisotnosti virusov in določanje koncentracije GLRaV-3 v trti oziroma merjenem listu. Odvzem vzorca smo opredelili kot sistemično poškodbo (napako). Opazovali smo tudi pojavljanje bolezenskih znamenj na preučevanih trtah.

3.3.2 Dokazovanje prisotnosti GLRaV v poskusnih trtah

3.3.2.1 Test DAS-ELISA

Prisotnost virusov GLRaV-1, -3 in -4 smo v nabranih vzorcih preverili s testom DAS-ELISA (glej točko 3.1.1.1). S tem testom smo preverjali tudi prisotnost omenjenih virusov v ključih po njihovi pripravi.

3.3.2.2 Izolacija RNA, RT in PCR

Izolacija RNA je potekala, kot je opisano v točki 3.1.2.2, le da smo tokrat natehtali 4–5 mg (dva krogca premera 5 mm) rastlinskega tkiva.

RT je potekal pri pogojih, kot so opisani v točki 3.1.5, in PCR za GLRaV-1, kot je opisano v točki 3.1.3.2.1. GLRaV-3 smo preverjali z začetnimi oligonukleotidi iz preglednice 10 pri spodnjih pogojih:

Pogoji pomnoževanja:

1 cikel	94 °C, 5 min
35 ciklov	94 °C, 30 s
	54 °C, 30 s
	72 °C, 50 s
1 cikel	72 °C, 7 min

Preglednica 10: Seznam začetnih oligonukleotidov uporabljenih za pomnoževanje 3' nekodirajoče regije GLRaV-3

Table 10: List of primers used to amplify the 3' non-coding region of GLRaV-3

Gen	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'–3')	Ref
GLRaV-3	LR3_18345F	CCTCACGGTTTAATACTCTG	1
HSP70h	LR3-18488R	ATTGTCGATAAGTTAGCCTC	

VEL – velikost amplikona (bazni pari), vir – vir objavljenih zaporedij: 1 – Bester in sod., 2014

3.3.3 Določanje koncentracije virusne RNA

3.3.3.1 Razgradnja genomske DNA

V vzorcih RNA smo po izolaciji razgradili genomsko DNA po navodilih proizvajalca kita TURBO DNase free kit (Life Technologies, ZDA). Genomsko DNA smo razgradili v reakciji 25 µl, ki je vsebovala 8 µl izolirane RNA. Vzorce smo shranili pri –80 °C. Uspešnost razgradnje smo preverili s pomnoževanjem 18S ribosomalne RNA v PCR reakciji v realnem času, za kar smo uporabili kit Eukaryotic 18S rRNA endogenous control (VIC®/MGB probe, primer limited) po priporočilih proizvajalca (Life Technologies, ZDA).

3.3.3.2 Kvantitativna PCR v realnem času (qPCR)

Koncentracijo virusne RNA smo izmerili s qPCR. Uporabili smo nespecifično metodo SYBR Green I, pri kateri se vrednotenje nastalega PCR produkta v času reakcije meri na podlagi količine fluorescence, ki jo barvilo oddaja, ko se veže na dvoverižno DNA.

V vsakem vzorcu smo analizirali izbrani odsek HSP70h glede GLRaV-3 ter odseka za referenčna gena COX in 18S, s katerima smo preverjali pomnoževanje rastlinske RNA. Na optično ploščico formata 96-luknjic smo za vsak vzorec nanesti 18 μ l reakcijske mešanice, ki je bila odvisna od preučevanega gena, in 2 μ l cDNA.

Za določanje tarčnih genov GLRaV-3 smo uporabili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala Power SYBR® Green PCR Master Mix (2x), 100 pmol vsakega od parov začetnih oligonukleotidov za izbrani gen (preglednica 10) in 2 μ l cDNA.

Za določanje referenčnih genov COX in 18S smo uporabili reakcijsko mešanico TaqMan®, ki smo jo pripravili iz mešanice 2x Master Mix, ki je vsebovala referenčno barvilo ROX™, 10 pmol vsakega od začetnih oligonukleotidov za COX in 0,5 μ l COX sonde. Reakcijska mešanica za določanje 18S je vsebovala že pripravljeno mešanico skupaj z začetnimi oligonukleotidi in sondo v kitu Eukaryotic 18S rRNA endogenous control (VIC®/MGB probe, primer limited). Reakcijo smo izvedli po priporočilih proizvajalca.

Vsak vzorec smo analizirali v dveh tehničnih ponovitvah. V dve luknjici na optični ploščici smo za kontrolo kontaminacije – NTC (*angl.* no template control) k reakcijski mešanici namesto vzorca dodali 2 μ l dH₂O. Ploščico smo prekrili z lepljivo prozorno folijo Abi Prism in centrifugirali 2 minuti pri hitrosti 1000x g. Zatem smo optično ploščico vstavili v ciklični termostat ABI 7500 Real-Time PCR System, kjer je pomnoževanje specifičnega odseka nukleotidnega zaporedja potekalo ob privzetih nastavitvah, razen pri GLRaV-3. Pri GLRaV-3 smo pred denaturacijo dodali dodaten cikel 15 s pri 54 °C za optimalno naleganje začetnih oligonukleotidov. Proizvajalec vseh uporabljenih reagentov in aparatur je Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ZDA. Po reakciji smo za GLRaV-1 in GLRaV-3 ocenili njeno specifičnost na podlagi disociacijske krivulje in dodatno preverili specifičnost pomnoževanja z 1 % agarozno elektroforezo.

3.3.3.3 Validacija qPCR

Za tarčni in oba referenčna gena smo z računalniškim programom Sequence Detection Software (SDS) v2.0.6 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ZDA) izračunali učinkovitost pomnoževanja pri optimalni koncentraciji začetnih oligonukleotidov. Za vsak gen smo izračunali standardno krivuljo na podlagi petih 10-kratnih redčitev cDNA iz dveh

vzorcev. Reakcijo smo izvedli v dveh tehničnih ponovitvah. Za vsako kombinacijo smo dodali negativno kontrolo z vodo (NTC). Učinkovitost pomnoževanja smo izračunali iz naklona linearne regresijske premice med vrednostmi C_q in logaritmirano koncentracijo DNA po standardni enačbi (Pfaffl, 2004):

$$E (\%) = 10^{\left(\frac{1}{S}\right)} - 1 \times 100, \quad \dots (1)$$

pri čemer je *E* učinkovitost pomnoževanja gena v reakciji PCR in *S* naklon premice.

Z izračunom smo ugotovili, da je učinkovitost pomnoževanja tarčnega in referenčnih genov približno enaka, in sicer od 92 do 94 %. Iz umeritvene krivulje smo dobili tudi podatke o koeficientu linearne regresije (*R*²).

3.3.3.4 Obdelava podatkov qPCR

Podatke smo analizirali s programom SDS v 2.0.6. Program je izrisal graf pomnoževanja produktov PCR, na katerem je bilo na osi *x* število ciklov PCR, na osi *y* pa so bile vrednosti fluorescenčnega signala (ΔR_n). V programu smo nastavili samodejno bazno linijo. Na njeni podlagi je program za vsako reakcijo posebej izračunal, v katerem ciklu je ΔR_n presegel nastavljeni prag – Ct (*angl.* threshold cycle). Vrednost Ct je bila obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNA/RNA, zato smo jo lahko uporabili za izračun začetne količine RNA v vzorcu.

V programu Microsoft Excel (Microsoft, ZDA) smo izračunali povprečne Ct vrednosti vzorca iz dveh ponovitev in razliko Ct vrednosti med dvema zaporednima redčitvama (ΔCt), ki nam je povedala, ali je bila prisotna inhibicija pomnoževanja.

Relativno kvantifikacijo virusne RNA v posameznem vzorcu, glede na količino virusne RNA v določenem referenčnem vzorcu, smo izračunali po enačbi $R = 2^{-\Delta \Delta Ct}$ (Pfaffl, 2004):

$$R = 2^{-(\Delta Ct_{\text{vzorca}} - \Delta Ct_{\text{reference}})}, \quad \dots (2)$$

pri čemer je *R* relativna količina virusne RNA, $\Delta Ct_{\text{vzorca}}$ razlika Ct vrednosti med tarčnim zaporedjem GLRaV in referenčnim genom v posameznem vzorcu, $\Delta Ct_{\text{reference}}$ razlika povprečnega Ct med tarčnim zaporedjem GLRaV in referenčnim v izbranem referenčnem vzorcu (geometrijsko povprečje Ct referenčnih genov COX in 18S).

3.3.4 Merjenje fizioloških parametrov

3.3.4.1 Meritve fotosinteze s prenosnim merilnikom fotosinteze LI-6400

Osnova prenosnega merilnega sistema LI-6400 je merilna komora, ki obdaja fotosintezno aktivno tkivo. Zrak vstopa v komoro z znanim pretokom, ki ga meri in nadzira kontrolor. List spreminja koncentracije CO₂ (C) in H₂O (W) v komori. Velikost spremembe v koncentraciji CO₂ in H₂O med zrakom, ki vstopa v komoro (C_e, W_e), in zrakom, ki izstopa (C_o, W_o), je odvisna od aktivnosti izmenjave plinov.

V listni komori je ventilator za mešanje zraka, ki poveča prevodnost mejne plasti v okolici lista. S tem je omogočen boljši nadzor nad temperaturo lista in zmanjšana možnost napak, povezanih z oceno prevodnosti listnih rež. V komori je tudi senzor za merjenje temperature lista in zraka ter svetlobni senzor. V novejših prenosnih sistemih obstaja možnost uravnavanja temperature v komori. Tlak v listni komori je le rahlo višji od sobnega, s čimer je preprečen vstop zunanjega zraka vanjo. CO₂ z difuzijo prehaja z mesta z višjo proti mestu z nižjo koncentracijo, celo ob tlačnem gradientu. Sistem LI-6400 ima tesnilo iz neoprena, ki omejuje difuzijo CO₂, vendar ne popolnoma (Lambers in sod., 2008).

Z LI-6400 lahko sami nastavimo vstopni koncentraciji CO₂ in H₂O v zraku. V tem primeru usmerimo zrak, ki vstopa v sistem, na kolone, napolnjene s sušilom, ki odstrani ves CO₂ in vso vlago iz zraka, nato pa sami nastavimo koncentraciji obeh plinov v vstopnem zraku. Ker molekuli CO₂ in H₂O adsorbirata infrardečo svetlobo, lahko z IRGA-analizatorjem izmerimo koncentraciji obeh molekul. IRGA je v glavi senzorja, kar omogoča hitrejše zaznavanje sprememb v listih in prilagajanje vstopnega zraka tem razmeram. Sistemi so opremljeni tudi z računalniško enoto, ki nadzira razmere ter zbira in obdela podatke (Using the LI-6400, 2008).

Neto fotosintezo smo merili s prenosnim merilnikom fotosinteze LI-6400 (Licor, ZDA). V merilno kiveto smo vstavili izbrani list vinske trte tako, da je bila z listom pokrita celotna površina okenca merilne kivete. Koncentracija CO₂ je bila uravnana na 380 μmol CO₂ mol⁻¹, temperatura lista na 25 °C in svetloba na 1000 μmol m⁻² s⁻¹, kar je bilo v svetlobnem saturacijskem območju fotosinteze. Posamezno meritev smo končali, ko je bila dosežena stabilna razlika med koncentracijo CO₂ v zraku, ki je bil v kiveto dovajan, in zrakom, ki je iz kivete izstopal. Dejansko fotokemično učinkovitost PSII (Fv'/Fm') merjenega lista smo izmerili tako, da je bil list osvetljen s saturacijskim svetlobnim pulzom, fluorometer na glavi merilne kivete pa je izmeril oddano svetlobo.

3.3.4.2 Merjenje fluorescence (PAM-fluorometer)

Metoda merjenja fluorescence klorofila daje informacijo o stanju fotosinteznega aparata. Ob osvetljevanju klorofil del fotosintezno aktivne svetlobe sprosti kot svetlobo daljše valovne dolžine, običajno kot rdečo svetlobo. Fenomen temelji na Kautskyjevem načelu, ki meri zvezo med minimalno F_0 in maksimalno fluorescenco F_m , za oceno fotokemijske učinkovitosti vzorca. Preučevani vzorec pred meritvijo postavimo v temo in ga s kratkimi pulzi osvetljujemo (F_0), nato pa močno osvetlimo (F_m). Izračunano spremenljivko F_v , ($F_m - F_0$), uporabimo za izračun razmerja F_v/F_m , ki je ocena potencialne oziroma maksimalne fotokemične učinkovitosti PSII in je sorazmerna fotosintezi (Vodnik, 2001).

Potencialno oziroma maksimalno fotokemično učinkovitost PSII (F_v/F_m) smo merili s PAM-fluorometrom. Na izbrani list smo 10 minut pred merjenjem namestili priponke za temotno adaptacijo in medtem ko smo čakali na temotno adaptacijo, smo izmerili še dejansko fotokemično učinkovitost PSII.

3.3.4.3 Merjenje vsebnosti klorofila (SPAD – klorofilomer)

Klorofilomer (ali N-tester) je prenosna merilna naprava, s katero lahko hitro in preprosto izmerimo vsebnost fotosinteznih pigmentov (klorofila) v rastlinskem tkivu. Naprava nam omogoča hitro in neinvazivno meritev (lista ne poškodujemo). Posamezna meritev je opravljena v nekaj sekundah in majhna površina, na kateri merimo, omogoča, da lahko meritve opravljamo tudi na rastlinah z drobnimi listi. Naprava SPAD vsebuje dva vira svetlobe (650 in 940 nm) in detektor, ki meri prepustnost (transmisijo) svetlobe skozi list. Izmerjene vrednosti (t. i. vrednosti SPAD) so ocena vsebnosti klorofila. Z meritvijo dobimo oceno preskrbljenosti rastline z dušikom. Metoda temelji na spoznanju, da je preskrbljenost rastlin z dušikom v neposredni povezavi z vsebnostjo klorofila v njihovih listih. Vendar je ta odvisna tudi od genetskih zmožnosti rastlin, osvetlitve, vsebnosti vode v listih, časa meritve prek dneva, temperature zraka, mesta meritve na listih in pedoloških lastnosti tal (Sušin in sod., 2004).

Pri ugotavljanju vsebnosti klorofila v listu smo opravili meritve z napravo SPAD-502 klorofilometer (Minolta, Osaka, Japonska). Na vsakem listu smo opravili tri meritve vsebnosti klorofila in si zapisali povprečje teh meritev, ki dajejo le oceno vsebnosti klorofila.

3.3.5 Statistične metode

Dobljene podatke v nalogi smo uredili in obdelali z Microsoft Excel 2007 (Microsoft, ZDA). Za ugotavljanje statistično značilnih sprememb parametrov v času smo obdelali

podatke s programom R (R Development Core Team, 2008) s paketom *Rcmdr* (v. 2.2-3) in programom GraphPad Prism 5.00.

Obravnavanja A, B, C in N v času prvega vrednotenja fizioloških parametrov smo primerjali z enosmerno analizo variance (ANOVA, $p \leq 0,05$) ter iskali statistično značilne razlike med obravnavanji s Tukeyjevim HSD in Dunnetovim posttestom. Obravnavanji A in C smo primerjali z dvosmerno analizo varianc (ANOVA, $p \leq 0,05$) in iskali statistično značilne razlike med obravnavanji z Bonferonnijevim posttestom. Vse meritve na slikah in preglednicah so predstavljene kot povprečje s standardno napako (povprečje \pm s.n.).

4 REZULTATI

4.1 MOLEKULARNE ZNAČILNOSTI GLRAV-4

S testom DAS-ELISA smo ugotovili mešano okužbo z GLRaV-3 in GLRaV-4 v dveh od 70 simptomatičnih vzorcev vinske trte. Z omenjeno metodo nismo zaznali ArMV, CLRV, GFkV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GVA, RBDV, RpRSV, SLRSV, TBRV, ToRSV in TRSV s testom DAS-ELISA nismo zaznali.

Enega od dveh vzorcev, ki sta potrjevala prisotnost GLRaV-4 smo uporabili za nadaljnjo molekularno karakterizacijo izbranega izolata. Po njegovi detekciji z IC-RT-PCR in določanju nukleotidnega zaporedja smo iz štirih prekrivajočih delov sestavili izbrani del genoma slovenskega izolata GLRaV-4. Dobljeno nukleotidno zaporedje smo poimenovali 055-SI in objavili v GenBank (KM892778).

Določeno nukleotidno zaporedje slovenskega izolata 055-SI je dolgo 1769 nukleotidov in pokriva 3'-terminalni del genoma GLRaV-4. Omenjeni del vključuje 204 nukleotide gena p60, 78 nukleotidov intergenske regije, celotna gena CP in p23 ter 42 nukleotidov 3' nekodirajoče regije na koncu genoma GLRaV-4. Nukleotidno zaporedje CP in p23 izolata 055-SI smo primerjali z vsemi prosto dostopnimi zaporedji GLRaV-4. Na podlagi primerjav smo zbrali 16 zaporedij za CP in 13 zaporedij gena p23, ki so bila dolga vsaj toliko kot zaporedje slovenskega izolata (preglednica 7).

4.1.1 Analiza CP slovenskega izolata 055-SI

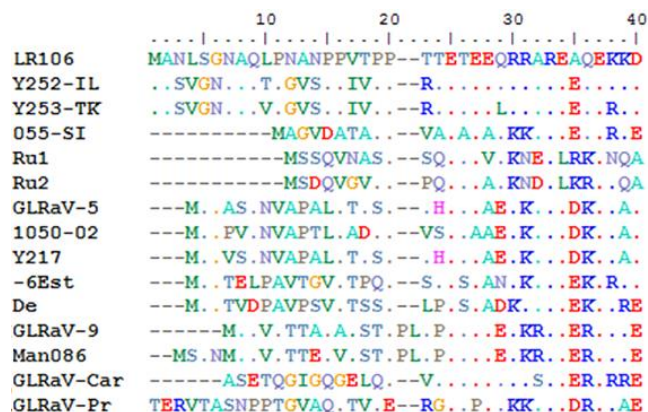
Nukleotidno zaporedje CP izolata 055-SI sestavlja 789 nukleotidov. Ta gen slovenskega izolata ima največjo nukleotidno podobnost z izolati LR106, Y235-TK in Y252-IL (od 81 do 82 %). Podobnost z drugimi izolati je med 69 in 74 % (Ru1, Ru2, GLRaV-5, 1050-02, Y217, -6Est, GLRaV-9, Man086 in -De). Z izolatoma -Car in -Pr ima le 68 % podobnosti (preglednica 11). Celotno aminokislinsko zaporedje CP izolata 055-SI je dolgo 262 aminokislin. Najnižjo podobnost ima z izolati Ru1, Ru2, -Car in -Pr (od 76 do 78 %) (preglednica 11). Nekoliko višja podobnost zaporedja celotnega CP je z izolati GLRaV-5, 1050-02, Y217, -6Est, GLRaV-9, Man086 in -De (od 79 do 81 %). Podobnost izolata 055-SI z izolati LR106, Y235-TK in Y252-IL je tudi v tem primeru največja (88 %). Še večji odstotek podobnosti (od 95 do 97 %) dobimo pri primerjavi 234 aminokislin dolgega odseka na C-terminalnem delu CP med omenjenimi izolati. To območje se je pokazalo tudi za najbolj ohranjeno znotraj CP.

Preglednica 11: Deleži enakosti nukleotidnih (pod diagonalo) in aminokislinskih (nad diagonalo) zaporedij plaščnega proteina med slovenskim izolatom in drugimi izolati GLRaV-4

Table 11: Nucleotide and amino acid sequence identity (%) of the coat protein (below and above the diagonal, respectively) between Slovenian variant and corresponding sequences of GLRaV-4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
LR106	1	94	94	88	74	76	83	82	83	81	81	81	77	77	80	51
Y252-IL	2	93	99	88	75	76	81	82	81	81	81	82	78	79	80	50
Y253-TK	3	90	95	88	74	75	81	82	81	81	80	81	78	78	80	51
055-SI	4	81	81	82	76	78	79	80	79	81	81	81	76	77	81	50
Ru1	5	68	68	67	69	93	74	73	74	72	71	73	74	73	74	53
Ru2	6	70	70	70	70	88	75	75	75	74	73	74	74	75	75	53
GLRaV-5	7	71	73	73	72	67	68	96	99	85	87	85	78	77	86	52
1050-02	8	72	74	73	73	68	69	94	96	85	86	85	78	77	85	52
Y217	9	71	73	73	73	67	68	99	94	85	87	85	78	77	86	52
-6Est	10	73	72	72	72	68	68	74	74	75	84	83	78	75	91	51
GLRaV-9	11	72	72	72	74	66	67	80	79	80	76	97	78	77	86	50
Man086	12	72	72	72	74	66	68	81	79	81	77	97	78	76	85	51
GLRaV-Car	13	70	69	69	68	67	68	68	69	68	69	68	68	75	75	52
GLRaV-Pr	14	70	70	71	68	64	67	69	68	69	69	67	68	68	75	51
-De	15	71	72	72	73	68	69	75	74	75	85	75	76	69	68	51
PMWaV-1	16	55	55	55	56	57	56	56	56	55	55	55	60	58	56	

Največ neujemanj je na N-terminalnem delu CP. To območje je dolgo od 29 do 39 aminokisljin, odvisno od izolata (slika 14). Primerjava aminokislinskih zaporedij med 055-SI, LR106, Y235-TK in Y252-IL je pokazala, da je izolat 055-SI za 10 aminokisljin krajši od preostalih treh. Na tem delu proteina je najmanjša podobnost med GLRaV-9 in Ru1 (13 %), medtem ko je največja (97 %) med izolatom GLRaV-5 in Y252-IL. Podobnost 055-SI s preostalimi izolati je na tem delu od 23,6 do 42,1 %.



Slika 14: Aminokislinska zaporedja N-terminalnega dela CP GLRaV-4

Figure 14: Amino acids sequences of N-terminal part of CP GLRaV-4

4.1.2 Analiza p23 gena slovenskega izolata 055-SI

Gen p23 slovenskega izolata 055-SI sestavlja 624 nukleotidov in ima najvišjo podobnost z LR106 (87 %). Sledijo GLRaV-5, 1050-02, Y217, -6Est, GLRaV-9 in Man086 z od 79 do 81 % podobnostjo (preglednica 12). Tako kakor pri CP tudi pri p23 doseže pri podobnosti izolat 055-SI najnižje vrednosti z izolati -Pr, -Car, Ru1 in Ru2.

In silico prevedeno aminokislinsko zaporedje gena p23 je dolgo 207 aminokislin. Lestvica podobnosti p23 proteina izolata 055-SI z drugimi izolati je podobna kakor pri nukleotidni primerjavi omenjenega gena (preglednica 12).

Preglednica 12: Deleži enakosti nukleotidnih (pod diagonalo) in aminokislinskih (nad diagonalo) zaporedij gena p23 med slovenskim izolatom in drugimi izolati GLRaV-4

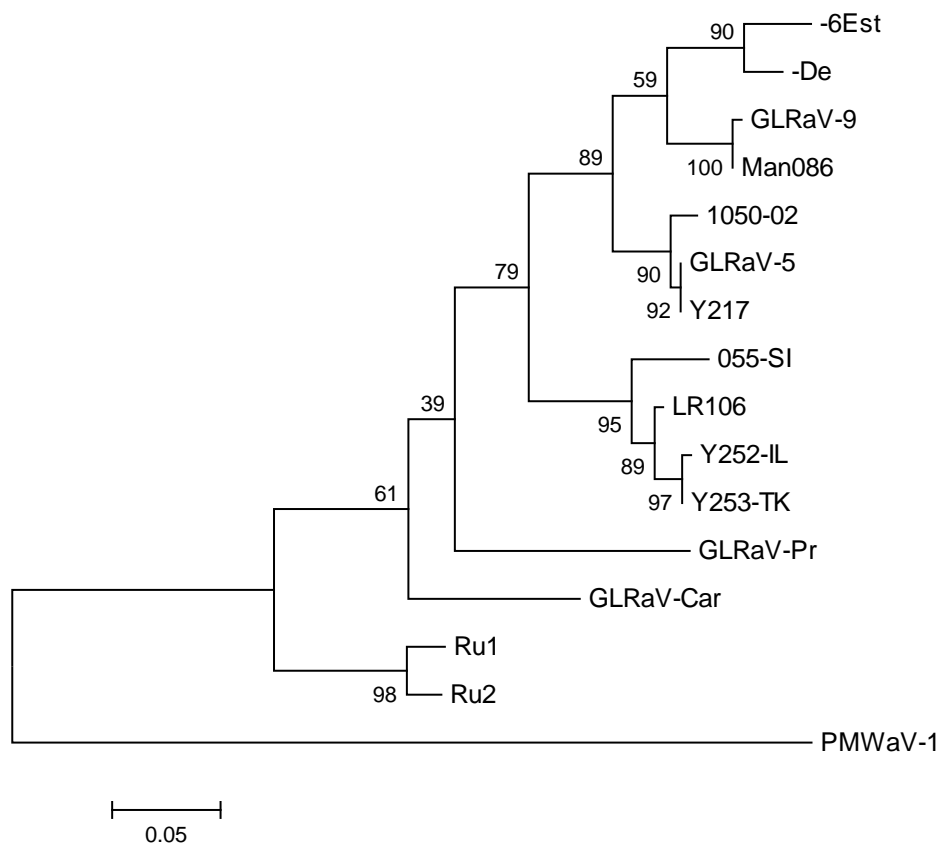
Table 12: Nucleotide and amino acid sequence identity (%) of the p23 gene (below and above the diagonal, respectively) between Slovenian variant and corresponding sequences of GLRaV-4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
LR106	1	85	52	52	71	70	71	71	70	70	52	62	37
055-SI	2	87	57	56	76	75	76	76	75	75	57	65	38
Ru1	3	60	61	87	53	52	53	54	54	53	55	56	38
Ru2	4	61	61	88	52	53	52	53	54	52	55	55	38
GLRaV-5	5	79	80	58	60	94	100	83	92	93	56	62	40
1050-02	6	79	81	58	59	96	94	83	89	90	56	61	39
Y217	7	79	81	58	59	99	96	83	92	93	56	62	40
-6Est	8	77	79	58	59	85	85	85	86	85	59	62	38
GLRaV-9	9	79	80	59	59	91	89	90	85	97	57	62	40
Man086	10	78	80	58	58	92	90	92	85	97	56	63	39
GLRaV-Car	11	60	62	60	59	61	61	61	63	62	61	50	37
GLRaV-Pr	12	69	70	61	59	68	68	68	70	67	69	59	38
PMWaV-1	13	46	46	46	45	46	45	46	46	45	45	48	50

4.1.3 Filogenetske analize

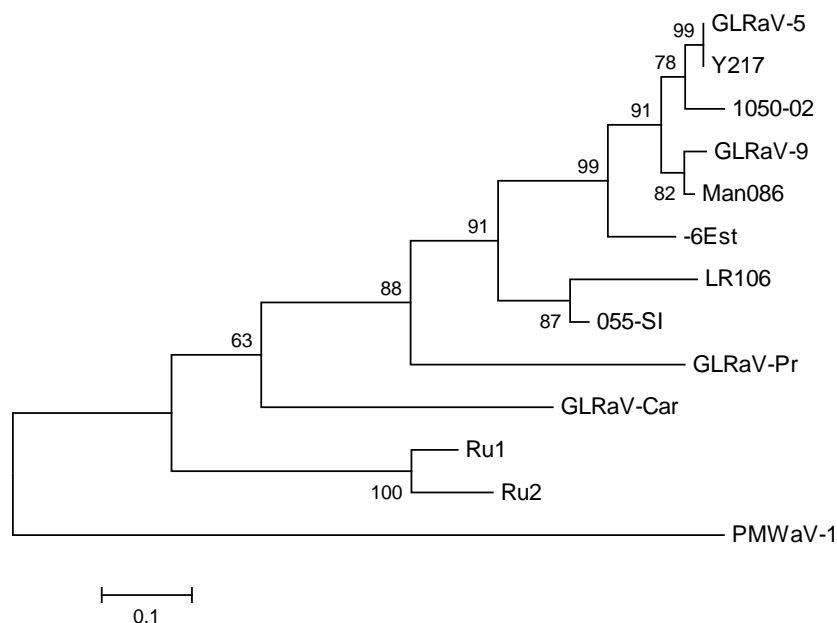
Za izris filogenetskih dreves smo s programom določili specifičen model aminokislinskih substitucij na podlagi najmanjše BIC-vrednosti za vsak set podatkov. Model Jones-Taylor-Thornton + G (Jones in sod., 1992) je bil izbran kot najboljši za oba gena (CP in p23). Z uporabo algoritma The maximum-likelihood (ML) in izbranega modela smo na podlagi nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij izrisali filogenetski drevesi za vsak gen posebej. Pri obeh genih sta oba sklopa zaporedij dala enako združevanje izolatov. Prikazani sta le drevesi, izrisani iz aminokislinskih zaporedij (slika 15 in slika 16).

Filogenetski drevesi posameznih genov sta obdržali zelo podobno obliko in topološko postavitev vej. Različki GLRaV-4 se pri obeh genih združujejo v pet skupin. Slovenski izolat 055-SI se uvrsti v skupino z izolati LR106, Y252-IL in Y253-TK, kar je v skladu s podobnostjo nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij. Znotraj skupin imajo izolati zelo majhno genetsko raznolikost.



Slika 15: Filogenetsko drevo narisano iz aminokislinskih zaporedij plaščnega proteina – CP. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Drevo je koreninjeno s PMWaV-1.

Figure 15: Phylogenetic tree based on amino acid sequences corresponding to the coat protein - CP datasets. Bar represent genetic distance. PMWaV-1 is used as an outgroup.



Slika 16: Filogenetsko drevo narisano iz homolognih aminokislinskih zaporedij gena p23. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Drevo je koreninjeno s PMWaV-1.

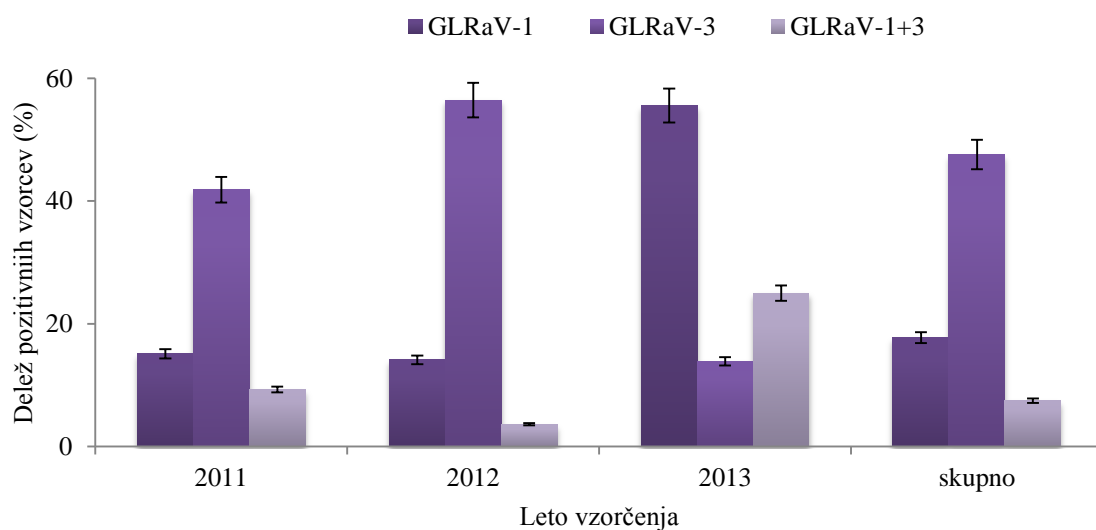
Figure 16: Phylogenetic tree based on homologues amino acid sequences corresponding to the p23 gene datasets. Bar represent genetic distance. PMWaV-1 is used as an outgroup.

4.2 GENETSKA RAZNOLIKOST GLRaV-1 IN GLRaV-3

4.2.1 Okuženost vinske trte z GLRaV

S testom DAS-ELISA smo testirali vzorce trt z značilnimi bolezenskimi znamenji za GLD. Od 456 testiranih trt smo pri 332 trtah potrdili okužbo z vsaj enim virusom. Z GLRaV-1 je bilo okuženih 81 trt, 217 pa jih je bilo okuženih z GLRaV-3. Mešanih okužb je bilo le 34. Virusov GLRaV-2, GLRaV-4 in GVA nismo določili v nobenem od testiranih vzorcev. Razširjenost virusov med belimi in rdečimi sortami, kjer je znana sorta ni pokazala značilnih razlik. Največ testiranj je bilo opravljenih v letu 2012 in najmanj v letu 2013. V letu 2011 so bili testirani vzorci iz celotne Slovenije, v letu 2012 jih je bila večina iz zahodnega in leta 2013 iz vzhodnega dela Slovenije. Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da je GLRaV-1 bolj pogost v vzhodni, GLRaV-3 pa v zahodni Sloveniji (slika 17).

Podrobneje smo preučili vinograde v Dobravljah (zahod Slovenije) in Semiču (vzhod Slovenije). V Dobravljah smo testirali 194 trt. Med njimi je en vzorec potrjeval le prisotnost GLRaV-1, 64 % je bilo pozitivnih v zvezi z GLRaV-3, medtem ko je bilo 4,6 % mešanih okužb z GLRaV-1 in GLRaV-3. V vinogradu v Semiču smo testirali 40 trt. Mešano okužbo smo potrdili v 28,2 %, z GLRaV-1 je bilo okuženih 43,6 % in z GLRaV-3 12,8 % vzorcev.



Slika 17: Ugotavljanje prisotnosti GLRaV s testom DAS-ELISA v letih 2011, 2012 in 2013 v vinski trti s 95-odstotnim intervalom zaupanja

Figure 17: GLRaV assessment in vine samples by DAS-ELISA method in 2011, 2012 and 2013 with 95% confidence interval

4.2.2 Izbor izolatov

Glede na geografsko lego vinogradov smo med vsemi pozitivnimi vzorci za nadaljnjo analizo genetske raznolikosti izbrali 24 vzorcev okuženih z GLRaV-1, 32 okuženih z GLRaV-3 in 12 z mešano okužbo obeh virusov (skupno 68). V analizo genetske raznolikosti smo vključili 103 izolate GLRaV-1 (36 slovenskih in 67 tujih) in 59 izolatov GLRaV-3 (44 slovenskih in 15 tujih). Izolate smo pridobili iz 20 vinogradov in so označeni z začetnicami kraja, v katerem je vinograd (Dobravlje, DOB; Semič, SE; Moravče pri Gabrovki, MO itd.; Priloga A). Večina izbranih izolatov je iz dveh vinogradov, Dobravlje (15 izolatov) in Semič (13 izolatov), kjer smo testirali trte z značilnimi bolezenskimi znamenji za GLD.

Nukleotidna zaporedja gena HSP70h posameznega vzorca smo pregledali in primerjali z znanimi zaporedji v zbirki podatkov NCBI. Vsi kloni istega vzorca so pripadali istemu izolatu. Z uporabljenim parom začetnih oligonukleotidov smo potrdili okužbo ene trte z le enim izolatom posameznega GLRaV. Dobljena nukleotidna zaporedja gena HSP70h smo poimenovali in objavili v GenBank (KP866939-KP866974 za GLRaV-1 in KP866975-KP867018 za GLRV-3).

4.2.3 Analiza slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3

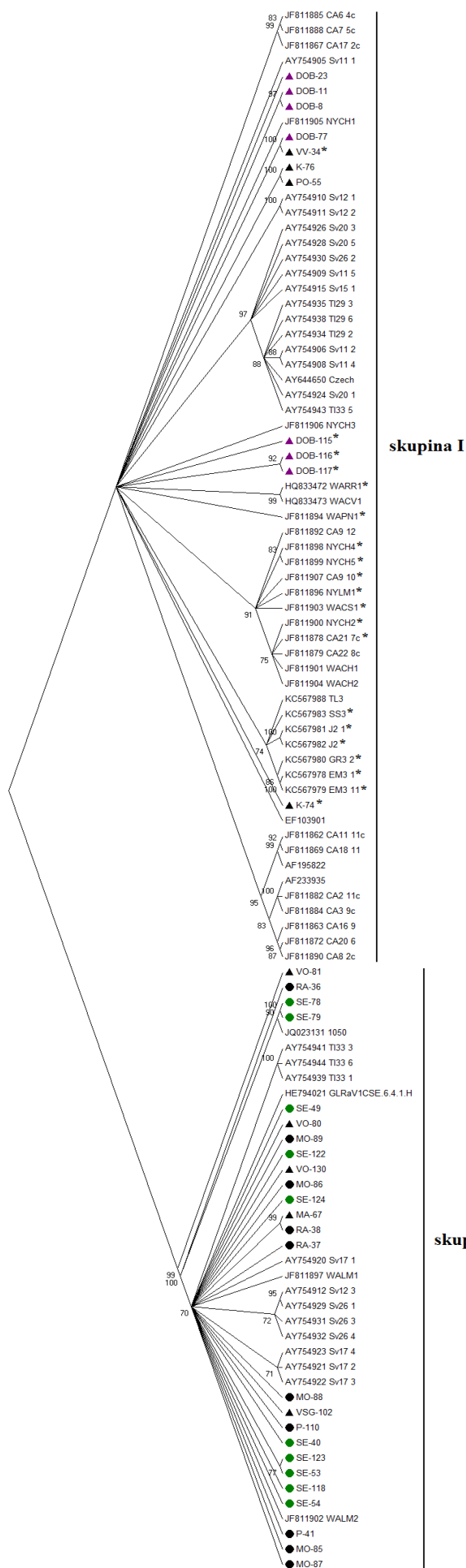
Filogenetski drevesi za GLRaV-1 in GLRaV-3 smo izrisali z uporabo algoritma The maximum-likelihood (ML) in izbranega modela na podlagi nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij izbranih izolatov. Drevesi sta imeli enako postavitev vej (topologijo), zato smo prikazali le drevesi iz nukleotidnega zaporedja. Ne glede na virus se slovenski izolati združujejo v dve skupini (vzhod ter vzhod in zahod) glede na geografsko lego vinogradov. Mešane okužbe niso imele vpliva na raznolikost omenjenih virusov.

4.2.3.1 Analiza izolatov GLRaV-1

Podobnost 975 nukleotidov dolgih zaporedij gena HSP70h slovenskih izolatov GLRaV-1 je od 85,4 do 100 %. Podobnost med sedmimi izolati iz Dobravelj je od 95,2 do 100 % med nukleotidnimi in od 97,5 do 100 % med aminokislinskimi zaporedji. Podobnost med desetimi izolati iz Semiča je od 92,6 do 100 % med nukleotidnimi in od 95,1 do 100 % med aminokislinskimi zaporedji. Izolata SE-78 in SE-79 sta identična ter imata najmanjšo podobnosti z drugimi izolati iz Semiča.

Večina izolatov GLRaV-1 v zbirki GenBank je dolgih 500 bp, zato smo tudi mi za filogenetske analize uporabili zaporedja enake dolžine. Za izris filogenetskih dreves smo s programom na podlagi najmanjše BIC-vrednosti kot specifičen model nukleotidnih substitucij izbrali The Tamura 3-parameter model.

Na temelju filogenetske analize so se 103 obravnavani izolati razdelili v dve skupini, v skupino I in skupino II (slika 18). Slovenski izolati so bili razporejeni v obe skupini. Vseh 11 izolatov v skupini I izvira iz zahodnega dela Slovenije, medtem ko spada v skupino II 25 izolatov iz vse Slovenije. V skupini II je le 20 % izolatov iz zahodnega, preostali so iz vzhodnega dela Slovenije. Vsi izolati iz Dobravelj spadajo v skupino I, v skupino II pa izolati iz Semiča. Na podlagi te delitve izolatov sklepamo, da se slovenski izolati GLRaV-1 genetsko in geografsko med seboj razlikujejo. S simulacijo restrikcijske analize je endonukleaza *Bsi*WI rezala samo izolate iz skupine II, medtem ko je *Sal*I rezala le polovico izolatov skupine I.



Slika 18: Filogenetsko drevo izbranih izolatov GLRaV-1 narisano na podlagi delnega nukleotidnega zaporedja gena HSP70h. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Prikazane so le vrednosti bootstrap, ki so ≥ 70 %. Izolati iz zahodnega dela Slovenije so označeni z ▲ in izolati iz vzhodnega dela Slovenije z ●, izolati iz Dobravelj z vijolično in iz Semiča s zeleno barvo. Izolati, ki jih ne reže nobeden od encimov (*Bsi*WI in *Sal*I), so označeni z *.

Figure 18: Phylogenetic analyses of selected GLRaV-1 isolates based on partial hsp70h sequences. Branch lengths are proportional to genetic distances. Only bootstrap values, higher than 70 %, are shown. Isolates from western part are indicated by ▲ and from eastern part of Slovenia by ●, isolates from Dobravlje with purple and from Semič with green colour. Isolates which do not possess the recognition sequence of *Bsi*WI and *Sal*I are marked with *.

4.2.3.2 Analiza izolatov GLRaV-3

Podobnost 1140 nukleotidov dolgih zaporedij gena HSP70h slovenskih izolatov GLRaV-3 je od 93,7 do 100 %. Podobnost med 14 izolati iz Dobravelj je od 95 do 100 % med nukleotidnimi in od 98,6 do 100 % med aminokislinskimi zaporedji. Podobnost med 6 izolati iz Semiča je od 99,8 do 100 % med nukleotidnimi in od 99,7 do 100 % med aminokislinskimi zaporedji.

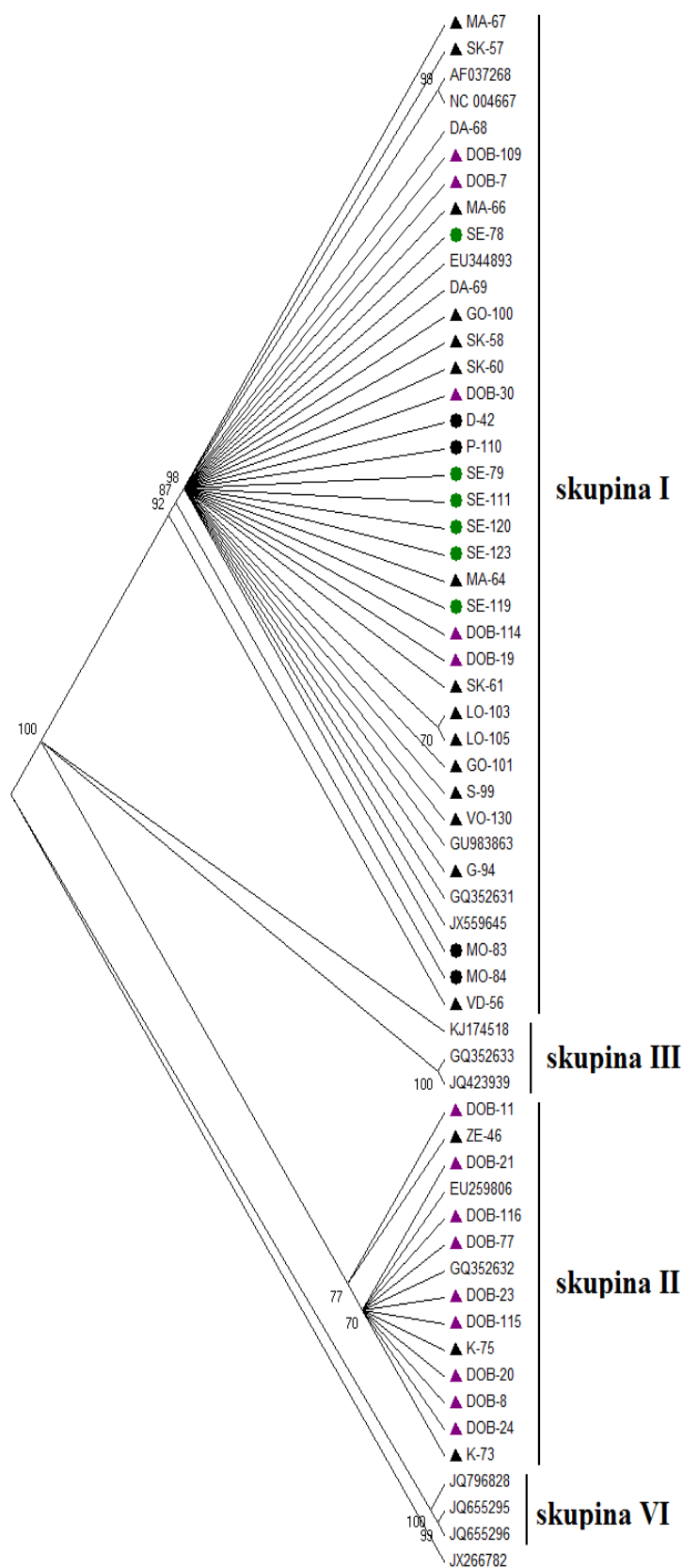
Za izris filogenetskih dreves smo s programom na podlagi najmanjše BIC-vrednosti kot specifičen model nukleotidnih substitucij izbrali model Hasegawa-Kishino-Yano. Nukleotidna zaporedja 44 slovenskih izolatov GLRaV-3 so se razporedila v dve skupini, v skupino I in skupino II (slika 19). Izolati zahodne Slovenije se z izolati iz Južne Afrike združujejo v skupino II, v skupino I pa se uvrstijo vsi drugi izolati iz celotne Slovenije (31 izolatov). V tej skupini so tudi izolati drugih držav po svetu: Čile, Južna Afrika, Kanada in ZDA. V skupino III se uvrščajo izolati iz Južne Afrike in Kitajske, medtem ko so v skupini VI izolati iz Južne Afrike in Kalifornije (ZDA). Nobeden od slovenskih izolatov ne pripada omenjenima skupinama.

Slovenski izolati skupine I imajo največjo nukleotidno podobnost, in sicer od 95 do 99,7 % z izolatoma iz Južne Afrike (GQ352631) in ZDA (GU983863). Podoben razpon podobnosti je ugotovljen med izolati skupine II. Največjo nukleotidno podobnost dosežejo z izolatoma iz Južne Afrike, EU259806 (od 94,8 do 99 %) in GQ352632 (od 95 do 99,9 %).

4.2.4 Analiza populacije slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3

Razmerje dN/dS je pri obeh virusih manjše od ena. Razmerje pri GLRaV-1 je dN/dS 0,173268 95 % (CI = [0,147192; 0,202313]) in pri GLRaV-3 0,198763 95 % (CI = [0,148097; 0,2599]). Dobljeni rezultati kažejo, da je gen HSP70h obeh preiskovanih virusov pod vplivom negativne selekcije.

Genetska razdalja med GLRaV-1 je bila največja med izolati skupine I ($0,021 \pm 0,005$), medtem ko je bila pri GLRaV-3 največja v skupini II ($0,006 \pm 0,002$). Med izolati skupine II (GLRaV-1) je bila razdalja $0,018 \pm 0,005$ in $0,004 \pm 0,001$ med izolati GLRaV-3 v skupini I. Genetska razdalja med skupinama (I in II) je od 0,020 do 0,085 pri GLRaV-1 in od 0,005 do 0,013 pri GLRaV-3.



Slika 19: Filogenetsko drevo izbranih izolatov GLRaV-3 je narisano na podlagi delnega nukleotidnega zaporedja gena HSP70h. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Prikazane so le vrednosti bootstrap, ki so ≥ 70 %. Izolati iz zahodnega dela Slovenije so označeni z ▲ in izolati iz vzhodnega dela s ●, izolati iz Dobravlj z vijolično barvo in iz Semiča s zeleno.

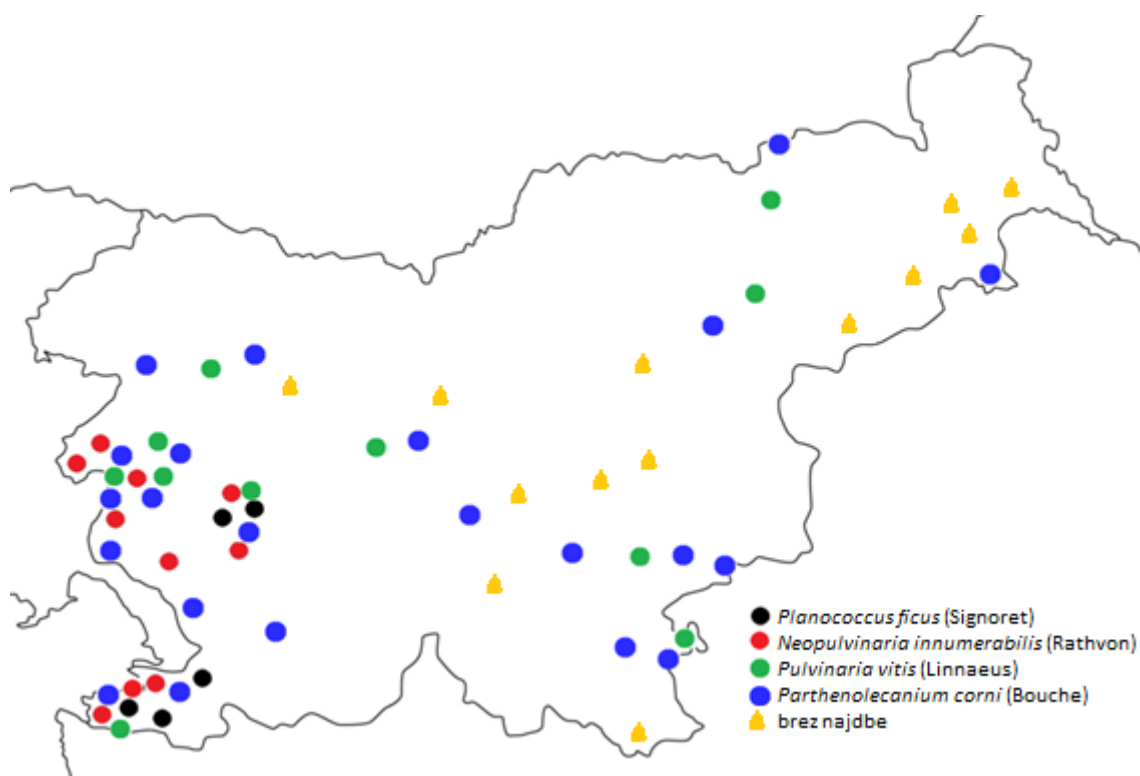
Figure 19: Phylogenetic tree of selected GLRaV-3 isolates based on partial hsp70h sequences. Branch lengths are proportional to genetic distances. Only bootstrap values, higher than 70 %, are shown. Isolates from western part are indicated by ▲ and from eastern part of Slovenia by ●, isolates from Dobravlje with purple and from Semič with green colour.

4.3 RAZŠIRJENOST KAPARJEV IN PRENOS GLRaV

4.3.1 Razširjenost kaparjev

V slovenskih vinogradih smo na vinski trti našli predstavnike dveh družin kaparjev, Coccidae in Pseudococcidae. Kaparje smo našli v vinogradih in tudi na trtah na hišnih vrtovih oziroma dvoriščih. Morfološko smo jih določili v sodelovanju z mag. Gabrijelom Seljakom iz Kmetijsko-gozdarskega zavoda v Novi Gorici.

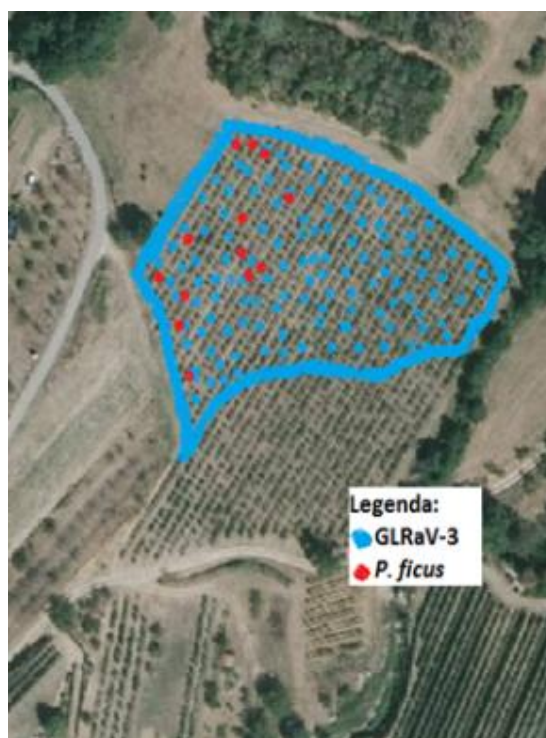
Prepoznali smo naslednje vrste kaparjev: *N. innumerabilis*, *P. vitis*, *P. corni* in *P. ficus*. Vse štiri vrste kaparjev so močno razširjene na Primorskem, medtem ko sta *P. vitis* in *P. corni* razširjena po skoraj vsej Sloveniji (slika 20).



Slika 20: Razširjenost štirih vrst kaparjev na žlahtni vinski trti v Sloveniji med letoma 2011 in 2014
Figure 20: The presence of four scale insects species on grapevine in Slovenia during 2011 and 2014

4.3.2 Razširjenost virusov in kaparjev v izbranem vinogradu

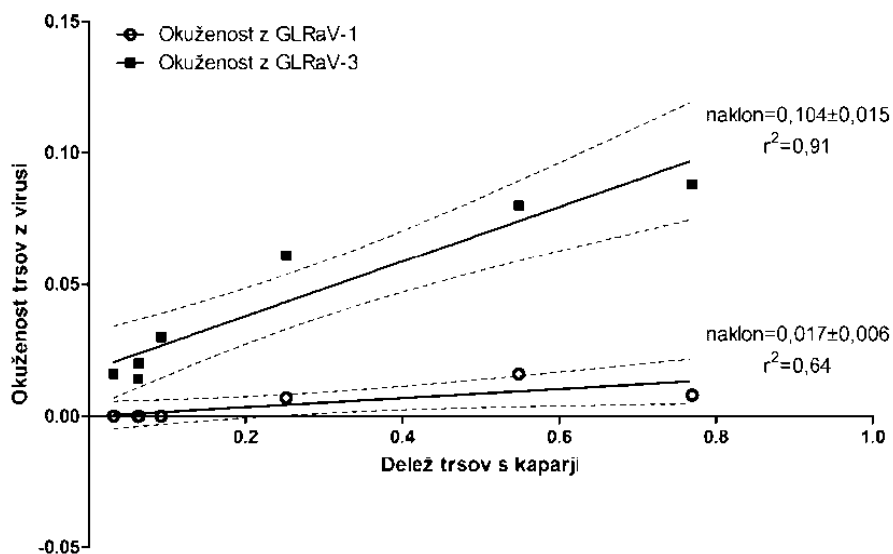
V vinogradu v Dobravljah so bile zastopane štiri sorte vinske trte, in sicer 'Sivi pinot' in 'Zelen' (zahodna stran vinograda), 'Modri pinot' in 'Cabernet sauvignon' (vzhodna stran vinograda). Za statistično obdelavo okuženosti trt smo vinograd razdelili na sedem delov. Rezultati analize 194 rastlinskih vzorcev so na podlagi teh podvzorcev pokazali veliko okuženost vinograda z GLRaV-3 (68,6 %), zasledili pa smo tudi nekaj trt okuženih z GLRaV-1 (4,6 %). Na trtah sort 'Sivi pinot' in 'Zelen' smo virusa potrdili v 97,8 %, na trtah sort 'Modri pinot' in 'Cabernet sauvignon' pa v 54,6 % testiranih trt. V delu vinograda, kjer je bila okuženost z virusom pogostejša, so bili tudi kaparji zelo razširjeni (slika 21).



Slika 21: Razširjenost kaparjev in virusov v izbranem vinogradu v Dobravljah leta 2012

Figure 21: The spread of scale insects and viruses in selected vineyard in Dobravljah in 2012

V vinogradu smo identificirali kaparje iz družin Coccidae in Pseudococcidae. Na navzočnost virusov smo analizirali 68 kaparjev obeh družin. V 51,5 % smo detektirali GLRaV-3, v 8,8 % GLRaV-1 in v 7,4 % oba virusa (GLRaV-1 in GLRaV-3). V kaparjih iz iste kolonije nismo vedno našli vseh preiskovanih virusov. Povezanost med stopnjo okuženosti trt z GLRaV-3 in prisotnostjo kaparjev je velika (slika 22), kar kaže na veliko verjetnost širjenja tega virusa s kaparji.



Slika 22: Okuženost trt z virusi glede na prisotnost kaparjev na trti in linearni regresijski model s 95-odstotnim intervalom zaupanja dobljen na podlagi surovih podatkov sedmih podvzorcev

Figure 22: Vines infected with viruses, depending on the infestation by scale insects and linear regression model with 95% confidence interval, obtained on the basis of raw data from seven subsamples

4.3.3 Uspešnost prenosa GLRaV z vrsto *P. ficus*

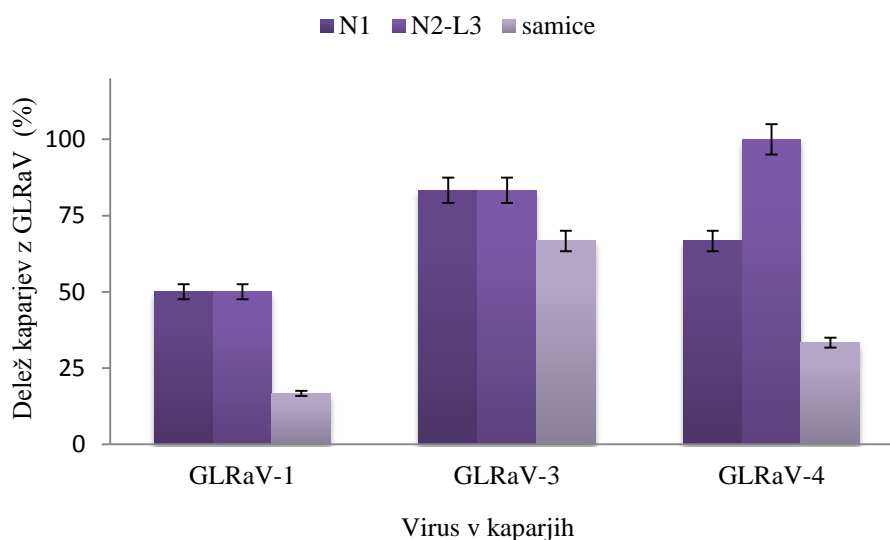
V poskusu prenosa virusov s trte na trto so kaparji vrste *P. ficus* uspešno prenesli GLRaV-3. Prenos GLRaV-1 in GLRaV-4 nismo dokazali. Uspešnost prenosa GLRaV-3 z nimfami prve razvojne stopnje je bila od 23,5 do 25,0 % (preglednica 13), neodvisno od prisotnosti drugih virusov v izvorni trti. Prenosi so bili uspešni le v prvem letu (leto 2012). Delež okuženih trt po poskusu prenosa virusov v letu 2012 je bil 50 % (virusna trta GLRaV-1 in GLRaV-3) in 40 % (virusna trta GLRaV-4 in GLRaV-3) ter se z leti ni spreminjal. Pri kontrolnem obravnavanju nismo zaznali nobenega virusa, vključenega v poskus prenosov. Na nobeni od trt se niso razvila značilna bolezenska znamenja.

Preglednica 13: Število okuženih trt po poskusu prenosa GLRaV-1, -3 in -4 s *P. ficus* v dveh letih poskusa
 Table 13: Number of infected grapevines after transmission experiment of GLRaV-1, -3 and -4 with *P. ficus* performed in two-years study

Virusi v okuženi rastlini	Razvojni stadij kaparja	n	Število okuženih trt		
			GLRaV-1	GLRaV-3	GLRaV-4
GLRaV-1	N1	19	0	-	-
	N2-N3	22	0	-	-
	Odrasla samica	16	0	-	-
GLRaV-1 in GLRaV-3	N1	20	0	5	-
	N2-N3	17	0	0	-
	Odrasla samica	14	0	0	-
GLRaV-3 in GLRaV-4	N1	17	-	4	0
	N2-N3	16	-	0	0
	Odrasla samica	16	-	0	0

n – skupno število trt sorte 'Refošk' vključenih v poskus v juniju 2012 in 2013

Z metodo RT-PCR smo dokazali prisotnost virusov v kaparjih po hranjenju na okuženih trtah. V vseh preučevanih razvojnih stopnjah kaparja smo detektirali vse tri viruse (slika 23). Po končanem poskusu smo v 56 % testiranih odraslih samicah potrdili le GLRaV-3. Virusov v preostalih razvojnih stopnjah kaparjev (21 testiranih) nismo zaznali.



Slika 23: Delež kaparjev vrste *P. ficus* okuženih z GLRaV po hranjenju na okuženih trtah s 95-odstotnim intervalom zaupanja

Figure 23: Amount of mealybugs *P. ficus* infected with GLRaV after feeding on donor grapevines with 95 % confidence interval

4.4 GLRaV IN FIZIOLOŠKI PROCESI V VINSKI TRTI

4.4.1 Prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 v vzorcih vinske trte skozi čas

Glede na rezultate RT-PCR-predvidevamo, da je bil ves material okužen z GLRaV-1. Kot kaže, je bila koncentracija virusa v rastlinah zelo majhna in verjetno tudi njegova razporeditev v trti neenakomerna, kar je privedlo do negativnih rezultatov pri testu ELISA. Prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 v vinski trti skozi sezono se je v nadzorovanih razmerah v rastlinjaku s časom spreminjala, ravno tako koncentracija GLRaV-3 (preglednica 14). Pri obravnavanju A ni bilo zaznanih veliko naknadnih okužb z GLRaV-3, medtem ko je bilo pri obravnavanju B ravno obratno. Največ naknadnih okužb z GLRaV-1 smo pri skupini B zasledili pri drugem, tretjem in petem merjenju fizioloških parametrov. Skupina N pa je največkrat potrjevala prisotnost GLRaV-1 pri prvih dveh merjenjih.

Na podlagi izračunov relativne koncentracije virusne RNA (preglednica 14) lahko ocenimo, da je bilo v obravnavanju B največ virusne RNA prisotne na začetku rastne sezone (junij) in na koncu avgusta, medtem ko je bilo najmanj virusne RNA v drugih terminih rastne sezone (julij, začetek avgusta, september). Ne glede na omenjen trend, so bila nihanja v koncentraciji virusne RNA precejšnja, še posebno pri obravnavanju C. Pri skupini C se je relativno število molekul virusne RNA med trtami in terminom merjenja precej razlikovalo.

Preglednica 14: Prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 ter koncentracija GLRaV-3 (relativno število molekul virusne RNA) glede na vzorčenje med rastno dobo vinske trte v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014

Table 14: The presence of GLRaV-1 and GLRaV-3 and concentration of GLRaV-3 (relative number of molecules of viral RNA) depending on the sampling during the growing season of the vine in greenhouse of Agricultural institute of Slovenia in 2014

vzorec	3. junij		17. julij		11. avgust		25. avgust		8. september	
	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
A1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
A2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
A3	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
A4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
A5	+	-	+	-	+	0,45	+	+	+	-
A6	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
A7	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
A8	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
B1	+	1,32	-	0,24	+	0,16	-	1,68	-	1,17
B2	-	3,66	-	1,86	+	0,22	+	2,89	-	0,03

se nadaljuje

... nadaljevanje preglednice 14: Prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 ter koncentracija GLRaV-3 (relativno število molekul virusne RNA) glede na vzorčenje med rastno dobo vinske trte v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014

vzorec	3. junij		17. julij		11. avgust		25. avgust		8. september	
	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
B3	–	8,49	+	2,80	–	0,14	–	7,18	–	0,11
B4	–	4,98	+	0,14	+	0,40	v	1,70	+	0,11
B5	–	0,15	+	0,40	–	1,25	–	4,28	+	0,44
B6	+	+	+	2,39	+	5,29	–	4,04	+	0,54
B7	–	3,59	+	4,37	+	0,57	+	8,74	+	0,23
B8	–	+	+	1,28	+	0,96	–	2,65	+	0,74
C1	+	1,81	+	0,11	+	0,08	+	0,06	+	0,19
C2	+	6,79	+	0,44	+	0,08	+	4,54	+	0,10
C3	+	1,68	+	0,12	+	0,02	+	2,13	+	0,18
C4	+	2,29	+	0,35	+	0,08	+	0,34	+	2,84
C5	+	5,23	+	0,22	+	6,94	+	0,17	+	1,58
C6	+	2,19	+	4,36	+	3,98	+	0,19	+	5,65
C7	+	2,00	+	6,76	+	0,26	+	0,17	+	5,69
C8	+	0,11	+	0,28	+	0,30	+	0,33	+	0,01
N1	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
N2	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–
N3	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
N4	+	–	+	+	–	–	–	–	+	0,01
N5	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
N6	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–
N7	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
N8	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–
N9	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–

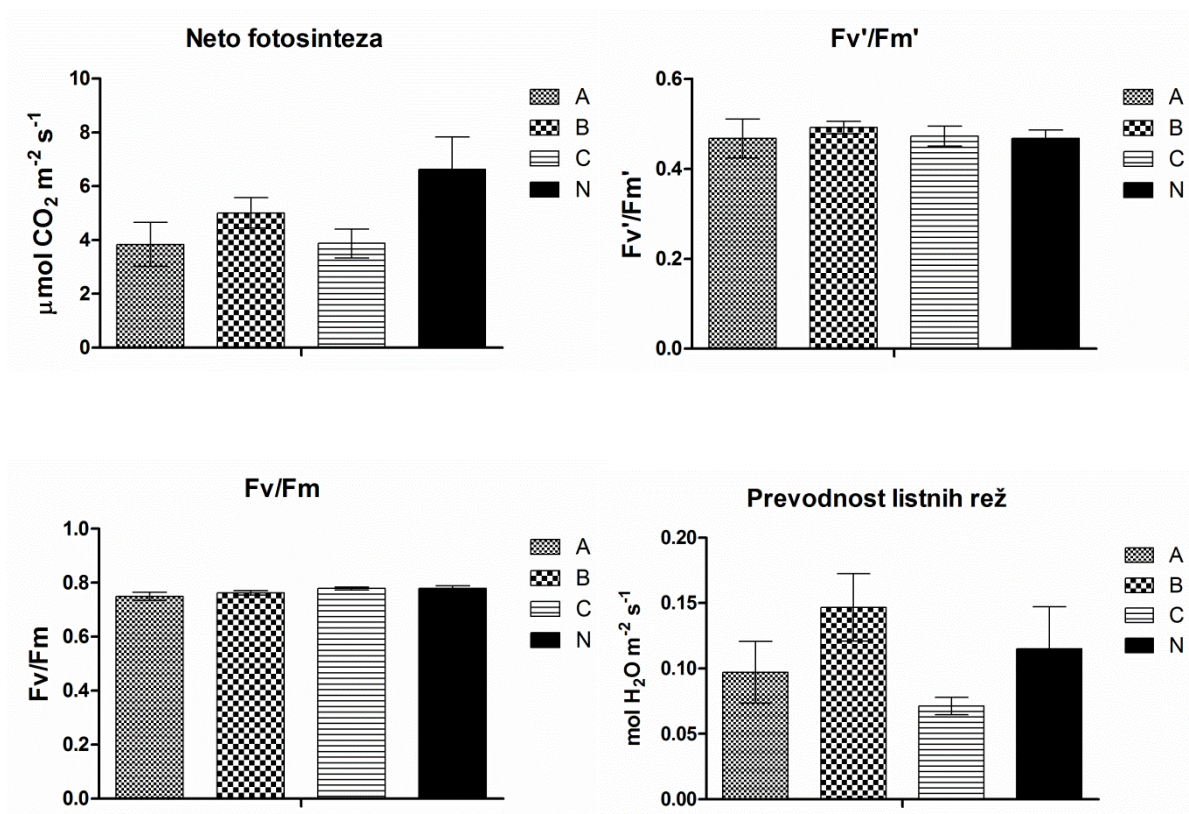
1 – GLRaV-1; 3 – GLRaV-3; A, B, C, N – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA in zaporedna številka trte; A – okužene z GLRaV-1; B – okužene z GLRaV-3, C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3; N – neokužene v začetku poskusa (DAS-ELISA test), kontrola; + – zaznana prisotnost GLRaV-1 oziroma GLRaV-3 s PCR; – prisotnost GLRaV-1 oziroma GLRaV-3 s PCR ni bila zaznana; številčne vrednosti – koncentracija GLRaV-3 (relativno število molekul virusne RNA)

4.4.2 Vrednotenje fizioloških parametrov

Spremljali smo neto fotosintezo (Pn), dejansko (Fv'/Fm') in potencialno (Fv/Fm) fotokemično učinkovitost PSII, prevodnost listnih rež (g_s), transpiracijo (E), koncentracijo CO₂ v listu (C_i), hitrost transporta elektronov po tilakoidi (ETR) in vsebnost klorofila (Chl) pri trtah okuženih z GLRaV-1 in GLRaV-3, in sicer v petih terminih med rastno dobo vinske trte v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014.

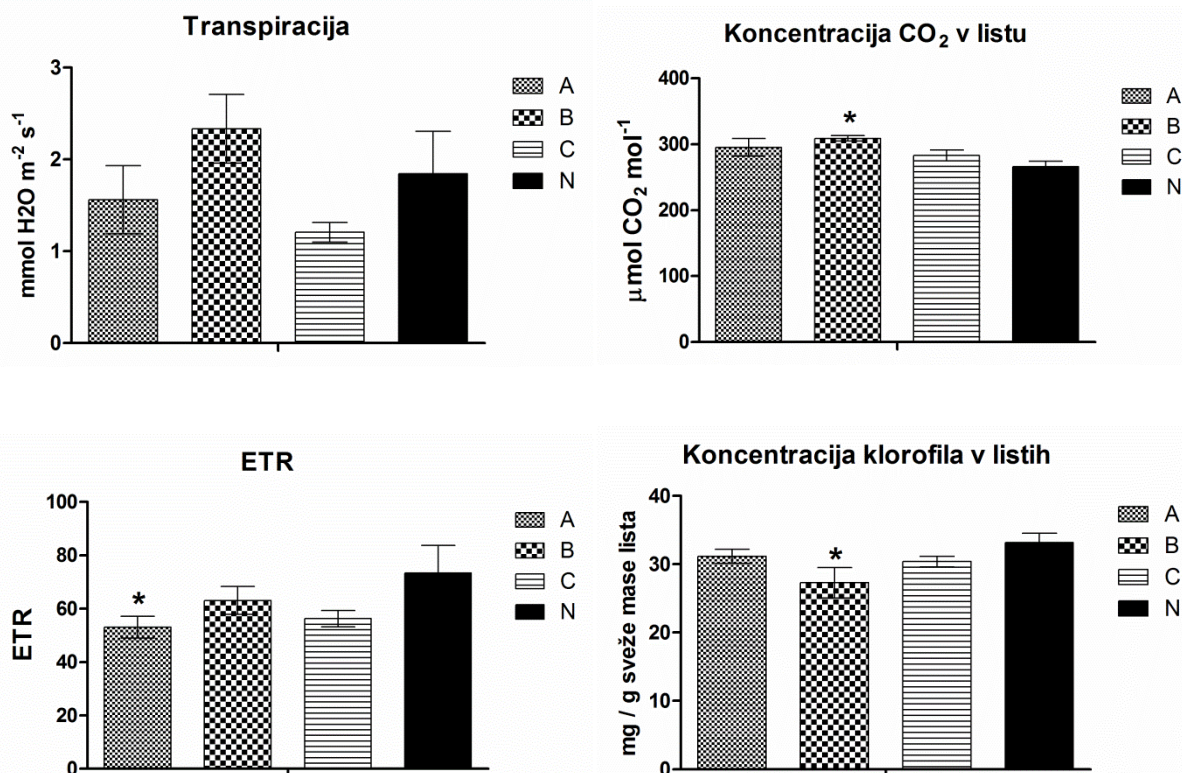
4.4.2.1 Vpliv okužb na vinsko trto

Fiziološke parametre smo vrednotili za vsa obravnavanja (A, B, C in N) v začetku junija (slika 24). Rezultati meritev med obravnavanji se pri tem merjenju niso nikjer značilno razlikovali, zato ne moremo trditi, da je imela okužba z virusi značilen vpliv na vinsko trto. Značilno razliko smo zaznali le pri obravnavanju A pri merjenju ETR-vrednosti ter pri obravnavanju B pri merjenju koncentracije klorofila in CO₂ v listih. Kljub vsemu pa fiziološki parametri dosegajo večje vrednosti pri obravnavanjih, pri katerih predvidena koncentracija GLRaV-1 ni velika; meritve fizioloških parametrov pri B so v splošnem večje kakor pri C.



se nadaljuje

...nadaljevanje slike 24



Fv'/Fm' – dejanska fotokemična učinkovitost PSII, Fv/Fm – potencialna največja mogoča fotokemična učinkovitost PSII, ETR – hitrost transporta elektronov po tilakoidi, * – statistično značilna razlika

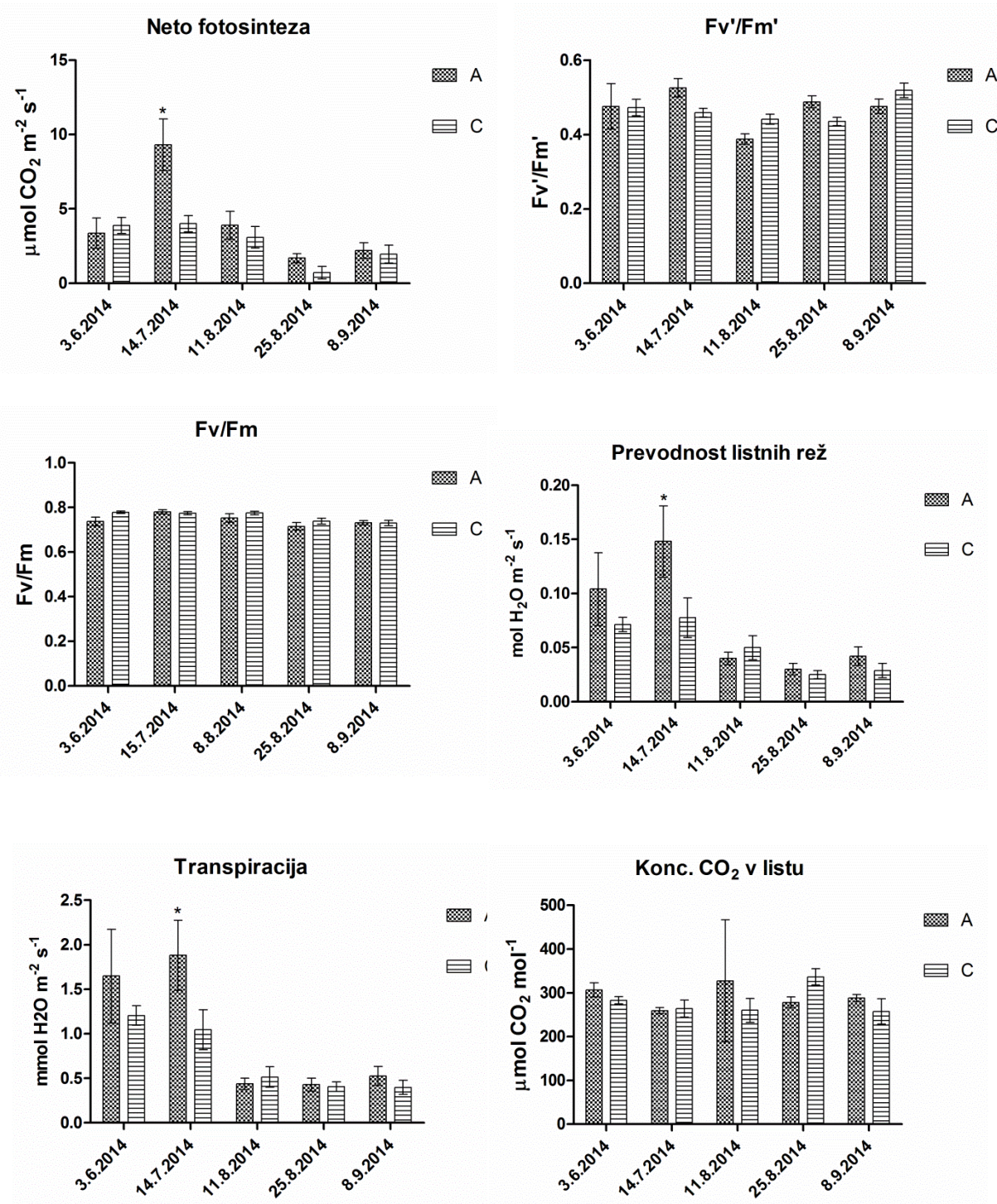
Slika 24: Povprečne meritve s standardno napako fizioloških parametrov pri obravnavanjih A, B, C in N v prvem terminu meritev (3. junij) v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014

Figure 24: An average measurements with standard of physiological parameters within at treatments A, B, C in N upon the first term, (3th June) in greenhouse of Agricultural institute of Slovenia in 2014

4.4.2.2 Medsebojni vpliv okužb na fiziološke parametre

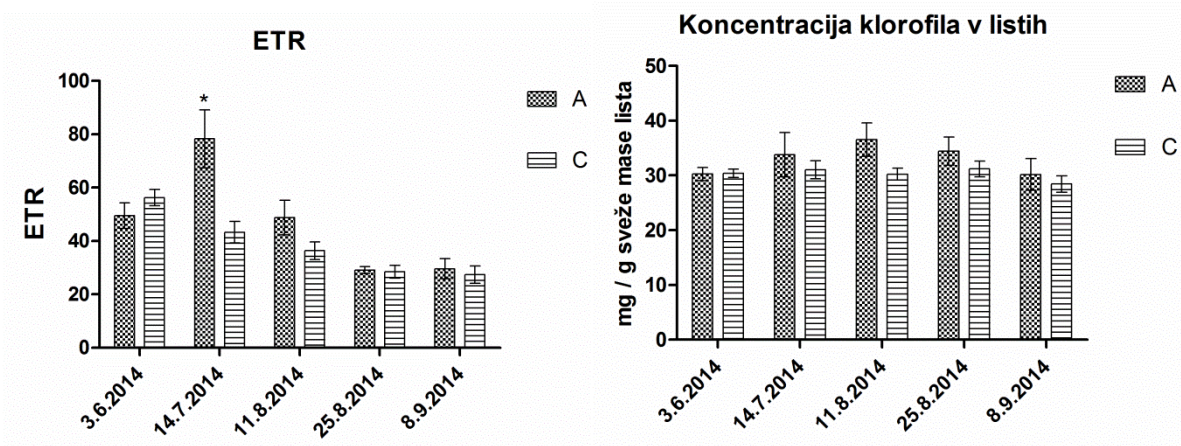
Fiziološke parametre smo vrednotili za okužbo z GLRaV-1 (obravnavanje A) ter mešano okužbo z GLRaV-1 in GLRaV-3 (obravnavanje C) v petih terminih (slika 25). Analiza je pokazala, da je imel termin merjenja med rastno značilen vpliv na obe obravnavanji pri vseh parametrih. Značilne razlike med A in C so se pokazale skoraj pri vseh vrednotenih parametrih, razen pri Fv'/Fm' in Ci, medtem ko se je značilna interakcija pokazala med Pn, Fv'/Fm' in ETR.

Okuženost le z GLRaV-1 se je od okuženosti z GLRaV-1 in GLRaV-3 (mešana okužba) značilno razlikovala pri Pn, ETR, E in g. Okužba z GLRaV-1 je dosegla za polovico večjo neto fotosintezo ($9,19 \pm 1,43$ enote) od mešane okužbe ($4,16 \pm 0,60$ enote), pa tudi v primerjavi z vsemi drugimi meritvami (od $0,89 \pm 0,43$ do $4,16 \pm 0,60$ enote). Podrobne povprečne vrednosti parametrov so navedene v prilogi B.



se nadaljuje

...nadaljevanje slike 25



Fv'/Fm' – dejanska fotokemična učinkovitost PSII; Fv/Fm – potencialna maksimalna fotokemična učinkovitost PSII; ETR – hitrost transporta elektronov po tilakoidi; * – statistično značilna razlika

Slika 25: Povprečne meritve s standardno napako fizioloških parametrov pri obravnavanjih A in C v petih terminih meritev v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije leta 2014

Figure 25: An average measurements with standard of physiological parameters within at treatments A and C upon the five terms in greenhouse of Agricultural institute of Slovenia in 2014

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Prva molekularna karakterizacija GLRaV-4 v Sloveniji

O okužbah z GLRaV-4 poročajo iz vinorodnih dežel po vsem svetu (Martelli, 2014). Okužbe vinske trte z GLRaV-4 in njegovimi različki so že potrdili v Franciji (Thompson in sod., 2012), Grčiji (Maliogka in sod., 2008), Italiji (Giampetruzzi in sod., 2011; Rizzo in sod., 2014), Španiji (Padilla in sod., 2010), Švici (Reynard in sod., 2015), Turčiji (Buzkan in sod., 2010) in na Portugalskem (Esteves in sod., 2012). Toda o okužbah s tem virusom v osrednji in vzhodni Evropi, razen Švice (Reynard in sod., 2015), še ne poročajo. Z molekularno potrditvijo prve najdbe GLRaV-4 v vinogradu v Sloveniji in z molekularno karakterizacijo slovenskega izolata 055-SI smo dobili dodatne informacije o kompleksnosti izolatov tega virusa.

S testom ELISA smo ugotovili okužbo dveh vzorcev z GLRaV-4 in GLRaV-3. Kakor kaže, komercialna protitelesa GLRaV-4-9 detektirajo antigene na 3'-terminalnem delu CP (Gomez Talquenca in sod., 2015). Z njimi je mogoče zaznati, ali so v vzorcu GLRaV-4 in njegovi različki, ne pa razločiti, za katerega od njih gre. Želeli smo natančneje okarakterizirati slovenski izolat GLRaV-4 in ugotoviti, za katerega od različkov gre. Pred RT-PCR smo s tehniko imunske vezave (IC) izločili vpliv GLRaV-3 in drugih inhibitorjev v vzorcu. Rowhani in sod. (1995) so dokazali, da je IC-RT-PCR zelo občutljiva metoda za določanje rastlinskih virusov, saj se z njo lahko zazna tudi manjše koncentracije virusa v testnem vzorcu.

Z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov smo potrdili prvo okužbo z GLRaV-4 v slovenskem vinogradu. Taksonomska uvrstitev v družino *Closteroviridae* temelji na podobnosti RdRp, HSP70h in CP (Dolja in sod., 2006). Meja med virusi v rodu *Ampelovirus* je vsaj 75 % podobnost aminokislinskega zaporedja RdRp, HSP70h ali CP (Martelli in sod., 2011). Slovenski izolat 055-SI po teh kriterijih uvrstimo kot GLRaV-4 v rod *Ampelovirus*, saj ima s preučevanimi izolati tega virusa vsaj 88 in 85 % podobnost aminokislinskega zaporedja CP in p23. Z molekularno karakterizacijo slovenskega izolata GLRaV-4 smo tako potrdili rezultate seroloških testiranj.

Filogenetska analiza obeh genov, ki smo ju v celoti določili v okviru naše raziskave je pokazala, da je rezultat analize pri obeh genih podoben. Vsa prosto dostopna zaporedja, ki smo jih uporabili v naših analizah tvorijo pet skupin, ki odgovarjajo različkom GLRaV-4 (GLRaV-4 ter njegovi različki -5, -6, -9, -Car in -Pr). Izolat 055-SI je najbližje soroden amerškemu izolatu (LR106), kar je v skladu z rezultati primerjave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij in sodi v različek GLRaV-4. Znotraj različkov izolati kažejo

zelo majhno genetsko raznolikost, tudi organizacija genoma izolata 055-SI je podobna organizaciji ostalih GLRaV-4.

Pri določanju 5'-terminalnega dela gena za CP smo imeli velike težave, saj z uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi iz literature pri našem izolatu nismo dobili nobenega produkta. Na podlagi dejstva, da gre znotraj GLRaV-4 za več različkov (Abou Ghanem-Sabanadzovic in sod., 2012; Martelli in sod., 2012; Thompson in sod., 2012) smo načrtovali še dodatne pare začetnih oligonukleotidov, s katerimi smo uspešno pomnožili želeni del genoma 055-SI. Pozneje smo ugotovili, da so imeli podobne težave pri določanju nukleotidnih zaporedij svojih izolatov tudi Saldarelli in sod. (2006). Primerjava aminokislinskih zaporedij CP izolatov različka GLRaV-4 (055-SI, LR106, Y235-TK in Y252-IL) je pokazala, da je izolat 055-SI za 10 aminokislin krajši od ostalih treh, te razlike pa so prisotne na N-terminalnem delu CP. S kasnejšo primerjavo neuspešno uporabljenih začetnih oligonukleotidov in nukleotidnega zaporedja našega izolata GLRaV-4 smo ugotovili, da je bilo na mestih naleganj teh začetnih oligonukleotidov od tri do sedem razlik, kar je bil verjetno razlog za neuspeh pri pomnoževanju. Zaradi krajšega CP slovenskega izolata GLRaV-4 je bila tudi podobnost z ostalimi izolati tega različka relativno majhna (od 23,6 do 42,1 %). Zato smo podrobneje analizirali celoten CP in ugotovili, da je N-terminalni del CP najbolj heterogen del tega proteina. Omenjene razlike niso vplivale na serološko detekcijo virusa, povzročale pa so nam težave pri molekularni identifikaciji. Podatki o raznolikosti na 5'-terminalnem delu CP so zelo pomembni za nadaljnji razvoj molekularnih diagnostičnih testov GLRaV-4 in njegovih različkov.

5.1.2 Raznolikost slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3

Test ELISA je še vedno najpogostejša metoda detekcije rastlinskih virusov. Z njo smo potrdili splošno okuženost testiranih trt v naši raziskavi slovenskih vinogradov z GLRaV (78 %). Največ okužb trte je bilo z GLRaV-3, 55 %. Podobna okuženost testiranih trt z GLRaV-3 je bila potrjena v Španiji, 49 % (Pesqueira in sod., 2016), in Južni Afriki, 80 % (Jooste in sod., 2015). V raziskavi na Kitajskem je bil ta delež celo 100-odstoten, medtem ko je bil v isti raziskavi GLRaV-1 potrjen pri 29,9 % vseh vzorcev (Liu in sod., 2013), v neki drugi raziskavi na Kitajskem pa pri 36,4 % (Fan in sod., 2015). Tudi v Sloveniji je bilo za več od polovice manj (25,2 %) okužb z GLRaV-1 kakor z GLRaV-3. Kot kaže, sta omenjena virusa v Sloveniji splošno razširjena, pa vendar smo odkrili le 7,5 % mešanih okužb. Pogostejše enojne okužbe in majhen delež mešanih okužb so potrdili tudi v Severni Ameriki (Fuchs in sod., 2009; Sharma in sod., 2011) ter v obratnem razmerju okuženosti trt z GLRaV-1 in GLRaV-3 drugod po svetu, kjer so odkrili več okužb z GLRaV-1 kakor pa z GLRaV-3 (Akbas in sod., 2007; Mahfoudhi in sod., 2008; Jooste in sod., 2015).

Nekatere slovenske raziskave so v preteklosti potrdile prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 v slovenskih vinogradih (Korošec-Koruza, 1990, 1991; Tomažič in sod., 2005; Čepin, 2011;

Mavrič Pleško in sod., 2011). Prva serološka testiranja slovenskega materiala so bila izvedena leta 1987 v Švici in nato med leti 1988 in 1991 v Sloveniji, ko so bile prvič s testom ELISA potrjene okužbe z GLRaV-1, -2 in -3 (Korošec-Koruza, 1990, 1991). V tem obdobju je test ELISA prvič dobil svoje mesto v sistemu zdravstvene selekcije vinske trte, v prvi vrsti za testiranje okužb z GFLV (Korošec-Koruza, 1992). Kljub temu, da je bilo v Sloveniji pretestiranega veliko materiala vinske trte, pa niso bile opravljene raziskave teh virusov na molekularnem nivoju. Zato smo v naši raziskavi z molekularnimi metodami določili nukleotidna zaporedja slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3 in tako prvič ovrednotili genetsko raznolikost teh izolatov. Za karakterizacijo smo zbrali gen HSP70h, ki obstaja le pri družini *Closteroviridae* ter se uporablja za filogenetske raziskave in klasifikacijo predstavnikov te družine (Martelli in sod., 2012). Za medpopulacijsko raziskavo smo uporabili tudi nukleotidna zaporedja, ki so dostopna v podatkovni zbirki NCBI.

Analiza nukleotidnih zaporedij kloniranih odsekov gena HSP70h tudi ni potrdila prisotnosti več izolatov v istem preiskovanem vzorcu oziroma trti, če so si bili kloni različni za več kot 2 %. Mogoče je, da je bilo v isti trti več različnih izolatov istega virusa, vendar tega nismo določili zaradi njihove premajhne koncentracije ali uporabljenih parov začetnih oligonukleotidov. Poleg tega vpliva na detekcijo neenakomerna razporeditev variant virusov in virusov samih. Nukleotidna zaporedja slovenskih izolatov GLRaV-1 so si bolj različna kakor pri GLRaV-3. Razlike so se večinoma kazale kot enojne, manj dvojne, substitucije nukleotidov. Vseh razlik pa ne gre pripisati genski raznolikosti, ker so s tehničnega vidika mogoče nekatere napake pri določanju zaporedij.

Genetska raznolikost GLRaV-1 še ni dobro raziskana. To dokazuje le peščica objav na to tematiko in število celotnih genomov v zbirki podatkov NCBI (Kominek in sod., 2005; Alabi in sod., 2011; Esteves in sod., 2013; Fan in sod., 2015). Naši izolati pripadajo dvema skupinama, skupini I in II, ki sta enakovredni skupinama E ($E = I$) in A ($A = II$). Kot kaže, sta ti dve skupini najbolj razširjeni tudi drugod po svetu. Glede na le eno celotno nukleotidno zaporedje genoma in omejeno število nukleotidnih zaporedij v zbirki NCBI, ki bi bila enako dolga kakor naša ali daljša, smo za filogenetske analize vsa nukleotidna zaporedja skrajšali na isto dolžino, to je 500 bp. Razporeditev slovenskih izolatov v obe skupini je na podlagi 500 bp (5'-terminalni del) in 975 bp (celotno zaporedje) dolgega zaporedja enaka. To nakazuje, da na 3'-terminalnem delu slovenskih izolatov ni značilnih razlik, ki bi vplivale na raznolikost in filogenetsko razvrstitev izolatov.

Kominek in sod. (2005) so delitev izolatov v dve skupini podprli tudi z restrikcijsko analizo z encimoma *BsiWI* in *SalI*. Po rezultatih njihovih analiz izolate iz E-skupine reže le *BsiWI*, medtem ko reže izolate iz A-skupine le encim *SalI*. Z določitvijo nukleotidnih zaporedij in simulacijo restrikcije encimov *BsiWI* in *SalI* smo v naši raziskavi ugotovili, da *BsiWI* reže vse izolate iz skupine II (E), medtem ko *SalI* reže le polovico izolatov skupine

I (A). Po tem sklepamo, da delitev v skupine na podlagi restrikcije s tema dvema encimoma ni več primerna. V prvi študiji raznolikosti GLRaV-1 so bili uporabljeni le izolati iz Slovaške in Češke (Kominek in sod., 2005), zdaj pa je na voljo vse več zaporedij gena HSP70h izolatov iz različnih držav, kar pomeni tudi več informacij o genetski pestrosti virusa.

Genetska raznolikost GLRaV-3 je dobro raziskana, saj so na tej tematiki delali številni raziskovalci (Wang in sod., 2001; Turturo in sod., 2005; Fuchs in sod., 2009; Jooste in sod., 2010, 2015; Gouveia in sod., 2011; Farooq in sod., 2012; Kumar in sod., 2012; Bester in sod., 2012, 2014; Esteves in sod., 2013; Maree in sod. 2015; Pesqueira in sod., 2016). Najnovejša raziskava, ki so jo objavili Maree in sod. (2015) je pokazala obstoj osmih skupin izolatov GLRaV-3. Med temi sta v svetu najbolj razširjeni skupini I in II. Na podlagi filogenetske analize HSP70h gena sodijo tudi slovenski izolati GLRaV-3 v ti dve skupini. Filogenetska analiza, ki smo jo naredili z nukleotidnimi zaporedji dostopnimi v javni banki GenBank je sicer potrdila obstoj več skupin, podobno kot pri raziskavi Maree in sod. (2015), vendar se naši izolati v njih niso uvrstili. Tako kot drugod po svetu (Farooq in sod., 2012; Kumar in sod., 2012; Pesqueira in sod., 2016) se tudi največ izolatov iz Slovenije združuje v najobsežnejšo skupino I, medtem ko so v Južni Afriki najpogosteje zastopani izolati skupin II in VI (Jooste in sod., 2015).

Na številčnost skupin vpliva izbrana metoda in uporabljeni pari začetnih oligonukleotidov, ki določajo položaj na genomu. Razdelitev v 8 skupin GLRaV-3 so v najnovejši raziskavi dokazali Maree in sod. (2015). Kot omenjeno lahko na podlagi 1140 bp genoma naše izolate uvrstimo le v prvi dve skupini. Mogoče je, da bi z določitvijo celotnega genoma GLRaV-3 ali uporabe drugih parov začetnih oligonukleotidov (Bester in sod., 2014) uvrstili v katero od omenjenih skupin še vse nezaznavne slovenske izolate.

Rezultati naravnega izbora oziroma selekcije kažejo, da je gen HSP70h obeh preiskovanih virusov pod vplivom negativne selekcije ($dN/dS < 1$). Kadar so deli gena HSP70h pod vplivom negativne selekcije, je to lahko zaradi funkcije proteinov, medtem ko deli gena pod vplivom pozitivne selekcije lahko nakazujejo potrebne spremembe za prilagoditev virusa na novega gostitelja in/ali rušenje odpornosti. Selekcija v našem primeru nakazuje, da izolati GLRAV-1 in GLRaV-3 v Sloveniji obstajajo že dalj časa. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v drugih državah na podlagi genov HSP70h in CP (Wang in sod., 2001; Turturo in sod., 2005; Esteves in sod., 2013; Farooq in sod., 2013; Pesqueira in sod., 2016).

Za primerjavo med populacijami je poleg naravnega izbora pomembna še genetska razdalja, ki se nanaša na razlike med vrstami oziroma populacijami znotraj vrste. Manjša genetska razdalja nakazuje na večjo, večja pa na manjšo genetsko povezanost vrst/populacij. Genetska razdalja je lahko uporabljena kot mera razlik med populacijami

znotraj neke vrste (Falconer in Mackay, 1996). Genetska razdalja med GLRaV-1 je bila največja med izolati skupine I, medtem ko je bila pri GLRaV-3 največja v skupini II. Tesnejšo povezanost med izolati omenjenih skupin potrjuje tudi njihova geografska povezanost. V doslej objavljenih študijah ni bilo dokazano, da bi se izolati virusov združevali v skupine glede na geografsko prisotnost, česar pa ne moremo trditi za izolate iz Slovenije, kot to potrjuje še filogenetsko drevo. Vendar pa po drugi strani ne gre zapostaviti obsega območij, na katerih so preučevali viruse in izolate. Nekatere preučevane pokrajine po svetu so po velikosti primerljive s skoraj celotno Slovenijo.

Kot omenjeno, evolucija virusov ni odvisna samo od genetskega spreminjanja, ampak tudi od kultivarja in navsezadnje od prenašalca, ki dodatno prispeva k selekciji oziroma ohranjanju populacije (Rubio in sod., 2001; Chare in Holmes., 2004). H genetski podobnosti oziroma pestrosti slovenskih izolatov so najverjetneje znotraj vinogradov pripomogli kaparji, za širjenje virusov med bolj oddaljenimi vinogradi pa okužen rastlinski material.

5.1.3 Interakcije med virusi in kaparji

V vinogradu v Dobravljah pri Ajdovščini so imeli velike težave z GLD in napadom kaparjev. Lastnik vinograda se je odločil, da ga bo izkrčil, zato smo vse trte pregledali na prisotnost kaparjev in testirali na viruse. Rezultati pregledov, testiranj in determinacije kaparjev so pokazali, da je 68,6 % trt okuženih z GLRaV-3 in le 4,6 % trt z GLRaV-1. V vinogradu smo dokazali prisotnost dveh vrst kaparjev (*P. vitis* in *P. ficus*), v največji meri je bila zastopana vrsta *P. ficus*. To je bila tudi prva najdba te vrste kaparja v večjem obsegu v slovenskih vinogradih. Na trtah, okuženih z GLRaV so bili okuženi tudi kaparji. Vinska trta je zelo dovzetna za viruse, zato domnevamo, da so ravno kaparji vzrok širjenja virusnih okužb v obravnavanem vinogradu. Po podatkih lastnika vinograda se je bolezen razširila iz zahodnega dela vinograda in se v nekaj letih razširila skoraj po celem vinogradu. V tem delu so bili virusi in kaparji najbolj razširjeni. Širitev virusa je odvisna od dejavnikov, kot so smer vetra, interakcija med virusom in prenašalcem, kombinacija virusnih različkov in navsezadnje vrsta virusa.

Kaparji imajo pomembno vlogo pri učinkovitem širjenju virusnih okužb vinske trte, tip prenesenih virusov pa je odvisen od populacije in vrste kaparjev (Tsai in sod., 2010; Le Maguet in sod., 2012). To hipotezo smo želeli preveriti v nadzorovanih razmerah s poskusom prenosa slovenskih izolatov virusov s slovensko populacijo kaparjev vrste *P. ficus*. Izsledki naše raziskave kažejo, da je ta populacija kaparjev zmožna prenosa GLRaV-3, kar smo domnevali tudi na osnovi rezultatov razširjenosti GLRaV-3 in kaparjev v vinogradu, ne prenaša pa GLRaV-1. Uspešnost prenosov z izbranimi populacijami vrste *P. ficus* in virusov so potrdili tudi drugi raziskovalci (Credi in sod., 2009; Mahfoudhi in sod., 2009; Bertin in sod., 2010; Tsai in sod., 2010; Krüger in sod., 2015). V večini

preostalih prenosov poročajo o neuspešnem prenosu GLRaV-1 s *P. ficus*. Pozneje so dokazali, da je omenjena vrsta kaparja zmožna prenosa GLRaV-1 v nadzorovanih razmerah in ob prenosu 50 osebkov na rastlino (Tsai in sod., 2010). V prvem in drugem letu prenosov v naši raziskavi nismo uporabili iste trte z okužbo GLRaV-1 in GLRaV-3 tako kot pri drugih kombinacijah virusov. Zmožnost prenosa GLRaV-3 z lokalno populacijo *P. ficus* smo uspeli potrditi le v poskusih, ki smo jih izvedli leta 2012. Vzrok za neuspešne prenose v drugem letu gre najverjetneje iskati v manjši koncentraciji virusa v okuženi trti v drugem letu in ne v dovzetnosti kaparjev za virus ali v času detekcije virusov po okužbi.

Po drugi strani pa nekateri avtorji navajajo, da lahko *P. ficus* prenaša tudi GLRaV-4 (različke GLRaV-4, -5 in -9) (Mahfoudhi in sod., 2009; Tsai in sod., 2010). Pri prenosih GLRaV-4 drugih študij je bil uporabljen izolat LR106 (Tsai in sod., 2010). Kljub veliki stopnji sorodnosti izolata LR106 s slovenskim izolatom 055-SI, ki smo ga uporabili v poskusu prenosa, slednji ni bil uspešen. Prvi poskusi prenosa, pri katerih so uporabili izolat LR106, ravno tako niso bili uspešni (Golino in sod., 2002). Neuspešnost prenosov so pripisali genetski raznolikosti in nezdržljivosti med izbranim izolatom virusa in kaparjem, kar je bil najverjetneje tudi v našem primeru vzrok, da izbrana populacija kaparja ni prenesla izolata LR106.

Nasprotno od izbrane populacije *P. ficus* pa se je v poskusu prenosa GLRaV-1 in GLRaV-3 v Sloveniji izkazala populacija *N. innumerabilis* iz vinograda na Primorskem. Ta je uspešno prenesla GLRaV-1 (Mavrič Pleško in sod., 2011), ne pa GLRaV-3 kakor v poskusih drugih raziskovalcev (Zorloni in sod., 2006; Le Maguet in sod., 2012). Podobne rezultate (uspešno prenesen GLRaV-1 in neuspešno prenesen GLRaV-3) so dobili s prenosi *P. corni* v Italiji in Franciji (Belli in sod., 1994; Sforza in sod., 2003; Hommay in sod., 2008). Ena od možnih razlag nezmožnosti prenosa GLRaV-3 je nezdržljivost med populacijo virusa in populacijo kaparja, v tem primeru je prenos odvisen celo od družine (Coccidae) prenašalca. Toda po drugi strani poročajo, da *P. vitis* (družina Coccidae) uspešno prenaša GLRaV-3 v sosednji Italiji (Belli in sod., 1994). Zato obstaja verjetnost, da je k širjenju virusov v vinogradu v Dobravljah malo pripomogla tudi vrsta *P. vitis*, vendar poskusov v nadzorovanih razmerah nismo mogli izvesti zaradi majhne populacije kaparjev v vinogradu.

Uspešnost prenosa virusa s kaparji ni odvisna le od vrste virusa in kaparja, temveč tudi od razvojne stopnje prenašalca (Tsai in sod., 2010). Izsledki raziskav so pokazali, da so vsi razvojni stadiji teh žuželk sposobni prenosa virusov, čeprav so nimfe uspešnejše od odraslih osebkov (Petersen in Charles, 1997; Mahfoudhi in sod., 2009; Tsai in sod., 2010; Daane in sod., 2012), kar smo potrdili tudi v naših poskusih. Prenos virusov z nimfami je učinkovitejši, saj se kaparji v prvih razvojnih stopnjah aktivno premikajo in iščejo

primerno mesto hranjenja, mnogokrat pa jim pomaga pri premikanju tudi veter. Stopnja okužbe z nimfami je zato v splošnem večja v primerjavi z odraslimi samicami.

Okužbe trt z GLRaV-3 so potrdili s prenosom od 10 do 15 (Mahfoudhi in sod., 2009) in od 15 do 20 (Krüger in sod., 2015) nimf prve in druge razvojne stopnje na trto. Douglas in Krüger (2008) sta dokazala, da bi se moral virus prenašati ne glede na število uporabljenih kaparjev, saj je bilo več rastlin okuženih pri poskusih prenosa s petimi nimfami na trto kakor pa pri prenosu z 10, 20 ali 40 nimfami na trto. Po njunih raziskavah je že ena nimfa dovolj za uspešen prenos GLRaV-3 na zdravo trto.

Eno vrsto virusa lahko bolj ali manj učinkovito prenašajo različne vrste kaparjev. Kot kaže, ima GLRaV-3 velik krog prenašalcev (Tsai in sod., 2010; Martelli, 2014), vendar je uspešnost prenosa odvisna od izolata in vrste kaparja. Uspešnost prenosa virusov s kaparji je bila v našem poskusu v enem letu od 40 do 50 %, kar se ujema z rezultati drugih raziskovalcev. Povprečni delež prenosov je od 30 do 60 %, najmanjša uspešnost prenosa populacije *P. ficus* je bila 11 % (Douglas in Krüger, 2008) in največja 100 % (Krüger in sod., 2015).

Virusi se s pomočjo kaparjev zelo hitro širijo in okužijo celotne vinograde v le nekaj letih. Kaparji se sorazmerno z velikostjo telesa zelo hitro premikajo, vendar pa je njihovo gibanje večinoma omejeno le na eno trto. V nekaterih primerih pridejo še na sosednjo in širijo viruse vzdolž vrste (Cabaleiro in sod., 2008), medvrstnih razdalj pa sami ne morejo premostiti. Na daljše razdalje so jim pri premikanju v pomoč živali (ptice), veter in človek. Ptice se npr. na trti hranijo s kaparji in drugimi žuželkami ter jih tako pasivno prenašajo med vrstami ali celo med vinogradi. Raziskave so pokazale, da se GLRaV v prisotnosti kaparjev razširijo in okužijo vinograd v od treh do desetih letih po zasaditvi (Cabaleiro in Segura, 1997; Krake in sod., 1999; Cabaleiro in sod., 2008; Golino in sod., 2008; Gribaudo in sod., 2009; Le Maguet in sod., 2013). V Španiji se je v samo štirih letih okuženost z GLRaV-3 povečala (s 33 na 83 %) (Cabaleiro in Segura, 1997). V raziskavah so ugotovili, da je bilo vsako leto v povprečju okuženih okoli 10 % več trt kakor v predhodnem letu, seveda pa je hitrost napredovanja bolezni odvisna od intenzivnosti prenašanja virusov, od vrste kaparja, od kultivarja vinske trte in njegove starosti, podnebnih razmer itd. Vendar kot kaže, kultivar vinske trte ne vpliva na izid prenosov. Vrsta *P. ficus* je GLRaV-3 v naši raziskavi prenesla neodvisno od kultivarja vinske trte, saj kultivarja 'Refošk', ki smo ga uporabili v poskusu prenosa, ni bilo v vinogradu, od koder so izvirali kaparji. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi raziskovalci na Kmetijskem inštitutu Slovenije pri prenosih z *N. innumerabilis* (Mavrič Pleško in sod., neobjavljeno).

Populaciji *P. ficus* in *P. vitis* iz vinograda v Dobravljah sta bili okuženi z GLRaV-1 in GLRaV-3, kar dokazuje, da so ti kaparji sposobni pridobitve virusov. To smo potrdili tudi z analizo virusov v kaparjih iz poskusa prenosov. Ti kaparji so bili sposobni pridobitve

GLRaV-1, -3 in -4, ne pa tudi prenosa le-teh. Vse razvojne stopnje kaparjev s prvotno okuženih trt so vsebovale vse viruse, prisotnost katerih smo ugotavljali s testi, medtem ko so bile s prvotno neokuženih (certificiranih) trt okužene le odrasle samice. Najverjetneje so se kaparji (nižje razvojne stopnje) po prenosu na zdravo trto hranili in prenesli GLRaV-3, potem pa izgubili sposobnost prenosa virusa. Znano je namreč, da se ti virusi prenašajo semiperzistentno ter da jih kaparji po preobrazbi izgubijo in niso več kužni (Tsai in sod., 2008). Sodeč po zadnji raziskavi, so kaparji vrste *P. ficus* sposobni pridobiti virus že v 15 minutah in ga ob stradanju zadržati vse tja do štiri dni (Krüger in sod., 2015), mi pa smo jih testirali po sedmih dneh tako kakor Mahfoudhi in sod. (2009).

Virus je uspešno prenesla le ena od preučevanih skupin kaparjev (nimfe prve stopnje), zaradi česar je majhen končni delež okuženih trt. Uspešnost prenosa GLRaV z nimfami je verjetno tudi posledica samega poteka prenosov. Kaparji se v prvih stopnjah razvoja aktivno premikajo in jih je mogoče poloviti, ne da bi jih pri tem poškodovali. Ne glede na to je treba z njimi ravnati izredno previdno. Preostale stopnje pa se že hranijo in so s stiletom prisesane na listno ploskev. Če jim stilet pri prenosu poškodujemo, se ne morejo hraniti, zato umrejo in prenos virusov ni uspešen. Kljub omejitvi gibanja le na eno rastlino so se kaparji lahko prosto gibali in si tako izbrali najprimernejše mesto hranjenja, zato je malo verjetno, da bi njihovo obnašanje vplivalo na izid prenosov.

Za ugotavljanje uspešnosti prenosa GLRaV s kaparji je pomemben tudi čas testiranja okuženih trt. Pogosto je za uspešno razširitev in namnožitev virusa v rastlini potreben daljši čas. Zato smo v naših poskusih okužene trte testirali dve ali tri zaporedna leta. Koncentracija virusa se namreč v trtah s sezono in z leti povečuje. V prvem poskusu prenosov so bile trte uporabljene v našem poskusu pozitivne na GLRaV-3 že po dveh mesecih, v drugem poskusu pa niso bile pozitivne niti po dveh letih na testu ELISA. Metoda testiranja (ELISA ali PCR) ne vplivata na zanesljivost detekcije GLRaV v poskusih prenosa s kaparji. To so raziskovalci potrdili v svojih raziskavah, kjer se rezultati testa ELISA in RT-PCR niso razlikovali, ne glede na čas testiranja (Sforza in sod., 2003; Tsai in sod., 2008).

V Sloveniji so bili na vinski trti do zdaj najdeni *N. innumerabilis*, *P. corni*, *P. vitis* in *P. ficus* (Seljak, 2010) ter so v splošnem razširjeni po vsej Sloveniji. Vrsta *N. innumerabilis* je na prostem prisotna že 30 let (Seljak, 1985), medtem ko smo kaparja *P. ficus* v vinogradu v večjem obsegu našli prvič leta 2012 v Dobravljah pri Ajdovščini. Pred tem se je pojavljal le v zavarovanih prostorih pri gojenju baznega materiala vinske trte, v zelo vročih letih pa na Primorskem nekajkrat tudi na prostem (Seljak in Žežlina, 2007). Vrsti *P. ficus* in *P. citri* sta si zelo podobni, obe pa sta znani kot prenašalki GLRaV (Cabaleiro in Segura, 1997; Golino in sod., 2002; Cabaleiro in sod., 2008). Ločimo ju lahko le z molekularnimi metodami ali morfološko, za kar so potrebne ustrezne izkušnje. Kapar vrste *P. citri* je v

Sloveniji prisoten že več desetletij (Janežič, 1954), vendar ga na vinski trti še nismo zasledili.

Kaže, da je vrsta *P. ficus* verjetno najučinkovitejši prenašalec GLRaV v Evropi z več rodovi na leto, GLRaV-3 pa najbolj razširjen povzročitelj GLD (Daane in sod., 2012; Martelli, 2014). To ima lahko pomembne epidemiološke posledice, še posebno ker je ta kapar sposoben prenesti virus na vinsko trto celo po osmih dneh hranjenja na negostiteljski rastlini (Krüger in sod., 2015). Posredna škoda, ki jo povzročajo kaparji je izločanje medene rose, na katero se naselijo glive sajavosti, ki vplivajo na fotosintezno delovanje listov ter na kakovost in tržno vrednost grozdja. Škode, ki jo povzročajo virusi in kaparji, vsekakor ne gre podcenjevati, saj v Sloveniji vinogradi predstavljajo kar 59 % ali 16.009 hektarjev vseh trajnih nasadov (Statistični ... , 2014). Po večini so manjši – kar dobrih 93 % vinogradov je manjših od enega hektarja (Stele in Žaucer, 2013; Statistični ... , 2009). Na novo vzpostavljeni vinogradi so lahko obdani s starimi vinogradi, ki so vir bolezni in škodljivih organizmov. S kaparji se GLRaV lahko zelo hitro razširijo, še preden njihove prenašalce sploh opazimo in ukrepamo. Glede na omejeno uporabo fitofarmaceutskih sredstev in vse večji vpliv podnebnih sprememb tudi na kaparje lahko z leti pričakujemo zgodnejši pojav, povečan napad in posledično večjo stopnjo škode zaradi kaparjev, pa tudi drugih škodljivih organizmov na vinski trti. Z večanjem števila kaparjev se povečuje možnost širitve virusov in tako možnost za razvoj GLD in slabši pridelek.

5.1.4 Vpliv GLRaV na fiziološke procese v žlahtni vinski trti

5.1.4.1 Prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 v vzorcih vinske trte skozi čas

Z metodama RT-PCR in RT-qPCR smo spremljali GLRaV-1 in GLRaV-3 v trti po vsakem merjenju fizioloških procesov, da bi ugotovili, ali se okuženost in količina virusa v sezoni spreminja. Zanimal nas je tudi možni vpliv koncentracije GLRaV-3 na fiziološke procese in razvoj bolezenskih znamenj.

Z metodo RT-PCR smo ugotovili, da se je prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 v vzorcih vinske trte v sezoni spreminjala. Rezultati teh testiranj se niso popolnoma ujemale z rezultati seroloških testiranj, ki smo jih opravili po pripravi ključev za gojenje virusnih rastlin. Mogoče je, da so bile trte okužene že od začetka, vendar tega nismo zaznali s testom ELISA zaradi njene nizke občutljivosti oziroma okužbe nismo dokazali z RT-PCR zaradi načina vzorčenja. Znano je namreč, da so GLRaV razporejeni po vinski trti neenakomerno (Monis in Bestwick, 1996), zato način vzorčenja in količina vzorčenega tkiva lahko močno vpliva na rezultat testiranja. Vseh razlik ne gre pripisati dejanski okuženosti vzorcev, ker so s tehničnega vidika mogoče nekatere napake. Glede na pridobljene rezultate RT-PCR privzamemo, da so bile vse trte v poskusu okužene z

GLRaV-1. Predvidevamo, da sta koncentracija virusa, ki je bila očitno pod mejo detekcije in metodološka napaka vplivali na detekcijo virusov.

Pri skupini B, ki naj bi bila glede na rezultate testa ELISA okužena le z GLRaV-3, smo čez sezono v nekaterih primerih dokazali tudi prisotnost GLRaV-1. V isti časovni točki so bile med posameznimi rastlinami velike razlike v koncentraciji GLRaV-3 (pri enem merjenju). Še večje razlike v koncentraciji je bilo opaziti pri mešani okužbi v skupini C (okužba z GLRaV-1 in GLRaV-3). Z gotovostjo ne moremo trditi, da okužba z GLRaV-1 ni vplivala na koncentracijo GLRaV-3 v skupini B, saj je bila ta kombinacija virusov prisotna tudi v skupini C, v kateri pa koncentracije virusa ne moremo povezati s časom merjenja. Rezultati ELISA testa so pokazali, da trte iz skupine B niso okužene z GLRaV-1. Zaradi manjše občutljivosti tega testa je možno, da je bila koncentracija GLRaV-1 v njih pod mejo detekcije te metode. V tem primeru je bila morda koncentracija virusa še premajhna, da bi lahko vplivala na koncentracijo GLRaV-3, seveda pa bi bilo potrebno to hipotezo preveriti v posebnem poskusu.

Natančnejšo korelacijo med virusoma bi mogoče potrdili s koncentracijo GLRaV-1. Teh rezultatov žal nismo mogli pridobiti. Začetna oligonukleotida in sonda za qPCR iz literature (Osman in sod., 2006) ne nalegajo pravilno na nukleotidna zaporedja izolatov iz vinograda v Semiču. Kot je pokazala genetska raznolikost slovenskih izolatov GLRaV-1, se ti delijo v dve skupini. Omenjeni začetni oligonukleotidi in sonda so primerni za določanje genetske skupine I, vendar ne tudi skupine II, v katero spadajo izolati iz Semiča. Za določanje koncentracije virusa smo zato izoblikovali več novih začetnih oligonukleotidov in sond, vendar tudi ti niso dali zelenih rezultatov. To dodatno kaže na kompleksnost in zapletenost molekularne določitve GLRaV.

Agrotehnični ukrepi in pogoji okolja vinske trte vplivajo na pojavnost bolezenskih znamenj. O vplivu razmer gojenja na pojavnost znamenj GLD poročajo Barba in sod. (1989) in Christov in sod. (2001), vendar naj ne bi bili povezani s koncentracijo virusa, saj je bila ta celo 30-krat večja kakor pri trtah v vinogradu (Barba in sod., 1989). Pri trtah v našem poskusu nismo zaznali vidnih bolezenskih znamenj, značilnih za GLD. Bolezenska znamenja se najverjetneje niso razvila zaradi gojenja trte v rastlinjaku, ne vemo pa ali to vpliva na koncentracijo virusa.

5.1.4.2 Fiziološki parametri

Bolezenska znamenja so navadno povezana z zmanjšanjem učinkovitosti fizioloških procesov v vinski trti, ki pa se pri naših trtah niso razvila. Razbarvanje in razpad listnega tkiva sta posledica strukturnih sprememb v fotosinteznih organelih, spremenjene asimilacije CO₂, prevodnosti listnih rež, celičnega dihanja, števila kloroplastov, metabolizmom klorofila, inhibicije Rubisca in drugih fotosinteznih encimov (Cabaleiro in

sod., 1999; Sampol in sod., 2003; Bertamini in sod., 2004; Endeshaw in sod., 2014; Martelli, 2014).

Bolezenska znamenja lahko bistveno vplivajo na fiziološke procese. Pri okuženih trtah so ovrednotili tudi do še enkrat večje neto fotosinteze (kultivarja 'Cabernet franc' in 'Cabernet sauvignon') brez bolezenskih znamenj v primerjavi s trtami, pri katerih so se znamenja okužbe z virusom razvila (Basso in sod., 2010). Virus GRBaV, ki ima podobna bolezenska znamenja kakor GLRaV, slabo vpliva na neto fotosintezo, transpiracijo in prevodnost listnih rež pri kultivarju 'Gamay'. Omenjene parametre so ovrednotili v Švici, kjer prevladujejo hladnejše vremenske razmere. Vpliv GRBaV je bil viden že sredi julija, še pred pojavom bolezenskih znamenj, in sicer so bili izmerjeni parametri manjši za okoli 30 % v primerjavi s kontrolno skupino. Podobne rezultate so dobili po nastanku bolezenskih znamenj (Reynard in Gugerli, 2015).

Pri trtah, vzdrževanih v rastlinjaku, nismo mogli dokazati značilnega vpliva okužbe z različnimi GLRaV na vse fotosintezne parametre v začetku poletja (junij), še pred pojavom mogočih bolezenskih znamenj GLD. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi pri nekaterih raziskavah v vinogradu z vrednotenjem parametrov pri različnih kultivarjih (Gutha in sod., 2012; Moutinho-Pereira in sod., 2012; Endeshaw in sod., 2014). Spet drugi raziskovalci poročajo, da so izmerili manjše vrednosti nekaterih parametrov pri kultivarjih, gojenih *in vitro*, pa tudi v lončnih poskusih in vinogradih z različnimi kombinacijami virusov (Mannini in sod., 1996, 1997; Guidoni in sod., 1997; Hristov in Abrasheva, 2001; Sampol in sod., 2003).

Kot kažejo rezultati našega poskusa, virusna okužba ni značilno vplivala na maksimalno potencialno učinkovitost PSII (Fv/Fm) med obravnavanji. Razmerje Fv/Fm je sorazmerno fotosintezi in pri vitalnih rastlinah v ugodnih razmerah dosega do 0,83. Ta parameter se zmanjša, kadar je rastlina izpostavljena močnemu ali dolgotrajnemu stresu, ki povzroči nepovratne posledice fotosinteznega aparata (Vodnik, 2001). Na zmanjšanje razmerja Fv/Fm lahko vplivajo tudi drugi dejavniki, npr. povišanje temperature okolja, pri čemer rastlina raste, in ne samo stres zaradi okužbe. Ne glede na vse so bile vrednosti Fv/Fm med merjenji nespremenjene, kar nakazuje, da so bile razmere v rastlinjaku primerne za izvajanje poskusa z vinsko trto in da okužba z GLRaV ni povzročila nepovratnih poškodb fotosinteznega aparata. To dodatno nakazuje, da je parameter Fv/Fm premalo občutljiv za merjenje vpliva okužb z virusi pri vinski trti. Pri dejanski učinkovitosti PSII (Fv'/Fm') je opaziti majhne razlike med okuženimi trtami z GLRaV-1 ter mešano okužbo z GLRaV-1 in GLRaV-3, ki pa niso značilne. Pri razlagi rezultatov moramo upoštevati tudi okolje merjenja parametrov, saj se vrednotenja v pogojih *in vivo*, v lončnih poskusih (v rastlinjaku) in na prostem razlikujejo. To še dodatno potrjuje zapletenost razlage učinkovitosti PSII in drugih parametrov, saj so povezani s starostjo merjene trte oziroma lista in časa meritve v sezoni, pa tudi z drugimi dejavniki vpliva (Zufferey in sod., 2000).

V podporo merjenju z napravama LI-6400 in PAM-fluorometrom smo opravili tudi meritve vsebnosti klorofila z napravo klorofilometer SPAD-502. Ocena vsebnosti klorofila nam omogoča, da posredno sklepamo o fotosintezni sposobnosti lista. Meritve s SPAD nam nakazujejo prepustnost lista za fotosintezno aktivno svetlobo, saj je prepustnost močno odvisna od količine klorofila na enoto listne površine. Tiste rastline, ki med stresom obdržijo večji SPAD, bolje prenašajo stres. Meritev SPAD je v našem poskusu dosegla podobne vrednosti kakor pri meritvah okuženih trt v vinogradu na drugi sorti (Moutinho-Pereira in sod., 2012). Rezultati meritev SPAD so v našem primeru nekoliko manjši, kar gre pripisati starosti trt v poskusu in razmeram v rastlinjaku. Tudi tu se kaže vpliv okuženosti na fotosintezno delovanje.

Od prevodnosti listnih rež je odvisna transpiracija, ki je merilo izgube vode v rastlini. Trte z mešano okužbo so imele manjše vrednosti omenjenih parametrov kakor pa trte z enojno okužbo. Razlika je vidna posebno pri drugem merjenju v sredini julija, pri katerem se vrednosti Pn, ETR, E in g_s med enojno in mešano okužbo z GLRaV značilno razlikujejo. Okužba z GLRaV ima vpliv na fiziološke parametre v vinski trti, čeprav ne na vse značilno. Pri mešani okužbi z GLRaV-1 in GLRaV-3 smo v primerjavi z okužbo z GLRaV-1 (brez GLRaV3) ovrednotili manjše vrednosti parametrov. Do podobnih rezultatov so prišli tudi pri vrednotenju parametrov v drugih kultivarjih (Guidoni in sod., 1997; Cabaleiro in sod., 1999; Bertamini in sod., 2004; Moutinho-Pereira in sod., 2012).

Tudi drugi virusi, drugih rodov in družin, slabo vplivajo na fiziološke parametre v vinski trti. Manjša vsebnost klorofila in zmanjšana neto fotosinteza na koncu rastne dobe je bila posledica okužbe z GRSPaV (rod *Foveavirus*, družina Betaflexiviridae) na sorti 'Bosco' (Gambino in sod., 2012), ravno tako pri okužbi z GLRaV-1 v kombinaciji z GVA pri sorti 'Nebbiolo' (Santini in sod., 2011) ali pri trtah z bolezenskimi znamenji sort 'Cabernet franc' in 'Cabernet sauvignon' okuženega z GLRaV-2 in RSPaV (Basso in sod., 2010).

Na vrednosti fizioloških parametrov in odzivnosti trte vplivajo zunanji in notranji dejavniki. Poleg okužbe imajo vpliv še kultivar, starost rastline, temperatura, lega lista in okolje, v katerem se vrednotenje izvaja, ter drugi dejavniki (Cabaleiro in sod., 1999; Zufferey in sod., 2000; Sampol in sod., 2003; Mannini in sod., 2012; Vodnik, 2012). Neodvisno od bolezenskih znamenj in njihovih povzročiteljev so dokazali, da je odziv trt na fiziološki ravni med sortami različen (Zufferey in sod., 2000). Najverjetneje pripomorejo k temu tudi podnebne razmere.

Težko je primerjati naše rezultate s podatki iz literature. Na rezultate vplivajo rastne in podnebne razmere vinske trte, uporabljene merilne naprave in kultivar vinske trte ter ne nazadnje različki virusov, s katerim je ta okužena. Na podlagi naših izsledkov in izsledkov drugih raziskovalcev ne moremo splošiti, kakšen je vpliv GLRaV na vinsko trto, še

posebno ne pred pojavom bolezenskih znamenj. Vpliv virusov in spremembe je mogoče opaziti, ne moremo pa reči, kaj točno se dogaja in zakaj nastajajo te razlike.

5.2 SKLEPI

V naši raziskavi smo prvič ovrednotili genetsko raznolikost slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3. Filogenetske analize nukleotidnih zaporedij gena HSP70h so pokazale, da se slovenski izolati obeh virusov iz zahodne Slovenije združujejo v eno skupino, medtem ko se izolati iz vzhodne Slovenije pojavljajo v dveh skupinah. Z rezultati naših analiz smo potrdili hipotezo o genetski raznolikosti omenjenih virusov tako na področju Slovenije, kot tudi znotraj posameznega vinograda. Ugotovili smo, da je GLRaV-1 bolj razširjen v vzhodni, GLRaV-3 pa v zahodni Sloveniji.

V okviru doktorske naloge smo razvili metodo RT-qPCR za določanje GLRaV-3, ki uspešno zazna slovenske izolate virusa. Z njo smo določili koncentracijo omenjenega virusa v listih vinske trte.

Z molekularno karakterizacijo slovenskega izolata GLRaV-4 (055-SI) smo dobili dodatne informacije o kompleksnosti tega virusa. Rezultati na podlagi karakterizacije CP in p23 slovenskega izolata 055-SI GLRaV-4 so potrdili našo hipotezo. Slovenski izolat najbolj podoben ameriškemu izolatu LR106, pa tudi izolatom iz Turčije (Y253-TK) in Izraela (Y252-IL) in je predstavnik osnovnega različka GLRaV-4. Kot pri nekaterih drugih virusih smo tudi pri GLRaV-4 ugotovili, da je N-terminalni del CP najbolj spremenljiv del tega proteina. Podatki o raznolikosti tega dela so zelo pomembni za nadaljnji razvoj molekularnih diagnostičnih testov GLRaV-4 in njegovih različkov.

S pregledom razširjenosti kaparjev na vinski trti smo delno potrdili hipotezo, saj smo prisotnost *N. innumerabilis* in *P. ficus* potrdili na Primorskem ter *P. corni* in *P. vitis* po skoraj vsej Sloveniji, drugih kaparjev pa na vinski trti nismo našli. V naši raziskavi smo ugotovili prvi večji napad *P. ficus* na prostem leta 2012 v vinogradu v Dobravljah pri Ajdovščini.

S prvim nimfalnim stadijem izbrane populacije *P. ficus* iz vinograda v Dobravljah smo uspešno prenesli izbrani izolat GLRaV-3 z okužene na zdravo trto. Uspešnosti prenosa s preostalimi stadiji kaparja nismo dokazali. S tem smo potrdili hipotezo, da so nižje razvojne stopnje ličink pri prenosu izbranih virusov vinske trte uspešnejše od višjih razvojnih stopenj ličink in odraslih samic slovenske populacije kaparjev. V vseh preučevanih razvojnih stopnjah kaparja smo odkrili vse tri preiskovane viruse, kar potrjuje, da je le-ta tudi zmožen prenosa virusa. Za potrditev statusa prenašalca je zato potrebno opraviti študije prenosa virusov z želenim potencialnim prenašalcem.

Fiziološke parametre smo vrednotili na trtah okuženih z GLRaV-1 ter GLRaV-1 in GLRaV-3. V začetku junija se vrednosti med okužbami z različnima GLRaV niso nikjer značilno razlikovale. Značilne razlike med okužbo z GLRaV-1 ter mešano okužbo z GLRaV-1 in GLRaV-3 so se pojavile le pri neto fotosintezi, potencialni fotokemični učinkovitosti PSII, prevodnosti listnih rež, transpiraciji, hitrosti transporta elektronov po tilakoidi in vsebnosti klorofila v sredini julija. Pri mešani okužbi z GLRaV-1 in GLRaV-3 smo v primerjavi z okužbo z GLRaV-1 (brez GLRaV-3) ovrednotili manjše vrednosti parametrov. V našem primeru hipoteze o vplivu okužbe z GLRaV na fiziološke procese v vinski trti ne moremo potrditi v celoti. Na podlagi rezultatov merjenj v rastlinjaku težko splošimo, kakšen je vpliv GLRaV na vinsko trto, še posebno ne pred pojavom bolezenskih znamenj, ali kakšen je njihov vpliv na trte na prostem.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Bolezen zvijanja listov vinske trte povzročajo z zvijanjem listov vinske trte povezani virusi (GLRaV) iz družine *Closteroviridae*. Virusi se nahajajo predvsem v floemu okuženih rastlin ter povzročajo zvijanje listov in nekatere druge morfološke spremembe na listih vinske trte, kar vodi k zmanjšanju fizioloških procesov v trti ter neugodno vpliva na kakovost in količino pridelka. Zaradi naštetega uvrščamo GLRaV med najnevarnejše in gospodarsko najpomembnejše viruse vinske trte. Virusi se s pomočjo kaparjev hitro širijo in okužijo celotne vinograde v le nekaj letih. Povod raziskave je prisotnost GLRaV-1 in GLRaV-3 ter kaparjev v rodni vinogradih v Sloveniji. To sta najbolj razširjena virusa po svetu, ki povzročata veliko gospodarsko škodo v vinogradništvu, kaparji pa so na skoraj vseh vinorodnih območjih. Povečanje števila in razširjenost kaparjev lahko pospešujeta širjenje virusov iz okuženih trt v vinogradih. Posledica tega bi bila lahko občutna gospodarska škoda zaradi vpliva virusov, pa tudi zaradi samih kaparjev. Namen raziskave je razumevanje širjenja bolezni zvijanja listov vinske trte ter boljše poznavanje interakcij med povzročitelji in prenašalci te bolezni v Sloveniji. Cilj raziskave pa je bil ugotoviti genetsko raznolikost slovenskih izolatov GLRaV s poudarkom na GLRaV-1, -3 in -4 ter katere GLRaV prenašajo slovenski kaparji in katere razvojne stopnje so pri teh prenosih uspešnejše. Eden od ciljev je bil tudi ovrednotiti vpliv GLRaV na nekatere fiziološke procese v vinski trti.

Taksonomija GLRaV se v zadnjih letih močno spreminja. Do leta 2011 je bilo opisanih 11 z zvijanjem listov vinske trte povezanih virusov: GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -Car in -Pr, vendar jih je bilo nato pet izmed njih združenih v eno vrsto, poimenovano GLRaV-4. V Sloveniji je bil v preteklih letih poleg GLRaV-1, -2 in -3 najden GLRaV-4, vendar ni bil podrobneje okarakteriziran. Iz rastlinskega materiala, v katerem smo potrdili prisotnost GLRaV-3 in GLRaV-4 s testom DAS-ELISA, smo z metodo IC RT-PCR pomnožili 1769 nukleotidov dolg 3'-terminalni del slovenskega izolata GLRaV-4. Zaporedje vključuje celoten CP in gen za protein p23. Na podlagi tega zaporedja smo preučili sorodnost slovenskega izolata z drugimi izolati GLRaV-4. Ugotovili smo, da je slovenski izolat 055-SI GLRaV-4 najbolj soroden referenčnemu izolat GLRaV-4 LR106. Raziskovalci poročajo tudi o genetski raznolikosti GLRaV-1 in GLRaV-3 na podlagi celotnih ali delnih genov in genomov. V naši raziskavi smo s PCR pomnožili gen HSP70h in na podlagi dobljenega zaporedja prvič ovrednotili genetsko raznolikost slovenskih izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3. S filogenetskimi analizami smo pokazali, da se slovenski izolati vsakega virusa združujejo v dve skupini, skupino I in skupino II, glede na geografsko lego vinogradov. Skupini I in II sta tudi najbolj razširjeni skupini GLRaV-1 in GLRaV-3 v večini vinorodnih okolišev po svetu.

Za razumevanje interakcij med GLRaV in kaparji je ključno poznavanje obeh vrst. Na vinski trti v Sloveniji smo potrdili prisotnost štirih vrst kaparjev: *N. innumerabilis*, *P. corni*, *P. vitis* in *P. ficus*. Kaparja *P. corni* in *P. vitis* sta domači vrsti ter razširjeni po celotni Sloveniji, medtem ko sta *N. innumerabilis* in *P. ficus* tujerodni vrsti in se za zdaj pojavljata le na Primorskem. *P. ficus* je bil v preteklosti na trti le v zavarovanih prostorih. Prvo večjo prisotnost *P. ficus* na prostem sta bila zaznana leta 2012 v vinogradu v Vipavski dolini in leta 2013 v dolini Drnice v okolici Kopra. V izbranem vinogradu v bližini Ajdovščine so imeli velike težave z boleznijo zvijanja listov vinske trte in napadom kaparjev. Zato smo opravili vizualni pregled trsov in laboratorijske analize s testom DAS-ELISA, da bi ugotovili prisotnost virusov na izbranih trsih. S testiranjem smo ugotovili močno okuženost vinograda z GLRaV-3. Okužb z GLRaV-1 je bilo bistveno manj. V delu vinograda, v katerem je bila okuženost z GLRaV-3 pogostejša, so bili tudi kaparji zelo razširjeni, kar je kazalo na njihovo možno vpletenost v širjenje bolezni. Z izbrano populacijo *P. ficus* iz tega vinograda smo dve leti zapored preučevali možnost prenosa GLRaV-1, GLRaV-3 in GLRaV-4 s tremi različnimi skupinami razvojnih stopenj kaparja. Uspešnost prenosa virusov na neokužene trte smo preverjali s testom DAS-ELISA. Rezultati so pokazali, da prvi nimfalni stadij izbrane populacije *P. ficus* uspešno prenaša izbrani izolat GLRaV-3, medtem ko s preostalimi stadiji kaparja tega nismo dokazali. Z metodo RT-PCR smo dokazali viruse v kaparjih po hranjenju na okuženih trtah. V vseh preučevanih razvojnih stopnjah kaparja smo odkrili vse tri viruse. Ta kapar ima več rodov letno, kar še pospeši njegovo širjenje in ob tem tudi širjenje virusne okužbe v vinogradih. Posledica tega je lahko velika gospodarska škoda zaradi vpliva virusov, pa tudi zaradi samih kaparjev. Pomembno je, da se zavedamo nevarnosti virusnih okužb tudi, ko bolezen še ni razvita in ni značilnih bolezenskih znamenj.

Bolezenska znamenja so navadno povezana z odzivom vinske trte na okuženost z virusi, kar zmanjšuje učinkovitost fizioloških procesov. Fiziološke parametre (neto fotosintezo, dejansko in potencialno fotokemično učinkovitost PSII, prevodnost listnih rež, transpiracijo, koncentracijo CO₂ v listu, hitrost transporta elektronov po tilakoidi in vrednost klorofila) smo vrednotili s prenosnim merilnikom fotosinteze LI-6400, PAM-fluorometrom in SPAD napravo v nadzorovanih razmerah na trtah, okuženih z GLRaV-1 in GLRaV-3. Ugotovili smo, da se v začetku junija vrednosti merjenih parametrov med okužbami z različnima GLRaV niso nikjer značilno razlikovale. Te razlike so se pojavile pozneje poleti, vendar tudi tu ne povsod statistično značilno. Predvidevamo, da bi večji vpliv virusov na vinsko trto ovrednotili na trtah v vinogradu.

6.2 SUMMARY

Grapevine leafroll disease is caused by grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs) of the family *Closteroviridae*. GLRaVs are mostly located in the phloem of infected plants. They cause downward leaf rolling and other morphological changes in grapevine leaves which lead to a reduction of physiological parameters in grapevines, quality and quantity of the clusters. Because of all these impacts GLRaVs are the most important viruses of grapevines. The only known natural vectors of GLRaVs are scale insects. They can spread the infection through the entire vineyards within a few years. The reason for this research was the presence of GLRaV-1, GLRaV-3 and scale insects in vineyards of Slovenia. GLRaV-1 and GLRaV-3 are the most widespread viruses in the world, causing great damage in viticulture, and scale insects are present in almost all wine-growing regions. Increasing populations and prevalence of scale insects can accelerate the spread of GLRaVs in the vineyards. This can result in considerable economic losses as a result of the impact of viruses, as well as the mealybugs themselves. The purpose of this research is to understand the spread of grapevine leafroll disease and to better understand the interactions between pathogens and possible vectors in Slovenia. The aims of this research were to determine the genetic diversity of Slovenian isolates of GLRaVs with an emphasis on GLRaV-1, -3 and -4; which GLRaVs can be transmitted with selected Slovenian populations of mealybugs; and to determine which developmental stages of mealybugs are the most efficient vectors. One of the aims was also to evaluate the impact of GLRaVs on some of the physiological parameters in grapevines.

Taxonomy of GLRaVs has changed greatly in recent years. Until 2011, eleven species of GLRaVs have been described: GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -Car, -De and -Pr, but recently six of them have been comprised in one species, GLRaV-4. GLRaV-1, -2 and -3 are known to occur in Slovenian vineyards. In addition GLRaV-4 was recently found on one location but has not been characterized so far. From plant material, where the presence of GLRaV-3 and GLRaV-4 was confirmed by DAS-ELISA, the 1769 nucleotides long 3'-terminal part of the Slovenian isolate of GLRaV-4 was amplified using IC RT-PCR. The sequence included the entire coat protein gene and the p23 gene. On the basis of this sequence we examined the relationship of Slovenian variant with other variants of GLRaV-4. Results showed that the Slovenian GLRaV-4 isolate 055-SI is most closely related to the reference isolate GLRaV-4 LR106. Researchers also report on the genetic diversity of GLRaV-1 and GLRaV-3 based on complete or partial genes and genomes. In our study, the HSP70h gene was amplified using PCR. Genetic diversity of Slovenian isolates of GLRaV-1 and GLRaV-3 was evaluated for the first time on the basis of obtained sequences. Phylogenetic analyses of the HSP70h gene revealed clustering of analyzed Slovenian isolates of GLRaV-1 and GLRaV-3 into two geographically separated groups, group I and II. Group I and II are the most widespread groups of GLRaV-1 and GLRaV-3 in most winegrowing regions of the world.

To understand the interaction between GLRaV and scale insects, the knowledge of both organisms is necessary. In Slovenian vineyards representatives of four scale insects species have been recorded so far: *N. innumerabilis*, *P. corni*, *P. vitis* and *P. ficus*. *P. vitis* and *P. corni* are indigenous species and occur throughout Slovenia, while *N. innumerabilis* and *P. ficus* are alien species occurring only in the Primorska region so far. In the past, *P. ficus* was recorded on the grapevine only in protected cultivation. The first heavier infestations in vineyards have been recorded recently, in 2012 in a vineyard in Vipava valley and in 2013 in Drnica valley near Koper. The rapid spread of the grapevine leafroll disease and scale insects attack was observed in selected vineyard near Ajdovščina. Visual survey and laboratory analysis using the DAS-ELISA were done to determine the presence of scale insects and viruses in selected grapevines. Results showed that the vineyard was heavily infected with GLRaV-3 while infections with GLRaV-1 were considerably lower. In the part of the vineyard with heavy GLRaV-3 infection, vine mealybugs were also widespread suggesting a possible role of mealybugs in the spread of the disease. Transmission experiments of GLRaV-1, -3 and -4 were made with three different groups of developmental stages of selected population of *P. ficus* from the same vineyard. The recipient plants were tested by DAS-ELISA for virus infections. The results showed that only the first instars nymphs of this population of *P. ficus* successfully transmit the selected isolate of GLRaV-3 while the other stages of *P. ficus* did not transmit any of the viruses included in the experiment. Viruses in mealybugs were determined after feeding on infected vines using RT-PCR. All three viruses were detected in all investigated developmental stages of mealybugs. *P. ficus* has several generations per year, which further accelerates its distributions and the spread of viral infections in the vineyards. This can result in considerable economic loss due to the impact of viruses, as well as scale insects themselves.

The symptoms on infected plants are usually associated with the response of the grapevine to virus infection, which lead to a reduction of efficiency of physiological processes which can be measured by physiological parameters. Physiological parameters (net photosynthesis, photochemical efficiency of PSII, quantum and maximum quantum yield of PSII, stomatal conductance, transpiration, leaf CO₂ concentration, electron transport rate and chlorophyll fluorescence) were estimated on grapevines infected with GLRaV-1 and GLRaV-3. Leaf gas exchange rates were measured under controlled conditions using an LI-6400 measuring system and PAM-fluorometer. Results showed that the values of evaluated parameters between infections with different GLRaVs do not significantly differ in early June. Differences have occurred later in the summer, although they were not statistically significant in all cases. We presume that the impact of viruses on physiological parameters would play a major role on the grapevines in the vineyard.

7 VIRI

- Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S., Gugerli P., Rowhani A. 2012. Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated virus 4 and 6: Taxonomic implications. *Virus Research*, 163: 120–128
- Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S., Uyemoto J.K., Golino D., Rowhani A. 2010. A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Archives of Virology*, 155, 11: 1871–1876
- Akbas B., Kunter B., Ilhan D. 2007. Occurrence and distribution of grapevine leafroll-associated viruses 1, 2, 3 and 7 in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 155: 122–124
- Al Rwahnih M., Dolja V. V., Daubert S., Koonin E. V., Rowhani A. 2012. Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus Research*, 163: 302–309
- Al Rwahnih M., Rowhani A., Islas C., Golino D. A., Preece J., Sudarshana M. R. 2015. Detection and genetic diversity of Grapevine red blotch-associated virus isolates in table grape accessions in the National Clonal Germplasm Repository in California. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37: 130–135
- Alabi O. J., Al Rwahnih M., Karthikeyan G., Poojari S., Fuchs M., Rowhani A., Naidu R. A. 2011. Grapevine leafroll-associated virus 1 occurs as genetically diverse populations. *Phytopathology*, 101: 1446–1456
- Alkowni R., Rowhani A., Daubert S., Golino D. 2004. Partial characterization of a new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Journal of Plant Pathology*, 86: 123–133
- Almeida R. P. P., Daane K. M., Bell V.A., Kai Blaisdell G., Cooper M. L., Herrbach E., Pietersen G. 2013. Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers of Microbiology*, 494: 1–13
- Balachandran S., Hurry V. M., Kelley S. E., Osmond C. B., Robinson S. A., Rohozinski J., Seaton G. G., Sims D. A. 1997. Concepts of plant biotic stress, some insights into stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photo-synthesis. *Physiologia Plantarum*, 100: 203–213
- Barba M., Cupidi A., Faggioli F. 1989. In vitro culture of grapevine infected by closterovirus type III. *Journal of Phytopathology*, 126: 225–230
- Basso M. F., Fajardo T. V. M., Santos H. P., Guerra C. C., Ayub R. A., Nickel O. 2010. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. *Tropical Plant Pathology*, 35, 6: 351–359

- Bell V. A., Bonfiglioli R. G. E., Walker J. T. S., Lo P. L., Mackay J. F., McGregor S. E. 2009. Grapevine leafroll-associated virus 3 persistence in *Vitis vinifera* remnant roots. *Journal of Plant Pathology*, 91: 527–533
- Belli G., Fortusini A., Casati P., Belli L., Bianco P.A., Prati S. 1994. Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia Vegetale*, 4: 105–108
- Ben-Dov Y. 1997. Morphology, Systematics and Phylogeny; Diagnosis. *World Crop Pests, Soft Scale Insects their Biology, Natural Enemies and Control*, 7, A: 157–201
<http://idtools.org/id/scales> (10. avgust 2015)
- Ben-Dov Y., Miller D., Gipson G. 2012. ScaleNet.
<http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm> (marec 2013)
- Berlec A., Štrukelj B. 2010. Nova generacija tehnik določanje nukleotidnega zaporedja: korak k osebni medicini. *Farmaceutski vestnik*, 61: 203–208
- Bertamini M., Malossini U., Muthuchelian K., Nedunchezian N. 2005. Physiological response of field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Marzemino) to grapevine leafroll-associated virus (GLRaV-1). *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 256–265
- Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N. 2004. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology*, 152: 145–152
- Bertazzon N., Borgo M., Vanin S., Angelini E. 2010. Genetic variability and pathological properties of grapevine leafroll-associated virus 2 isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 185–197
- Bertin S., Cavalieri V., Graziano C., Bosco D. 2010. Survey of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) vectors of *Ampelovirus* and *Vitivirus* in vineyards of northwestern Italy. *Phytoparasitica*, 38: 401–409
- Bertsch C., Beuve M., Dolja V. V., Wirth M., Pelsy F., Herrbach E., Lemaire O. 2009. Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. *Biology Direct*, 4, 21, doi:10.1186/1745-6150-4-21: 11 str.
- Bester R., Maree H. J., Burger J. T. 2012. Complete nucleotide sequence of a new strain of grapevine leafroll-associated virus 3 in South Africa. *Archives of Virology*, 157: 1815–1819
- Bester R., Pepler P. T., Burger J. T., Maree H. J. 2014. Relative quantitation goes viral: An RT-qPCR assay for a grapevine virus. *Journal of Virological Methods*, 210: 67–75

- Boonham N., Kreuze J., Winter S., van der Vlugt R., Bergervoet J., Tomlinson J., Mumford R. 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186: 20–31
- Boscia D., Greif C., Gugerli P., Martelli G. P., Walter B., Gonsalves D. 1995. Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. *Vitis*, 34: 171–175
- Bovey R., Gartel W., Hewitt W. B., Martelli G. P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like disease of grapevines. Colour atlas of symptoms. Lausanne, Editions Payot: 181 str.
- Bugg R. L., Waddington C. 1994. Using cover crops to manage arthropod pests of orchards: A reiew. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 50: 11–28
- Bustin S. A. 2004. A-Z of quantitative PCR. Bustin S. A. (ur.). La Jolla, California, USA, International University line: 882 str.
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. 2005. Quantitative real-time RTPCR-a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 3: 597–666
- Buzkan N., Karadağ S., Kaya A., Baloğlu S., Minifra A., Ben-Dov Y., 2010. First report of the Occurance of Grapevine leafroll-associated virus 5 in Turkish Vineyards. *Journal of Phytopathology*, 158: 448–449
- Cabaleiro C., Couceiro C., Pereira S., Cid M., Barrasa M., Segura A. 2008. Spatial analysis of epidemics of *Grapevine leafroll associated virus-3*. *Journal of Plant Pathology*, 121: 121–130
- Cabaleiro C., Pineiro A., Segura A. 1997. Photosynthesis in grapevines infected with leafroll virus (GLRaV-3). V: 12th Meeting of the international council for the study of viruses and virus-like diseases of the grapevine (ICVG). Extended abstracts. Lisbon, Portugal, 28 September - 2 Oktober 1997. de Sequera J. S., Santos M. T. (eds.). Lisbon, Portugal, Oficina Gráfica da Secretaria Geral do Ministerio da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das pescas: 153–154
- Cabaleiro C., Segura A. 2006. Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 441–446
- Cabaleiro C., Segura A., Garcia-Berrios J. J. 1999. Effects of Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 on the Physiology and Must of *Vitis Vinifera* L. cv. Albarino Following Contamination in the Field. *American Society for Enology and Viticulture*, 50: 40–44
- Çağlayan K., Elçi E., Gazel M. 2015. Detection and partial characterization of *Grapevine leafroll-associated virus 1* in pomegranate trees in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, doi: 10.1007/s10658-015-0807-4: 4 str.

- Camargo J. M. F., Pedro S. R. M. 2002. Mutualistic Association between a tiny Amazonian stingless bee and a wax-producing scale insect. *Biotropica*, 34, 3: 446–451
- Chare E. R., Holmes E. C. 2004. Selection pressures in the capsid genes of plant RNAviruses reflect mode of transmission. *Journal of General Virology*, 85: 3149–3157
- Charles J. G., Cohen D., Walker J. T. S., Forgie S. A., Bell V. A., Breen K. C. 2006. A review of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3). Report to New Zealand Winegrowers. *Plant Protect*, 59: 330–337
- Choi K. M., Pearson M. N., Cohen D., Pong J. C. H. 2009. Sequence variation in Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) New Zealand isolates. V: 16th Meeting International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Dijon, France, 13 August-4 September. Boudon-Padieu E. (ed.). Dijon, France, *Le Progrès Agricole et Viticole*: 290–291
- Choi K. M., Cohen D., Pearson M. N. 2013. Molecular characterisation of two divergent variants of grapevine leafroll-associated virus 3 in New Zealand. *Archives of Virology*, 158: 1597–1602
- Christov I., Stefanov D., Velinov T., Goltsev V., Georgieva K., Abracheva P., Genova Y., Christov N. 2007. The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 164, 9: 1124–1133
- Clark M. F., Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475–483
- Colnarič J., Gregorič J., Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1985. Posebno vinogradništvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 399 str.
- Conard, M. 1966. Une Pulvinaire de la vigne, nouvelle pour la France: *Neopulvinaria imeretina* (Coccoidea, Coccidae). *Annales de la Société entomologique de France*, 2, 1: 189–197
- Costello M. J., Daane K. M. 1998. Arthropods. V: Cover cropping in vineyards. Publication, 3338. Ingels C., Bugg R., McGourty G., Christensen P. (eds.). University of California, California. Division of Agriculture and Natural Resources: 93–106
- Cox J. M., Ben-Dov Y. 1986. Planococcine mealybugs of economic importance from the Mediterranean Basin and their distinction from a new African genus (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research*, 76: 481–489
- Credi R., Babini A. R. 1997. Effects of virus and virus-like infections on growth, yield and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 7–12

- Credi R., Terlizzi F., Martini L., Borsari S. 2009. Transmission trials of grapevine viruses by the mealybug *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae). V: 16th Meeting International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Dijon, France, 13 Avgust-4 September. Boudon-Padieu E. (ed.). Dijon, France, Le Progrès Agricole et Viticole: 285
- Crowther J. R. 1995. ELISA I Principles. Joint FAO/IAEA Division Vienna.
<http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/ras-ai-elisai.pdf> (julij 2013)
- Crowther J. R. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). V: Molecular biomethods handbook. Walker, J. K., Rapley, R. (ur.) Humana Press: 595–617
- Čepin U. 2011. Genetska raznolikost in določanje virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 172 str.
- Daane K. M., Almeida R. P. P., Bell V. A., Walker J. T. S., Botton M., Fallahzadeh M., Mani M., Miano J. L., Sforza R., Walton V. M., Zaviezo T. 2012. Biology and Management of Mealybugs in Vineyards. V: Arthropod Management in Vineyards: Pests, Approaches, and Future Directions. Bostanian N. J., Vincent C., Isaacs R. (eds.). Springer: 271–307
- Datamonkey web server. 2015.
<http://www.datamonkey.org/> (marec 2015)
- Dimitrijevic B. 1973. Some observations on natural spread of grapevine leafroll disease in Yugoslavia. Rivista di Patologia Vegetale, 9: 114–119
- Dolja V. V. 2009. New developments in understanding gene functions and evolution of the grapevine Clostroviruses. V: 16th Meeting International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Dijon, France, 13 Avgust-4 September. Boudon-Padieu E. (ed.). Dijon, France, Le Progrès Agricole et Viticole: 83–84
- Dolja V. V., Kreuze J. F., Valkonen J. P. T. 2006. Comparative and functional genomics of clostroviruses. Virus Research, 117: 38–51
- Domingo E., Martin V., Perales C., Grande-Perez A., Garcia-Arriaza J., Arias A. 2006. Viruses as quasispecies: Biological implications. Current Topics in Microbiology and Immunology, 299: 51–82
- Douglas N., Krüger K. 2008. Transmission efficiency of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). European Journal of Plant Pathology, 122: 207–212
- Endeshaw S. T., Sabbatini P., Romanazzi G., Schilder A. C., Neri D. 2014. Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and

- basic fruit chemistry of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Franc. *Scientia Horticulturae*, 170: 228–236
- Engelbrecht D. J., Kasdorf G. G. F. 1990. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planicoccus ficus*. *Phytophylactica*, 22: 341–346
- Esteves F., Teixeira Santos M., Eiras-Dias J. E., Fonseca F. 2013. Molecular data mining to improve antibody-based detection of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1). *Journal of Virological Methods*, 194: 258–270
- Esteves F., Teixeira Santos M., Eiras-Dias J. E., Fonseca F. 2012. Occurrence of grapevine leafroll-associated virus 5 in Portugal: genetic variability and population structure in field-grown grapevines. *Archives of Virology*, 157: 1747–1765
- Falconer D., Mackay T. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edition. Harlow, Essex, UK, Addison Wesley Longman: 464 str.
- Fan X., Hong N., Dong Y., Ma Y., Zhang Z. P., Ren F., Hu G., Zhou J., Wang G. 2015. Genetic diversity and recombination analysis of grapevine leafroll-associated virus 1 from China. *Archives of Virology*, 160: 1669–1678
- Farooq A. B. U., Ma Y.-X., Wang Z., Zhuo N., Wenxing X., Wang G.-P., Hong N. 2013. Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in Grapevine leafroll-associated virus 3 in China. *Virus Research*, 171: 15–21
- Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. 2005. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eight report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 1259 str.
- Fortusini A., Scattini G., Prati S., Cinquanta S., Belli G. 1997. Transmission of Grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and Grapevine virus A (GVA) by scale insects. V: 12th Meeting of the international council for the study of viruses and virus-like diseases of the grapevine (ICVG). Extended abstracts. Lisbon, Portugal, 28 September - 2 October 1997. de Sequera J. S., Santos M. T. (eds.). Lisbon, Portugal, Oficina Gráfica da Secretaria Geral do Ministerio da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das pescas: 121–122
- Fu Y., Li W. H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693–709
- Fuchs M. F. 2007. Grape leafroll disease.
https://pppmb.cals.cornell.edu/sites/pppmb.cals.cornell.edu/files/shared/documents/grape_leafroll.pdf (december 2011)
- Fuchs M., Martinson T. E., Loeb G. M., Hoch H. C. 2009. Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyard. *Plant Disease*, 93: 395–401

- Gachon C., Mingam A., Charrier B. 2004. Real-time PCR: What relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55, 402: 1445–1454
- Gambino G., Cuozzo D., Fasoli M., Pagliarani C., Vitali M., Boccaccio P., Pezzotti M., Mannini F. 2012. Effects of *Grapevine Rupestris Stem Pitting-Associated Virus* on *Vitis vinifera* L. V: Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Davis, California, USA, October 7-14. Davis, California, USA. Ferguson B. (ur.). Foundation Plant Services, University of California, Davis: 90–91
- Giampetruzzi A., Chiumenti M., Roberto R., Pirolo C., Minafra A., Saldarelli P. 2011. First detection of grapevine leafroll-associated virus 9 in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93, 4, Supplement: S4.63-S4.89
- Goheen A. C., Cook J. A. 1959. Leafroll (red-leaf or rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality, and yields. *American Journal of Enology and Viticulture*, 10, 4: 173–181
- Golino D. A., Sim S. T., Gill R., Rowhani A. 1999. Four species of Californian mealybugs can transmit leafroll virus. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 367–368
- Golino D. A., Sim S. T., Gill R., Rowhani A. 2002. California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, 56, 6: 196–201
- Golino D. A., Weber E., Sim S., Rowhani A. 2008. Leafroll disease is spreading rapidly in a Napa Valley vineyard. *California Agriculture*, 62: 156–160
- Gomez Talquenca S., Moyano S., Lanza Volpe M. 2015. Serological relationship among GLRaV-4 strains reflects the genetic variability of its coat protein gene. V: 18th Congress of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG). Ankara, Turkey, 7-11 September 2015. Ertunç F. (ed.). Ankara, Turkey, ICVG: 51–52
- Good X., J. Monis. 2001. Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of Grapevine leafroll-associated virus-5. *Phytopathology*, 91, 3: 274–281
- Goszczynski D. E. 2013. Brief report of a new highly divergent variant of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Journal of Phytopathology*, 161: 874–879
- Gouveia P., Santos M. T., Eiras-Dias J. E., Nolasco G. 2011. Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties. *Archives of Virology*, 156: 413–420
- Gribaudo I., Gambino G., Bertin S., Bosco D., Cotroneo A., Mannini F. 2009. Monitoring the spread of viruses after vineyard replanting with heat-treated clones of *Vitis vinifera* “Nebbiolo”. *Journal of Plant Pathology*, 91: 741–744

- Griffiths A., Wessler S. R., Lewontin R. C., Gelbart W. M., Suzuki D. T., Miller J. H. 2005. Introduction to genetic analysis. 8th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 782 str.
- Grill R. J. 1988. The Scale Insects of California. Part I. The Soft Scales (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). California Department of Food and Agriculture. Tehnical Series in Agricultural Biosystematics and Plant Pathology, no. 1- Sacramento, California, 132 str.
- Gugerli P. 2003. Grapevine Leafroll and related viruses. V: 14th Meeting International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Locorotondo/Bari, Italy, September 12-17 2003. Locorotondo, University of Bari: 25–31
- Gugerli P. 2009. 25 years of serological identification of *Grapevine leafroll-associated viruses*: antiserum and monoclonal antibodies to GLRaV-1 to GLRaV-9. V: 16th Meeting International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Dijon, France, 13 Avgust-4 September. Boudon-Padiou E. (ed.). Dijon, France, Le Progrès Agricole et Viticole: 24–28
- Guidoni S., Mannini F., Ferrandino A., Argamante N., di Stefano R. 2000. Effect of virus status on leaf and berry phenolic compounds in two wine grapevine *Vitis vinifera* cultivars. *Acta Horticulturae*, 526: 445–452
- Guidoni S., Mannini F., Ferrandino A., Argamante N., di Stefano R. 1997. The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 438–442
- Gullan P. J., Martin J. H. 2009. Sternorrhyncha (jumping plant-lice, whiteflies, aphids, and scale insects). V: *Encyclopedia of Insects*. 2. Izdaja. Resh V. H., Cardé R. T. (ur.). Elsevier, San Diego: 957–967
- Gutha L. R., Alabi O. J., Naidu R. A. 2012. Effects of Grapevine Leafroll Disease on Photosynthesis in a red-fruited Wine grape cultivar. V: *Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*. Davis, California, USA, October 7-14. Davis, California, USA. Ferguson B. (ur.). Foundation Plant Services, University of California, Davis: 168–169
- Hadidi A., Levy L., Podleckis E. V. 1995. Polymerase Chain Reaction technology in Plant Pathology. V: *Molecular methods in plant pathology*. Singh R. P., Singh U. S. (eds.). USA: 523 str.
- Hamon A. B. 1984. The soft scale insects of Florida (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). Hamon A. B., Williams M. L. (eds.). Florida Deptment of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry: 194 str.

- Hladnik J., Vodnik D. 2007. Regulacija prevodnosti listnih rež. *Acta agriculturae Slovenica*, 89, 1: 147–157
- Hommay G., Komar V., Lemaire O., Herrbach E. 2008. *Grapevine virus A* transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 185–188
- Hommay G., Le Maguet J., Komar V., lemaire O., Herrbach E. 2009. Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus-1* and *-3* (*Ampelovirus*) and *Grapevine virus A* (*Vitivirus*) by natural populations of soft scales and mealybugs in the north-easteren french vineyard. V: 16th Meeting International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Dijon, France, 13 Avgust-4 September. Boudon-Padiou E. (ed.). Dijon, France, *Le Progrès Agricole et Viticole*: 286–287
- Hrček L. 1973. Proučevanje virusnih boleznih v zvezi s selekcijo vinske trte. Zaključno tehnično poročilo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 198 str.
- Hristov I., Abrasheva P. 2001. Effect of grapevine fanleaf virus and grapevine leafroll-associated virus 3 on vine plants under conditions of in vitro cultivation. *Rasteništvodni Nauki*, 38: 269–274
- Janežič F. 1954. Prispevek k poznanju kaparjev v Sloveniji. *Biološki vestnik*, 3: 123–127
- Jelkmann W., Mikona C., Turturo C., Navarro B., Rott M. E., Menzel W., Saldarelli P., Minafra A., Martelli G. P. 2012. Molecular characterization and taxonomy of Grapevine leafroll-associated virus 7. *Archives of Virology*, 157: 359–362
- Jerman I., Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, Študentska založba: 129 str.
- Jones D. T., Taylor W. R., Thornton J. M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8: 275–282
- Jooste A. E. C., Maree H. J., Bellstedt D. U., Goszczynski D. E., Pietersen G., Burger J. T. 2010. Three *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3) variants identified from South African vineyards show high genetic variability in their 5' UTR. *Archives of Virology*, 155: 1997–2006
- Jooste A. E. C., Pietersen G., Burger J. T. 2011. Distribution of *Grapevine leafroll-associated virus-3* variants in South African vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, 131: 371–381
- Jooste A. E. C., Molenaar N., Maree H. J., Bester R., Morey L., de Koker W. C., Burger J. T. 2015. Identification and distribution of multiple virus infections in Grapevine leafroll diseased vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 2: 363–375
- Karasev A. V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 293–324

- Komar V., Vigne E., Demangeat G., Fuchs M. 2007. Beneficial effect of selective virus elimination on the performance of *Vitis vinifera* cv Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58: 202–210
- Kominek P., Bryxiova M., Glasa M. 2005. Partial molecular characterization of Czech isolate of Grapevine leafroll-associated virus 3. *Journal of Phytopathology*, 152: 427–431
- Korošec-Koruza Z. 1990. Proučevanje ustreznih metod za odkrivanje viroz v selekciji vinske trte (*Vitis vinifera*). Doktorska disertacija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet poljoprivrednih znanosti: 77 str.
- Korošec-Koruza Z. 1991. Virusno zvijanje in rdečenje listov vinske trte (grapevine leafroll) – GLR. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Agronomija, 57: 155–162
- Korošec-Koruza Z. 1992. Virusne bolezni vinske trte – pomen pri pridelavi grozdja. *Sodobno kmetijstvo*, 25: 219–222
- Korošec-Koruza Z., Tomažič I. 2002. Poti in stranpoti zdravstvene selekcije vinske trte. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2. Slovenski vinogradniško-vinarski kongres, Nova Gorica, 31. 1.–2. 2. 2002. Puconja, M. (ur). Nova Gorica, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije in Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 62–66
- Koruza B., Lokar V., Lavrenčič P., Korošec-Koruza Z., Topolovec A., Gregorič J. 2003. Introdukcija in selekcija vinske trte v letu 2002. Ljubljana, KIS: 74 str.
- Kosztarb M., Kozar F. 1988. Scale Insects of central Europe. Series Entomologica, no 41. Dordrecht, The Netherlands. V: Junk Publishers: 456 str.
- Kovacs L. G., Hanami H., Fortenberry M., Kaps M. L. 2001. Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevine Vidal blanc and St. Vincent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 254–259
- Koval C. F., Mahr D. L., Pellitteri P. J. 1996. Maple and other trees disorder: Cottony maple scale. University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension Publications, A3123
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385> (november 2011)
- Krake L. R., Steele Scott N., Rezaian M. A., Taylor R. H. 1999. Graft-transmitted diseases of grapevines. CSIRO Publishing, Australia: 137 str.
- Krüger K., Saccaggi D. L., van der Merwe M., Kasdorf G. G. F. 2015. Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3): Acquisition, Inoculation and Retention by the Mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus*

- (Hemiptera: Pseudococcidae). South African Journal of Enology and Viticulture, 36, 2: 223–230
- Kumar S., Baranwal V. K., Singh P., Jain R. K., Sawant S. D., Singh S. K. 2012. Characterization of a Grapevine leafroll-associated virus 3 from India showing incongruence in its phylogeny. Virus Genes, 45, 1: 195–200
- Kumar S., Reed M. W., Gamper H. B. Jr., Gorn V. V., Lukhtanov E. A., Foti M., West J., Meyer R. B. Jr., Schweitzer B. I. 1998. Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. Nucleic Acid Research, 26, 3: 831–838
- Lambers H., Chapin F. S., Pons T. L. 2008. Photosynthesis, Respiration, and Long Distance Transport. V: Plant Physiological Ecology. 2nd ed. Springer Lambers H., Chapin F. S., Pons T. L. (eds.). Science+Business Media, New York, USA: 11–100
- Lauring A. S., Andino R. 2010. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. PLoS Pathogens, 6, 7: e1001005, doi: 10.1371/journal.ppat.1001005: 8 str.
- Le Maguet J., Beuve M., Herrbach E., Lemaire O. 2012. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. Phytopathology, 102: 717–723
- Le Maguet J., Fuchs J. J., Beuve M., Chadoeu, J., Herrbach E., Lemaire O. 2013. The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the epidemic of Grapevine leafroll-associated virus-1 (GLRaV-1) in two French vineyards. European Journal of Plant Pathology, 135: 415–427
- Ling K. S., Zhu, H.Y., Petrovic, N., Gonsalves, D. 2001. Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting Grapevine leafroll-associated closterovirus-3 in field samples. American Journal of Enology and Viticulture, 52: 21–27
- Liu M.-H., Li M.-J., Qi H.-H., Guo R., Liu X. M., Wang Q., Cheng Y.-Q. 2013. Occurrence of Grapevine leafroll-associated viruses in China. Plant Disease, 97, 1339–1345
- Lodge J., Lund P., Minchin S. 2007. Gene cloning. Birmingham, Taylor & Francis Group: 473 str.
- Maček J. 1990. Posebna fitopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. 2. izd. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Mahfoudhi N., Digiario M., Dhoubi M. H. 2008. Incidence and distribution of grapevine leafroll-associated viruses in Tunisian vineyards. Journal of Phytopathology, 156, 556–558

- Mahfoudhi N., Digiario M., Dhoudi M. H. 2009. Transmission og grapevine Leafroll Viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera:pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). *Plant Disease*, 93: 99–1002
- Maliogka V. I., Dovas C. I., Katis N. I. 2008. Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the *Ampelovirus* genus. *Virus Research*, 135, 1: 125–135
- Maliogka V. I., Dovas C. I., Lotos L., Efthimiou K., Katis N. I. 2009. Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus *Ampelovirus*. *Archives of Virology*, 154, 2: 209–218
- Maliogka V. I., Martelli G. P., Fuchs M., Katis N. I. 2015. Control of Viruses Infecting Grapevine. V: *Advances in Virus Research*, 91. Loebenstein G., Katis N.I. (eds.). Burlington, Academic Press: 175-227
- Mannini F., Argamante N., Credi R. 1996. Improvements in the quality of grapevine Nebbiolo clones obtained by sanitation. *Acta Horticulturae*, 427: 319–24
- Mannini F., Guidoni S., Ferrandino A., Argamante N., Credi R. 1997. Photosynthesis and grape composition of a *Vitis vinifera* clone after virus sanitation. V: 12th Meeting of the international council for the study of viruses and virus-like diseases of the grapevine (ICVG). Extended abstracts. Lisbon, Portugal, 28 September - 2 Oktober 1997. de Sequera J. S., Santos M. T. (eds.). Lisbon, Portugal, Oficina Gráfica da Secretaria Geral do Ministerio da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das pescas: 155–156
- Mannini F., Mollo A., Credi R. 2012. Field performance and wine quality modification in a clone of *Vitis vinifera* cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63: 144–147
- Maree H. J., Almeida R. P. P., Bester R., Chooi K. M., Cohen D., Dolja V. V., Fuchs M. F., Golino D. A., Jooste A. E. C., Martelli G. P., Naidu R. A., Rowhani A., Saldarelli P., Burger J. T. 2013. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers of Microbiology*, 4, 82: 1–21
- Maree H. J., Pirie M.D., Bester R., Oosthuizen K., Burger J. T. 2015. Phylogenomic analysis reveals deep divergence and recombination in an economically important grapevine virus. *PLOS ONE*, 10, 5: e0126819, doi:10.1371/journal.pone.0126819: 18 str.
- Martelli G. P. 1993. Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Martelli, G. P. (ur.). Rome, FAO: 263 str.
- Martelli G. P. 2009. Grapevine virology highlights 2006-2009. V: 16th Meeting International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Dijon, France, 13 Avgust-4 September. Boudon-Padieu E. (ed.). Dijon, France, Le Progrès Agricole et Viticole: 15–23

- Martelli G. P. 2012. Grapevine Virology Highlights: 2010-2012. V: Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Davis, California, USA, October 7-14. Davis, California, USA. Ferguson, B. (ur.). Foundation Plant Services, University of California, Davis: 13–31
- Martelli G. P. 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 Supl: 1–136
- Martelli G. P. 2015. Grapevine Virology: a historical account with an eye to the studies of last 60 years or so. V: 18th Congress of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG). Ankara, Turkey, 7-11 September 2015. Ertunç F. (ed.). Ankara, Turkey, ICVG: 16–21
- Martelli G. P., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Agranovsky A. A., Al Rwahnih M., Dolja V. V., dovas C. I., Fuchs M., Gugerli P., Hu J. S., Jelkmann W., Katis N. I., Maliogka V. I., Malzer M. J., Menzel W., Minifra A., Rott M. E., Rowhani A., Sabanadzovic S., Saldarelli P. 2012. Taxonomic revision of the family *Closteroviridae* with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94: 7–19
- Martelli G. P., Agranovsky A. A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R. H. A., Dolja V. V., Hu J. S., Jelkmann W., Karasev A. V., Martin R. R., Minafra A., Namba S., Vetten H. J., 2011. Family *Closteroviridae*. *Virus Taxonomy*. V: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King A., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. (eds.). Amsterdam, The Netherlands, Academic Press: 987–1001
- Martelli G. P., Arganovsky A. A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R. H. A., Dolja V. V., Falk B. W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A. V., Minafra A., Namba S., Vetten H. J., Wisler G. C., Yoshikawa N. 2002. The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*, 147, 10: 2039–2044
- Martelli G. P., Boudon-Padieu E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies. Options Méditerranéennes Ser. B, Studies and Research, 55: 59–75
- Martelli G. P., Walter B., Pinck L. 2001. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385>: 15 str. (december 2013)
- Martin D. P, Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1, 1: vev003, doi: 10.1093/ve/vev003: 5 str.
- Masten-Milek T., Šimala M., Korić B., Bjeliš M. 2007. Status of scale insects (Coccoidea), family Coccidae, on grapes in 2006 in Croatia with emphasis on rarity of second

- generation of *Parthenolecanium corni* (Bouche) and *Parthenolecanium persicae* (Fabricius). V: Zbornik predavanj in referatov 8. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Radenci, 6.–7. marec 2007. Maček, J. (ur.). Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 326–329
- Mavrič I., Ravnikar M. 1998. Uporaba imunske elektronske mikroskopije v rastlinski virologiji. V: Zbornik posveta kmetijstvo in okolje. Bled, 12. in 13. marec 1998. Rečnik, M., Verbič, J. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 331–336
- Mavrič Pleško I., Viršček Marn M., Žežlina I., Urek G. 2011. Poskus prenosa virusov zvižanja listov vinske trte (GLRaV) z velikim trtnim kaparjem (*Neopulvinaria innumerabilis*). V: Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Podčetrtek, 1.–2. marec 2011. Maček, J., Trdan, S. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 47–48
- McKenzie H. L. 1967. Mealybugs of California with taxonomy, biology and control of North American species (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). Univ. Calif. Press. 526 str.
- Melzer M. J., Sether D. M., Karasev A. V., Borth W., Hu J. S. 2008. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. *Archives of Virology*, 153, 4: 707–714
- Miller D. R. 2005. Selected scale insect groups (Hemiptera: Coccoidea) in the southern region of the United States. *Florida Entomologist*, 88, 4: 482–501
- Miller D. R., Rung A., Venable G. L., Gill R. J., Willimas D. J. 2007. Systematic Entomology Laboratory ARS, USDA Scale Insects Identification Tools for Species of Quarantine Significance.
<http://www.sel.barc.usda.gov/ScaleKeys/index.html> (marec 2012)
- Miller D., Rung A., Parikh G., Venable G., Redford A. J., Evans G. A., Gill R. J. 2014. Scale insects: identification tool for species of quarantine significance, second edition. Fort Collins, Colorado: USDA APHIS Identification Technology Program (ITP). <http://idtools.org/id/scales/> (julij 2015)
- Monis J., Bestwick R. K. 1996. Detection and Localization of Grapevine Leafroll Associated *Closteroviruses* in Greenhouse and Tissue Culture Grown Plants. *American Journal of Enology and Viticulaerae*, 47, 2: 199–205
- Moutinho-Pereira J., Correia C. M., Goncalves B., Bacelar E. A., Coutinho J. F., Ferreira H. F., Lousada J. L., Cortez M. I. 2012. Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and -3) on the physiology of the Portugese grapevine cultivar 'Touriga Nacional' growing under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 160: 237–249
- Naidu R. A., Hughes J. D. A. 2003. Methods for the detection of plant viral diseases. V: Plant virology in sub - Saharan Africa. Proceedings of plant virology, IITA, Ibadan,

- Nigeria, 4-8 June 2001. Hughes J. D. A., Odu B. (eds.). International Institute of Tropical Agriculture: 233–260
- Naidu R. A., Maree H. J., Burger J. T. 2015. Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem. Annual Review of Phytopathology, 53: 613–634
- Naidu R. A., O'Neal S., Walsh D. 2008. Grapevine leafroll disease. Washington State University Extension Bulletin. 2008: 20 str.
<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf> (januar 2012)
- Naidu R., Rowhani A., Fuchs M., Golino D., Martelli G. P. 2014. Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. Plant Disease, 98, 9: 1172–1185
- Okasha S. 2008. Population Genetics. V: The Stanford Encyclopedia Philosophy. Zalta E. N. (ed.) Stanford University.
<http://plato.stanford.edu/archives/fall2008/entries/populationgenetics> (21. oktober 2015)
- Oliver J. E., Fuchs M. 2011. Tolerance and resistance to viruses and their vectors in *Vitis* spp.: A virologist's perspective of the literature. American Journal of Enology and Viticulture, 62: 438–451
- Osman F., Leutenegger C. H., Golino D., Rowhani A. 2007. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9. Journal of Virological Methods, 141: 22–29
- Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. 2008. Comparison of low density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in the detection of grapevine viruses. Journal of Virological Methods, 149, 2: 292–299
- Osman F., Rowhani A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). Journal of Virological Methods, 133, 2: 130–136
- Padilla C. V., Cretazzo E., López N., García de Rosa B., Padilla V., Velasco L. 2010. First report of Grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4) in Spain. New Disease Reports, 21, doi:10.5197/j.2044-0588.2010.021.021: 21
- Pearson R. C., Goheen A. C. 1998. Compendium of grape diseases. 4th ed. St. Paul, The American Phytopathological Society Press: 93 str.
- Pellizzari G. 1997. Grapevine. World Crop Pests, Soft Scale Insects their Biology, Natural Enemies and Control, 7, B: 323–331
- Peremyslov V. V., Andreev I. A., Prokhnevsky A. I., Duncan G. H., Taliansky M. E., Dolja V. V. 2004. Complex molecular architecture of beet yellows virus particles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 5030–5035

- Pesqueira A. M., Cabaleiro C., Velasco L. 2016. Genetic analysis of Grapevine leafroll-associated virus 3 population from Galicia, Spain. Article first published online: *Plant Pathology*, 65: 310–321
- Petersen C. L., Charles J. G. 1997. Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceorae*. *Plant Pathology*, 46: 509–515
- Pfaffl M. V. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. V: A-Z of quantitative PCR. Bustin S. A. (ed.). La Jolla, California, USA, International University line: 87–112
- Phillips J. H. H. 1963. Life history and ecology of *Pulvinaria vitis* (L.) (Hemiptera: Coccoidea), the Cottony Scale attacking peach in Ontario. *The Canadian Entomologist*, 95: 372–407
- Pietersen G., Spreeth N., Oosthuizen T., van Rensburg A., van Rensburg M., Lottering D., Rossouw N., Tooth, D. 2013. Control of grapevine leafroll disease spread at a commercial wine estate in South Africa: a case study. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64: 296–305
- Pietersen G., Walsh H. A. 2012. Development of a LAMP technique for the control of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3) in infected white cultivar vines by roguing. V: Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Davis, California, USA, October 7-14. Davis, California, USA. Ferguson B. (ed.). Foundation Plant Services, University of California, Davis: 50–51
- Poojari S., Alabi O. J., Naidu R. A. 2013. Molecular characterization and impacts of a strain of *Grapevine leafroll-associated virus 2* causing asymptomatic infection in a wine grape cultivar. *Virology Journal*, 10: 324
- Pravilnik o trženju materiala za vegetativno razmnoževanje trte. 2004. Ur. l. RS, št. 31/2004
<https://www.uradni-list.si/1/content?id=47976> (oktober 2015)
- Prosser S. W., Goszczynski D. E., Meng B. 2007. Molecular analysis of double-standed RNAs reveals complex infection of grapevines with multiple viruses. *Virus Research*, 124: 151–159
- Reynard J.-S., Gugerli P. 2015. Effects of *Grapevine red blotch-associated virus* on vine physiology and fruit composition of field grown grapevine cv. Gamay. V: 18th Congress of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG). Ankara, Turkey, 7-11 September 2015. Ertunç F. (ed.). Ankara, Turkey, ICVG: 237–235
- Reynard J.-S., Schneeberger P. H. H., Frey J. R., Schaerer S. 2015. Biological, Serological, and Molecular Characterization of a Highly Divergent Strain of Grapevine leafroll-

- associated virus 4 Causing Grapevine Leafroll Disease. *Phytopathology*, 105, 9: 1262–1269
- Rowhani A., Golino D. A., Klaassen V., Sim S. T., Gouran M., Al Rwahnih M. 2015. Grapevine leafroll associated virus 3: Effects on rootstocks, vine, performance, yield and berries. V: 18th Congress of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG). Ankara, Turkey, 7-11 September 2015. Ertunç F. (ed.). Ankara, Turkey, ICVG: 161–162
- Rowhani A., Manigas M. A., Lile L. S., Daubert S. D. Golino D. A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85, 3: 347–352
- Rowhani A., Uyemoto J. K., Golino D. A., Martelli G. P. 2005. Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 261–278
- Rubio L., Ayllón M. A., Kong P., Fernández A., Polek M., Guerri J., Moreno P., Falk B. W. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75: 8054–8062
- Rubio L., Guerri J., Moreno P. 2013. Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. *Frontiers of Microbiology*, 4: 151. doi: 10.3389/fmicb.2013.00151: 15 str.
- Saldarelli P., Castellano M. A., Harrison B. D., Martelli, G. P. 2005. Two grapevine viruses in an ornamental *Vitis* species from Scotland *Journal of Plant Pathology*, 87: 76
- Saldarelli P., Cornuet P., Vigne E., Talas F., Bronnenkant I., Dridi A.M., Andret-Link P., Boscia D., Gugerli P., Fuchs M., Martelli G. P. 2006. Partial characterization of two divergent variants of Grapevine leafroll-associated virus 4. *Journal of Plant Pathology*, 88, 2: 203–214
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Fritsch T. M. (ed.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 784 str.
- Sampol B., Bota J., Riera D., Medrano H., Flexas J. 2003. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist*, 160: 403–412
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 5463–5467
- Santini D., Mollo A., Pacifico D., Borgogno E., Mannini F. 2011. Ecophysiological and agronomic response of two ‘Nebbiolo’ clones to different leafroll virus infection. V: 17th International Symposium GiESCO, Asti-Alba, 29 August – 2 September 2011, Novello, V., Bovio M., Cavalletto S. (eds.). Asti-Alba, Italy, GiESCO: 243–246

- Satyanarayana T., Gowda S., Ayllón M. A., Dawson W. O. 2004. Closterovirus bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 799–804
- Schumutterer, H. 1952. Die Ökologie der Cocciden (Homoptera, Coccoidea) Frankens. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 33: 544–584
- Sefc K. M., Leonhardt W., Steinkellner H. 2000. Partial sequence identification of grapevine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *Journal of Virological Methods*, 86: 101–106
- Seljak G. 1995. *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathv.) – nov in vedno bolj škodljiv kapar vinske trte na Primorskem. V: Zbornik predavanj in referatov z 2. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Radenci, 21.–22. februar 1995. Maček, J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 265–274
- Seljak G. 2007: Scale insects introduced into Slovenia in the last fifty years. V: *Proceedings of the XI International Symposium on Scale Insect Studies*, Oeiras, Portugal, 24-27 September 2007. Lisbon, Portugal, ISA: 121–127
- Seljak G. 2010. A checklist of scale insects of Slovenia. *Entomologica hellenica*, 19: 99–113
- Seljak G. 2011. Analiza vnosa in odkrivanja tujerodnih fitofagnih žuželk in pršic v Slovenijo. V: Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Podčetrtek, 1.–2. marec 2011. Maček, J., Trdan, S. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 16–17
- Seljak G., Žežlina I. 2007. Kaparji vinske trte: možnosti in težave pri njihovem obvladovanju. V: Zbornik predavanj in referatov 8. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Radenci, 6.–7. marec 2007. Maček, J. (ur.). Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 233–237
- Sforza R., Boudon-Padiou E., Greif C. 2003. New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109: 975–981
- Sharma A. M., Wang J., Duffy S. 2011. Occurrence of *Grapevine leafroll-associates virus* complex in Napa Valley. *PLoS ONE*, 6, 10: e26227, doi: 10.1371/journal.pone.7 str.
- Sharon R., Zahavi T., Sokolsky T., Nir N., Harari A. 2013. Mating disruption of planococcus ficus is not as simple as for lobesia botrana but might have additional advantages for natural enemy's efficiency.
https://www.iobc-wprs.org/pub/2013_WG_Viticulture_meeting_Ascona_CH/41-Sharon.pdf (maj 2015)

- Sim S. T., Rowhani A., Alkowni R., Golino D. A. 2003. Experimental transmission of Grapevine leafroll-associated viruses 5 and 9 by longtailed mealybugs. V: 14th Meeting of the International Council for Virus and Virus like Diseases of Grapevines (ICVG), Extended Abstracts. Locorotondo/Bari, Italy, September 12-17 2003. Locorotondo, University of Bari: 211–212
- Smith D. B., McAllister J., Casino C., Simmonds P. 1997. Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill? *Journal of General Virology*, 78: 1511–1519
- Statistični urad Republike Slovenije. 2009.
<http://www.stat.si/StatWeb/glavnanavigacija/podatki/prikazistaronovico?IdNovice=3179>
(oktober 2015)
- Statistični urad Republike Slovenije. 2014.
<http://www.stat.si/StatWeb/prikazi-novico?id=5110&idp=11&headerbar=9>
(december 2015)
- Stele A., Žaucer I. 2013. O kmetijstvu doma in drugje po EU [elektronski vir], el. knjiga. – Ljubljana: Statistični urad Republike Slovenije
http://www.stat.si/doc/pub/kmetijstvo_EU.pdf (oktober 2015)
- Sušin J., Kmecl V., Žnidaršič-Pograc V. 2004. Uporabnost klorofilomera za napoved dognojevanja koruze z dušikom. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2004. Čatež ob Savi, 13. in 14. december 2004. Tanjšek A., Čeh Brežnik B., Dolničar P., Šantavec I., Sušnik J. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 299–304
- Štrukelj M., Mavrič Pleško I., Urek G., Trdan S. 2012. Kaparji (Hemiptera: Coccoidea) vinske trte (*Vitis vinifera* L.) v Sloveniji in možnosti njihovega biotičnega zatiranja. *Acta agriculturae Slovenica*, 99 (2): 255–269
- Štrukelj M., Mavrič Pleško I., Viršček Marn M., Razinger J., Urek G. 2013. Scale insects - vectors of grapevine viruses in Primorska. V: Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo (in Okrogle mize o zmanjšanju tveganja zaradi rabe FFS v okviru projekta CropSustaIn), Bled, 5.–6. marec 2013. Trdan, S., Maček, J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 344–347
- Štrukelj M., Mavrič Pleško I., Seljak G., Žežlina I., Urek G. 2015. Razširjenost kaparjev na vinski trti v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 12. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Ptuj, 3. –4. marec 2015. Trdan S. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 76
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipi A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729

- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680
- Thompson J. R., Fuchs M., Perry K. L. 2012. Genomic analysis of grapevine leafroll associated virus-5 and related viruses. *Virus Research*, 163, 1: 19–27
- Tomažič I. 2002. Raziskava povzročitelja boleznih razbrazdanja lesa vinske trte (*Vitis* sp.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 81 str
- Tomažič I., Mavrič Pleško I., Petrovič N., Ravnikar M., Korošec-Koruza, Z. 2008. Introduction of Grapevine virus B and Grapevine leafroll-associated virus 2 testing in sanitary selection of grapevine. *Acta agriculturae Slovenica*, 91: 75–85
- Tomažič I., Petrovič N., Korošec-Koruza Z. 2005. Effects of rugose wood and GLRaV-1 on yield of cv. 'Refošk' grapevines. *Acta agriculturae Slovenica*, 85, 1: 91–96
- Tomažič I., Vrhovšek U., Korošec-Koruza Z. 2003. The influence of virus diseases on grape polyphenols of cv. 'Refošk'. *Zbornik Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo*, 81, 2: 287–295
- Triapitsyn S. V., González D., Vickerman D. B., Noyes J. S., White E. B. 2006. Morphological, biological, and molecular comparisons among the different geographical populations of *Anagyrus pseudococci* (Hymenoptera: Encyrtidae), parasitoids of *Planococcus* spp. (Hemiptera: Pseudococcidae), with notes on *Anagyrus dactylopii*. *Biological Control*, 41: 14–27
- Tsai C. W., Chau J., Fernandez L., Bosco D., Daane K. M., Almeida, R. P. P. 2008. Transmission of grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology*, 98: 1093–1098
- Tsai C. W., Daugherty M. P., Almeida R. P. P. 2012. Seasonal dynamics and virus translocation of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in grapevine cultivars. *Plant Pathology*, 61: 977–985
- Tsai C. W., Rowhani A., Golino D. A., Daane K. M., Almeida R. P. P. 2010. Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology*, 100: 830–834
- Turturo C., Saldarelli P., Yafeng D., Digiario M., Minifra A., Savino V. Martelli G. P. 2005. Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *Journal of General Virology*, 86: 217–224
- Urek G., Hrzič A. 1998. Ogorčice - nevidni zajedavci rastlin: fitonematologija. Ljubljana, G. Urek (ur.). Ljubljana, samozaložba: 240 str.

- Using the LI-6400 / LI-6400XT Version 6. Portable Photosynthesis System. 2008. Li-COR Biosciences: 1280 str.
- Váradi G., Bálo B., Papp E., Böddi B., Polyák D. 1995. Photosynthetic parameters of virus infected grapevine leaves. V: Mathis P. (ed.). Photosynthesis: from light to biosphere, vol IV. Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 917–920
- Vega A., Gutierrez R. A., Pena-Neira A., Cramer G. R., Arce-Johnson P. 2011. Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Molecular Biology*, 77: 261–274
- Velasco L., Cretazzo E., Padilla C. V., Janssen D. 2015. Grapevine leafroll associated virus 4 strain 9: complete genome and quantitative analysis of virus-derived small interfering RNA populations. *Journal of Plant Pathology*, 97, 1: 189–192
- Vodnik D. 2001. Fiziologija rastlin – praktične vaje. Ljubljana. Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta: 56 str.
- Vodnik D. 2005. Študijska gradiva s predavanj: 145 str.
http://www.bf.uni-lj.si/ag/botanika/Gradiva_predavanja.html (februar 2013)
- Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta. Ljubljana: 141 str.
- Vrabl S. 1990: Varstvo kmetijskih rastlin pred boleznimi in škodljivci. I., Splošni del. – Maribor, Tiskarsko-založniška dejavnost, TF: 115 str.
- Vršič S., Lešnik M. 2010. Vinogradništvo. Ljubljana, Kmečki glas: 403 str.
- Walker N. J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296: 557–559
- Walton V. M., Pringle K. L. 2004a. A survey of mealybugs and associated natural enemies in vineyards in the Western Cape Province, South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 25, 1: 23–25
- Walton V. M., Pringle K. L. 2004b. Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), a Key Pest in South African vineyards. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 25, 2: 54–62
- Wang J., Sharma A. M., Duffy S., Almeida R. P. P. 2011. Genetic diversity in 3' terminal 4.7-kb region of Grapevine leafroll-associated virus 3. *Phytopathology*, 101: 445–450
- Ward E., Foster S. J., Fraaije B. A., McCartney H. A. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annual of Applied Biology*. 145: 1–16
- WebCutter 2.0. 2015
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> (marec 2015)

- Weber E., Golino D., Rowhani A. 2002. Laboratory testing for grapevine virus diseases. *Practical Winery and Vineyard* 22, 2: 13–26
- Williams D. J., Granara de Willink M. C. 1992 *Mealybugs of Central and South America*. Oxon U. K. CAB International Institute of Entomology, Wallingford: 635 str.
- Zhu H. Y., Ling K. S., Goszczynski D. E., McFerson J. R., Gonsalves D. 1998. Nucleotide sequence and genome organization of grapevine leafroll-associated virus 2 are similar to Beet yellows virus, the closterovirus type member. *Journal of General Virology*, 79: 1289–1298
- Zorloni A., Prati S., Chiesa S., Bianco P. A. 2006. Transmission of grapevine leafroll associated vitus 3 by the soft scale insect *Neopulvinaria innumerabilis*. *Journal of Plant Pathology*, 88: S31–S63
- Zufferey V., Murusuer F., Schultz H. R. 2000. A model analysis of tje photoynthetic response of *Vitis vinifera* L. cvs Riesling and Chasselas in the field: I. Interaction of age, light and temperature. *Vitis*, 39, 1: 19–26

ZAHVALA

Verjamem, da nihče ne vstopi v naše življenje po naključju. Trajnost nekega poznanstva ni pomembna. Nekatera kratka poznanstva so me naučila kar največ, druga so me naučila več o tem kdo sem in kaj zmorem, enostavno zaradi izzivov, ki so mi jih prinesla. Vse cenim. Ob zaključku določenega obdobja v mojem življenju bi se rada zahvalila vsem, ki ste mi bili kakor koli v pomoč in podporo. Na tem mestu bi želela izpostaviti ljudi, ki so v veliki meri prispevali k nastanku te doktorske disertacije.

Iskrena hvala mentorju dr. Gregorju Ureku, ker mi je omogočil raziskovalno delo in pot do še zadnje stopničke moje študijske poti. Mentor, hvala vam za vsestranske nasvete in pomoč pri reševanju težav.

Pomemben prispevek k doktorski disertaciji predstavlja tudi somentorica dr. Irena Mavrič Plaško, nepogrešljiva oseba v času mojega doktorskega študija. Irena, hvala vam za čas, ki ste si za vzeli vsakokrat, kadar sem vas potrebovala. Brez vašega vodstva in pomoči ne bi bilo to delo kar je in jaz takšna oseba kot sem.

Zahvala gre tudi prof. dr. Dominiku Vodniku in dr. Jaku Razingerju za pomoč pri izvedbi in analizi podatkov fizioloških meritev. Zahvaljujem se tudi članom komisije za pregled disertacije in strokovne popravke.

Hvala celotnemu kolektivu Oddelka za varstvo rastlin in vsem mojim 'cimrom'. Hvala vam, ker ste mi pomagali z nasveti in/ali dejanji ter naredili moje delovno okolje še prijetnejše. Slednje še posebej cenim, saj sem v teh letih z vami preživela več časa kot s svojimi domačimi.

Posebna zahvala pa gre vsekakor moji družini, kateri tudi posvečam to delo. Vi ste tisti, ki ste mi tekom celotnega študija stali ob strani, še posebno takrat, ko sem vas najbolj potrebovala. Hvala za vso spodbudo, razumevanje, potrpežljivost in stalno podporo na moji življenjski poti. Hvala, ker ste!

PRILOGA A

Genetska raznolikost z zvijanjem listov vinske trte povezanega virusa 1 in 3 (GLRaV-1 in GLRaV-3) v slovenskih vinogradih

Priloga A1: Seznam delnih genov HSP70h izolatov GLRaV-1 in GLRaV-3 iz slovenskih vinogradov in njihove aks. številke

Izolat	Izvor	Kutivar	V/Z Slovenija	Aks. št.	
				GLRaV-1	GLRaV-3
D-42	Drašiči	neznan	V	–	KP866975
DA-68	neznan	neznan	nz	–	KP866976
DA-69	neznan	neznan	nz	–	KP866977
DOB-109	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	–	KP866978
DOB-11	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	KP866939	KP866979
DOB-114	Dobravlje	'Zelen'	Z	–	KP866980
DOB-115	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	KP866940	KP866981
DOB-116	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	KP866941	KP866982
DOB-117	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	KP866942	–
DOB-19	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	–	KP866983
DOB-20	Dobravlje	'Cabernet sauvignon'	Z	–	KP866984
DOB-21	Dobravlje	'Cabernet sauvignon'	Z	–	KP866985
DOB-23	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	KP866943	KP866986
DOB-24	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	–	KP866987
DOB-30	Dobravlje	'Cabernet sauvignon'	Z	–	KP866988
DOB-7	Dobravlje	'Sivi pinot'	Z	–	KP866989
DOB-77	Dobravlje	'Modri pinot'	Z	KP866944	KP866990
DOB-8	Dobravlje	'Sivi pinot'	Z	KP866945	KP866991
G-94	Goče	neznan	Z	–	KP866992
GO-100	Goriška brda	neznan	Z	–	KP866993
GO-101	Goriška brda	neznan	Z	–	KP866994
K-73	Križ	'Malvazija'	Z	–	KP866995
K-74	Križ	'Refošk'	Z	KP866946	–
K-75	Križ	'Refošk'	Z	–	KP866996
K-76	Križ	'Sauvignon'	Z	KP866947	–
LO-103	Lože	neznan	Z	–	KP866997
LO-105	Lože	neznan	Z	–	KP866998
MA-64	Manče	'Laški rizling'	Z	–	KP866999
MA-66	Manče	'Laški rizling'	Z	–	KP867000
MA-67	Manče	'Sauvignon'	Z	KP866948	KP867001

se nadaljuje

... nadaljevanje priloge A1

Izolat	Izvor	Kutivar	V/Z Slovenija	Aks.št.	
				GLRaV-1	GLRaV-3
MO-83	Moravče pri Gabrovki	neznan	V	–	KP867002
MO-84	Moravče pri Gabrovki	neznan	V	–	KP867003
MO-85	Moravče pri Gabrovki	neznan	V	KP866949	–
MO-86	Moravče pri Gabrovki	neznan	V	KP866950	–
MO-87	Moravče pri Gabrovki	neznan	V	KP866951	–
MO-88	Moravče pri Gabrovki	neznan	V	KP866952	–
MO-89	Moravče pri Gabrovki	neznan	V	KP866953	–
P-110	Podzemelj	neznan	V	KP866954	KP867004
P-41	Podzemelj	neznan	V	KP866955	–
PO-55	Potoče	'Modri pinot'	Z	KP866956	–
RA-36	Dramlje	'Sauvignon'	V	KP866957	–
RA-37	Dramlje	'Sauvignon'	V	KP866958	–
RA-38	Dramlje	'Sauvignon'	V	KP866959	–
S-99	Solkan	neznan	Z	–	KP867005
SE-111	Semič	'Žametovka'	V	–	KP867006
SE-118	Semič	'Žametovka'	V	KP866960	–
SE-119	Semič	'Laški rizling'	V	–	KP867007
SE-120	Semič	'Laški rizling'	V	–	KP867008
SE-122	Semič	'Laški rizling'	V	KP866961	–
SE-123	Semič	'Žametovka'	V	KP866962	KP867009
SE-124	Semič	'Kraljevina'	V	KP866963	–
SE-40	Semič	'Sivi pinot'	V	KP866964	–
SE-49	Semič	'Sivi pinot'	V	KP866965	–
SE-53	Semič	'Modra frankinja'	V	KP866966	–
SE-54	Semič	'Žametovka'	V	KP866967	–
SE-78	Semič	'Modra frankinja'	V	KP866968	KP867010
SE-79	Semič	'Modra frankinja'	V	KP866969	KP867011
SK-57	Škocjan	'Malvazija'	Z	–	KP867012
SK-58	Škocjan	'Malvazija'	Z	–	KP867013
SK-60	Škocjan	'Malvazija'	Z	–	KP867014
SK-61	Škocjan	'Malvazija'	Z	–	KP867015
VD-56	Veliki Dol	'Refošk'	Z	–	KP867016
VO-130	Vodice	neznan	Z	KP866970	KP867017
VO-80	Vodice	neznan	Z	KP866971	–
VO-81	Vodice	neznan	Z	KP866972	–
VSG-102	Gorica	'Barbera'	Z	KP866973	–

se nadaljuje

... nadaljevanje priloge A1

Izolat	Izvor	Kutivar	V/Z Slovenija	Aks.št.	
				GLRaV-1	GLRaV-3
VV-34	Vrtovin	neznani	Z	KP866974	–
ZE-46	Železniki	neznani	Z	–	KP867018

V – vzhod Slovenije

Z – zahod Slovenije

nz – izvor izolata ni znan

Priloga A2: Seznam delnih genov HSP70h tujih izolatov GLRaV-1, uporabljenih v genetskih analizah

GenBank Aks. št.	Skupina	Izolat/različek	Država	Kultivar
AF195822	I	neznan	neznana	neznan
AF233935	I	neznan	neznana	neznan
AY644650	I	Czech	Češka	'Beli pinot'
AY754905	I	Sv11_1	Češka	'Beli pinot'
AY754906	I	Sv11_2	Češka	'Beli pinot'
AY754908	I	Sv11_4	Češka	'Beli pinot'
AY754909	I	Sv11_5	Češka	'Beli pinot'
AY754910	I	Sv12_1	Češka	'Beli pinot'
AY754911	I	Sv12_2	Češka	'Beli pinot'
AY754912	II	Sv12_3	Češka	'Beli pinot'
AY754915	I	Sv15_1	Češka	'Modra portugalka'
AY754920	II	Sv17_1	Češka	'Modra portugalka'
AY754921	II	Sv17_2	Češka	'Modra portugalka'
AY754922	II	Sv17_3	Češka	'Modra portugalka'
AY754923	II	Sv17_4	Češka	'Modra portugalka'
AY754924	I	Sv20_1	Češka	'Modra portugalka'
AY754926	I	Sv20_3	Češka	'Modra portugalka'
AY754928	I	Sv20_5	Češka	'Modra portugalka'
AY754929	II	Sv26_1	Češka	'Rizvanec'
AY754930	I	Sv26_2	Češka	'Rizvanec'
AY754931	II	Sv26_3	Češka	'Rizvanec'
AY754932	II	Sv26_4	Češka	'Rizvanec'
AY754934	I	TI29_2	Češka	neznan
AY754935	I	TI29_3	Češka	neznan
AY754938	I	TI29_6	Češka	neznan
AY754939	II	TI33_1	Slovaška	neznan
AY754941	II	TI33_3	Slovaška	'Zeleni vetlinac'
AY754943	I	TI33_5	Slovaška	'Zeleni vetlinac'
AY754944	II	TI33_6	Slovaška	'Zeleni vetlinac'
EF103901	I	WC	Južna Afrika	neznan
HE794021	II	GLRaV1CSE.6.4.1.H	Madžarska	'Juhfark'
HQ833473	I	WACV1	ZDA	'Claretvine'
JF811862	I	CA11 11c	ZDA: Kalifornija	'Zante currat'
JF811863	I	CA16 9	ZDA: Kalifornija	'Medaur'
JF811867	I	CA17 2c	ZDA: Kalifornija	'Cabernet sauvignon'
JF811869	I	CA18 11	ZDA: Kalifornija	'Chardonnay'
JF811872	I	CA20 6	ZDA: Kalifornija	'Audibert'
JF811878	I	CA21 7c	ZDA: Kalifornija	'Chardonnay'
JF811879	I	CA22 8c	ZDA: Kalifornija	'Modri pinot'
JF811882	I	CA2 11c	ZDA: Kalifornija	'Marsanne'

se nadaljuje

... nadaljevanje priloge A2

GenBank Aks. št.	Skupina	Izolat/različek	Država	Kultivar
JF811884	I	CA3 9c	ZDA: Kalifornija	'Marsanne'
JF811885	I	CA6 4c	ZDA: Kalifornija	'Black Seedless'
JF811888	I	CA7 5c	ZDA: Kalifornija	'Negrita'
JF811890	I	CA8 2c	ZDA: Kalifornija	'Cabernet sauvignon'
JF811892	I	CA9 12	ZDA: Kalifornija	'Chardonnay'
JF811894	I	WAPN1	ZDA: Washington	'Modri pinot'
JF811896	I	NYLM1	ZDA: New York	'Lemberger'
JF811897	II	WALM1	ZDA: Washington	'Lemberger'
JF811898	I	NYCH4	ZDA: New York	'Chardonnay'
JF811899	I	NYCH5	ZDA: New York	'Chardonnay'
JF811900	I	NYCH2	ZDA: New York	'Chardonnay'
JF811901	I	WACH1	ZDA: Washington	'Chardonnay'
JF811902	II	WALM2	ZDA: Washington	'Lemberger'
JF811903	I	WACS1	ZDA: Washington	'Cabernet sauvignon'
JF811904	I	WACH2	ZDA: Washington	'Chardonnay'
JF811905	I	NYCH1	ZDA: New York	'Chardonnay'
JF811906	I	NYCH3	ZDA: New York	'Chardonnay'
JF811907	I	CA9 10	ZDA: Kalifornija	'Chardonnay'
JQ023131	II	1050	Kanada	neznani
KC567978	I	EM3 1	Portugalska	'Estreito macio'
KC567979	I	EM3 11	Portugalska	'Estreito macio'
KC567980	I	GR3 2	Portugalska	'Gouveio real'
KC567981	I	J2 1	Portugalska	'Rootstock Jacques'
KC567982	I	J2 8	Portugalska	'Rootstock Jacques'
KC567983	I	SS3 1	Portugalska	'Sao Saul'
KC567988	I	TL3 5	Portugalska	'Tinta lameira'

Priloga A3: Seznam celotnih izolatov tujih GLRaV-3, uporabljenih v genetskih analizah

GenBank Aks. št.	Skupina	Izolat/različek	Država	Kultivar
AF037268	I	NY1	neznana	neznan
EU259806	II	GP18	J. Afrika	neznan
EU344893	I	CI-766	Čile	'Merlot'
GQ352631	I	621	J. Afrika	'Cabernet sauvignon'
GQ352632	II	623	J. Afrika	'Ruby Cabernet'
GQ352633	III	PL-20	J. Afrika	neznan
GU983863	I	WA-MR	ZDA	'Merlot'
JQ423939	III	LN	Kitajska	'Venus seedless'
JQ655295	VI	GH11	J. Afrika	'Cabernet'
JQ655296	VI	GH30	J. Afrika	'Cabernet'
JQ796828	VI	clone 3	ZDA: Kalifornija	'Merlot'
JX266782		139	Avstralija	'Sauvignon blanc'
JX559645	I	3138-07	Kanada	neznan
KJ174518	III	neznan	neznana	neznan
NC_004667	I	NY1	neznana	neznan

PRILOGA B

Vpliv GLRaV na fiziološke procese v žlahtni vinski trti

Priloga B1: Relativna kvantifikacija GLRaV-3 v vzorcih vinske trte, ki smo jih vzorčili skozi rastno sezono 2014

Vzorec	ΔCt		ΔCt	T_m	GEOMEAN	R
	COX	18S	LR3			
A25	23,47	12,14	23,45	74,40	16,88	0,45
B1	28,67	23,02	33,81	73,94	25,69	1,32
B11	26,85	16,90	26,96	73,58	21,30	0,24
B12	23,95	11,24	26,00	74,64	16,41	3,66
B13	24,91	12,29	26,7	74,67	17,49	2,80
B14	25,59	13,95	23,74	75,29	18,89	0,14
B15	24,86	12,53	24,05	75,11	17,65	0,40
B16	23,96	12,20	26,07	74,22	17,10	2,39
B17	24,63	13,01	27,75	74,39	17,90	4,37
B18	23,08	11,70	24,51	74,85	16,43	1,28
B2	26,28	18,43	26,37	74,85	22,01	0,10
B21	26,85	18,27	27,24	74,49	22,15	0,16
B22	25,96	17,02	26,57	75,21	21,02	0,22
B23	28,89	18,27	27,89	73,68	22,97	0,14
B24	29,92	21,30	31,63	74,46	25,25	0,40
B25	24,58	10,47	24,08	74,58	16,04	1,25
B26	28,24	14,54	30,39	74,40	20,26	5,29
B27	30,44	21,84	32,68	71,80	25,78	0,57
B28	23,67	11,00	23,79	74,85	16,14	0,96
B3	25,61	16,14	31,13	74,49	20,33	8,49
B31	26,22	11,26	25,64	74,76	17,18	1,68
B32	26,11	14,65	28,81	74,67	19,56	2,89
B33	25,21	11,56	27,63	73,86	17,07	7,18
B34	28,90	18,18	31,40	74,89	22,92	1,70
B35	23,36	9,64	24,83	74,22	15,01	4,28
B36	27,58	13,88	29,30	74,58	19,56	4,04
B37	24,75	9,29	26,01	74,39	15,16	8,74
B4	25,90	12,00	27,67	74,22	17,63	4,98
B41	24,07	11,30	24,44	74,67	16,49	1,17
B42	24,80	17,28	23,56	74,57	20,70	0,03
B43	25,67	14,68	23,96	74,40	19,41	0,11
B44	26,93	19,19	27,26	74,46	22,73	0,11
B45	24,12	12,28	23,74	74,4	17,21	0,44

se nadaljuje

... nadaljevanje priloge B1

Vzorec	ΔC_t		ΔC_t	T_m	GEOMEAN	R
	COX	18S	LR3			
B46	24,59	16,91	27,22	74,22	20,39	0,54
B47	25,94	17,81	27,08	74,04	21,49	0,23
B48	30,32	24,07	34,31	74,31	27,02	0,74
B5	30,05	19,29	29,04	74,58	24,08	0,15
B7	22,88	19,60	30,74	74,40	21,18	3,59
C1	24,52	18,97	30,15	74,31	21,57	1,81
C11	25,96	15,69	24,71	74,67	20,18	0,11
C12	27,03	13,64	25,74	75,03	19,20	0,44
C13	28,76	16,31	26,26	73,86	21,66	0,12
C14	25,21	13,21	24,45	74,22	18,25	0,35
C15	23,97	12,38	22,79	75,11	17,23	0,22
C16	24,68	12,6	27,48	73,86	17,63	4,36
C17	23,60	11,06	26,64	74,22	16,16	6,76
C18	25,35	14,23	24,86	74,31	18,99	0,28
C2	27,47	16,68	31,89	73,94	21,41	6,79
C21	27,21	15,86	24,87	74,49	20,77	0,08
C22	29,95	16,59	26,28	74,64	22,29	0,08
C23	30,37	20,96	27,56	73,32	25,23	0,02
C24	20,59	11,49	19,42	75,47	15,38	0,08
C25	23,22	8,75	24,77	74,58	14,25	6,94
C26	26,62	11,97	27,56	73,50	17,85	3,98
C27	29,05	18,93	29,21	74,57	23,45	0,26
C28	26,07	15,45	26,07	75,03	20,07	0,30
C3	26,93	12,07	26,49	74,40	18,03	1,68
C31	31,43	21,62	29,76	73,48	26,07	0,06
C32	26,92	11,91	27,81	75,39	17,91	4,54
C33	26,77	12,76	27,29	73,32	18,48	2,13
C34	29,12	24,15	32,92	74,58	26,52	0,40
C35	26,33	23,88	30,28	74,21	25,07	0,17
C36	27,62	19,18	28,36	74,40	23,02	0,19
C37	30,42	24,77	32,13	74,57	27,45	0,12
C38	23,89	22,21	29,17	75,00	23,04	0,33
C4	25,43	22,21	32,68	74,03	23,77	2,29
C41	24,08	9,52	20,46	75,18	15,14	0,19
C42	26,24	15,45	24,51	74,85	20,14	0,10
C43	20,62	12,05	20,98	74,76	15,76	0,18
C44	27,64	14,40	29,18	74,93	19,95	2,84
C45	24,12	12,28	25,59	73,68	17,21	1,58
C46	23,49	10,26	25,74	74,93	15,52	5,65

se nadaljuje

... nadaljevanje priloge B1

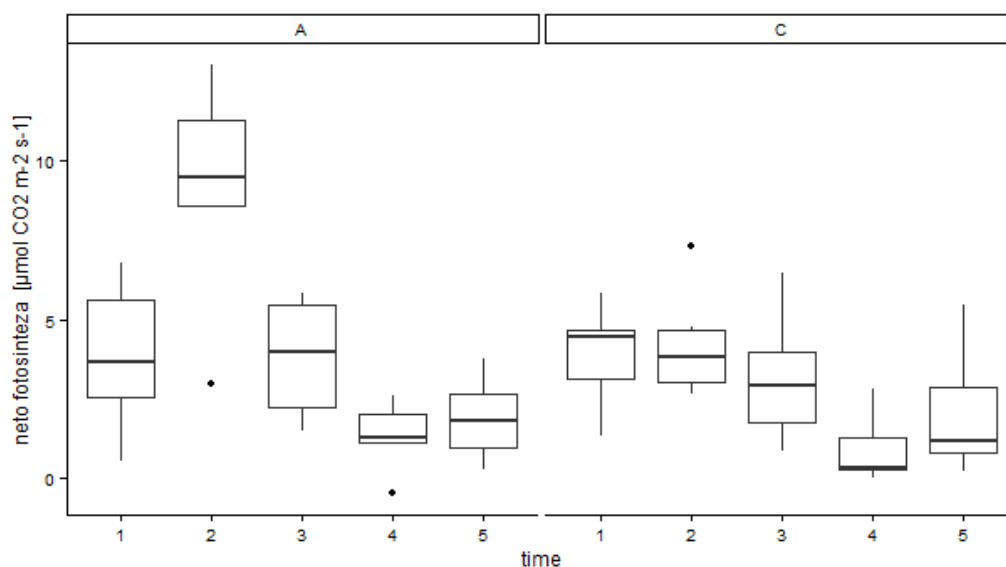
Vzorec	ΔCt		ΔCt	T_m	GEOMEAN	R
	COX	18S				
C47	22,23	12,86	27,14	74,58	16,91	5,69
C48	26,50	17,63	22,26	75,39	21,61	0,01
C5	27,51	19,05	33,00	74,4	22,89	5,23
C6	25,21	21,35	32,05	71,13	23,20	2,19
C7	22,25	21,15	30,42	74,39	21,70	2,00
C8	27,33	19,13	27,40	74,49	22,86	0,11
N44	26,13	16,43	32,58	74,64	20,72	0,01

ΔCt – razlika Ct vrednosti med zaporednima redčitvama

GEOMEAN – geometrijsko povprečje ΔCt COX in ΔCt 18S

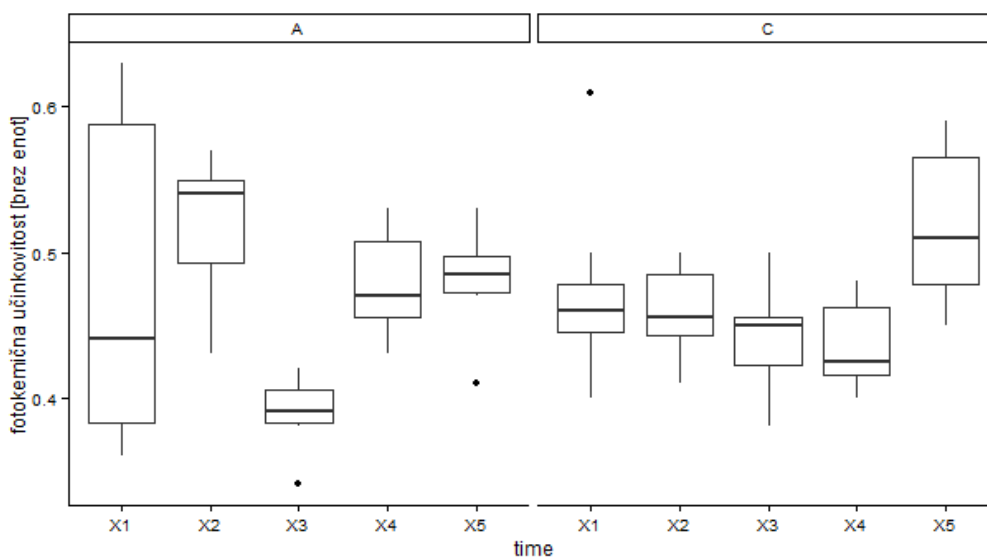
T_m – temperatura tališča verige DNA

R – relativna količina virusne RNA



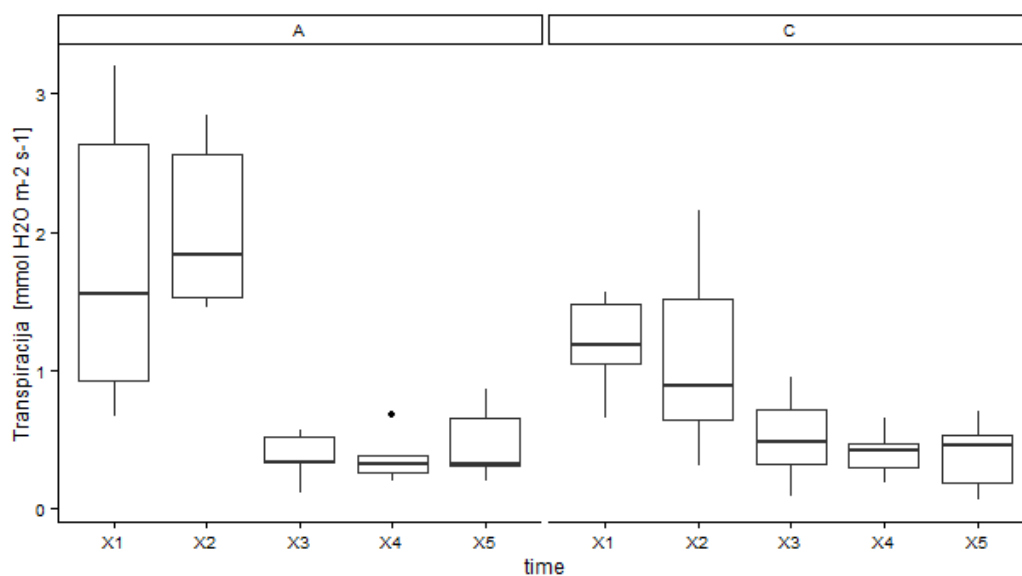
A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)

Priloga B2: Primerjava neto fotosinteze (Pn) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev



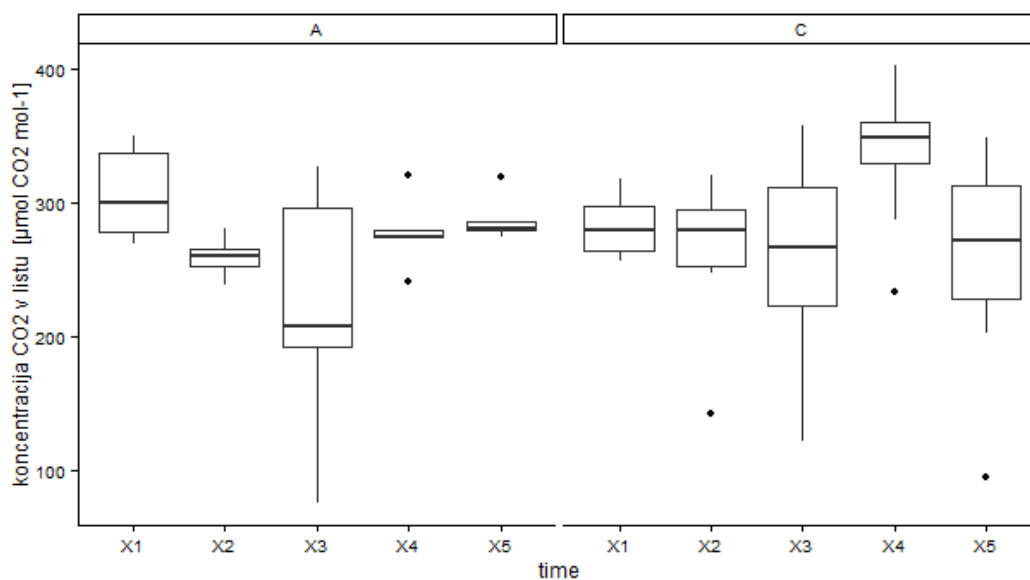
A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)

Priloga B3: Primerjava dejanske fotokemične učinkovitosti PSII (Fv/Fm') znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev



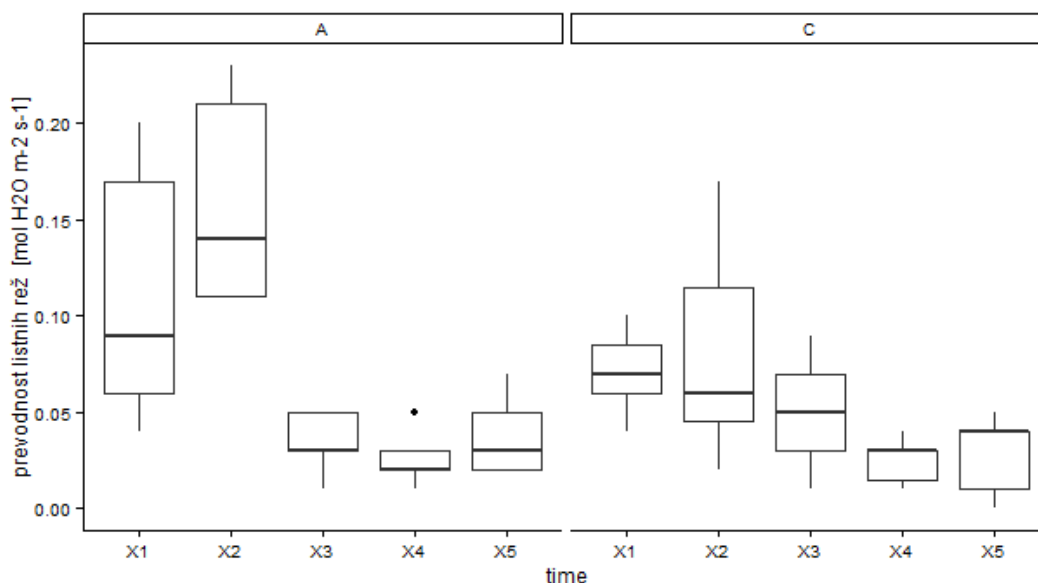
A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)

Priloga B4: Primerjava transpiracije (E)) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritvev



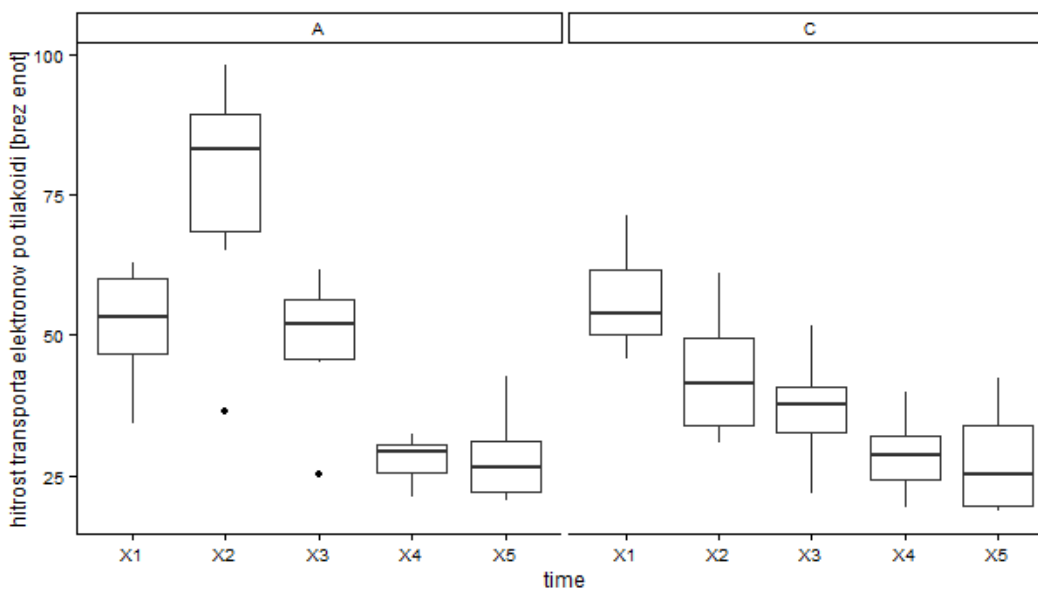
A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)

Priloga B5: Primerjava koncentracije CO₂ v listu (Ci) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritvev



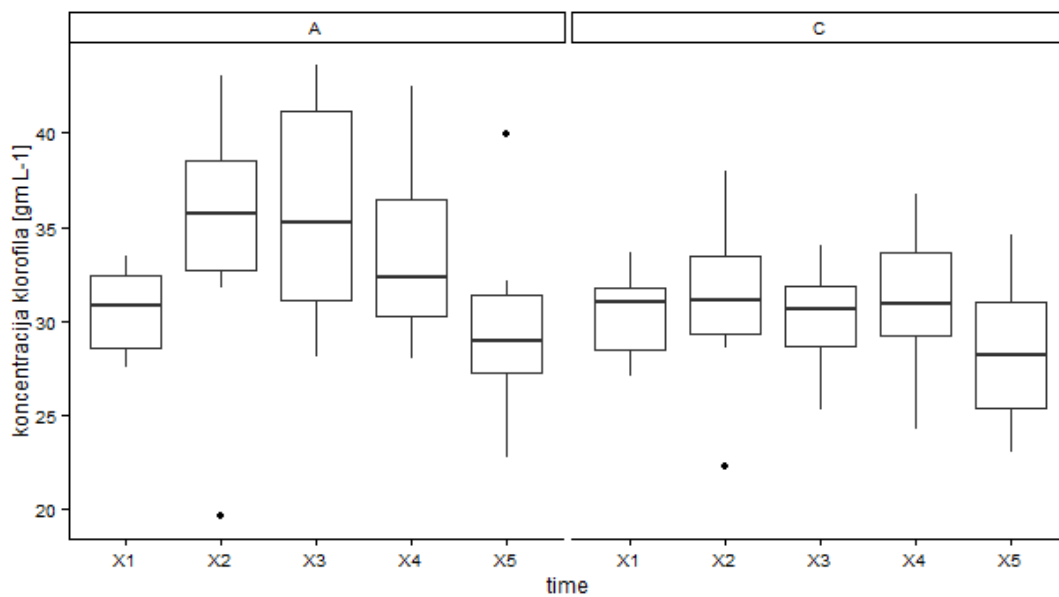
A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)

Priloga B6: Primerjava prevodnosti listnih rež (g_s) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev



A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)

Priloga B7: Primerjava hitrosti transporta elektronov po tilakoidi (ETR) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev



A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)

Priloga B8: Primerjava vrednosti klorofila (meritve SPAD) znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev

Priloga B9: Povprečne vrednosti in standardna napaka fizioloških parametrov znotraj obravnavanj A in C v petih terminih meritev

	t	A	C
Pn	1	3,84 ± 0,97	3,88 ± 0,62
	2	9,19 ± 1,43	4,16 ± 0,60
	3	3,79 ± 0,77	3,08 ± 0,72
	4	1,33 ± 0,44	0,89 ± 0,43
	5	1,88 ± 0,53	2,02 ± 0,69
Fv'/Fm'	1	0,48 ± 0,05	0,47 ± 0,02
	2	0,52 ± 0,02	0,46 ± 0,01
	3	0,39 ± 0,01	0,44 ± 0,01
	4	0,48 ± 0,02	0,44 ± 0,01
	5	0,48 ± 0,02	0,52 ± 0,02
Fv/Fm	1	0,76 ± 0,02	0,78 ± 0,01
	2	0,78 ± 0,01	0,77 ± 0,01
	3	0,76 ± 0,01	0,78 ± 0,01
	4	0,71 ± 0,02	0,74 ± 0,01
	5	0,72 ± 0,02	0,73 ± 0,01
g _s	1	0,11 ± 0,03	0,07 ± 0,01
	2	0,16 ± 0,03	0,08 ± 0,02
	3	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	4	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
	5	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
E	1	1,80 ± 0,49	1,21 ± 0,12
	2	2,05 ± 0,28	1,10 ± 0,25
	3	0,37 ± 0,08	0,51 ± 0,12
	4	0,37 ± 0,08	0,40 ± 0,06
	5	0,47 ± 0,13	0,38 ± 0,09
Ci	1	307,04 ± 16,00	283,06 ± 8,31
	2	259,40 ± 6,90	264,19 ± 19,30
	3	327,45 ± 139,48	260,11 ± 27,36
	4	278,10 ± 12,71	336,57 ± 18,63
	5	288,17 ± 7,95	257,65 ± 28,88
ETR	1	51,78 ± 4,53	56,28 ± 3,06
	2	76,07 ± 9,15	43,33 ± 4,01
	3	48,78 ± 5,30	36,36 ± 3,33
	4	27,79 ± 1,72	28,46 ± 2,44
	5	28,21 ± 3,36	27,38 ± 3,28
Chl	1	30,57 ± 1,01	30,38 ± 0,78
	2	34,18 ± 3,30	31,05 ± 1,64
	3	35,85 ± 2,61	30,24 ± 1,06
	4	33,77 ± 2,20	31,18 ± 1,46
	5	29,90 ± 2,37	28,44 ± 1,52

A, C – razporeditev trt v obravnavanja glede na rezultate testa ELISA (A – okužene z GLRaV-1; C – okužene z GLRaV-1 in GLRaV-3), Pn – neto fotosinteza, g_s – prevodnost listnih rež, E – transpiracija, Ci – koncentracija CO₂ v listu, Fv'/Fm' – dejanska fotokemična učinkovitost PSII, ETR – hitrost transporta elektronov po tilakoidi, Chl – klorofil (SPAD meritev), t – termin meritev, 1, 2, 3, 4, 5 – zaporedna številka meritve (1 – 3. 6. 2014, 2 – 14. 7. 2014, 3 – 11. 8. 2014, 4 – 25. 8. 2014, 5 – 8. 9. 2014)