

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nataša MEHLE

**PREŽIVETJE KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y, VIRUSA MOZAIKA
PEPINA IN VIROIDA VRETENATOSTI GOMOLJEV
KROMPIRJA IN NJIHOV PRENOS Z VODO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**SURVIVAL IN AND TRANSMISSION BY WATER OF *POTATO
VIRUS Y, PEPINO MOSAIC VIRUS, AND POTATO SPINDLE
TUBER VIROID***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Doktorsko delo je bilo večinoma opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) v Ljubljani, delno v okviru Centra odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo (COBIK).

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 31. Seje Komisije za doktorski študij UL z dne 19. 9. 2012 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologije. Za mentorja je bila imenovana prof. dr. Maja Ravnikar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
Član: prof. dr. Mladen KRAJAČIĆ
Zagreb, Prirodoslovno matematički fakultet, Biološki odsjek

Datum zagovora: 23.4.2014

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nataša Mehle

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 582.926.2(043.3)=163.6
- KG virus/viroid/PVY^{NTN}/PepMV/PSTVd/širjenje z vodo/preživetje v vodi/namakanje/rast rastlin na hidroponiji
- AV mag. MEHLE, Nataša, univ. dipl. biol.
- SA RAVNIKAR, Maja (mentor)
- KZ 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologije
- LI 2013
- IN PREŽIVETJE KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y, VIRUSA MOZAIKA PEPINA IN VIROIDA VRETENATOSTI GOMOLJEV KROMPIRJA IN NJIHOV PRENOS Z VODO
- TD Doktorska disertacija
- OP XVII, 126 str., 16 pregl., 29 sl., 29 pril., 262 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Pridelava kmetijskih rastlin na hidroponijah in intenzivno namakanje se v kmetijstvu veliko uporablja. Tak način pridelave lahko povzroči hitro širjenje različnih mikrobov z vodo po nasadu. Za mnoge viruse, ki so bili dokazani v vodi, možnost preživetja in širjenje z vodo oziroma s hranilno raztopino ni raziskano, predvsem zaradi dolgotrajnih in kompliciranih poskusov ter zaradi pomanjkanja občutljivih diagnostičnih metod v preteklosti. Vlogo vode kot možnega vira okužbe rastlin z virusi smo proučevali na primeru mehansko lahko prenosljivih in ekonomsko pomembnih povzročiteljev bolezni paradižnika in krompirja, kot so virus mozaika pepina (PepMV), krompirjev virus Y (PVY) in viroid vretenatosti gomoljev krompirja (PSTVd). Dokazali smo, da lahko PSTVd preživi v vodi, na temperaturi 20 ± 4 °C, do sedem tednov in da se PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd sproščajo iz korenin v hranilno raztopino. PepMV-Ch2 in PVY^{NTN} lahko nato okužita zdrave rastline v hidroponskem sistemu preko korenin, pri čemer je bila okužba nadzemnih delov rastlin potrjena z nekajmesečno zakasnitvijo. Za PSTVd smo dokazali, da so gomolji, ki se razvijejo na rastlinah, ki jih zalivamo z vodo, okuženo s PSTVd, vir novih okužb. Glede na rezultate lahko zaključimo, da je širjenje izbranih virusov in viroida z vodo možno. Čeprav je manj učinkovito od širjenja z vektorji ali mehansko preko listov, je epidemiološko pomembno, zato ga je v nadaljnjih študijah epidemiologije in ocenah tveganja treba upoštevati.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd
DC UDK 582.926.2(043.3)=163.6
CX virus/viroid/PVY^{NTN}/PepMV/PSTVd/transmission by water/survival in water/irrigation/hydroponic
AU MEHLE, Nataša
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)
PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biosciences, Field: Biotechnology
PY 2013
TI SURVIVAL IN AND TRANSMISSION BY WATER OF *POTATO VIRUS Y*, *PEPINO MOSAIC VIRUS*, AND POTATO SPINDLE TUBER VIROID
DT Doctoral Dissertation
NO XVII, 126 p., 16 tab., 29 fig., 29 ann., 262 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Hydroponic systems and intensive irrigation are used widely in horticulture, and thus have the potential for rapid spread of water-transmissible plant pathogens. Numerous plant viruses have been reported in aqueous environments, although information on their survival and transmission is minimal, due mainly to the lack of effective detection methods and to the complexity of the required transmission experiments. We have assessed the role of water as a source of plant infection using three mechanically transmissible plant pathogens that constitute a serious threat to tomato and potato production: *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Potato virus Y* (PVY) and *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). PSTVd remains infectious in water at 20 ± 4 °C for up to seven weeks. Experiments using a hydroponic system show that PepMV (Ch2 genotype), PVY (NTN strain) and PSTVd can be released from plant roots into the nutrient solution. PepMV-Ch2 and PVY^{NTN} can infect healthy plants through their roots, ultimately spreading to the green parts, where they can be detected after a few months. In addition, tubers developed on plants grown in substrate watered with PSTVd-infested water were confirmed to be the source of viroid infection. Our data indicate that although well known pathways of virus spread are more rapid than water-mediated infection, like insect or mechanical transmission through leaves, water is a route that provides a significant bridge for rapid virus/viroid spread. As such, water should be taken into account in future epidemiology and risk-assessment studies.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
SLOVARČEK (POJMI, OKRAJŠAVE, SIMBOLI).....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE.....	3
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 RASTLINSKI VIRUSI IN VIROIDI	4
2.1.1 Genom in morfološke lastnosti	4
2.1.2 Sinteza novih delcev	5
2.1.3 Širjenje po rastlinah	7
2.1.4 Odgovor rastlin na okužbo.....	10
2.1.5 Razširjanje med rastlinami	12
2.2 KROMPIRJEV VIRUS Y, VIRUS MOZAIKA PEPINA IN VIROID VRETNATOSTI GOMOLJEV KROMPIRJA	12
2.2.1 Krompirjev virus Y (Potato virus Y; PVY).....	12
2.2.2 Virus mozaika pepina (Pepino mosaic virus; PepMV).....	14
2.2.3 Viroid vretenatosti gomoljev krompirja (Potato spindle tuber viroid; PSTVd).....	17
2.3 VODA KOT MOŽNA POT PRENOSA VIRUSOV IN VIROIDOV MED RASTLINAMI.....	18
2.3.1 Prisotnost rastlinskih virusov v vodnih virih	19
2.3.2 Izvor virusov v vodnih virih.....	24
2.3.2.1 Sproščanje virusov iz poškodovanega ali razpadajočega rastlinskega materiala v vodo.....	24
2.3.2.2 Sproščanje virusov iz koreninskega sistema okuženih rastlin v vodo	25
2.3.2.3 Kanalizacija, gnojevka	25
2.3.3 Preživetje virusov in viroidov v vodi.....	25
2.3.4 Okužba rastlin z vodo, okuženo z virusi oziroma viroidi.....	27
2.3.5 Možen prenos virusov z vodo.....	28
2.3.5.1 Širjenje virusov med rastlinami v namakalnih sistemih z vodo ali hranilno raztopino	30

2.3.6	Preprečevanje širjenja rastlinskih virusov z vodo	31
2.3.6.1	Eliminacija rastlinskih virusov iz vode.....	32
2.3.7	Določanje rastlinskih virusov in viroidov v vodi	33
2.3.7.1	Koncentriranje.....	34
2.3.7.2	Biološki testi	35
2.3.7.3	Določanje virusnih proteinov.....	36
2.3.7.4	Morfološke metode	37
2.3.7.5	Molekularne metode	37
2.3.7.6	Novejše metode, primerne za določanje virusov in viroidov v vodi	39
3	MATERIALI IN METODE	43
3.1	IZOLATI VIRUSOV IN VIROIDOV	43
3.2	UGOTAVLJANJE NAJVEČJE RAZREDČENOSTI PSTVd IN PepMV-CH2 V VODI, DA Z NJO ŠE LAHKO OKUŽIMO TESTNE RASTLINE..	44
3.3	PREVERJANJE PREŽIVETJA PSTVd V VODNEM OKOLJU	45
3.4	POSKUSI ŠIRJENJA PSTVd, PepMV-CH2 IN PVY ^{NTN} Z VODO.....	46
3.4.1	Dodajanje inokuluma v zemljo	47
3.4.2	Poskusi v sistemu gojenja rastlin na hidroponijah	48
3.5	DIAGNOSTIČNE METODE	51
3.5.1	Mehanska okužba testnih rastlin	51
3.5.2	Serološke metode	51
3.5.2.1	ELISA	51
3.5.2.2	Hitri diagnostični testi.....	52
3.5.3	Molekularne metode	52
3.5.3.1	Izolacija RNA iz rastlinskega materiala.....	52
3.5.3.2	Izolacija RNA iz vzorcev vode	53
3.5.3.3	Obratno prepisovanje in PCR v realnem času v enem koraku.....	53
4	REZULTATI	57
4.1	NAJVEČJA RAZREDČENOST PSTVd IN PepMV-CH2 V VODI, DA Z NJO ŠE LAHKO OKUŽIMO TESTNE RASTLINE	57
4.2	PREŽIVETJE PSTVd V VODNEM OKOLJU	58
4.3	MOŽNOST ŠIRJENJA PSTVd, PepMV-CH2 IN PVY ^{NTN} Z VODO.....	60
4.3.1	Okužba rastlin s PVY^{NTN} in s PSTVd v primeru dodajanja okužene vode v zemljo	60
4.3.2	Širjenje PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji	64
4.3.2.1	Širjenje PepMV-Ch2 s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji.....	64
4.3.2.2	Širjenje PVY ^{NTN} s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji .	

.....	67
4.3.2.3 Širjenje PSTVd s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji...	74
5 RAZPRAVA	81
5.1 NAJVEČJA RAZREDČENOST PSTVd IN PepMV-CH2 V VODI, DA Z NJO ŠE LAHKO OKUŽIMO TESTNE RASTLINE	81
5.2 PREŽIVETJE PSTVd V VODNEM OKOLJU	82
5.3 MOŽNOST ŠIRJENJA PSTVd, PVY ^{NTN} IN PepMV-CH2 Z VODO	84
5.3.1 Okužba rastlin s PVY^{NTN} in PSTVd v primeru dodajanja okužene vode v zemljo	86
5.3.2 Širjenje PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji	87
5.3.2.1 PVY ^{NTN} , PepMV-Ch2 in PSTVd se v mehansko okuženih rastlinah paradižnika oziroma krompirja močno namnožijo	87
5.3.2.2 PVY ^{NTN} , PepMV-Ch2 in PSTVd se sproščajo iz okuženih korenin paradižnika oziroma krompirja v hranilno raztopino.....	87
5.3.2.3 Možnost okužbe zdravih rastlin krompirja oziroma paradižnika s hranilno raztopino, okuženo s PVY ^{NTN} , PepMV-Ch2 in PSTVd, preko korenin v hidroponskih sistemih	89
5.3.2.4 Možnost okužbe sadilnega materiala z okuženo hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji	95
5.4 POMEN ŠIRJENJA PSTVd, PVY ^{NTN} IN PepMV-CH2 Z VODO	96
6 SKLEPI	98
7 POVZETEK (SUMMARY)	99
7.1 POVZETEK	99
7.2 SUMMARY	102
8 VIRI	106

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Infektivni rastlinski virusi, ki so jih našli v vodnih virih, kot so kanali, reke, potoki, ribniki, jezera in oceani	19
Pregl. 2:	Karakteristike izolatov iz poskusa	43
Pregl. 3:	Pregled poskusov, izvedenih v sistemih, podobnih gojenju rastlin na hidroponiji.....	49
Pregl. 4:	Oligonukleotidni začetniki in sonde za analizo vzorcev z RT-qPCR.....	54
Pregl. 5:	Primerjava možnosti določanja prisotnosti PepMV-Ch2 in PSTVd z RT-qPCR ter z biološkim testom	58
Pregl. 6:	Preživetje PSTVd v vodi na temperaturi 20 ± 4 °C	59
Pregl. 7:	Prisotnost PSTVd / PVY ^{NTN} v rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd / PVY ^{NTN} , in v rastlinah, zraslih iz gomoljev teh rastlin	60
Pregl. 8:	Prisotnost PepMV-Ch2, določena z RT-qPCR in s testnimi rastlinami, v mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma), hranilni raztopini in v rastlinah za vabo	66
Pregl. 9:	Prisotnost PepMV-Ch2 v različnih delih rastlin za vabo iz poskusa PepMV-paradižnik 134. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino...67	
Pregl. 10:	Prisotnost PepMV-Ch2 v različnih delih rastlin za vabo iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino.....	67
Pregl. 11:	Prisotnost PVY ^{NTN} , določena z RT-qPCR in s testnimi rastlinami, v mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma), hranilni raztopini in v rastlinah za vabo.	69
Pregl. 12:	Prisotnost PVY ^{NTN} v različnih delih paradižnika za vabo iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino.....	70
Pregl. 13:	Prisotnost PVY ^{NTN} v različnih delih rastlin krompirja za vabo iz poskusa PVY-krompir 131.dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino70	
Pregl. 14:	Gomolji, zrasli na mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma) in na rastlinah za vabo v poskusu PVY-krompir, ter prisotnost virusa v rastlinah zraslih iz gomoljev teh rastlin.....	72
Pregl. 15:	Prisotnost PSTVd, določena z RT-qPCR in s testnimi rastlinami, v mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma), hranilni raztopini in v rastlinah za vabo.	76
Pregl. 16:	Prisotnost PSTVd v različnih delih rastlin paradižnika za vabo iz poskusa PSTVd-paradižnik 141. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino	77

KAZALO SLIK

Sl. 1: Žilni sistem rastline in smer prenosa vode in mineralov po ksilemu ter fotoasimilatov po floemu. Povečano je prikazan vstop virusov v floem v primeru okužbe lista in v primeru okužbe preko korenin.	9
Sl. 2: Širjenje rastlinskih virusov z vodo.....	42
Sl. 3: Shematski prikaz poskusa za določanje največje razredčenosti PepMV-Ch2 in PSTVd v vzorcu vode, s katerim še lahko okužimo testne rastline.....	44
Sl. 4: Shematski prikaz poskusa za ugotavljanje preživetja PSTVd v vodi, shranjeni v karantenskem rastlinjaku.	45
Sl. 5: Shematski prikaz poskusov širjenja PepMV, PVY in PSTVd z vodo	46
Sl. 6: Shematski prikaz poskusa, pri katerem smo inokulum dodajali v zemljo.....	47
Sl. 7: Pretakanje hranilne raztopine iz akvarija z mehansko okuženimi rastlinami (vir inokuluma) v akvarij z zdravimi rastlinami / gomolji (rastline za vabo).	49
Sl. 8: Rastline paradižnika štiri tedne po mehanski okužbi z vodo, okuženo s PSTVd, ki je bila shranjena pri temperaturi 20 ± 4 °C en teden.....	59
Sl. 9: Rastline krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, en mesec po dodajanju inokuluma v zemljo	61
Sl. 10: Gomolji, ki so zrasli na rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PVY ^{NTN} ..	62
Sl. 11: Rastline zrasle 16 tednov po posaditvi gomoljev, ki so zrasli na rastlinah krompirja, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PVY ^{NTN}	62
Sl. 12: Gomolji, ki so zrasli na rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd.....	63
Sl. 13: Rastline zrasle deset tednov po posaditvi gomoljev, ki so zrasli na rastlinah krompirja, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd	63
Sl. 14: Rastline zrasle 16 tednov po posaditvi gomoljev, ki so zrasli na rastlinah krompirja, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd	64
Sl. 15: Rastline krompirja za vabo iz poskusa PVY-krompir 131. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino	71
Sl. 16: Gomolji, ki so zrasli na mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma) iz poskusa PVY-krompir	72
Sl. 17: Gomolji, ki so zrasli na rastlinah, ki smo jih uporabili v poskusu PVY-krompir kot vabo	73
Sl. 18: Rastline zrasle 15 tednov po posaditvi gomoljev, ki so se razvili na rastlini C za vabo iz poskusa PVY-krompir.....	74
Sl. 19: Poskus PSTVd-paradižnik 141. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino	78
Sl. 20: Plodovi iz poskusa PSTVd-paradižnik 141. dan od začetka namakanja z okuženo	

hranilno raztopino	78
Sl. 21: Poskus PSTVd-krompir dva meseca od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino	79
Sl. 22: Gomolji, ki so zrasli na rastlinah za vabo iz poskusa PSTVd-krompir	80
Sl. 23: Rastline zrasle 15 tednov in 17,5 tedna po posaditvi gomoljev, zraslih na rastlinah, ki smo jih uporabili kot vabo v poskusu PSTVd-krompir	80
Sl. 24: Relativna količina RNA PSTVd glede na LUC v vzorcih vode oziroma hranilne raztopine	83
Sl. 25: Povzetek rezultatov o dokazanih možnostih širjenja PVY ^{NTN} , PepMV-Ch2 in PSTVd z vodo.....	85
Sl. 26: Relativna količina RNA PepMV-Ch2 glede na LUC v vzorcih vode oziroma hranilne raztopine	89
Sl. 27: Relativna količina RNA PepMV-Ch2 glede na COX v pozitivnih vzorcih 134. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino v poskusu PepMV-paradižnik in v poskusu PepMV+PVY-paradižnik	93
Sl. 28: Relativna količina RNA PVY ^{NTN} glede na COX v pozitivnih vzorcih 134. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino v poskusu PepMV+PVY-paradižnik in 131. dan v poskusu PVY-krompir	94
Sl. 29: Relativna količina RNA PSTVd glede na COX v pozitivnih vzorcih 141. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino v poskusu PSTVd-paradižnik in 125. dan v poskusu PSTVd-krompir	95

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Sestava pufrov za ELISA
- Priloga B: Shematski prikaz izvedbe ELISA za določanje PepMV in PVY
- Priloga C: Sestava reakcijskih mešanic za RT-qPCR
- Priloga Č: Primerjava občutljivosti ELISA in RT-qPCR za določanje PepMV na vzorcih iz poskusa PepMV-paradižnik
- Priloga D: Primerjava občutljivosti ELISA in RT-qPCR za določanje PVY na vzorcih iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik
- Priloga E: Sestava hranilne raztopine
- Priloga F: Vzorci okužene vode, ki smo jo injicirali v zemljo – rezultati analiz z RT-qPCR
- Priloga G: Negativne kontrole izolacij z RNeasy Plant Mini kitom (NKI) – rezultati analiz z RT-qPCR
- Priloga H: Negativne kontrole izolacij s QIAamp Viral RNA mini kitom (NKI) – rezultati analiz z RT-qPCR
- Priloga I: Sveža hranilna raztopina (pred dolivanjem v akvarij z mehansko okuženimi rastlinami) – rezultati analiz z RT-qPCR
- Priloga J: Testne rastline, ki so bile v rastlinjaku v bližini in sočasno z rastlinami iz poskusov (negativne kontrole poskusov) – rezultati analiz z RT-qPCR
- Priloga K: Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PepMV (Ling in sod., 2007), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika
- Priloga L: Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PVY (Kogovšek in sod., 2008), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika
- Priloga M: Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PSTVd (Boonham in sod., 2004), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika
- Priloga N: Vzorci korenin, ki smo jih pregledali s svetlobno mikroskopijo, da bi preverili, ali so v njih morebiti prisotne glivne spore
- Priloga O: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PepMV-paradižnik
- Priloga P: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PepMV-paradižnik 134. dan
- Priloga R: Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PepMV za vzorce iz poskusa

PepMV+PVY-paradižnik

- Priloga S: Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PepMV za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan
- Priloga Š: Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PVY za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik
- Priloga T: Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PVY za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan
- Priloga U: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PVY-krompir
- Priloga V: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PVY-krompir 131. dan
- Priloga Z: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-paradižnik
- Priloga Ž: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-paradižnik 141. dan
- Priloga Q: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-krompir
- Priloga W: Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-krompir 125. dan
- Priloga X: Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PepMV-Ch2 za vzorce vode in hranilne raztopine
- Priloga Y: Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PSTVd za vzorce vode in hranilne raztopine

SLOVARČEK (POJMI, OKRAJŠAVE, SIMBOLI)

18S	18 S rRNA
6K1	6-kDa protein 1
6K2	6-kDa protein 2
AMV	virus mozaika lucerne (<i>Alfalfa mosaic virus</i>)
ArMV	virus mozaika repnjaka (<i>Arabidopsis mosaic virus</i>)
AWBV	ahlumski z vodo prenosljivi virus (<i>Ahlu waterborne virus</i>)
BMV	virus mozaika stoklase (<i>Brome mosaic virus</i>)
BNYVV	virus nekroze in rumenih žil pese (<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>)
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin
BSMV	virus črtastega mozaika ječmena (<i>Barley stripe mosaic virus</i>)
CarMV	virus lisavosti nageljna (<i>Carnation mottle virus</i>)
CRSV	virus obročkaste pegavosti nageljna (<i>Carnation ringspot virus</i>)
CCR	osrednja ohranjena regija (central conserved region)
CD	osrednja domena (central domain)
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
CGMMV	virus zelene lisavosti in mozaika kumare (<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>)
CIb	valjasta inkluzijska telesca (cylindrical inclusion body)
CIM	monolitni kromatografski nosilec s patentiranim imenom: Convective Interacion Media
CIRV	italijanski virus obročkaste pegavosti nageljna (<i>Carnation Italian ringspot virus</i>)
CLSV	virus pegavosti listov kumare (<i>Cucumber leaf spot virus</i>)
CMV	virus mozaika kumare (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CNV	virus nekroze kumare (<i>Cucumber necrosis virus</i>)
COX	citokrom oksidaza
CP	plaščni protein virusa
Cq	cikel PCR v realnem času, pri katerem fluorescenca preseže nastavljeni prag (threshold cycle)
DAS-ELISA	dvojni sendvič ELISA (double-antibody-sandwich ELISA)
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
dsDNA	dvoverižna DNA
dsRNA	dvoverižna RNA

ELISA	encimskoimunski test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EM	elektronska mikroskopija
EPPO A2	karantenski seznam organizmov, ki so prisotni, vendar pod nadzorom v EPPO območju
EPPO	organizacija za zaščito rastlin v Evropi in na Mediteranu (European and Mediterranean Plant Protection Organization)
EU I.A.I	evropski karantenski seznam rastlinam škodljivih organizmov, katerih vnos in širjenje v državah članicah je prepovedano. Ti organizmi niso prisotni v območju EU.
F	smiselni začetni oligonukleotid (forward primer)
FAM	6-karboksi-fluorescein
FERA	Food and Environment Research Agency
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
GALV	alžirski latentni virus vinske trte (<i>Grapevine Algerian latent virus</i>)
HaRV	havelski rečni virus (<i>Havel river virus</i>)
Hc-Pro	proteinaza pomožne komponente (helper component proteinase)
HSVd	viroid zakrnelosti hmelja (Hop stunt viroid)
IC-RT-PCR	RT in PCR s predhodno imunsko vezavo (immunocapture RT-PCR)
ISEM	imunska elektronska mikroskopija
LAMP	metoda izotermalnega pomnoževanja, posredovanega z zanko, za določanje nukleinskih kislin (loop-mediated isothermal amplification)
LBVaV	z velikimi žilami solate povezani virus (<i>Lettuce big-vein associated virus</i>)
LIV	longevity of the sap infectivity <i>in vitro</i>
LUC	luciferaza
MiLV	virus Mirafiori velikih žil solate (<i>Mirafiori lettuce big-vein virus</i>)
MNSV	virus nekrotične pegavosti melone (<i>Melon necrotic spot virus</i>)
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
MWLMV	virus belega linijskega mozaika koruze (<i>Maize white line mosaic virus</i>)
NGS	sekvenciranje (določanje nukleotidnega zaporedja) naslednje generacije (next generation sequencing)
NIa	protein a jedrnega vključka (nuclear inclusion protein a)
NIb	protein b jedrnega vključka (nuclear inclusion protein b)
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo
NKI	negativna kontrola izolacije
NRV	neckarski rečni virus (<i>Neckar river virus</i>)
NTC	negativna kontrola PCR (no template control)
NTP	nukleozid trifosfat

ORF	odprt bralni okvir (open reading frame)
P1	protein P1
P3	protein P3
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PD	domena patogenosti (pathogenic domain)
PetAMV	virus zvezdastega mozaika petunije (<i>Petunia asteroid mosaic virus</i>)
PEG	polietilenglikol
PepMV	virus mozaika pepina (<i>Pepino mosaic virus</i>)
PepMV-Ch2	genotip Ch2 virusa mozaika pepina (<i>Pepino mosaic virus</i> genotype Chili 2)
PepMV-EU	evropski genotip paradiznika virusa mozaika pepina (<i>Pepino mosaic virus</i> genotype European tomato)
PepMV-US1	genotip US1 virusa mozaika pepina (<i>Pepino mosaic virus</i> genotype US1)
PepMV-US2	genotip US2 virusa mozaika pepina (<i>Pepino mosaic virus</i> genotype US2)
PFBV	virus razbarvanja cvetov pelargonije (<i>Pelargonium flower break virus</i>)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PK	pozitivna kontrola PCR
PLCV	virus kodravosti listov pelargonije (<i>Pelargonium leaf curl virus</i>)
PLPV	virus linijskega vzorca pelargonije (<i>Pelargonium line pattern virus</i>)
PMMoV	virusa blage lisavosti paprike (<i>Pepper mild mottle virus</i>)
PRI	Plant Research International
PSTVd	viroid vretenatosti gomoljev krompirja (Potato spindle tuber viroid)
PTNRD	obročasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrotic ringspot disease)
PVX	virus X krompirja (<i>Potato virus X</i>)
PVY	krompirjev virus Y (<i>Potato virus Y</i>)
PVY ^C	krompirjev virus Y ^C (<i>Potato Y^C virus</i>)
PVY ^N	krompirjev virus Y ^N (<i>Potato Y^N virus</i>)
PVY ^{N:O}	krompirjev virus Y ^{N:O} (<i>Potato Y^{N:O} virus</i>)
PVY ^{NTN}	nekrotični različek krompirjevega virusa Y (<i>Potato virus Y^{NTN}</i>)
PVY ^O	krompirjev virus Y ^O (<i>Potato Y^O virus</i>)
PVY ^W	krompirjev virus Y ^W (<i>Potato Y^W virus</i>)
PVY ^Z	krompirjev virus Y ^Z (<i>Potato Y^Z virus</i>)
qPCR	PCR v realnem času (real time PCR)
R	protismiselni začetni oligonukleotid (reverse primer)
RCNMV	virus nekrotičnega mozaika črne detelje (<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment

	length polymorphism)
Rn ⁻	emisija pasivnega referenčnega barvila ROX
Rn ⁺	emisija fluorescence produkta v določenem času
ΔR	sprememba v signalu fluorescence
RNA	ribonukleinska kislina
ROX	6-karboksi-X-rodamin
R-PAGE	povratna poliakrilamidna gelska elektroforeza (return polyacrylamide gel electrophoresis)
rRNA	ribosomska RNA (ribosomal RNA)
RT	obratno prepisovanje (reverse transcription)
RT-PCR	obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo
RT-qPCR	RT in PCR v realnem času
S	sonda
SBMV	južni virus mozaika navadnega fižola (<i>Southern bean mosaic virus</i>)
SD	standardna deviacija
ssDNA	enoverižna DNA
ssRNA	enoverižna RNA
-ssRNA	enoverižna, negativno usmerjena RNA
+ssRNA	enoverižna, pozitivno usmerjena RNA
SWBV	sitkeški z vodo prenosljivi virus (<i>Sitke waterborne virus</i>)
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin
TASVd	viroid apikalne zakrnelosti paradižnika (Tomato apical stunt viroid)
TBSV	virus grmičavosti in zakrnelosti paradižnika (<i>Tomato bushy stunt virus</i>)
TCDVd	viroid klorotične pritlikavosti paradižnika (Tomato chlorotic dwarf viroid)
TCSV	virus klorotične pegavosti paradižnika (<i>Tomato chlorotic spot virus</i>)
TGBp	proteini trigenskega bloka (triple gene block proteins)
TLD	leva končna domena (terminal left domain)
TMV	virus mozaika tobaka (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
TNV	virus nekroze tobaka (<i>Tobacco necrosis virus</i>)
ToMV	virus mozaika paradižnika (<i>Tomato mosaic virus</i>)
TRD	desna končna domena (terminal right domain)
tRNA	prenašalna RNA (transfer RNA)
TRV	virus šelestenja tobaka (<i>Tobacco rattle virus</i>)
TSWV	virus pegavosti in uvelosti paradižnika (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)
UTR	neprevedljiva regija (untranslated region)
UV	ultravijolična
VD	domena variabilnosti (variable domain)

VPg	protein, povezan z virusnim genomom (viral genome-linked protein)
WDV	virus pritlikavosti pšenice (<i>Wheat dwarf virus</i>)
WWBV	weddelski z vodo prenosljivi virus (<i>Weddel waterborne virus</i>)
ZYMV	virus rumenega mozaika bučke (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>)

1 UVOD

Za namakanje v kmetijstvu se uporabljajo vedno večje količine vode. V državah v razvoju namakanje pogosto presega 80 odstotkov skupne porabe vode (Riley in sod., 2011). Voda postaja dražja in težje dostopna, zato je treba uporabljati njene vire bolj odgovorno, na primer z uporabo reciklirane vode za namakanje v proizvodnih nasadih rastlin in rastlinjakih. Po vsem svetu vse več rastlin gojijo na hidroponijah. Rast rastlin na hidroponijah pomeni veliko prednost za proizvodnjo, vendar lahko, če voda v sistemu kroži, pride do hitre širitve povzročiteljev bolezni, saj se lahko mikrobi širijo iz ene rastline preko hranilne raztopine v druge rastline (Stewart-Wade, 2011). V vodah so potrdili prisotnost številnih gliv, oomicet, bakterij, ogorčic in tudi rastlinskih virusov. Z razvojem metod sekvenciranja (določanja nukleotidnega zaporedja) naslednje generacije (NGS) se seznam rastlinskih virusov, najdenih v vodnih virih, občutno daljša (Roossinck, 2012). Možne vire okužbe vod z rastlinskimi virusi, znane podatke o preživetju virusov v vodah ter možnost okužbe rastlin z vodo in ukrepe za preprečevanje širjenja virusov z vodo smo zbrali in opisali v preglednem članku (Mehle in Ravnikar, 2012).

Prisotnost virusov v vodah ima epidemiološki pomen, če le-ti vstopijo v rastlino, na primer preko listov ali drugih delov rastline zaradi namakanja s škropljenjem ali v času kalitve rastlin (Teakle in Morris, 1981). Številni virusi lahko okužijo rastline preko korenin s pomočjo vektorjev, bodisi ogorčic ali gliv (Wyss, 1982; Campbell, 1996). Sprostitev virusov iz okuženih korenin v hranilno raztopino in nadaljnja okužba drugih rastlin preko korenin, brez dotika rastlin in domnevno brez pomoči vektorjev, je bila jasno dokazana le za okužbe paradižnika z virusom mozaika paradižnika (*Tomato mosaic virus*; ToMV) (Pares in sod., 1992) in z genotipom EU virusa mozaika pepina (*Pepino mosaic virus* genotype EU; PepMV-EU) (Schwarz in sod., 2010) ter pelargonij z virusom razbarvanja cvetov pelargonij (*Pelargonium flower break virus*; PFBV) (Krczal in sod., 1995). Za številne rastlinske viruse, ki so jih dokazali v vodnih virih, možnost preživetja v vodi in njihovo širjenje z vodo ni dobro raziskano, predvsem zaradi dolgotrajnih in kompleksnih raziskav ter pomanjkanja primernih diagnostičnih metod v preteklosti.

Rast rastlin na hidroponijah in/ali intenzivno namakanje se pogosto uporabljata v proizvodnih nasadih paradižnika in krompirja, zato smo se odločili raziskati, ali je lahko voda vir okužbe s tremi razmeroma stabilnimi in kužnimi rastlinskimi povzročitelji bolezni, ki povzročajo velike ekonomske izgube na rastlinah paradižnika in krompirja: genotip Ch2 virusa mozaika pepina (*Pepino mosaic virus* genotype Ch2; PepMV-Ch2),

nekrotični različek krompirjevega virusa Y (*Potato virus Y* strain NTN; PVY^{NTN}) in viroid vretenatosti gomoljev krompirja (Potato spindle tuber viroid; PSTVd) (Beczner in sod., 1984; Owens, 2007; Hanssen in Thomma, 2010).

PepMV-Ch2 je eden od štirih znanih genotipov PepMV, ki se je od prve najdbe v Evropi leta 2005 hitro razširil po vsej Evropi (Van der Vlugt, 2009). V rastlinskih ostankih in na okuženih rastlinah lahko preživi več tednov. Podatki o širjenju z vodo so znani le za genotip EU virusa PepMV (PepMV-EU) (Alfaro-Fernandez in sod., 2010; Schwarz in sod., 2010). Schwarz in sod. (2010) so dokazali, da PepMV-EU v vodi, ki kroži po sistemu za gojenje rastlin na hidroponijah, lahko okuži zdrave rastline ter da prisotnost glive *Pythium aphanidermatum* povzroči zakasnitev okužbe s PepMV. V poskusu Alfaro-Fernandez in sod. (2010) so dokazali okužbo rastlin paradižnika s PepMV-EU le, če so rastline namakali z drenažno vodo, zbrano iz rastlin, okuženih sočasno s PepMV-EU in glivo *Olpidium virulentus*.

PVY^{NTN} povzroča obročkasto gnilobo gomoljev krompirja, ki pomeni eno izmed največjih težav pri pridelavi krompirja (Ahmadvand in sod., 2012). Virus se prenaša med rastlinami z ušmi in preko gomoljev. Opazili so, da pride do hitre širitve virusa tudi, če je populacija uši majhna. Predvidevajo, da je razlog v učinkovitejšem prenašanju novih izolatov PVY^{NTN} z ušmi (Verbeek in sod., 2010), vendar je smiselno preučiti tudi alternativne poti prenosa.

Podatkov o preživetju viroidov v vodnem okolju ni. Viroidi so najmanjši znani povzročitelji bolezni na rastlinah. Sestavljeni so izključno iz krožne molekule RNA v velikosti približno 250–400 nukleotidov (Flores in sod. 2005). PSTVd se podobno kot PepMV (Aguilar in sod., 2002) in PVY (Wintermantel, 2011) zlahka prenaša med rastlinami mehansko – z okuženim orodjem ali okuženimi rokami (Seigner in sod., 2008; Verhoeven in sod., 2010a). Z dosedanjimi raziskavami niso dokazali prenosa PSTVd na rastline paradižnika preko korenin po enkratnem zalitju le-teh z okuženo vodo (Seigner in sod., 2008), niti če so jih zalivali z okuženo vodo deset dni (Verhoeven in sod., 2010a). Vendar so v praksi, če za namakanje uporabljamo reciklirano vodo, korenine rastlin lahko v stiku z okuženo vodo celotno rastno sezono, zato je smiselno preučiti dolgotrajno tretiranje z okuženo vodo.

1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE

- Ugotoviti možnost sproščanja PSTVd, PVY^{NTN} in PepMV-Ch2 iz okuženih rastlin preko korenin v hranilno raztopino.
- Ugotoviti možnost preživetja PSTVd v vodi (pri pogojih, ki so primerni za rast rastlin (na primer v rastlinjaku)).
- Ugotoviti možnost prenosa PSTVd, PVY^{NTN} in PepMV-Ch2 v hidroponskem sistemu gojenja rastlin: možnost okužbe zdravih rastlin preko korenin (ter možnost okužbe sadilnega materiala).
- Ugotoviti možnost okužbe rastlin oziroma gomoljev krompirja s PSTVd in PVY^{NTN}, če zalivamo zemljo z okuženo vodo.

Poznavanje možnosti preživetja ter širjenja ekonomsko pomembnega viroida PSTVd in virusov, kot sta PVY^{NTN} in PepMV-Ch2, z vodo bo pripomoglo k uspešnemu preprečevanju širjenja bolezni in s tem povezanih velikih izgub za prehrano pomembnih kmetijskih pridelkov.

1.2 HIPOTEZE

Hipoteza 1

Predvidevali smo, da se lahko PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd v koreninah okuženih rastlin paradižnika oziroma krompirja močno namnožijo. Za PVY^{NTN} smo že dokazali, da je v koreninah krompirja lahko prisoten v veliki koncentraciji (Mehle in sod., 2004). Zato smo predvidevali, da so korenine lahko vir PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd za sproščanje iz okuženih korenin paradižnika oziroma krompirja v hranilno raztopino.

Hipoteza 2

Predvidevali smo, da lahko PSTVd preživi v vodnem okolju, podobno tudi PVY^{NTN} in PepMV-Ch2, vsaj nekaj dni.

Hipoteza 3

V primeru potrditve zgornjih dveh hipotez smo predvidevali, da obstaja možnost okužbe zdravih rastlin z okuženo hranilno raztopino preko korenin v hidroponskih sistemih.

Hipoteza 4

Predvidevali smo, da se rastline in gomolji krompirja lahko okužijo s PSTVd in PVY^{NTN}, če zemljo namakamo z okuženo vodo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINSKI VIRUSI IN VIROIDI

Virusi so majhni infektivni delci (virioni), sestavljeni iz plaščnega proteina in nukleinske kisline. Nekateri virusi so obdani še z lipidno ovojnico. Viroidi pa so najmanjši znani povzročitelji bolezni na rastlinah. Sestavljeni so izključno iz molekule RNA. Zunaj gostiteljskih celic virusi in viroidi niso sposobni razmnoževanja. Na z virusi ali z viroidi okuženih rastlinah se lahko pojavijo bolezenska znamenja, zato okužbe ekonomsko pomembnejših rastlin z virusi ali viroidi lahko povzročijo velik izpad pridelka in posledično veliko gospodarsko in okoljsko škodo (povzeto po Agrios, 2005).

2.1.1 Genom in morfološke lastnosti

Rastlinske viruse razvrščamo v pet skupin glede na naravo genoma (Fauquet in sod., 2005):

- virusi z enoverižno DNA (ssDNA): sem uvrščamo dve družini rastlinskih virusov, ki imata majhen krožen genom, pogosto iz dveh ali več delov
- virusi z reverzno transkriptazo, ki imajo ali dvoverižno DNA (dsDNA) ali enoverižno RNA (ssRNA): od rastlinskih virusov uvrščamo sem eno družino, ki ima krožno dsDNA in se podvaja preko vmesne RNA
- virusi z dvoverižno RNA (dsRNA): redki rastlinski virusi
- virusi z enoverižno, negativno usmerjeno RNA (-ssRNA): nekateri rastlinski virusi
- virusi z enoverižno, pozitivno usmerjeno RNA (+ssRNA): večina rastlinskih virusov

Genom virusov je krožen (vsi znani rastlinski DNA virusi) ali linearen. Število sestavnih delov genoma je od 1 (potyvirusi) do 11 (nekateri predstavniki nanovirusov), pri čemer je posamezen segment lahko velik od 1 kb (nanovirusi) do 20 kb (closterovirusi). Večina rastlinskih virusov ima najmanj tri gene: najmanj enega za podvajanje nukleinske kisline, najmanj enega za širjenje med celicami gostitelja in najmanj enega za strukturni protein – običajno imenovan plaščni protein. Dodatni geni imajo lahko regulatorno lastnost ali sodelujejo pri prenosu med rastlinami v povezavi s prenašalcem (Fauquet in sod., 2005).

Rastlinski virusni delci so različnih oblik in velikosti (Fauquet in sod., 2005):

- izometrični: navidezno okrogli s premerom več kot 18 nm
- togo paličasti s širino 20–25 nm in dolžino 100–300 nm ter pogosto z jasno vidnim centralnim kanalom; nekateri virusi imajo delce dveh ali več različnih dolžin, ki vključujejo različne dele genoma
- nitasti, upogljivi: premer je običajno 12 nm, dolžina je lahko tudi več kot 100 nm; nekateri virusi imajo delce dveh ali več različnih dolžin, ki vključujejo različne dele genoma
- podvojeni: dva združena izometrična delca
- baciliformni: kratke, na koncih zaokrožene palčke, ki so lahko dolge do 300 nm in široke do 30 nm

Viroidi so kovalentno zaprte krožne enoverižne molekule RNA velikosti od 246 do 401 nukleotidov. Ne kodirajo proteinov, zato morajo za pomnoževanje, procesiranje in transport uporabljati beljakovine gostitelja. Značilna sekundarna struktura viroidov, sestavljena iz zank (neparjeni nukleotidi) in regij s povezanimi nukleotidi (samokomplementarna področja v molekuli RNA), naj bi imela ključno vlogo pri biološki aktivnosti viroidov. Molekula RNA ima pet strukturnih domen: osrednja (CD), patogena (PD), variabilna (VD), leva končna (TLD) in desna končna (TRD). Za patogenost ni odgovorna zgolj domena PD, temveč tudi druge štiri (Ding in Itaya, 2007).

Viroide razvrščamo v dve družini (Ding in Itaya, 2007):

- *Pospiviroidae*: togo paličasta sekundarna struktura; nekateri lahko tvorijo tudi lasnice. CD domena vključuje dva ohranjena odseka, ki tvorita osrednjo ohranjeno regijo (CCR); en ohranjen odsek pa je v TLD domeni.
- *Avsunviroidae*: nepravilno paličasta ali razvejena sekundarna struktura. Nimajo CCR in ne ohranjenih odsekov v TLD domeni. Tvorijo strukturo, imenovano »hammerhead«, ki vključuje 11 ohranjenih ostankov in poleg ležečih vijačnic ter omogoča samocepitev.

2.1.2 Sinteza novih delcev

Po vstopu virusov in viroidov v gostiteljske celice preko poškodovanih laskov ali drugih manjših poškodb na povrhnjici, le-ti izkoristijo mehanizme gostiteljskih celic za pomnoževanje svoje dedne zasnove ter tvorbo novih delcev.

Pri virusih se najprej loči nukleinska kislina od proteinskega plašča. Podvajanje rastlinskih virusov se razlikuje glede na tip nukleinske kisline, ki jo virus vsebuje (povzeto po Agrios, 2005):

- Virusi s +ssRNA RNA se podvajajo v citoplazmi. Rastlinska celica sintetizira virusno RNA polimerazo. Virusna RNA v citoplazmi služi kot matrika za tvorbo komplementarne -ssRNA, ki nato služi za sintezo novih virusnih +ssRNA verig. Za sintezo virusnih proteinov virusi izkoriščajo gostiteljske aminokislino, ribosome in prenašalno RNA (tRNA), del virusnih RNA molekul pa služi kot informacijska RNA (mRNA). Podenote proteinov obdajo virusni genom in skupaj tvorijo nov virusni delec, ki se lahko transportira v sosednje celice.
- Virusi z -ssRNA in tisti z dsRNA vsebujejo zapis za encim transkriptazo, ki v gostiteljski celici negativno usmerjeno verigo prepíše v pozitivno usmerjeno RNA verigo, ki lahko služi kot mRNA.
- Nukleinska kislina virusov z dsDNA vstopi v jedro gostiteljske celice, kjer tvori minikromosom. Nato se prevede v dve enoverižni RNA, ki potujeta v citoplazmo, kjer manjša tvori virusno kodiran protein, večja pa se obda s plaščnim proteinom in služi kot matrika za reverzno transkriptazo.
- Mehanizem namnožitve virusov s ssDNA ni popolnoma jasen. Predvidevajo, da se oblikuje nekakšen kotaleč se krog, ki tvori negativno usmerjene verige, ki služijo kot matrika za sintezo pozitivno usmerjenih verig. Sinteza virusnih nukleinskih kislin in proteinov ter združitve v virione poteka v tem primeru v jedru gostiteljske celice, nato se že oblikovani virusni delci sprostijo v citoplazmo.

Zaradi razlike v strukturi genoma med predstavniki iz družine *Pospiviroidae* in predstavniki iz družine *Avsunviroidae* je različno tudi podvajanje. Vstop in izstop viroidov v jedro in kloroplaste oziroma iz njih je še precej neraziskan (Ding in Itaya, 2007; Owens, 2007):

- *Pospiviroidae*: razmnožujejo se v celičnem jedru; podvajanje na način kotalečega se kroga je asimetrično (krožna, pozitivno usmerjena RNA se prepíše v oligomerno, linearno, negativno usmerjeno RNA, ki nato služi kot matrika za sintezo oligomernih, linearnih, pozitivno usmerjenih RNA, ki se razcepijo v monomere in nato ligirajo v krožne molekule RNA). Encimi gostitelja so vključeni v prepisovanje (jedrna od DNA odvisna RNA polimeraza II), cepitev (RNaza) in ligacijo RNA (ligaza).

- *Avsunviroidae*: razmnožujejo se v kloroplastih; podvajanje na način kotalečega se kroga je simetrično (krožna, pozitivno usmerjena RNA se prepíše v oligomerno, linearno, negativno usmerjeno RNA, ki se razcepi v monomere, ki se nato ligirajo v krožne molekule RNA. Krožna, negativno usmerjena RNA nato služi kot matrika za sintezo linearnih, oligomernih, pozitivno usmerjenih RNA, ki se razcepijo v monomere in ligirajo v krožne molekule RNA). Encimi gostitelja so vključeni v prepisovanje (v jedru ali v kloroplastih kodirana RNA polimeraza) in ligacijo RNA (ligaza). Za cepitev ne potrebujejo encimov gostitelja, saj jim struktura »hammerhead« omogoča samocepitev oligomernih, negativno in pozitivno usmerjenih molekul RNA.

2.1.3 Širjenje po rastlinah

Virusi morajo prepotovati številne celične tipe in tkiva, da povzročijo sistemsko okužbo, pri čemer izkoriščajo in spreminjajo že obstoječe poti za premikanje makromolekul znotraj celic, med celicami in med organi. Pri širjenju virusov po rastlinah sodeluje veliko faktorjev gostiteljskih celic, ki so podrobno opisani v nedavno objavljenem preglednem članku (Harries in Ding, 2011).

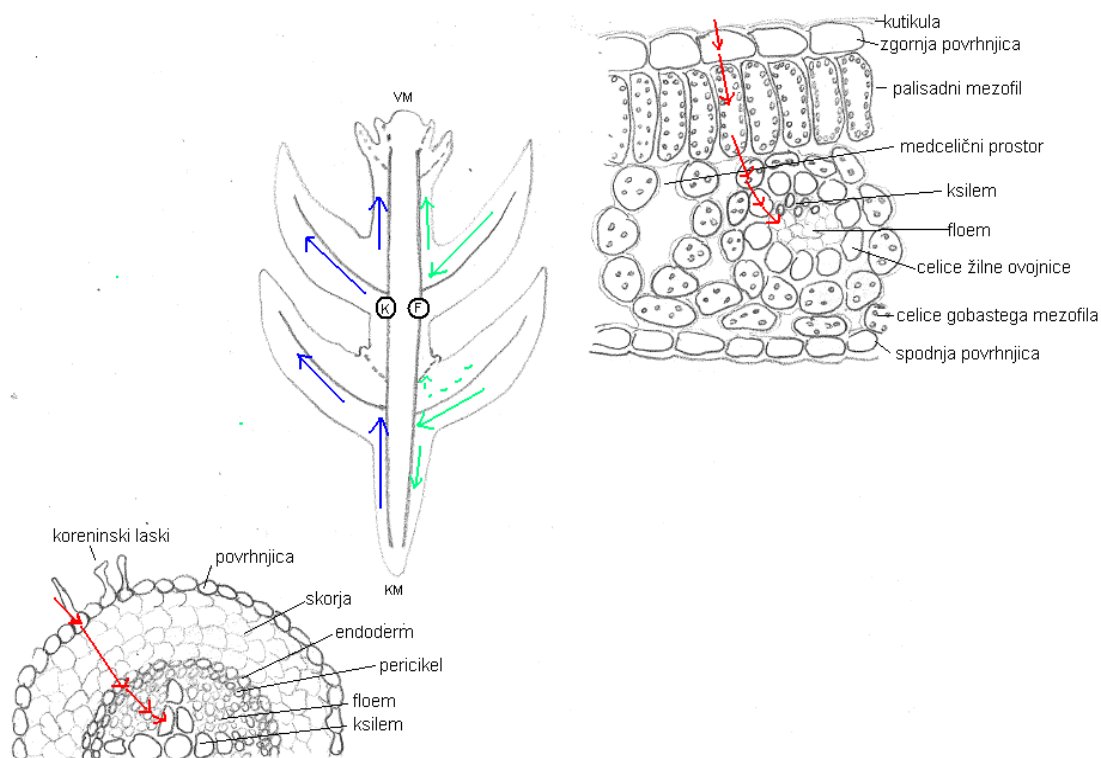
Od celice do celice se virusi, v obliki kompleksa virusne nukleinske kisline in proteinov (lahko tudi neodvisno) ali intaktnega viriona, širijo preko plazmodezem, ki povezujejo sosednji celici. Pri prenosu virusov preko plazmodezem sodelujejo virusni gibalni proteini, ki se nespecifično vežejo na virusno nukleinsko kislino in ob pomoči gostiteljevih proteinov prenesejo nukleoproteinski kompleks do plazmodezme, katere propustnost se poveča. Če se infekcija začne v celicah povrhnjice, se virusi najprej razširijo v celice mezofila. Iz mezofila gredo v žilno ovojnico, nato do floemskega parenhima in celic spremljevalk, od koder preidejo v sitaste celice (Slika 1). S floemom se, podobno kot fotoasimilati, tudi virusi večinsko prenašajo iz spodnjih listov v korenine in iz zgornjih listov v razvijajoče se poganjke (Slika 1). Širjenje virusov (tudi v oblikah, ki niso intaktni virioni) po floemu je pasiven proces, zato so večji gomolji, v katere se prenese več fotoasimilatov, pogosto bolj okuženi kot manjši (povzeto po Carrington in sod., 1996; Gilbertson in Lucas, 1996; Oparka in Cruz, 2000).

Izstop virusa iz sitastega elementa in njegov vstop vključujeta več mehanizmov, odvisnih od tipa virusa, od mesta in od razvojne stopnje gostiteljskega tkiva (Gilbertson in Lucas, 1996). Potencialno lahko na katerikoli točki vzdolž funkcionalnega floema

pride do interakcije med kompleksom virusne nukleinske kisline in endogenimi mesti v plazmodezmi med sitastim elementom in celico spremljevalko, ki omogoča izstop virusov. Prenos fotoasimilatov do konice korenin, plodov in semen mora biti učinkovit in hiter. To naj bi bilo doseženo s številčnejšimi plazmodezmami, ki naj bi bile bolj prevodne. Tako je možno, da virioni lahko tu brez pomoči gibalnih proteinov preidejo iz sitastih celic v celice spremljevalke (Oparka in Cruz, 2000). Popolna simplastična zapreka številne reproduktivne organe ločuje od materinske rastline, kar zahteva izključno aktiven prenos snovi po apoplastu s transmembranskimi nosilci. Ta selektivni prenos snovi v reproduktivne organe onemogoči vstop številnim virusom (Oparka in Cruz, 2000). Ker PSTVd ni bil dokazan v nekaterih delih cvetov okuženega paradižnika (Zhu in sod., 2001), le-ta najverjetneje onemogoča vstop tudi viroidom.

Širjenje virusov po floemu lahko preprečijo številni obrambni mehanizmi rastlin, ki so povzeti v nedavno objavljenem preglednem članku (Vuorinen in sod., 2011). Virusi se lahko razširijo po rastlini tudi s premikanjem od celice do celice, vendar bistveno počasneje kot po floemu (Vuorinen in sod., 2011).

Snovi, raztopljene v vodi, se lahko transportirajo iz koreninske skorje prek endoderma in pericikla v parenhimske celice floema in od tod aktivno v ksilem. Teoretično bi lahko tudi virusi izkoriščali to pot s penetracijo celične stene (Slika 1). Drugi možni način vdora virusov v ksilem je po simplastu iz floema v meristemske celice korenin. Ko te meristemske celice med dozorevanjem propadejo, se lahko virusi masivno sprostijo v ksilemski sistem. Osmotski potencial in transpiracija sta gonilna sila za tok po ksilemu. Možnost, da bi virusi na svoji poti po ksilemu lahko izstopili preko za vodo nepropustne, lignificirane celične stene, je majhna. Nasprotno je možen hiter lateralni prehod po apoplastu preko radialno orientiranih intercelularjev med žarkastimi celicami (povzeto po Nelson in van Bel, 1998).



Slika 1: Žilni sistem rastline in smer prenosa vode in mineralov po ksilemu (modro) ter fotoasimilatov po floemu (zeleno) (prirejeno po Gilbertson in Lucas, 1996). Povečano je prikazan vstop virusov v floem (rdeče) v primeru okužbe lista (zgoraj) in v primeru okužbe preko korenin (spodaj).

Figure 1: The vascular system of the plant, including the transport pathways for water and mineral nutrients through the xylem (blue) and photoassimilates through the phloem (green) (adapted from Gilbertson and Lucas, 1996). An enlarged view of virus entry into the phloem (red) after infection of leaves (above) or through roots (below) (red).

Oznake v shemi: K – ksilem, F – floem, KM – koreninski meristem, VM – vegetativni meristem.

Viroidi se po rastlinah širijo podobno kot virusi: od celice do celice preko plazmodezem, na dolge razdalje pa s floemom (Ding in sod., 1997; Zhu in sod., 2001; Ding in Itaya, 2007). V okuženih rastlinah paradižnika so viroid vretenatosti gomoljev krompirja (Potato spindle tuber viroid; PSTVd) dokazali tudi v ksilemu (Zhu in sod., 2001). Viroidi, v nasprotju z virusi, nimajo gibalnih proteinov. Širjenje viroidov po rastlini naj bi bilo odvisno od specifične vezave dela viroida s celičnimi komponentami gostitelja, na primer vezava lektina PP2 iz floemskih celic kumar z viroidom zakrnelosti hmelja (Hop stunt viroid; HSVd), vezava VirP1 proteina iz paradižnika z RY motivom v domeni TRD viroida PSTVd in HSVd (Ding in sod., 2005; Ding in Itaya, 2007; Owens, 2007).

2.1.4 Odgovor rastlin na okužbo

Rastline so v naravnem okolju stalno izpostavljene številnim povzročiteljem bolezni. Kljub temu redko pride do razvoja bolezni, saj so rastline razvile številne obrambne mehanizme, s katerimi povzročitelje bolezni prepoznavajo in se pred njimi branijo. Tudi povzročitelji rastlinskih bolezni se v procesu koevolucije prilagajajo, tako da obidejo obrambni odgovor rastline (Mysore in Ryu, 2004).

Odgovori rastlin na okužbo so zelo različni. V celicah imunih rastlin (negostiteljski odziv) se povzročitelj bolezni ne množi niti v celicah, v katere je neposredno vstopil, v gostiteljskih rastlinah pa se razmnožuje. Za okužbo dovzetne rastline so tiste, v katerih se povzročitelj bolezni razmnožuje in sistematično širi po rastlini. Dovzetne rastline so na okužbo lahko občutljive, kar se izraža v bolezenskih znamenjih, ali so tolerantne, če ne kažejo znakov okužbe (latentne okužbe). V nekaterih primerih gostiteljske rastline okužbo omejijo na nekaj celic na mestu, kjer je bil povzročitelj bolezni vnesen, najpogosteje s tvorbo dobro vidnih nekrotičnih lokalnih lezij (hipersenzitivna reakcija) (povzeto po Agrios, 2005).

Posamezen virus ali viroid lahko okuži številne rastlinske vrste in pri različnih vrstah povzroča različna bolezenska znamenja. Odgovor rastlin se razlikuje tudi, če so za okužbo odgovorni različni različki istega virusa ali viroida (Xu in sod., 2003; Love in sod., 2005; Ding in Itaya, 2007; Owens, 2007; Sajnani in sod., 2007; Kogovšek in sod., 2010).

Rastline se na prisotnost virusa odzovejo z obrambnim odgovorom, ki vključuje številne fiziološke spremembe, ki lahko vodijo v razvoj bolezni. Interakcija med rastlino in virusom je opisana z dvema modeloma. Če virus in rastlina tekmujeta za metabolne snovi v celici, govorimo o kompetitivnem modelu. Pri interakcijskem modelu pa gre za vmešavanje virusnih produktov v metabolizem rastline (Culver in Padmanabhan, 2007).

V rastlinah, okuženih z virusi, običajno opazimo izražanje genov, povezanih s stresom (Xu in sod., 2003). Pogosto pride do aktivacije askorbatnih in glutationskih peroksidaz, katalaz, superoksid dismutaz, glutation reduktaz, glutation S-transferaz in drugih (Milavec in sod., 2001; Kiraly in sod., 2002; Li in Burritt, 2003; Sajnani in sod., 2007; Diaz-Vivancos in sod., 2008). Pogosto se spremeni izražanje β -glukanaz, ki so glavni encim razgradnje kaloze (Ward in sod., 1991; Pompe-Novak in sod., 2006). V okuženih rastlinah se zato kopiči kaloza in s tem je omejeno premikanje virusov po rastlini (Iglesias in Meins, 2000; Xu in sod., 2003). Bolezenska znamenja na rastlinah, okuženih

z virusi, so običajno posledica upada fotosinteze (manjša vsebnost klorofila v listih, zmanjšano delovanje fotosistema in manjša listna površina), kopičenja topnih sladkorjev in netopnih ogljikovih hidratov, manjše količine rastnih regulatornih snovi (hormonov) oziroma večje količine rastnih inhibitorjev (Herbers in sod., 1997, 2000).

Viroidna RNA naj bi v gostiteljskih celicah, podobno kot virusna RNA, aktivirala encim protein kinazo, le-ta nato druge celične encime, kar posledično vodi v spremenjeno sintezo proteinov (Agrios, 2005). Na izražanje bolezenskih znamenj vpliva tudi struktura viroidne RNA, saj lahko že zamenjava enega samega nukleotida na specifičnem mestu povzroči, da mil različek postane agresiven in obratno (Ding in Itaya, 2007; Owens, 2007). Predvidevajo, da viroidna RNA v gostiteljskih celicah odigra vlogo mikro RNA ali male interferenčne RNA in s tem vpliva na utišanje gostiteljevih genov in posledično na pojav bolezenskih znamenj (Ding in Itaya, 2007).

Na izražanje bolezenskih znamenj ne vpliva zgolj interakcija med povzročiteljem bolezni in gostiteljem, temveč tudi številni drugi dejavniki, na primer sočasna okužba z drugimi nesorodnimi virusi. Ker se virusi po rastlini širijo pasivno s floemom, prenos fotoasimilatov v zrele liste pa je manjši kot v razvijajoče se liste (Seron in Haenni, 1996), in ker je množenje virusov popolnoma odvisno od gostiteljske celice, so mlajše rastline oziroma listi običajno bolj občutljivi na virusno okužbo kot starejši. Okoljske razmere, v katerih rastline rastejo pred okužbo, v času okužbe in med razvojem bolezenskih znamenj, imajo velik vpliv na občutljivost rastlin. Tako so lahko rastline, ki so v določenih razmerah močno občutljive, v drugih popolnoma odporne. Višje temperature, ki so še v mejah za normalno rast rastlin, običajno pospešijo množenje virusov in njihovo širjenje po rastlini. Še višje temperature pa povzročijo upočasnjeno množenje virusov. Visoke temperature povzročijo inaktivacijo mehanizmov, odgovornih za odpornost rastline, in tako se lahko po padcu temperature prisotni virusi močno namnožijo tudi v odpornih rastlinah. V toplejših razmerah, v primerjavi s hladnejšimi, opazajo tudi učinkovitejše množenje viroidov ter močnejše izražena bolezenska znamenja na rastlinah, okuženih z viroidi (Handley in Horst, 1988; Škorić in sod., 2001; Verhoeven in sod., 2010a). Na izražanje bolezenskih znamenj zaradi okužbe z virusi in viroidi vplivata tudi intenziteta svetlobe in fotoperioda. Običajno sta višja svetlobna intenziteta in daljši dan naklonjena podvajanju virusov in viroidov. Za številne kombinacije gostitelj – virus je dokazan diurnalni cikel občutljivosti z maksimumom popoldne in minimumom tik pred zoro. Poleg že omenjenih dejavnikov na izražanje bolezenskih znamenj vplivajo tudi hranila (običajno koncentracija, ki je ugodna za rast rastlin, poveča občutljivost za okužbe) in vlažnost (dobro zalite rastline imajo tanjšo kutikulo in so zato bolj občutljive za mehansko okužbo). (povzeto po

Matthews, 1992).

2.1.5 Razširjanje med rastlinami

Najpogostejši in ekonomsko najpomembnejši način prenosa virusov od rastline do rastline je z žuželkami. Viruse, ki jih prenašajo žuželke, delimo na neperzistentne (virus se prenaša na žuželčjem ustnem aparatu; kužnost v tem primeru hitro mine) in perzistentne ali cirkularne (virus preide v žuželčjo kri, od tod v žleze, ki izločajo slino; žuželka lahko ostane kužna do konca življenja). Prenasajo se lahko tudi z vegetativnim razmnoževanjem, s semeni, s pelodom, mehansko z rastlinskim sokom po poškodbi ter stiku (močan veter, obžiranje listov, obdelovanje ...) sosednjih zdravih in okuženih rastlin, z ličinkami iz družine *Eriophyidae*, z ektoparazitskimi ogorčicami, z zoosporami gliv ali s parazitsko predenico (*Cuscuta* sp.) (povzeto po Agrios, 2005).

Najučinkovitejši in najpomembnejši način prenosa viroidov med rastlinami pa je vegetativno razmnoževanje (Verhoeven, 2010). Zelo učinkovito se prenašajo tudi mehansko z rastlinskim sokom, na primer z okuženim orodjem (Verhoeven in sod., 2004; Verhoeven in sod., 2010a). Za številne viroide je dokazan prenos s semeni in s pelodom, za nekatere tudi prenos z ušmi, če je rastlina sočasno okužena z virusom zvijanja listov krompirja (*Potato leaf roll virus*; PLRV) (Querci in sod., 1997; Flores in sod., 2005; Owens, 2007; Verhoeven in sod., 2009). Poleg uši navajajo še čmrlje kot možne prenašalce nekaterih pospiviroidov, na primer viroida apikalne zakrnelosti paradižnika (Tomato apical stunt viroid; TASVd) in viroida klorotične pritlikavosti paradižnika (Tomato chlorotic dwarf viroid; TCDVd) (Antignus in sod., 2007; Matsuura in sod., 2010). Obstaja možnost, da le-ti prenašajo viroide zgolj mehansko ali s prenosom peloda (Verhoeven, 2010).

2.2 KROMPIRJEV VIRUS Y, VIRUS MOZAIKA PEPINA IN VIROID VRETENATOSTI GOMOLJEV KROMPIRJA

2.2.1 Krompirjev virus Y (*Potato virus Y*; PVY)

Krompirjev virus Y (PVY) okužuje številne rastline iz družine razhudnikovk. Uvrščamo ga v rod *Potyvirus* iz družine *Potyviridae*. Virusni delci PVY so nitasti in upogljivi, dolgi 730 nm in široki 11 nm (Bokx in Huttinga, 1981). Potivirusi so sestavljeni iz ene molekule RNA, ki jo obdaja 2000 molekul plaščnega proteina. Genom potivirusov

sestavlja linearna, enoverižna, pozitivno usmerjena RNA z dolžino okoli 10.000 baz. RNA se prevede v en sam 340–370 kDa velik poliprotein, ki se med translacijo in po njej razreže na naslednje proteine: protein P1 (P1), proteinaza pomožne komponente (HC-Pro), protein P3 (P3), 6-kDa protein 1 (6K1), valjasto inkluzijsko telesce (C1b), 6-kDa protein 2 (6K2), protein, povezan z virusnim genomom (VPg), protein a jedrnega vključka (NIa), protein b jedrnega vključka (NIb) in plaščni protein (CP). Ti proteini sodelujejo pri cepitvi vezi v poliproteinu (P1, HC-Pro, NIa), razmnoževanju virusa (P3, NIa), premikanju virusa (C1b, NIa) in vezavi na rastlinsko RNA (NIb). Plaščni protein (CP) tvori plašč virusne RNA. Pri okužbi se plaščni protein veže na rastlinsko celico, zato določa specifičnost gostiteljev. Vključen je tudi v premikanje virusa po rastlini, v prenos z listnimi ušmi in v regulacijo pomnoževanja virusa. Hc-Pro zavira delovanje obrambnega sistema rastline, usmerjenega proti virusni RNA ali pomnoževanju virusa, in sodeluje pri prenosu iz rastline v rastlino z listnimi ušmi (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

PVY je stabilen virus, ki lahko pri temperaturi od 18 do 22 °C *in vitro* preživi od 1 do 50 dni, mnogo dlje pa v listih, shranjenih na –18 °C ali v tekočem dušiku ali v liofilizirani obliki. V posušeni okuženi vzorci, ki jih hranimo s kalcijevim kloridom na 4 °C, PVY ohrani kužnost 15 let. Viri navajajo, da se virus inaktivira z 10-minutnim gretjem do 56 °C oziroma do 72 °C (Kerlan, 2006).

PVY je razdeljen v pet skupin izolatov, ki se med seboj razlikujejo v bolezenskih znamenjih, ki jih povzročajo na okuženih rastlinah: PVY^N, PVY^O, PVY^C, PVY^Z in PVY^E (povzeto po Singh in sod., 2008). Različek PVY^{NTN} povzroča največje izgube v poljedelstvu. Na občutljivih sortah krompirja povzroča nastanek mozaika kloroz in občasno tudi nekroz na listih. Na okuženih gomoljih občutljivih sort se razvijejo obročkaste nekroze, ki vodijo v propad gomoljev, zato je bolezen dobila ime obročkasta nekroza gomoljev (potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD). PVY^{NTN} naj bi nastal z rekombinacijo dveh skupin izolatov, PVY^N in PVY^O, ki sta razširjena po vsem svetu, vendar agronomsko nista pomembna, saj ne povzročata nastanka bolezenskih znamenj na gomoljih (Boonham in sod., 2002).

PTNRD so prvič zasledili na Madžarskem okoli leta 1980, nekaj let pozneje se je pojavila tudi v Sloveniji. To je nedvomno ena od bolezni, ki je slovenskim pridelovalcem krompirja povzročila največjo škodo. Epidemija krompirjevega virusa Y^{NTN} je skoraj popolnoma uničila pridelavo semenskega krompirja. Bolezen je najbolj prizadela sorto 'Igor', ki je takrat pomenila 70 % celotne pridelave jedilnega krompirja v Sloveniji. Tri leta po pojavu bolezni so to sorto prenehali pridelovati (Kus, 1994).

Danes je bolezen PTNRD razširjena po vsej Evropi, na Japonskem in v Severni Ameriki. Vsi izolati različka PVY^{NTN}, najdeni v Veliki Britaniji, so rekombinantni in reagirajo s protitelesi, specifičnimi za PVY^N (Boonham in sod., 2002). V Severni Ameriki so bolezen PTNRD povzročili nerekombinantni različki (NA-PVY), ki so serološko tudi podobni PVY^N. Skupini se med seboj razlikujeta v delu genoma, ki kodira protein P1 (Piche in sod., 2004). V ZDA je najpogosteje najden različek, ki povzroča bolezen PTNRD, rekombinanten PVY^{N:O}, ki je sicer glede na zaporedje P1 gena bolj podoben evropskim PVY^{NTN}, vendar je serološko prepoznan kot PVY^O (Piche in sod., 2004). Skupina različkov, ki povzročajo škodo s sprožitvijo bolezn PTNRD na Japonskem, je podobna evropskim, saj se tako serološko kot glede na nukleotidno zaporedje plaščnega proteina uvrščajo v skupino PVY^N izolatov (Ohshima in sod., 2000).

PVY prenaša več vrst listnih uši, in sicer na neperzistenten način. Opazili so, da lahko, četudi so populacije uši majhne, pride do hitre širitve virusa, kar bi bila lahko posledica učinkovitejšega prenašanja novih izolatov PVY^{NTN} z ušmi (Verbeek in sod., 2010). PVY se lahko prenaša tudi z dotikom ter z okuženim orodjem (Wintermantel, 2011).

2.2.2 Virus mozaika pepina (*Pepino mosaic virus*; PepMV)

Virus mozaika pepina (PepMV) uvrščamo v rod *Potexvirus* iz družine *Alphaflexiviridae* (Mumford in Jones, 2005). Prvič so ga odkrili v Peruju leta 1974 na rastlinah pepina (*Solanum muricatum*) (Jones in sod., 1980). Leta 1999 so ga odkrili na Nizozemskem na paradižniku (van der Vlugt in sod., 2000), pozneje tudi v številnih drugih evropskih državah (EPPO, 2012a) pa tudi v Severni Ameriki (French in sod., 2001) in Aziji (Zhang in sod., 2003). V Sloveniji prisotnosti PepMV še nismo potrdili (Ravnikar in sod., 2013). PepMV je uvrščen na seznam EPPO A2 (EPPO, 2012a). EPPO A2 je karantenski seznam organizmov, ki so prisotni, vendar pod nadzorom v EPPO območju.

Naravni gostitelji so lahko, poleg paradižnika in pepina, še številne plevelne rastline z bolezenskimi znamenji ali brez njih (Jorda in sod., 2001; Cordoba in sod., 2004) ter divje vrste iz rodu *Lycopersicon* (Soler in sod., 2002). PepMV so v Peruju odkrili tudi na rastlinah krompirja (Jones in sod., 2005). Različne sorte krompirja so se v poskusih pokazale kot odporne, tolerantne ali občutljive za okužbo s PepMV, vendar niti za občutljive sorte ni podatkov, da bi virus povzročal bolezenska znamenja na gomoljih oziroma vplival na količino ali kvaliteto pridelka (Jones in sod., 2005).

Virusni delci PepMV so nitasti in upogljivi, dolgi 508 nm in široki od 11 do 12,5 nm (Jones in sod., 1980). Genom PepMV je enoverižna, pozitivno usmerjena RNA (+ssRNA) v velikosti 6410 nukleotidov. Sestavljen je iz petih odprtih bralnih okvirov (ORF), pri čemer se drugi, tretji in četrti bralni okvir prekrivajo (Cotillon in sod., 2002). ORF1 kodira replikazo (metiltransfertaža, NTPaza/helikaza in od RNA odvisna RNA polimeraza), ki omogoča podvajanje virusa, ORF2-4 kodira proteine trigenskega bloka, označene od 1–3 (TGBp1-3), ki sodelujejo pri širjenju virusa od celice do celice, in ORF5 kodira plaščni protein (CP). Na 5' in 3' koncih sta kratki neprevedljivi regiji (UTR), na 3' koncu pa rep iz ponavljajočih se nukleotidov A (poly(A) rep) (Mumford in Metcalfe, 2001; Aguilar in sod., 2002; Lopez in sod., 2005).

Analiza nukleotidnega zaporedja številnih izolatov PepMV kaže na veliko raznolikost znotraj vrste. Izolate PepMV uvrščamo v pet genotipov, ki so poimenovani glede na lokacijo prve najdbe (Mumford in Metcalfe, 2001; Aguilar in sod., 2002; Cotillon in sod., 2002; Verhoeven in sod., 2003; Lopez in sod., 2005; Maroon-Lango in sod., 2005; Pagan in sod., 2006; Ling, 2007):

- Perujski [izolat iz Peruja, odkrit leta 1974 na rastlinah pepina (*Solanum muricatum*)]
- Evropski paradižnikov (EU) (prvi izolat tega genotipa, najden v Evropi)
- US1 (prvi izolat tega genotipa, najden v ZDA)
- US2 (prvi izolat tega genotipa, najden v ZDA)
- Ch2 (prvi izolat tega genotipa, najden v Čilu)

Stopnja podobnosti nukleotidnega zaporedja izolatov perujskega genotipa z izolati genotipa EU je več kot 95 % (Lopez in sod., 2005; Maroon-Lango in sod., 2005), med izolati genotipa Ch2 in US2 je 91 % (Ling, 2007), med US 1 in US 2 86 % (Maroon-Lango in sod., 2005), med EU in US1 81–82 % in med EU in US2 oziroma Ch2 78–79 % (Maroon-Lango in sod., 2005; Ling, 2007).

Izolati genotipa Ch2 so bili odkriti v Čilu. V Evropi so bili prvič dokazani leta 2005, od takrat se je genotip Ch2 hitro razširil po vsej Evropi (Van der Vlugt, 2009). Izolati genotipa Ch2 so v Evropi pogosto najdeni v mešanih okužbah z izolati genotipa EU (Pagán in sod., 2006; Hanssen in sod., 2008; Hasiów in sod., 2008). V Belgiji so na rastlinah paradižnika, okuženih z obema genotipoma, našli rekombinante med genotipoma EU in Ch2 (Hanssen in sod., 2008). Sočasna okužba rastlin z genotipom Ch2 in EU lahko povzroči močnejše izražena bolezenska znamenja (Hanssen in sod., 2008). V rastlinjakih v ZDA so potrdili izolate genotipa EU, US1, US2 in Ch2 (Ling, 2008). V rastlinah paradižnika so pogosto našli mešane okužbe z izolati dveh ali celo

treh genotipov virusa PepMV (Ling, 2008). Do leta 2010 je v Severni Ameriki prevladoval genotip EU, leta 2010 so opazili nenadno nadvlado izolatov genotipa Ch2 (Ling in sod., 2013). Leta 2012 pa so v Mehiki okužbe z izolati genotipa US1 nadvladale nad okužbami z izolati genotipa Ch2 (Ling in sod., 2013).

Različni izolati PepMV se razlikujejo v bioloških karakteristikah in bolezenskih znamenjih, ki jih povzročajo na različnih gostiteljih in kultivarjih (Verhoeven in sod., 2003). Perujski genotip lahko mehansko prenesemo na paradižnik, vendar na paradižniku ne povzroči bolezenskih znamenj (Jones in sod., 1980; Lopez in sod., 2005). V nasprotju z izolati perujskega genotipa izolati genotipa EU, US1, US2 in Ch2 na paradižniku povzročijo različna bolezenska znamenja: rumen ali temno zelen mozaik, kloroze, rumeni robati ali celo nekrotični madeži, zvijanje in mehurjavost listov, zelene raze na stebelu in venčnih listih ter razbarvanje, neenakomerno zorenje in zmanjšanje velikosti plodov (Cotillon in sod., 2002; Salomone in Roggero, 2002; Cordoba in sod., 2004; Lopez in sod., 2005; Maroon-Lango in sod., 2005; Mumford in Jones, 2005; Spence in sod., 2006; Ling, 2007). Bolezenska znamenja so na rastlinah paradižnika lahko komaj opazna, lahko pa vodijo do velikih ekonomskih izgub – izgube pridelka in izgube kvalitete plodov (Mumford in Metcalfe, 2001; Aguilar in sod., 2002; Mansilla in sod., 2003; Spence in sod., 2006).

PepMV je zelo obstojen virus [infektivnost virusa se v soku *Nicotiana glutinosa* na 20 °C ohrani vsaj tri mesece (Jones in sod., 1980)] in se izredno hitro širi z dotikom ali z okuženim orodjem (Aguilar in sod., 2002). Obleke, ki so bile v stiku z okuženimi rastlinami, so lahko vir kontaminacij najmanj 14 dni (Ferguson, 2009). Po podatkih iz literature specifičen žuželčji prenašalec za PepMV ni poznan (Lopez in sod., 2005), vendar zaradi velike obstojnosti virusa sklepajo, da le-tega lahko prenašajo mehansko tudi žuželke, kar je bilo eksperimentalno že dokazano za čmrlje (Lacasa in sod., 2003). PepMV so dokazali tudi v semenih paradižnika (Salomone in Roggero, 2002; Ling, 2007). Salomone in Roggero (2002) prenosa virusa s semeni na sadike paradižnika nista potrdila, nasprotno pa so Córdoba-Sellés in sod. (2007) dokazali, da je bil prenos PepMV z netretiranimi ali slabo očiščenimi semeni paradižnika na sadike v 1,84 % primerov. V podobni študiji, ki so jo izvedli Hanssen in sod. (2010), je bil prenos s semeni paradižnika dokazan v 0,026 % od 87.000 analiziranih rastlin. Ne glede na to, da je možnost prenosa PepMV s semeni nizka, se lahko okužba ene same rastline hitro razširi na druge rastline. Córdoba-Sellés in sod. (2007) niso dokazali prenosa virusa s semeni na sadike po tretiranju semen s trinatrijevim fosfatom. Sklepajo, da naj bi bil virus prisoten na površini semen in ne v samih semenih ter da naj bi se sadike okužile ob kalitvi z virusnimi delci na površini semen.

2.2.3 Viroid vretenatosti gomoljev krompirja (Potato spindle tuber viroid; PSTVd)

Viroid vretenatosti gomoljev krompirja (PSTVd) uvrščamo v rod *Pospiviroid* iz družine *Pospiviroidae*. Molekula RNA je velika od 356 do 361 nukleotidov. Sekundarna struktura je togo paličasta in kot taka odporna proti razgradnji z nukleazami *in vitro* (Owens, 2007). PSTVd se inaktivira z 10-minutnim gretjem ekstrakta okuženih listov krompirja v 0,2 M NaCl pri temperaturi med 75 in 80 °C oziroma pri tretiranju s fenolom med 90 in 100 °C (Diener in Raymer, 1971).

O bolezenskih znamenjih na krompirju, značilnih za okužbo s PSTVd, so poročali iz ZDA že leta 1922. Leta 1971 so odkrili, da je povzročitelj majhna RNA, ki ne kodira proteinov, a se, v nasprotju s satelitsko RNA, lahko podvaja v celicah gostitelja brez pomožnega virusa (Diener, 1971). Leta 1973 so s pomočjo elektronske mikroskopije opazovali delce PSTVd. Leta 1978 so določili njegovo celotno nukleotidno zaporedje in sekundarno strukturo. PSTVd je prvi povzročitelj bolezni evkariontov, ki so mu določili celotno nukleotidno zaporedje genoma (Owens, 2007).

PSTVd je uvrščen na seznam EPPO A2 (EPPO, 2012b). Čeprav je bil že večkrat najden tudi v Evropski uniji (Puchta in sod., 1990; Verhoeven in sod., 2004; Verhoeven in sod., 2007), je še vedno uvrščen na seznam I.A.I direktive 2000/29/ES. V Sloveniji je bil prvič potrjen leta 2006 na okrasni rastlini *Brugmansia suaveolens* (FURS, 2008).

Največjo gospodarsko škodo povzroča na rastlinah krompirja (Pfannenstiel in Slack, 1980) in paradižnika (Verhoeven in sod., 2004). V eksperimentalnih pogojih so dokazali, da izgube pridelka krompirja zaradi okužbe s PSTVd lahko dosežejo od 17 do 64 % in izgube pridelka paradižnika od 0 do 50 % (Verhoeven, 2010). Bolezenska znamenja so zelo različna, odvisno od izolata PSTVd in gostiteljske rastline (Schnolzer in sod., 1985; Verhoeven in sod., 2004; Owens, 2007). Okuženi gomolji krompirja so pogosto majhni in deformirani – vretenasti, lahko tudi grčasti. Nadzemni deli okuženih krompirjev so pogosto zakrneli. Listi lahko spremenijo barvo ter so deformirani. Okužene rastline paradižnika so zakrnele, njihov vrh je šopast. Včasih se pojavijo tudi vretenasti poganjki. Listi so deformirani, porumenijo ali pordečijo. Cvetovi pogosto odpadejo. Plodovi zorijo neenakomerno, so majhni, trdi in pogosto temno zeleni. Podobna bolezenska znamenja, kot jih povzroča PSTVd na rastlinah paradižnika, lahko povzroča še šest drugih predstavnikov iz rodu *pospiviroidov* (Verhoeven, 2010). PSTVd okužuje tudi avokado (Querci in sod., 1995), pepino (Puchta in sod., 1990) ter številne okrasne rastline in plevele iz družine *rzhudnikovk* (*Solanaceae*), pri katerih so okužbe

pogosto prikrite, zato pomenijo vir novih okužb (Verhoeven in sod., 2010b; Verhoeven in Roenhorst, 2010).

Najpomembnejši način širjenja PSTVd je vegetativno razmnoževanje (z gomolji in sadikami). Prenaša se tudi s semenom in cvetnim prahom (Diener in Raymer, 1971). PSTVd se zlahka prenaša z dotikom okuženih rastlin in z okuženim orodjem ter rokami (Owens, 2007; Seigner in sod., 2008; Verhoeven in sod., 2010a). Dve uri po dotiku okuženih rastlin *Brugmansia suaveolens* in *Solanum jasminoides* s prsti so PSTVd uspešno prenesli z dotikom na rastline paradižnika (Verhoeven in sod., 2010a). Če so sočasno okužili rastline krompirja s PSTVd in PLRV (virus linijskega vzorca pelargonije; *Pelargonium line pattern virus*), se je PSTVd lahko prenesel tudi z listnimi ušmi (*Myzus persicae*) (Querci in sod., 1997). Verhoeven (2010) navaja, da s poskusi, ki so jih izvedli v različnih laboratorijih, niso potrdili prenosa PSTVd z okuženih okrasnih rastlin na rastline paradižnika s čmrlji, čebelami, tripsi in vodo.

2.3 VODA KOT MOŽNA POT PRENOSA VIRUSOV IN VIROIDOV MED RASTLINAMI

Vode lahko v določenih primerih, kot so poplave, potresi, onesnaženje ali teroristični napadi, pomenijo pomemben vir okužbe človeka, živali in rastlin s patogenimi mikrobi (Szewzyk in sod., 2000; Khan in sod., 2001; Casteel in sod., 2006; Günter, 2006; Gleick, 2006; Costigliola in Quagliata, 2010; Ping, 2010; Abraham, 2011; Knutsson in sod., 2011). Ta pot okužbe je dobro znana pri bakterijah. Veliko pozornosti je posvečene tudi onesnaženju vode s človeškimi in živalskimi virusi (pregledni članki: Rudolfs in sod., 1950; Gerba in Schaiberger, 1975; Labelle in Gerba, 1980; Szewzyk in sod., 2000; Griffin in sod., 2003; Toze, 2006; Reynolds in sod., 2008). Prva opažanja o prisotnosti rastlinskih virusov v vodah, kot so reke, jezera in morja ter pitne vode, so stara le 30 let (Koenig, 1986; pregledni članek: Mehle in Ravnkar, 2012). Po nam znanih informacijah podatkov o najdbi viroidov v vodnih virih ni.

V vrtnarstvu se intenzivno uporabljajo namakalni sistemi ter v zadnjem času različne oblike gojenja rastlin na hidroponijah, saj je s tem omogočen večji in kakovostnejši pridelek. Z odkritjem virusov v vodah so se začela pojavljati številna vprašanja, na primer kako in od kod virusi vstopijo v vodo, ali lahko v vodi preživijo in ali se lahko na ta način razširijo na druge rastline. V primeru pritrdilnih odgovorov se pojavi bojazen, da gojenje rastlin na hidroponiji omogoča hitro širjenje rastlinskih virusov.

2.3.1 Prisotnost rastlinskih virusov v vodnih virih

Leta 1969 je van Dorst poročal o najdbi rastlinskega virusa v vodi za namakanje (cit. po Pares in sod., 1992). Prva opažanja o prisotnosti rastlinskih virusov v vodnih virih, kot so reke in jezera, so iz 80-ih let prejšnjega stoletja. Takrat so se s problematiko ukvarjale posamezne raziskovalne skupine v Evropi. Zadnjih deset let narašča število objav o najdbah rastlinskih virusov v vodi. Do zdaj so v vodnih virih, kot so kanali, reke, potoki, ribniki, jezera in oceani, našli infektivne viruse iz vsaj sedmih različnih rodov (Preglednica 1).

Preglednica 1: Infektivni rastlinski virusi, ki so jih našli v vodnih virih, kot so kanali, reke, potoki, ribniki, jezera in oceani (Mehle in Ravnikar, 2012)

Table 1: Infective plant pathogenic viruses found in environmental waters, such as canals, rivers, streams, ponds, lakes and oceans (Mehle and Ravnikar, 2012)

Rastlinski virus	Država najdbe	Vir vodnega vzorca	Metoda koncentriranja vodnega vzorca	Metode dokazovanja prisotnosti virusa	Vir informacij
Carmovirusi:					
Virus lisavosti nageljna (<i>Carnation mottle virus</i> ; CarMV)	Nemčija	reka Oker	ultracentrifugiranje (200 do 300 ml)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunodifuzijski test	Koenig in Lesemann, 1985
Weddelski z vodo prenosljivi virus (<i>Weddel waterborne virus</i> ; WWBV), ahlumski z vodo prenosljivi virus (<i>Ahlum waterborne virus</i> ; AWBV)	Nemčija	kanali in potoki v bližini polj	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, imunodifuzijski test, SDS-PAGE in hibridizacija odtisa northern	Yi in sod., 1992
Cucumovirusi					
Virus mozaika kumare (<i>Cucumber mosaic virus</i> ; CMV)	Italija	reka Bradano	centrifugiranje pri 5000 g (1 l)	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM	Piazzolla in sod., 1986
Dianthovirusi					
Virus obročkaste pegavosti nageljna (<i>Carnation ringspot virus</i> ; CRSV)	Nemčija	kanal, ki povezuje reki Oker in Aue	ultracentrifugiranje (60 ml)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM, SDS-PAGE, hibridizacija odtisa northern, hibridizacija dot blot	Koenig in sod., 1988
	Nemčija	kanali in drenaže v bližini vinogradov	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, imunodifuzijski test	Koenig in sod., 1989
	Nemčija	kanali in potoki v bližini polj ter potok stran od polj	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunodifuzijski test	Yi in sod., 1992

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1. Infektivni rastlinski virusi, ki so jih našli v vodnih virih, kot so kanali, reke, potoki, ribniki, jezera in oceani

Rastlinski virus	Država najdbe	Vir vodnega vzorca	Metoda koncentriranja vodnega vzorca	Metode dokazovanja prisotnosti virusa	Vir informacij
Necrovirusi					
Virus nekroze tobaka (<i>Chenopodium necrosis virus</i> oziroma <i>Tobacco necrosis virus</i> ; TNV)	Anglija	reke Cham, Temza, Avon s pritoki, jezero Esthwaite	adsorpcija filtrirane vode na filter (60 l), nato koncentriranje eluenta z ultracentrifugiranjem	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM	Tomlinson in sod., 1983
	Nemčija	kanali in drenaže v bližini vinogradov	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, imunodifuzijski test	Koenig in sod., 1989
Virus nekroze tobaka (<i>Chenopodium necrosis virus</i> oziroma <i>Tobacco necrosis virus</i> ; TNV)	Nemčija	kanali in potoki v bližini polj	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunodifuzijski test	Yi in sod., 1992
Potexvirusi					
Virus X krompirja (<i>Potato virus X</i> ; PVX)	Nemčija	ribniki in potoki v gozdnih sestojih (Northrhine-Westfalia)	ultrafiltriranje (50 l)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunoprecipitacijski test	Büttner in Nienhaus, 1989
Tobamovirusi:					
Virus mozaika tobaka (<i>Tobacco mosaic virus</i> ; TMV)	bivša Jugoslavija	reka Donava in Sava	ultracentrifugiranje na 60.000 g (1 l filtrirane vode)	EM in mehanska okužba testnih rastlin, nato imunodifuzijski test	Tošić M. in Tošić D., 1984
	Nemčija	reka Henne	ultracentrifugiranje (200 do 300 ml)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunoprecipitacijski test	Koenig in Lesemann, 1985
	Italija	reka Lato	centrifugiranje pri 5000 g (1 l)	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM	Piazzolla in sod., 1986
	Hrvaška	kanali v gozdnih sestojih in potok	ultracentrifugiranje (250 ml) / centrifugiranje pri 4000 g / brez centrifugiranja	mehanska okužba testnih rastlin, nato imunodifuzijski test, EM in svetlobna mikroskopija	Pleše in sod., 1996
Virus mozaika paradižnika (<i>Tomato mosaic virus</i> ; ToMV)	Nemčija	ribniki in potoki v gozdnih sestojih (Northrhine-Westfalia)	ultrafiltracija (50 l)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunoprecipitacijski test	Büttner in Nienhaus, 1989

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1. Infektivni rastlinski virusi, ki so jih našli v vodnih virih, kot so kanali, reke, potoki, ribniki, jezera in oceani

Rastlinski virus	Država najdbe	Vir vodnega vzorca	Metoda koncentriranja vodnega vzorca	Metode dokazovanja prisotnosti virusa	Vir informacij
Virus mozaika paradižnika (<i>Tomato mosaic virus</i> ; ToMV)	ZDA	potoki in jezera v gozdnih sestojih v New Yorku in v visokogorju (Adirondack)	adsorpcija na Zeta Plus 50 S membranski filter (20 l), nato koncentriranje eluenta z ultracentrifugiranjem	EM in mehanska okužba testnih rastlin, nato EM, imunodifuzijski test, ELISA	Jacobi in Castello, 1991
	ZDA	oblaki (vrh gore Whiteface), megla (obala Maine)	ultracentrifugiranje (30–290 ml)	ELISA, RT-PCR-blot hibridizacija, določanje nukleotidnega zaporedja, mehanska okužba testnih rastlin	Castello in sod., 1995
Virus mozaika paradižnika (<i>Tomato mosaic virus</i> ; ToMV)	Hrvaška	dva potoka v gozdnih sestojih	ultracentrifugiranje (250 ml)	mehanska okužba testnih rastlin, nato imunodifuzijski test, EM in svetlobna mikroskopija	Pleše in sod., 1996
	Slovenija	gramoznica Ivanci, reke Drava, Vipava in Krka	koncentriranje s CIM monolitnimi kromatografskimi nosilci (1 l) (v nekaterih primerih koncentriranje vzorcev ni bilo potrebno)	RT-PCR v realnem času, ELISA, mehanska okužba testnih rastlin, ISEM	Boben in sod., 2007
Tombusvirusi:					
Virus grmičavosti in zakrnelosti paradižnika (<i>Tomato bushy stunt virus</i> ; TBSV)	Anglija	reke Temza, Trent, Cam, Esthwaite Water	adsorpcija filtrirane vode na filter (60 l), nato koncentriranje eluenta z ultracentrifugiranjem	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, imunodifuzijski in imunoprecipitacijski test	Tomlinson in sod., 1983; Tomlinson in Faithfull, 1984
	Nemčija	reki Elbe in Mosel	ultracentrifugiranje (200 do 300 ml)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunodifuzijski test	Koenig in Lesemann, 1985
	Nemčija	ribniki in potoki v gozdnih sestojih (Northrhine-Westfalia)	ultrafiltriranje (50 l)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunodifuzijski test	Büttner in Nienhaus, 1989
Italijanski virus obročkaste pegavosti nageljna (<i>Carnation Italian ringspot virus</i> ; CIRV)	Nemčija	ribniki in potoki v gozdnih sestojih (Northrhine-Westfalia)	ultrafiltriranje (50 l)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunodifuzijski test	Büttner in sod., 1987; Büttner in Nienhaus, 1989

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1. Infektivni rastlinski virusi, ki so jih našli v vodnih virih, kot so kanali, reke, potoki, ribniki, jezera in oceani

Rastlinski virus	Država najdbe	Vir vodnega vzorca	Metoda koncentriranja vodnega vzorca	Metode dokazovanja prisotnosti virusa	Vir informacij
Virus zvezdastega mozaika petunije (<i>Petunia asteroid mosaic virus</i> ; PetAMV)	Nemčija	kanali in drenaže v vinogradih	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, imunodifuzijski test	Koenig, 1988; Koenig in sod., 1989
	Baltsko morje	200 m stran od SV dela plaže otoka Helgoland	ultracentrifugiranje (400 ml filtrirane vode)	mehanska okužba testnih rastlin, nato serološki test	Fuchs in sod., 1996
Alžirski latentni virus vinske trte (<i>Grapevine Algerian latent virus</i> ; GALV)	Nemčija	kanali in potoki v bližini polj	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, imunodifuzijski test, hibridizacija odtisa northern	Yi in sod., 1992
Sitkeški z vodo prenosljivi virus (<i>Sitke waterborne virus</i> ; SWBV)	Nemčija	kanali in potoki v bližini polj	ultracentrifugiranje	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, imunodifuzijski test, SDS-PAGE in hibridizacija odtisa northern	Yi in sod., 1992
Neckarski rečni virus (<i>Neckar river virus</i> ; NRV)	Nemčija	reka Neckar	ultracentrifugiranje (200 do 300 ml)	mehanska okužba testnih rastlin, nato EM in imunodifuzijski test	Koenig in Lesemann, 1985
Havelski rečni virus (<i>Havel river virus</i> ; HaRV)	Nemčija	reka Havel, majhen potok, ki teče skozi gozd	ultracentrifugiranje (500 ml)	mehanska okužba testnih rastlin, nato ISEM, RT-PCR in določanje nukleotidnega zaporedja	Koenig in sod., 2004

Tobamovirusi, kot sta virus mozaika tobaka (*Tobacco mosaic virus*; TMV) in virus mozaika paradižnika (*Tomato mosaic virus*; ToMV), so zelo stabilni in razširjeni RNA virusi, ki okužujejo številne rastlinske vrste (Hollings in Huttinga, 1976). TMV so izolirali iz reke Henne v Nemčiji (Koenig in Lesemann, 1985), iz reke Lato v Italiji (Piazzolla in sod., 1986), iz Donave in Save v bivši Jugoslaviji (Tošić M. in Tošić D., 1984) ter iz dveh kanalov v gozdnem sestoj in iz potoka na Hrvaškem (Pleše in sod., 1996). Infektivne delce ToMV so izolirali iz vod v gozdnih sestojih na Hrvaškem (Pleše in sod., 1996) in v Nemčiji, v pokrajini Northrhine-Westfalia (Büttner in Nienhaus, 1989). Dokazan je bil tudi v več kot 25 % vzorcev vode, zbranih iz rek in jezer, ki izvirajo v gozdovih v New Yorku, in iz visokogorja Adirondack, kjer ni nobenega vpliva kmetijstva (Jacobi in Castello, 1991). Infektivne virusne delce ToMV so našli tudi v oblakih in megli (Castello in sod., 1995). Njegovo RNA so potrdili celo na

starodavnih ledenikih (Castello in sod., 1999), ki bi bili lahko abiotski rezervoar teh virusov (Rogers in sod., 2004). V Sloveniji so ToMV dokazali v sedmih od devetih analiziranih vzorcev vode; in sicer v reki Krki, Dravi in Vipavi, v gramoznici Ivanci in v vodi iz namakalnih naprav, v kateri je bila okužba s ToMV na rastlinah paradižnika potrjena leta 2004 (Boben in sod., 2007).

Poleg tobamovirusov so iz drenažnih vod v gozdovih na področju Northrhine-Westfalia izolirali še druge viruse, ki povzročajo bolezni na kmetijskih rastlinah, na primer virus X krompirja (*Potato virus X*; PVX) iz rodu Potexvirusov ter virus grmičavosti in zakrnelosti paradižnika (*Tomato bushy stunt virus*; TBSV) in italijanski virus obročkaste pegavosti nageljna (*Carnation Italian ringspot virus*; CIRV) iz rodu Tombusvirusov (Büttner in sod., 1987; Büttner in Nienhaus, 1989). Infektivne delce TBSV so izolirali iz jezer in rek po vsem svetu (povzeto po Koenig, 1986). Druga dva predstavnika rodu Tombusvirusov, virus zvezdastega mozaika petunije (*Petunia asteroid mosaic virus*; PetAMV) in alžirski latentni virus vinske trte (*Grapevine Algerian latent virus*; GALV), sta bila izolirana iz nemških potokov in jarkov (Koenig, 1988; Koenig in sod., 1989; Yi in sod., 1992). PeAMV so izolirali tudi iz morske vode, in sicer 200 m stran od obale otoka Helgoland (Fuchs in sod., 1996). Virus lisavosti nageljna (*Carnation mottle virus*; CarMV), predstavnika rodu Carmovirusov, so izolirali iz nemške reke Oker (Koenig in Lesemann, 1985) in prisotnost potrdili v Baltskem morju (Kontzog in sod., 1988). Infektivne delce virusa nekroze tobaka (*Chenopodium necrosis virus* oziroma *Tobacco necrosis virus*; TNV), predstavnika rodu Necrovirusov, so potrdili v jarkih, potokih in kanalih v Nemčiji (Koenig in sod., 1989, Yi in sod., 1992), v rekah Cam, Temzi, Avon in njihovih pritokih ter v jezeru Esthwaite Water v Angliji (Tomlinson in sod., 1983). Infektivne delce virusa mozaika kumare (*Cucumber mosaic virus*; CMV) iz rodu Cucumovirusov so izolirali v italijanski reki Bradano (Piazzolla in sod., 1986) ter virus obročkaste pegavosti nageljna (*Carnation ringspot virus*; CRSV) iz rodu Diantovirusov v številnih nemških jarkih ter potokih in v kanalu Oker-Aue (Koenig in sod., 1988, 1989; Yi in sod., 1992).

V vodnih virih so našli tudi številne druge viruse, za katere nista znana naravni gostitelj oziroma njihova vloga v naravi, jih pa zaradi podobnosti lahko uvrščamo v do zdaj znane rodove rastlinskih virusov; na primer Carmovirusi (Yi in sod., 1992), Potexvirusi (Koenig in Lesemann, 1985; Büttner in Nienhaus, 1989), Tombusvirusi (Koenig in Lesemann, 1985; Gallitelli in sod., 1989, Yi in sod., 1992; Koenig in sod., 2004) in Tobamovirusi (Koenig in Lesemann, 1985). Pogosto so le-te poimenovali po reki ali po kraju, kjer so jih prvič izolirali, na primer sitkeški z vodo prenosljivi virus (*Sitke waterborne virus*; SWBV), ahlumski z vodo prenosljivi virus (*Ahlum waterborne virus*;

AWBV), weddelski z vodo prenosljivi virus (*Weddel waterborne virus*; WWBV) (Yi in sod., 1992), neckarski rečni virus (*Neckar river virus*; NRV) (Koenig in Lesemann, 1985), havelski rečni virus (*Havel river virus*; HaRV) (Koenig in sod., 2004).

V morski vodi (Rosario in sod., 2009b) in v rekah (Hamza in sod., 2011) so dokazali prisotnost virusa blage lisavosti paprike (*Pepper mild mottle virus*; PMMoV). Z razvojem novih generacij določanja nukleotidnega zaporedja so v morju (Culley in sod., 2006), jezerih (Djikeng in sod., 2009) in odpadnih vodah (Rosario in sod., 2009a) našli še številne druge RNA in tudi DNA viruse, ki so znani povzročitelji bolezni na kopenskih rastlinah. Biološki pomen teh novih najdb je še neznanka.

2.3.2 Izvor virusov v vodnih virih

V različne okoljske vode naj bi se virusi sproščali preko koreninskega sistema okuženih rastlin ter iz poškodovanega ali razpadajočega rastlinskega materiala. Številni virusi se izločajo iz prebavnega trakta vretenčarjev z blatom v kanalizacijo oziroma v gnojevko. Drenažne in kanalizacijske vode se pogosto stekajo v reke, jezera in potoke, ki se lahko uporabljajo za namakanje rastlin (Slika 2), ter v morja.

Virusi, ki so znani povzročitelji bolezni na kmetijskih rastlinah, so lahko v gozdu prisotni zaradi pogozdovanja kmetijskih površin (Fillhart in sod., 1998). Če gozd ni na področju, kjer so bile včasih kmetijske površine, so gozdne rastline najverjetneje izvorni gostitelji (Fillhart in sod., 1998). ToMV bi se lahko širil z oblaki s kmetijskih površin v gozdove v visokogorju in od tod z vodo nazaj do kmetijskih površin (Castello in sod., 1995).

2.3.2.1 Sproščanje virusov iz poškodovanega ali razpadajočega rastlinskega materiala v vodo

Že leta 1960 je Yarwood ugotovil, da se TNV in TMV sproščata v vode iz poškodovanih, razpadajočih oziroma mrtvih korenin (Yarwood, 1960). Sproščanje virusov iz razpadajočega rastlinskega materiala je bilo dokazano v eksperimentalnih in naravnih pogojih. Ugotovili so, da so lahko ostanki s ToMV okuženih rastlin paradižnika (Lanter in sod., 1982) in buč, okuženih z virusom zelene lisavosti in mozaika kumare (*Cucumber green mottle mosaic virus*; CGMMV) (Rao in Varma, 1984), eden pomembnih virov za širjenje virusov. Sproščanje virusa iz propadajočih korenin v vodo naj bi bil glavni razlog za porast okužb z virusom pritlikavosti pšenice

(*Wheat dwarf virus*; WDV) na poljih pšenice na Madžarskem (Horvath in sod., 1999). Ker se virusi sproščajo iz razpadajočih rastlinskih tkiv, je lahko tudi kompost pomemben vir okužbe. Za CGMMV je znano, da je v kompostu lahko kužen več kot šest mesecev (Van Dorst, 1969, cit. po Koenig, 1986).

2.3.2.2 Sproščanje virusov iz koreninskega sistema okuženih rastlin v vodo

Številni virusi, na primer virus nekroze kumare (*Cucumber necrosis virus*; CNV), TBSV, CarRSV, ToMV in CGMMV, se lahko sproščajo v hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji, kar kaže na to, da se lahko sproščajo tudi iz živih korenin (povzeto po Koenig, 1986).

2.3.2.3 Kanalizacija, gnojevka

Tomlinson in sod. (1982) so bili prvi, ki so opozorili na kanalizacijo kot pomemben vir rastlinskih virusov. Tomlinson in Faithfull (1984) sta v paradižnikih, rastočih na primarnem blatu dveh čistilnih naprav v Angliji, našla TBSV, ToMV in CMV. Predvidevata, da naj bi te rastline paradižnika zrasle iz semen, ki so nepoškodovana potovala skozi človeški prebavni trakt. V vodi iz kanala, ki povezuje nemški reki Oker in Aue in ki se napaja z izpusti mestnih čistilnih naprav, so dokazali visoke koncentracije virusa CarRSV (Koenig in sod., 1988). Virus CarRSV, ki okužuje številne okrasne in plevelne rastline in tudi različne rastline sadnega drevja, je v vodo prišel ali iz korenin plevelnih rastlin, rastočih vzdolž kanala, ali s kanalizacijsko vodo. Okužena kanalizacijska voda je lahko najprej povzročila okužbo plevelnih rastlin, rastočih vzdolž izpusta, nato pa bi se lahko virusi masovno sproščali nazaj v kanalizacijsko vodo preko okuženih korenin ali rastlinskih ostankov (Koenig in sod., 1988). Veliko različnih rastlinskih virusov so našli tudi Zhang in sod. (2006) v blatu izbrane ameriške populacije ljudi. Številne infektivne rastlinske viruse so našli tudi v iztrebkih drugih vretenčarjev. V iztrebkih zajcev in miši so našli TMV, virus šelestenja tobaka (*Tobacco rattle virus*; TRV), CGMMV, virus mozaika stoklase (*Brome mosaic virus*; BMV), virus črtastega mozaika ječmena (*Barley stripe mosaic virus*; BSMV) in virus mozaika lucerne (*Alfalfa mosaic virus*; AMV) (Kegler in sod., 1984, cit. po Koenig, 1986).

2.3.3 Preživetje virusov in viroidov v vodi

Večina rastlinskih virusov, ki so jih izolirali iz vodnih virov, je stabilna. ToMV, TMV, CarRSV, TBSV, CaRMV in PVX ohranijo infektivnost *in vitro* (ang: longevity of the

sap infectivity *in vitro*; LIV) od 50 do 3000 dni. Iz vodnih virov so izolirali tudi manj stabilne viruse, na primer TNV z LIV od 7 do 28 dni in CMV z LIV med 1 in 10 dni (podatki o LIV so iz baze podatkov Brunt in sod. (od 1996 dalje)).

Preživetje virusov *in vitro* je vsekakor odvisno od eksperimentalnih pogojev. Na primer LIV za TMV je v bazi podatkov, ki so jih zbrali Brunt in sod. (od 1996 dalje), 3000 dni. Nasprotno Park in sod. (1999) poročajo, da TMV *in vitro* preživi le pet dni. Yarwood (1960) je dokazal, da se TNV inaktivira hitreje v suhem kot v vlažnem okolju. Ocenjena razpolovna doba TNV v vodni suspenziji je med 46 in 80 ur. Podatkov o preživetju rastlinskih virusov v vodi ali hranilni raztopini v razmerah, ki so primerne za rast rastlin (na primer v rastlinjaku), je malo. Pares in sod. (1992) so ugotovili, da očiščeni virusni delci ToMV in PMMoV v hranilni raztopini lahko ohranijo infektivnost vsaj šest mesecev ne glede na to, ali raztopino hranimo pri 4 °C ali v rastlinjaku. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo smo v predhodnih raziskavah dokazali, da PepMV v vodi, shranjeni na temperaturi 20 ± 4 °C, preživi tri tedne (Prezelj in sod., 2009), PVY^{NTN} pa en teden (Vidic, 2011). V vodi je bilo sicer možno virusno RNA določiti tudi pozneje, vendar okužba testnih rastlin ni bila uspešna, kar kaže na to, da se je količina infektivnih virusov zmanjšala pod mejo uspešne okužbe rastlin. PVY^{NTN} v vodi, shranjen na temperaturi 4 °C, pa je preživel kar deset tednov (Mehle in sod., 2014).

Za živalske in človeške viruse je znano, da ostanejo v vodi infektivni dlje časa, če so agregirani ali adsorbirani na trde delce, na primer na glino, silikate, organske ostanke, bakterije ali alge (Gerba in Schaubberger, 1975; Labelle in Gerba, 1980). Podobno naj bi tudi adsorpcija rastlinskih virusov na glinene delce ali organsko snov zaščitila le-te pred inaktivacijo v vodi (Koenig, 1986).

Stabilnost številnih rastlinskih virusov, podobno kot velja za človeške viruse, je izredno velika (Carter, 2005; Reynolds in sod., 2008). Tomlinson in sod. (1982) so dokazali, da očiščeni virusni delci TBSV pri prehodu skozi prebavni trakt, kjer so izpostavljeni delovanju prebavnih encimov, žolčnih soli, temperaturi 37 °C in spreminjanju pH od 3 do 8,8, ostanejo infektivni. Zhang in sod. (2006) so v blatu izbrane ameriške populacije ljudi našli 35 različnih rastlinskih virusov. Prevladoval je PMMoV, ki je pogost virus na papriki v Ameriki. Ugotovili so, da PMMoV iz človeškega blata lahko okuži testne rastline. Potrdili so tudi, da PMMoV ohrani infektivnost v procesu predelave hrane, na primer v omakah in v mleti posušeni papriki. Primerjava količine virusa v enaki suhi teži blata in zaužite hrane je pokazala, da je bilo v blatu statistično pomembno več virusa kot v zaužiti hrani. Predvidevajo, da je to lahko rezultat podvajanja virusov v

človeškem prebavnem traktu, vendar tega niso dokazali. Glede na to, da so količino virusa merili z molekularnimi metodami, torej so merili količino virusne RNA, bi lahko bila izmerjena večja količina virusa v blatu zgolj posledica razgradnje hrane v prebavilih in s tem sproščanja virusne RNA iz rastlin, kar bi lahko omogočilo lažjo dostopnost virusne RNA za detekcijo ali manjšo inhibicijo. PMMoV so dokazali tudi v odpadnih vodah ter v morski vodi v bližini izliva odpadnih voda na Floridi (Rosario in sod., 2009b) in v nemški reki (Hamza in sod., 2011), zato predlagajo, da bi bil PMMoV indikator fekalnega onesnaženja površinskih voda.

Manj stabilni virusi najverjetneje ne morejo preživeti »prosti« v vodi ali pri prehodu skozi prebavni trakt vretenčarjev. Vsaj nekateri od teh lahko preživijo v glivnih sporah ali v semenih. Preživetje virusov v semenih je pomembno zlasti za viruse, ki okužujejo enoletnice, in za tiste, ki se širijo, na primer, s počasi premikajočimi se ogorčicami, pri čemer je potemtakem razširjanje virusov v semenih z vetrom ali z vodo učinkovitejše (povzeto po Matthews, 1992). Povezava virusov z dolgo živečimi sporami gliv je opisana v preglednem članku, ki ga je napisal Campbell (1996). Virus nekrotične pegavosti melone (*Melon necrotic spot virus*; MNSV) se veže na zunanji ovoj zoospor gliv *Olpidium bornovanus* in tako v zemlji ostane infektiven več let (Campbell, 1996).

Podatkov o preživetju viroidov v vodnem okolju ni. Sekundarna struktura krožne RNA jim omogoča veliko stabilnost, zato lahko morda dolgo preživijo tudi v vodi (Ruščić in sod., 2013).

2.3.4 Okužba rastlin z vodo, okuženo z virusi oziroma viroidi

Prisotnost rastlinskih virusov v drenažnih vodah, rekah in jezerih ima epidemiološki pomen le, če le-ti lahko okužijo rastline. Rastline se lahko okužijo z virusi iz vode ali preko korenin ali preko nadzemnih delov rastline. Do okužbe lahko pride tudi v času kalitve rastlin. Teakle in Morris (1981) sta ugotovila, da iz semen fižola, ki jih pred sejanjem namakamo v vodi, okuženi z južnim virusom mozaika navadnega fižola (*Southern bean mosaic virus*; SBMV), zrastejo s SBMV okužene rastline. Okužba je bila pri namakanju semen s poškodovano povrhnjico učinkovitejša kot pri namakanju intaktnih semen.

Številni virusi lahko okužijo rastline preko korenin ob pomoči prenašalcev – bodisi ogorčic ali gliv. Rastline so sposobne sprejeti virusne delce preko koreninskega sistema tudi brez pomoči prenašalcev. Prenos virusov preko korenin je učinkovitejši, če rastline

rastejo v sterilnem pesku, in manj učinkovit, če rastejo v sterilni hranilni raztopini, kar kaže na to, da virusi vstopajo v rastlino preko poškodovanih koreninskih laskov ali manjših poškodb, ki nastanejo med rastjo korenin. Za nekatere viruse so ugotovili, da je njihov prenos preko korenin v rastlino učinkovitejši ob prisotnosti gliv. Okužba rastlin preko korenin se pogosto omeji na korenine. Če se okužijo poganjki, se to pogosto zgodi z zamikom in le v nekaterih rastlinah. Poganjki, ki so se okužili preko korenin, pogosto niso imeli bolezenskih znamenj. Sicer pa so lahko bolezenska znamenja na poganjkih rastlin pri okužbi preko korenin izrazitejša kot pri okužbi preko listov. (povzeto po Koenig, 1986).

Ali se z okuženo vodo preko korenin okužijo poganjki in v kakšnem obsegu se okužba izrazi, je predvsem odvisno od koncentracije virusov v vodi, kar so potrdili na primeru ToMV (Pares in sod., 1992). Ne glede na način okužbe na izražanje bolezenskih znamenj vplivajo okoljske razmere, na primer temperatura (Schuerger in Hammer, 1995). Ugotovili so, da je vpliv temperature na izražanje bolezenskih znamenj pri okužbi preko korenin podoben, kot če se poganjki okužijo neposredno. Bolezenska znamenja so bila na rastlinah paprike, okuženih s ToMV, najmočneje izražena, ko so le-te rastle pri temperaturi 24 °C, manj pri temperaturi 32 °C ter najmanj, če so rastle pri temperaturi 18 °C (Schuerger in Hammer, 1995).

Z dosedanjimi raziskavami niso dokazali prenosa PSTVd na rastline paradižnika preko korenin po enkratnem zalitju le-teh z okuženo vodo (Seigner in sod., 2008). Verhoeven in sod. (2010a) so s pipeto v prst, v kateri so rastle rastline paradižnika, pet oziroma deset dni dodajali svež inokulum (macerat s PSTVd okuženih listov, pomešan z vodo brez RNaz). Po šestih tednih so z analiziranjem rastlin s PCR v realnem času ugotovili, da tudi v njihovem poskusu do prenosa PSTVd preko korenin ni prišlo.

2.3.5 Možen prenos virusov z vodo

Večina virusov (na primer Carmo-, Tombus-, Diantho-, Tobamo- in Potexvirusi), ki so jih našli v zemlji ali vodnih virih, ima sledeče lastnosti (povzeto po Koenig, 1986; Koenig, 1988):

- nimajo živalskega vektorja, ki bi jim omogočal širjenje na dolge razdalje
- v okuženih rastlinah se močno namnožijo ter se nato masovno sproščajo iz okuženih korenin
- so zelo stabilni, z izjemami (na primer CMV)
- lahko okužijo rastline preko korenin brez vektorja

- imajo širok krog gostiteljskih rastlin
- po namnožitvi v rastlini se lahko hitro širijo na sosednje rastline mehansko z dotikom listov ali preko korenin v tleh

Razširjanje rastlinskih virusov v potoke, jezera in reke na ta način omogoča širjenje virusov na velike razdalje. Glede na to, da so infektivne delce ToMV našli tudi v oblakih in v megli, predpostavljajo, da pomembno vlogo pri širjenju stabilnih infektivnih virusov na dolge razdalje igra tudi atmosfera (Castello in sod., 1995). Tudi če le malo virusom uspe na ta način okužiti rastline, zaradi zadnjih dveh zgoraj naštetih lastnosti, to zadostuje za pojav novih izbruhov bolezni na drugih oddaljenih območjih.

K širjenju določenih rastlinskih virusov z vodo pripomoremo tudi ljudje in živali (povzeto po Koenig, 1986; Park in sod., 1999):

- z namakalni sistemi: namakanje nasadov z okuženo vodo iz potokov, rek ali jezer. S transportom sveže vode s tankerji v sušne predele, za namene namakanja, se lahko virusi širijo na zelo velike razdalje
- z gnojenjem polj z gnojevko (številni virusi se v prebavnem traktu vretenčarjev ne inaktivirajo)
- s fecesom po uživanju z virusi okužene surove zelenjave in sadja (okužba kanalizacijskih vod). S svetovnim trgovanjem rastlinskih produktov lahko omogočimo transport »tujih« virusov v vode in posledično razširitev le-teh na novih področjih.
- z odlaganjem rastlinskih ostankov na odlagališča ali kompost (spiranje v drenažne vode)

V zadnjem času se vse več pridelovalcev odloča za način gojenja rastlin na hidroponijah. Hidroponika je način gojenja rastlin brez prsti. Korenine rastlin lahko rastejo v različnih inertnih substratih, kot so kamena volna, ekspanzirana glina, šotni substrati in pesek. Ob vzdrževanju velike vlažnosti korenine lahko uspevajo na zraku, in če je prezračevanje dobro, tudi v vodi. Sisteme za gojenje rastlin na hidroponijah v grobem razdelimo na zaprte in odprte. Za zaprt sistem gojenja rastlin na hidroponiji je značilno, da hranilna raztopina v sistemu kroži, medtem ko v odprtem sistemu hranilna raztopina po uporabi odteka iz sistema.

V rastlinah, gojenih na hidroponijah, so opazili številne bolezni, ki jih povzročajo virusi, na primer z velikimi žilami solate povezani virus (*Lettuce big-vein associated virus*; LBVaV), virus Mirafiori velikih žil solate (*Mirafiori lettuce big-vein virus*; MiLV) in virus klorotične pegavosti paradižnika (*Tomato chlorotic spot virus*; TCSV)

na rastlinah solate (Tomlinson in Faithfull, 1980; Rosales in sod., 2004; Colariccio in sod., 2004; Colariccio in sod., 2005; Navarro in sod., 2005); MNSV, virus rumenega mozaika bučke (*Zucchini yellow mosaic virus*; ZYMV), CGMMV in virus pegavosti listov kumare (*Cucumber leaf spot virus*; CLSV) na kumarah (Wong in sod., 1992; Stanghellini in Rasmussen, 1994a, 1994b; Rosner in sod., 2006); PVY in PepMV v različnih kultivarjih paradižnika (Crescenzi in sod., 2005; Fakhro in sod., 2011) ter druge viruse, ki okužujejo vrtnine in okrasne rastline (Schnitzler, 2004). V rastlinah, ki so rastle na hidroponiji, so dokazali tudi viroide, na primer PSTVd na rastlinah paradižnika (Mackie in sod., 2002). Preživetje teh virusov in viroidov v vodnem okolju in okužba rastlin preko korenin sta malo raziskana, saj so za to potrebni kompleksni in dolgotrajni poskusi (glej 2.3.5.1).

V sistemih za gojenje rastlin na hidroponijah se virusi ne širijo zgolj s hranilno raztopino, temveč tudi z dotikom listov ali korenin, z žuželkami, z okuženim sadilnim materialom ter med obdelovanjem z okuženim orodjem, rokami, obleko. Za proučevanje možnosti širjenja virusov s hranilno raztopino, kar je nujno za boljše razumevanje vpliva in sanacije le-teh v sistemih gojenja rastlin na hidroponijah, so zato potrebni skrbno načrtovani in dobro kontrolirani eksperimentalni pogoji.

2.3.5.1 Širjenje virusov med rastlinami v namakalnih sistemih z vodo ali hranilno raztopino

Nekateri virusi se v namakalnih sistemih prenašajo s pomočjo vodnih zoospor gliv iz družine Chytridiomycetes. Pogosto je tak način prenosa mnogo bolj učinkovit kot prenos brez pomoči vektorja (Campbell, 1996). V namakalnih sistemih naj bi se s pomočjo gliv *Olpidium* spp. širila LBVaV in MiLV med rastlinami solate, TNV, CNV, CLSV in MNSV med rastlinami fižola in kumar ter PepMV med rastlinami paradižnika (Tomlinson in Faithfull, 1980; Tomlinson in Thomas, 1986; Stanghellini in Rasmussen, 1994a; Campbell, 1996; Navarro in sod., 2005; Alfaro-Fernandez in sod., 2010). Gojenje solate v zaprtem sistemu na hidroponiji omogoča idealne pogoje za nastajanje, sproščanje in širjenje zoospor glive *O. brassicae*, kar posledično lahko vodi do okužbe vseh rastlin z LBVaV in MiLV (Jones, 2004). V poskusu, ki so ga izvedli Alfaro-Fernandez in sod. (2010), se je PepMV-EU prenesel na 8 % rastlin paradižnika (cv. Marmande), če so jih zalivali z drenažno vodo, dobljeno iz rastlin, okuženih s PepMV-EU in z glivo *O. virulentus*. V odsotnosti glive do okužbe s PepMV v njihovem poskusu ni prišlo. Če so bile korenine okužene z glivo *Pythium aphanidermatum*, so opazili zakasnitev okužbe s PepMV. Vlogo razširjanja z namakalno vodo na primeru virusa nekroze in rumenih žil pese (*Beet necrotic yellow vein virus*; BNYVV), povzročitelja

rizomanije, gospodarsko pomembne bolezni sladkorne, rdeče in krmne pese ter špinače, je opisala Koenig (1988). Cistosori talne glive *Polymyxa betae*, ki so vektor za virus BNYVV, preživijo v vodi najmanj eno leto, pri čemer ne izgubijo sposobnosti prenosa virusov. Cistosori in tudi BNYVV v njih lahko preživijo prehod skozi prebavni trakt goveda in ovac, ki se hranijo z listi pese. Spore, okužene z BNYVV, naj bi iz tal pronicale v odtoke, od tod pa z vodo v kanale. Okužene spore naj bi v kanale prišle tudi preko odtočnih cevi iz tovarn, v katerih pred predelavo perejo peso. Z namakanjem in škropljenjem polj z vodo iz teh kanalov se okužene spore širijo na polja.

Virusi se v sistemu gojenja rastlin na hidroponijah lahko sproščajo iz okuženih korenin v hranilno raztopino in nato okužijo druge rastline preko korenin brez dotika ali mehanskega širjenja preko zgornjih delov rastlin in, kot predpostavljajo, brez pomoči prenašalcev. To je bilo dokazano za okužbo paradižnika s ToMV (Pares in sod., 1992), pelargonij z virusom razbarvanja cvetov pelargonij (*Pelargonium flower break virus*; PFBV) (Krczal in sod., 1995) in paradižnika s PepMV-EU (Schwarz in sod., 2010). Büttner in sod. (2008) so nakazali možnost, da se v sistemu gojenja rastlin na hidroponijah tako širijo tudi drugi virusi, na primer virus pegavosti in uvelosti paradižnika (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV), virus mozaika repnjaka (*Arabidopsis mosaic virus*; ArMV), CGMMV, CMV, virus kodravosti listov pelargonije (*Pelargonium leaf curl virus*; PLCV), TMV, TNV in virus linijskega vzorca pelargonije (*Pelargonium line pattern virus*; PLPV). Z umetno okuženo hranilno raztopino so podoben način širjenja virusov med rastlinami, gojenimi na hidroponskih sistemih, dokazali še za druge kombinacije virus-gostitelj, na primer za okužbo paprike s ToMV (Schuerger in Hammer, 1995) in koruze z virusom belega linijskega mozaika koruze (*Maize white line mosaic virus*; MWLMV) (Louie in sod., 1992). Nasprotno Park in sod. (1999) tovrstnega načina prenosa virusov niso potrdili, saj je v njihovem poskusu do okužbe rastlin paradižnika, feferonov in tobaka s TMV prišlo le, če so se korenine dotikale. Verhoeven in sod. (2010a) okužbe rastlin paradižnika s PSTVd iz okužene prsti ali hranilne raztopine niso dokazali (glej 2.3.4).

2.3.6 Preprečevanje širjenja rastlinskih virusov z vodo

Virusi in viroidi povzročajo velike ekonomske izgube. Okužbe paradižnika s TSWV lahko, na primer, povzročijo 100 % izpad pridelka (Roselló in sod., 1996). Ker okuženih rastlin ne moremo ozdraviti s kemičnimi sredstvi, je rešitev v gojenju odpornih rastlin ali v preprečevanju okužb (Slika 2).

Poleg rednega spremljanja fitosanitarnega stanja semen in sadik z visoko občutljivimi diagnostičnimi metodami, ki so nujne zlasti pri odkrivanju latentnih okužb, takojšnjega odstranjevanja okuženih rastlin ter ustreznih higienskih ukrepov pri samem delu (odstranjevanje rastlinskih ostankov, razkuževanje delovnih orodij in oblačil) moramo v namakalnih sistemih in v sistemih za gojenje rastlin na hidroponijah upoštevati tudi dejstvo, da se rastlinski virusi lahko širijo tudi z vodo. Zato je priporočljivo, da izvajamo sledeče preventivne ukrepe (povzeto po Koenig, 1986; Schuerger in Hammer, 1995):

- redni monitoring namakalnih vod ter vod, ki se uporabljajo za mešanje s hranilno raztopino; za monitoring so nujne visoko občutljive detekcijske metode, saj je koncentracija virusov v vodah nizka
- če za mešanje s hranilno raztopino uporabljamo vode iz okolja, v katerih so lahko prisotni virusi, je priporočljiva njihova dekontaminacija
- dekontaminacija celotnega sistema za gojenje na hidroponiji po koncu ene rastne dobe
- širjenja rastlinskih virusov z vodo iz okolja ne moremo popolnoma omejiti, lahko pa omilimo učinke virusov na pridelek z gojenjem proti virusom odpornih sort (Pategas in sod., 1989; Strange in Scott, 2005)

Če se pojavi okužba, je treba odstraniti okužene rastline in sanirati vso opremo, orodje, obleko delavcev in celotno strukturo rastlinjaka (Schnitzler, 2004). Pred sajenjem novih rastlin je treba dekontaminirati celoten sistem za dovajanje hranilne raztopine. Zgolj odstranjevanje obolelih rastlin v zaprtem sistemu gojenja rastlin na hidroponiji ni dovolj, saj se virusi lahko sprostijo v hranilno raztopino in razširijo po celotnem sistemu pred odstranitvijo obolelih rastlin. Odstranjevanje zgolj obolelih rastlin je upravičeno le, če se sezona pobiranja pridelka bliža koncu in naknadno razširjane virusa ne pomeni večjega problema. V tem primeru je seveda nujno, da se izvede eradikacija povzročitelja bolezni na koncu rastne sezone (Schuerger in Hammer, 1995).

2.3.6.1 Eliminacija rastlinskih virusov iz vode

Možnosti odstranjevanja oziroma inaktivacije mikrobov z namenom pridobivanja pitne vode so opisane v številnih člankih (na primer: Khan in sod., 2001; Reynolds in sod., 2008 in Riley in sod., 2011). Podrobno so opisane tudi možnosti dekontaminacije vod za namakanje rastlin (Schnitzler, 2004; Hong in Moorman, 2005; Stewart-Wade, 2011), vendar so redke primerne za eliminacijo rastlinskih virusov. Glede na to, da se nekateri virusi z vodo učinkovito prenašajo s pomočjo vodnih zoospor, je v takih primerih seveda potrebno tudi tretiranje vode proti glivam oziroma njihovim sporam (Tomlinson

in Faithfull, 1980; Tomlinson in Thomas, 1986; Jones, 2004; Stewart-Wade, 2011). Različni pristopi imajo različne prednosti in slabosti (Hong in Moorman, 2005).

Možnosti za eradikacijo rastlinskih virusov v vodi so:

- Uporaba dezinfekcijskih sredstev: 30-minutno tretiranje vode s hipokloritom uspešno uniči CLSV (Rosner in sod., 2006). Čas tretiranja in koncentracija dezinfekcijskega sredstva sta odvisna od virusa, ki ga želimo inaktivirati.
- Vročinsko tretiranje: 10 sekund pri 95 °C uniči ToMV (Runia, 1995). Segrevanje vode na 95 °C in nato ohlajanje na temperaturo, primerno za rastline, zahteva veliko infrastrukturo, zato je to zelo drag način. Poleg tega tako ubijemo tudi koristne mikroorganizme, opažajo pa tudi neželene učinke na nekatere kemične spojine (Stewart-Wade, 2011).
- UV-sevanje: UV-sevanje z močjo 200 mJ cm⁻² uniči ToMV zaradi delovanja na RNA (Runia, 1995). Za uspešno tretiranje vode na ta način je treba le-to predhodno prefiltrirati, zato je to drag način. Nastajajo tudi prosti radikali in ozon, ki lahko negativno vplivajo na rast rastlin (Stewart-Wade, 2011).
- Ozonizacija: redoks vrednost 754 mV je učinkovita za uničenje CGMMV (Runia, 1995).
- Filtriranje vode: počasna filtracija vode skozi pesek je upočasnila širjenje PFBV [število okuženih rastlin se je zmanjšalo za približno tretjino (Krczal in sod., 1995)]. Z ultrafiltracijo odpadnih vod so Liu in sod. (1999) odstranili skoraj 100 % delcev ToMV. Uporaba ultrafiltracije ni praktična, saj so stroški postavitve zelo visoki, poleg tega se dragi filtri hitro zamašijo (Stewart-Wade, 2011).
- Sedimentacija: električni tok proizvaja ione, ki privlačijo pozitivno in negativno nabite snovi v vodi, te pa potem koagulirajo in se oborijo ter tako tvorijo blato. Metoda je varna in preprosta za uporabo. Sestava vode ne vpliva na učinkovitost metode. Vendar je vzpostavitev sistema draga, poleg tega je potrebno tudi redno odstranjevanje blata (Stewart-Wade, 2011).
- Elektroliza deionizirane vode: vsebuje nizko koncentracijo soli, hipoklorove kisline, ima visok oksidacijsko-redukcijski potencial in nizek pH (Kim in sod., 2000; Stewart-Wade, 2011). Ta metoda je preprosta, ni toksična za rastline, ni nevarna ne za zdravje ne za okolje, vendar njena učinkovitost v vodi še ni dobro raziskana (Stewart-Wade, 2011).

2.3.7 Določanje rastlinskih virusov in viroidov v vodi

Virusi so v vodah pogosto prisotni v koncentraciji, ki je pod mejo detekcije, zato jih

brez predhodnega koncentriranja ne moremo zaznati (Mehle in Ravnikar, 2012). Enako se predvideva tudi za viroide (Ruščić in sod., 2013). Infektivnost virusov in viroidov dokazujemo z mehansko okužbo testnih rastlin. Najbolj pogosto uporabljena metoda v diagnostiki rastlinskih virusov je ELISA (encimskoimunski test; Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Clark in Adams, 1977). Občutljivost testa ELISA je odvisna od kvalitete protiteles, pri čemer je limita detekcije rastlinskih virusov s testom DAS-ELISA (double-antibody-sandwich ELISA) 1–10 ng/ml (Bergmayer, 1986). Obstajajo tudi druge metode določanja rastlinskih virusov, na primer RT-PCR, ki je od sto- do tisočkrat bolj občutljiv (Candresse in sod., 1998), in v zadnjem času uveljavljeni PCR v realnem času (qPCR) (Mumford in sod., 2000; Boonham in sod., 2000; López in sod., 2006; Agindotan in sod., 2007; Ling in sod., 2007; Kogovšek in sod., 2008; Gutierrez-Aguirre in sod., 2009b; Čepin in sod., 2010), ki je še bolj občutljiv (1–10 kopij genoma) (Gutierrez-Aguirre in sod., 2009b). V diagnostiki viroidov sta se najprej uporabljala R-PAGE (povratna poliakrilamidna gelska elektroforeza) (Morris in Wright, 1975) in hibridizacija (Owens in Diener, 1981), pozneje RT-PCR (Shamloul in sod., 1997; Weidemann in Buchta, 1998; Verhoeven in sod., 2004), v zadnjem času pa se, podobno kot pri virusih, vse bolj uveljavlja RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) (Boonham in sod., 2004; Monger in sod., 2010; Botermans in sod., 2013).

2.3.7.1 Koncentriranje

Poznamo več načinov koncentriranja virusov iz vode. Tomlinson in Faithfull (1984) ter Tomlinson in sod. (1983) so koncentrirali 60-litrške vzorce vode. Vodo so najprej filtrirali skozi dva filtra: filter s porami velikosti 5 µm in filter s porami velikosti 1 µm. Prefiltrirani vodi so umerili pH na 5,5 in jo filtrirali skozi Zeta-Plus adsorpcijski filter. Viruse so iz adsorpcijskega filtra eluirali z enoodstotnim govejim ekstraktom, dobljeni eluat so na koncu koncentrirali z ultracentrifugiranjem. Na podoben način sta vodne vzorce, vendar brez predhodnega filtriranja, koncentrirala Jacobi in Castello (1991). 50-litrške vodne vzorce so z ultrafiltracijo koncentrirali Büttner in sod. (1987) ter Büttner in Nienhaus (1989). Koenig in Lesemann (1985), Koenig in sod. (1988, 1989, 2004), Castello in sod. (1995), Pleše in sod. (1996) ter Gosalvez in sod. (2003) so uporabili metodo ultracentrifugiranja manjših vodnih vzorcev (na primer 200–300 µl vzorca vode so centrifugirali 2 uri pri 100.000 g). Podobno so z ultracentrifugiranjem Tošić M. in Tošić D. (1984) ter Fuchs in sod. (1996) koncentrirali predhodno filtrirane vzorce vode. Možen način koncentriranja virusov iz vode je tudi precipitacija v polietilenglikolu (PEG) (Gosalvez in sod., 2003; Hamza in sod., 2011). Piazzolla in sod. (1986) ter Pleše in sod. (1996) so določili rastlinske viruse tudi v sedimentu po centrifugiranju pri nizki hitrosti (5000 g), kar dokazuje, da se virusi adsorbirajo na večje delce, ki jih s

filtriranjem odstranimo (Piazzolla in sod., 1986).

Zgoraj opisane metode koncentriranja rastlinskih virusov so dolgotrajne, sestavljene iz številnih korakov ali pa zahtevajo drago opremo (ultracentrifuga). Poleg tega analiziranje majhnega volumna vodnega vzorca ni reprezentativno (Riley in sod., 2011). Branović in sod. (2003) so razvili novo metodo koncentriranja človeških virusov z uporabo CIM (Convective Interacion Media) monolitnih kromatografskih nosilcev. Ni jasno, ali so koncentrirali virusne delce ali zgolj virusno RNA. Koncentriranje virusnih delcev s CIM je bilo prvič dokazano na primeru rastlinskega virusa ToMV (Kramberger in sod., 2004). Uporaba CIM monolitnih kromatografskih nosilcev se je izkazala kot primerna za koncentriranje človeških virusov iz vodnih vzorcev (Gutierrez-Aguirre in sod., 2009a, 2011; Kovač in sod., 2009). Virusi se vežejo na CIM, nato se eluirajo s pufrom z visoko vsebnostjo soli. ToMV, razredčen pod mejo detekcije s testom ELISA, se je s to enokoračno metodo koncentriral in pri tem ostal infektiven. Koncentriranje ToMV na ta način je bilo uspešno tudi pri koncentriranju vzorcev vod iz rek (Boben in sod., 2007). CIM monolitni kromatografski nosilci so primerni tudi za koncentriranje PSTVd (Ruščić in sod., 2013) in PVY (Rupar in sod., 2013). V primerjavi z drugimi metodami za koncentriranje rastlinskih virusov iz vode je omenjena metoda hitrejša in učinkovitejša.

Po koncentriranju virusov v vodi je možna določitev le-teh z različnimi metodami, pogosto s kombinacijo različnih metod, kar omogoča zanesljivejšo določitev virusov v vodah.

2.3.7.2 Biološki testi

Z biološkimi testi dokazujemo infektivne viruse in viroide, ki jih na testnih rastlinah lahko tudi namnožimo. Ugotovimo lahko spekter gostiteljskih rastlin, vendar brez kombinacije z drugimi bolj specifičnimi metodami natančna identifikacija virusa oziroma viroida ni možna. Teoretično je za mehansko okužbo dovolj en sam virusni delec, vendar jih je običajno potrebnih celo več kot 500, da pride do nastanka vidnih bolezenskih znamenj. Razlog za slabo učinkovitost prenosa virusov na testne rastline je najverjetneje v tem, da le majhen del celic povrhnjice poškodujemo tako, da virusi lahko vstopijo v citoplazmo. Uspešnost prenosa virusov in viroidov z mehansko okužbo na testne rastline je odvisna od virusa oziroma viroida (njegove stabilnosti in koncentracije), od občutljivosti testne rastline (genotip, starost rastline v času okužbe) in od razmer za rast (temperatura, svetloba, vlažnost, hranilne snovi v zemlji) (povzeto po Dijkstra in De Jager, 1998; Verhoeven in sod., 2010a).

Rastlinske viruse so v vodah po koncentriranju dokazovali z mehansko okužbo številnih testnih rastlin (Jacobi in Castello, 1991; Pleše in sod., 1996) ali z mehansko okužbo manjšega števila testnih rastlin, na primer z okužbo testne rastline *Chenopodium quinoa* (Tomlinson in sod., 1983; Tomlinson in Faithfull, 1984; Piazzolla in sod., 1986; Koenig in sod., 1989; Fuchs in sod., 1996) ali *C. quinoa* in *Nicotiana clevelandii* (Koenig in Lesemann, 1985) ali *C. amaranticolor*, *C. murale*, *N. tabacum* cv. Samsun in *N. glutinosa* (Tošić M. in Tošić D., 1984) ali *C. quinoa*, *N. benthamiana* in *N. tabacum* var. Xanthi-nc (Büttner in Nienhaus, 1989). Testne rastline so pogosto služile za določanje prisotnosti virusov v vodi ali za namnožitev virusa za poznejšo analizo z drugimi specifičnimi testi (Tomlinson in sod., 1983; Büttner in sod., 1987; Koenig in Lesemann, 1985; Piazzolla in sod., 1986; Büttner in Nienhaus, 1989; Koenig in sod., 1988, 1989, 2004) ali kot potrditvena metoda za preverjanje infektivnosti virusov, izoliranih iz vode (Castello in sod., 1995; Boben in sod., 2007).

2.3.7.3 Določanje virusnih proteinov

Po izolaciji virusov iz vode in namnožitvi v propagacijskih rastlinah so le-te očistili ter določili velikost plaščnega proteina očiščenih virusnih delcev s SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Koenig in sod., 1988; Yi in sod., 1992). Bolj pogosti načini za določanje plaščnega proteina virusov so serološke metode. Vse serološke metode temeljijo na reakciji med antigenom (v tem primeru je to plaščni protein virusa) in za antigen specifičnim protitelesom. Najbolj uveljavljena serološka metoda je encimskoimunski test (ELISA; Enzyme Linked Immunosorbent Assay) v različnih izvedbah (Dijkstra in De Jager, 1998). Primernost testa ELISA za določanje rastlinskih virusov sta prva opisala Clark in Adams (1977). Druge serološke metode za dokazovanje prisotnosti rastlinskih virusov so imunodifuzijski test, precipitacija v gelu, odtis tkiva (Krzymowska in Henning, 1997) in različni hitri diagnostični testi, ki omogočajo dokazovanje virusov v rastlinah tudi na terenu (Salomone in Roggero, 2002; Danks in sod., 2007).

V začetku proučevanja rastlinskih virusov v vodah so po okužbi testnih rastlin z vodo le-te analizirali z različnimi serološkimi metodami (posredno določanje prisotnosti virusov v vodah), na primer z imunodifuzijo ali/in imunoprecipitacijo (Tomlinson in sod., 1983; Tomlinson in Faithfull, 1984; Tošić M. in Tošić D., 1984; Koenig in Lesemann, 1985; Koenig in sod., 1989; Büttner in Nienhaus, 1989; Büttner in sod., 1987; Yi in sod., 1992; Pleše in sod., 1996) in pozneje s testom ELISA (Jacobi in Castello, 1991). Castello in sod. (1995) ter Boben in sod. (2007) so s testom ELISA

prisotnost virusov v koncentrirani vodi določali neposredno (brez predhodne okužbe testnih rastlin).

2.3.7.4 Morfološke metode

Posamezne virusne delce lahko vidimo z elektronsko mikroskopijo (EM). Z EM opazujemo morfologijo (obliko in velikost) virusnih delcev in tako določimo družino virusov, ki ji le-ta pripada. V ta namen se vzorci najpogosteje pripravijo z metodo negativnega kontrastiranja. Ločitev nitastih virusnih delcev od celičnih ostankov je lahka. Težje je ločiti majhne izometrične delce, ki jih lahko zamenjamo z majhnimi celičnimi organeli, na primer ribosomi. EM lahko kombiniramo s specifičnimi serološkimi testi; govorimo o imunski elektronski mikroskopiji (ISEM). Pri metodi ISEM mrežice prekrijemo s protitelesi, ki jih nato inkubiramo z rastlinskim sokom, v katerem iščemo viruse. Na ta način koncentriramo virusne delce. Izboljšava metode ISEM je t. i. dekoracija, kar pomeni, da na mrežici adsorbirane viruse označimo z dodatnim slojem protiteles. Z ISEM vidimo, ali so v vzorcu prisotni specifični virusi, opazimo pa lahko tudi druge viruse, ki so prisotni v rastlinah z mešanimi okužbami. Prednost ISEM pred testom ELISA je predvsem v tem, da imunsko reakcijo vidimo in nas pri interpretaciji rezultatov morebitne nespecifične reakcije protiteles z rastlinskim materialom ali sorodnimi virusi manj motijo (Dijkstra in De Jager, 1989).

Rastlinske viruse so z EM v koncentriranih vzorcih vode opazovali direktno (Tošić M. in Tošić D., 1984; Jacobi in Castello, 1991), v večini primerov pa indirektno s pregledom s koncentrirano vodo mehansko okuženih testnih rastlin (Koenig in Lesemann, 1985; Koenig in sod., 1988; Büttner in sod., 1987; Büttner in Nienhaus, 1989; Jacobi in Castello, 1991; Pleše in sod., 1996). Pleše in sod. (1996) so vzorce pregledali tudi s pomočjo svetlobnega mikroskopa, pri čemer so opazovali celične vključke, ki nastanejo zaradi okužbe z virusi. ISEM so Tomlinson in sod. (1983), Tomlinson in Faithfull (1984), Piazzolla in sod. (1986), Koenig in sod. (1989), Yi in sod. (1992) ter Koenig in sod. (2004) uporabili kot metodo za dokazovanje specifičnih virusov po potrditvi prisotnosti virusov s predhodno opravljenimi testi.

2.3.7.5 Molekularne metode

Z molekularnimi metodami določamo prisotnost nukleinskih kislin, zato so primerne za dokazovanje prisotnosti virusov in viroidov. Molekularna metoda, s katero dobimo največ podatkov o virusnem oziroma viroidnem genomu, je metoda ugotavljanja nukleotidnega zaporedja. Specifične molekularne metode pa delimo v dve skupini:

- hibridizacijske metode: fluorescentna in situ hibridizacija – FISH, hibridizacija odtisa southern (hibridizacija sonde s fragmenti DNA, ki smo jih po ločevanju z agarozno elektroforezo prenesli s kapilarnim prenosom na nosilec), hibridizacija odtisa northern (za analizo vzorcev RNA), hibridizacija točkovnega odtisa (DNA nanese neposredno na nosilec (ni predhodne elektroforeze) in nato hibridiziramo),
- metode pomnoževanja delcev nukleinskih kislin: verižna reakcija s polimerazo (PCR) oziroma RT-PCR in PCR v realnem času (qPCR). Omenjeni metodi se v diagnostiki v zadnjem času zelo uveljavljata, kar velja zlasti za qPCR, ki velja za eno najboljčutljivejših metod in omogoča detekcijo velikega števila vzorcev v kratkem času (Mumford in sod., 2006).

V verižni reakciji s polimerazo pomnožujemo specifični odsek nukleinske kisline (Deng in sod., 1994). Ponavljajoč se proces denaturacije, prileganja in DNA sinteze privede do eksponentialnega pomnoževanja DNA odseka, omejenega z začetnimi oligonukleotidi. Produkt PCR lahko po koncu reakcije odkrijemo na agaroznem ali poliakriamidnem gelu (Newton in Graham, 1994). Če dokazujemo prisotnost RNA virusov ali viroidov, najprej izvedemo reakcijo obratnega prepisovanja (RT), nato še PCR (French in sod., 2001; Dovas in sod., 2002; Hartono in sod., 2003; Verhoeven in sod., 2004; Maroon-Lango in sod., 2005). Produkte PCR lahko nadalje analiziramo z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja in z analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). RFLP temelji na uporabi ustreznih restrikcijskih encimov, ki prepoznajo kratka zaporedja DNA, na katera se vežejo in prekinejo verigi. Razlike v velikosti fragmentov oziroma v restrikcijskih vzorcih, ki jih vidimo na elektroforeznem gelu, omogočajo nadaljnje ugotavljanje virusov (Accotto in sod., 2000). V rastlinski virologiji se uporablja tudi različica PCR, pri kateri virus najprej lovimo na protitelesa (IC – immunocapture) in nato nadaljujemo z RT in PCR (immunocapture RT PCR = IC-RT-PCR). Prednost te metode je, da ni potrebna izolacija RNA (Dijkstra in De Jager, 1998).

Nadgradnja običajne PCR oziroma RT-PCR je PCR oziroma RT-PCR v realnem času (qPCR, RT-qPCR), ki omogoča, v nasprotju z običajno PCR, tudi kvantifikacijo DNA oziroma obratno prepisane RNA ali mRNA. Končna analiza pomnoženih produktov PCR ni potrebna, kajti njihovo nastajanje se spremlja med samim potekom reakcije. S tem se zmanjša možnost kontaminacij po poteku reakcije PCR, do katerih lahko prihaja, kadar analiziramo končne produkte na agaroznih ali poliakrilamidnih gelih. Detekcija nastalih produktov PCR je lahko specifična (TaqMan kemija, molekularna svetila, škorpionski začetni oligonukleotidi, hibridizacijske sonde, svetleče sonde) ali

nespecifična (interkalirajoča barvila, na primer SYBR Green I) (Freeman in sod., 1999; Peters in sod., 2004). PCR v realnem času je zelo občutljiva metoda, s katero lahko dokazujemo nizke koncentracije virusov in viroidov, ki jih pričakujemo, na primer v dormantnih gomoljih krompirja, prenašalcih, zemlji in tudi v vodi (Boonham in sod., 2004; Mumford in sod., 2006; Boben in sod., 2007).

Koenig in sod. (1988) so po namnožitvi virusov iz vode v propagacijskih rastlinah (posredno določanje prisotnosti virusov v vodah) le-te očistili, izolirano virusno RNA pa analizirali s hibridizacijo odtisa northern in s hibridizacijo točkovnega odtisa. Hibridizacijo odtisa northern so uporabili tudi Yi in sod. (1992). Castello in sod. (1995, 1999) so prisotnost ToMV v oblakih, megli in ledu dokazali z RT-PCR in z določanjem nukleotidnega zaporedja produktov PCR. Z RT-PCR in z določanjem nukleotidnega zaporedja produktov PCR so tudi Koenig in sod. (2004) v vodnih virih dokazali prisotnost drugih, neidentificiranih virusov. Gosalvez in sod. (2003) so razvili molekularno metodo RT-PCR za določanje MNSV v rastlinah, v namakalni vodi in v hranilni raztopini. V slednjih dveh je njihov način določanja virusa temeljil na predhodnem koncentriranju vzorca vode, ki so ga izvedli z ultracentrifugiranjem ali s precipitacijo v polietilenglikolu (PEG). Vpeljana metoda RT-PCR se je izkazala za bolj občutljivo (limita detekcije za okužene rastline: 10,2 ng/ml) od specifičnega testa DAS-ELISA (limita detekcije za okužene rastline: 160 µg/ml).

Boben in sod. (2007) so razvili občutljivo, specifično in kvantitativno metodo RT-PCR v realnem času, s katero lahko zaznamo do $4,2 \times 10^{-10}$ mg ml⁻¹ ToMV v namakalnih vodah iz okolja. S predhodnim koncentriranjem virusov s CIM monolitnimi kromatografskimi nosilci so občutljivost testa povečali za več velikostnih razredov (od 1 do 6) (Boben in sod., 2007). Celoten postopek, ki so ga razvili, je preprost, hiter in zelo občutljiv ter ga je mogoče adaptirati za detekcijo drugih rastlinskih virusov pa tudi živalskih in človeških v različnih vodnih virih. qPCR so uporabili tudi za kvantifikacijo PMMoV v koncentriranih vzorcih morske vode (Rosario in sod., 2009b) in v vzorcih vode iz rek (Hamza in sod., 2011).

2.3.7.6 Novejše metode, primerne za določanje virusov in viroidov v vodi

Diagnostični postopki za monitoring vod iz okolja naj bi bili:

- visoko specifični
- zelo občutljivi
- hitri
- primerni za sočasno detekcijo večjega števila vzorcev in tarč

- poceni
- izvedljivi na mestu vzorčenja

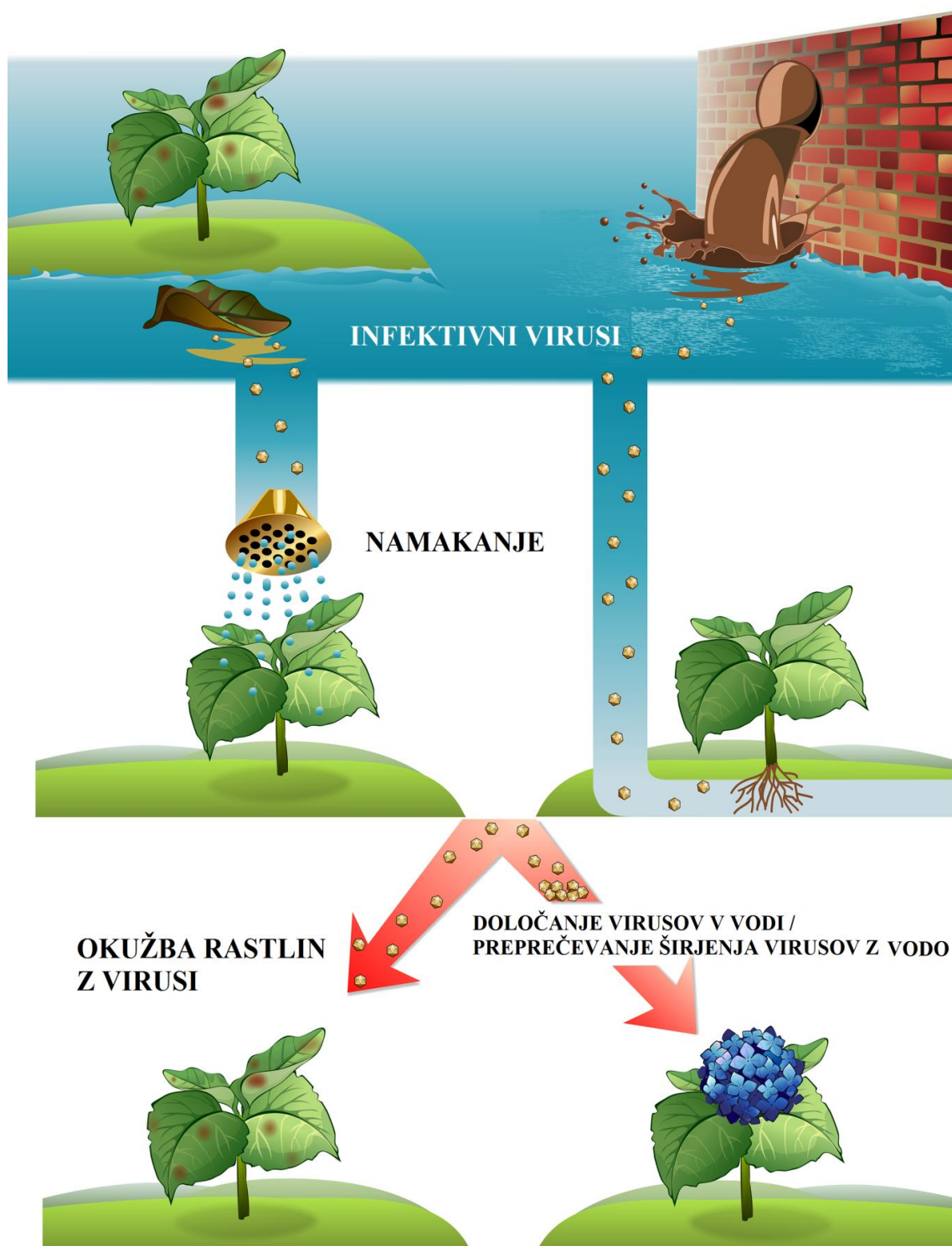
Trenutne metode, ki jih uporabljamo v diagnostiki virusov in viroidov, običajno omogočajo določanje enega ali nekaj (multiplex PCR/qPCR) virusov oziroma viroidov sočasno. Določanje večjega števila rastlinskih povzročiteljev bolezni v eni reakciji bi bilo zelo primerno, saj bi s tem prihranili pri času, potrošnem materialu in kemikalijah, posledično pa bi bila analiza cenejša. To bi lahko dosegli z uporabo mikromrež, novih generacij določanja nukleotidnega zaporedja ali s tehnologijo xMap.

Mikromreže so relativno nova metoda, ki se uporablja v rastlinski virologiji (Boonham in sod., 2007), na primer na rastlinah krompirja (Boonham in sod., 2003), bučnic (Lee in sod., 2003) ter tudi za določanje drugih povzročiteljev bolezni na rastlinah (Bystricka in sod., 2005; Kostrzynska in Bachard, 2006). Na eni sami mikromreži je lahko razporejenih do 30.000 DNA sond (Boonham in sod., 2003). Sonde so nukleotidna zaporedja, specifična za določanje tarče. Mikromreže po izpostavitvi fluorescentno označenim DNA v vzorcu skeniramo in tako ugotavljamo prisotnost različnih tarč v vzorcu (Boonham in sod., 2007). Metoda je za izvedbo relativno zahtevna, in čeprav so jo že poskušali poenostaviti (Bystricka in sod., 2005), je še vedno predraga za uporabo v rutinski diagnostiki.

Van der Vlugt in sod. (2011) so razvili t. i. Luminex xMAP platformo, pri kateri se kombinirajo serološki in molekularni pristopi. S serološkega vidika je ta metoda sorodna metodi ELISA, vendar je mnogo hitrejša, saj jo lahko izvedemo v dveh urah in pri tem ne izgubimo specifičnosti in občutljivosti. Metoda teoretično omogoča sočasno določanje številnih kombinacij različnih virusov v različnih rastlinah (Van der Vlugt in sod., 2011).

Sekvenciranje (določanje nukleotidnega zaporedja) naslednje generacije (NGS) so diagnostične metode, s katerimi lahko hitro določamo različne neznane povzročitelje bolezni na rastlinah (Adams in sod., 2009; Roossinck in sod., 2010). Analize nukleotidnih zaporedij v vzorcu so primerne pri študijah populacije mikroorganizmov, na primer v morju (Breitbart in sod., 2002; Angly in sod., 2006; Culley in sod., 2006), v jezeru (Djikeng in sod., 2009) ter v odpadnih vodah (Rosario in sod., 2009a). Z NGS dobimo milijone nukleotidnih zaporedij (Mardis, 2008; Pop in Salzberg, 2008; Aw in Rose, 2012; Studholme in sod., 2011), zato razvijajo bioinformacijska orodja, ki omogočajo hitrejšo obdelavo dobljenih nukleotidnih zaporedij (Segerman in sod., 2011).

Obstoječe diagnostične metode skušajo tudi poenostaviti, da bi lahko določili povzročitelje bolezni na terenu. S tem bi prihranili čas, ki ga sicer izgubimo pri pošiljanju vzorcev v laboratorij, in tako bi bilo mogoče ukrepe za preprečevanje širjenja povzročiteljev bolezni izvesti hitreje. Za ta namen je treba razviti prenosne aparature in hitre postopke. Gutierrez-Aguirre in sod. (2011) so razvili postopek, primeren za izvedbo na terenu, ki vključuje koncentriranje z uporabo CIM monolitnih kromatografskih nosilcev v kombinaciji z RT-qPCR, ki se izvede v prenosnem cikličnem termostatu (Gutierrez-Aguirre in sod., 2011). Na ta način so na terenu uspešno določali rotaviruse v vzorcih vode. Metoda se lahko adaptira tudi za določanje rastlinskih povzročiteljev bolezni v vodi. V svojem primeru so analize izvedli z aparaturami, ki niso najbolj optimalne za delo na terenu, zato je razvoj primernejših aparatov za delo na terenu, tako za koncentriranje s CIM kot tudi za qPCR, nujen (Gutierrez-Aguirre in sod., 2011). Postopek pomnoževanja nukleinskih kislin pri konstantni temperaturi, na primer pri LAMP (metoda izotermalnega pomnoževanja, posredovanega z zanko, za določanje nukleinskih kislin; loop-mediated isothermal amplification), omogoča pomnoževanje tarčne nukleinske kisline v preprostem termostatu. LAMP se že uveljavlja v humani medicini (Parida in sod., 2008; James in sod., 2010; Nemoto in sod., 2010) in tudi za določanje povzročiteljev bolezni na rastlinah, na primer za viroide (Tsutsumi in sod., 2010; Lenarčič in sod., 2012), genotipe PepMV (Ling in sod., 2013), bakterije (Kubota in sod., 2008; Bekele in sod., 2011; Bühlmann in sod., 2013) in glive (Tomlinson in sod., 2010). Produkte, ki jih dobimo pri LAMP, lahko identificiramo z določanjem temperature taljenja (T_m) ali z uporabo t. i. lateral flow device (James in sod., 2010), s čimer se metoda še bolj poenostavi. LAMP je hitra in za izvedbo preprosta metoda pa tudi manj občutljiva na inhibitorje v vzorcu (Bekele in sod., 2011; Francois in sod., 2011).



Slika 2: Širjenje rastlinskih virusov z vodo (Slika je narisal dr. Zdravko Podlesek) (Mehle in Ravnkar, 2012)

Figure 2: Pathway of waterborne plant viruses (Figure: Dr. Zdravko Podlesek) (Mehle and Ravnkar, 2012)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZOLATI VIRUSOV IN VIROIDOV

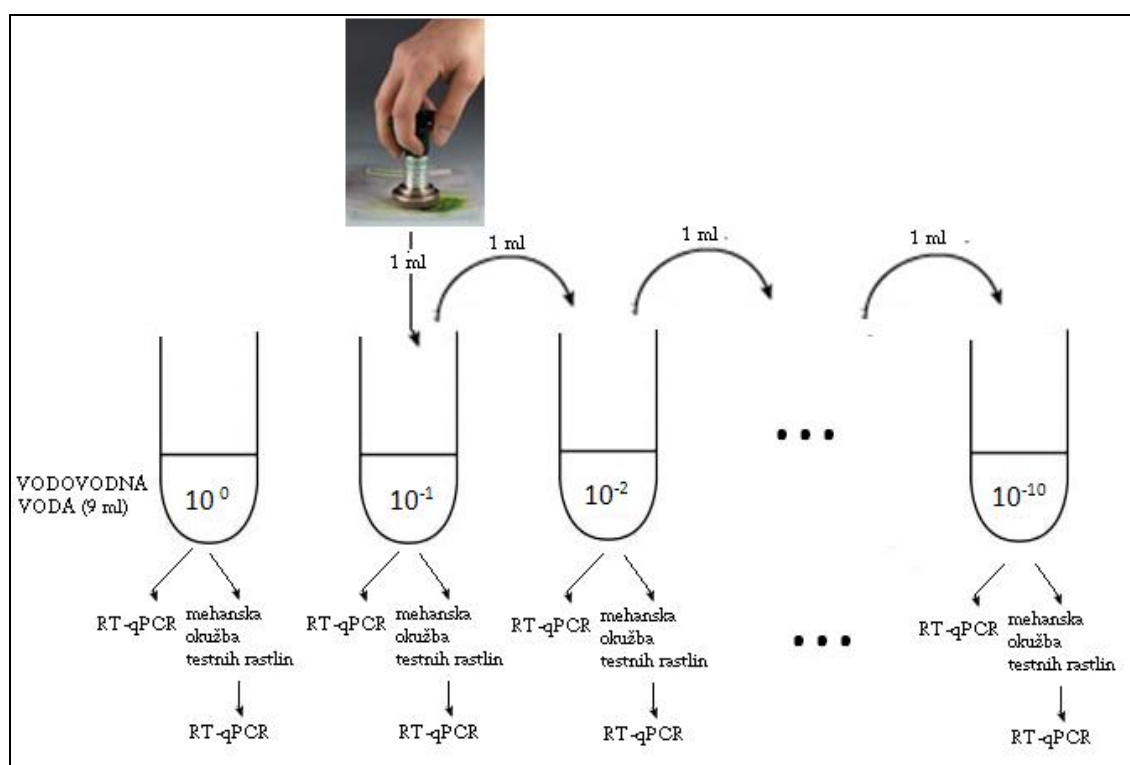
PVY^{NTN} smo pomnoževali v tkivni kulturi stebelnih nodijev rastlin krompirja (*Solanum tuberosum* L.) cv. 'Pentland squire'. PepMV-Ch2 in PSTVd (shranjena pri -20 °C v obliki liofiliziranih okuženih listov) pa smo namnožili na propagacijskih rastlinah (Preglednica 2). Propagacijske rastline smo vzgajali in mehansko okužili, kot je opisano v točki 3.5.1, z razliko v tem, da smo po listih propagacijskih rastlin premazali razredčen okužen rastlinski material. Sok okuženega rastlinskega materiala smo redčili v razmerju 1 : 10 (g : ml) z 20 mM fosfatnim pufrom [1,3 ml raztopine A (3,12 g NaH₂PO₄ x 2H₂O, raztopljene v 100 ml dd vode) in 8,7 ml raztopine B (2,84 g Na₂HPO₄, raztopljene v 100 ml dd vode)] za 100 ml pufra; pH = 7,4), ki je imel dodan 2 % PVP 10.000.

Preglednica 2: Karakteristike izolatov iz poskusa
Table 2: Characteristics of viruses and viroid isolates

Virus /viroid	Oznaka NIB	Izvor – država (ustanova)	Izvor – gostitelj	Oznaka iz tuje zbirke	Ohranjanje materiala na NIB-u	Propagacijske rastline
PepMV-Ch2	NIB V 147	Nizozemska (PRI)	paradižnik	PCH06/104; 22-9-2008	lioofilizirani okuženi listi paradižnika, shranjeni pri -20 °C	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker
PVY ^{NTN}	NIB V 001	Slovenija (NIB)	krompir	/	tkivna kultura stebelnih nodijev rastlin <i>Solanum tuberosum</i> cv. 'Pentland squire'	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley, <i>Solanum tuberosum</i> cv. Igor, <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker
PSTVd	NIB V 095	Anglija (FERA)	ni podatka	16/may/06	lioofilizirani okuženi listi paradižnika, shranjeni pri -20 °C	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker

3.2 UGOTAVLJANJE NAJVEČJE RAZREDČENOSTI PSTVd IN PepMV-CH2 V VODI, DA Z NJO ŠE LAHKO OKUŽIMO TESTNE RASTLINE

V vrečkah za ekstrakcijo z mrežico (Bioreba, Švica) smo pripravili ekstrakta iz listov paradižnika cv. Moneymaker, okuženega s PSTVd oziroma s PepMV-Ch2. Ekstrakt s PSTVd smo pripravili iz svežih listov, ekstrakt s PepMV-Ch2 pa iz listov, zamrznjenih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ekstrakta smo redčili z vodovodno vodo, tako da smo pripravili razredčine od 10^{-1} do 10^{-10} (Slika 3). Vsako razredčino smo analizirali z RT-qPCR ter z njo mehansko okužili liste treh (poskus s PSTVd) oziroma štirih (poskus s PepMV-Ch2) testnih rastlin paradižnika cv. Moneymaker. Za kontrolo smo slepo okužili testne rastline z vodovodno vodo. Pet (poskus s PSTVd) oziroma štiri in šest (poskus s PepMV-Ch2) tednov po mehanski okužbi smo vršičke testnih rastlin analizirali z RT-qPCR, specifičnim za PSTVd oziroma PepMV.



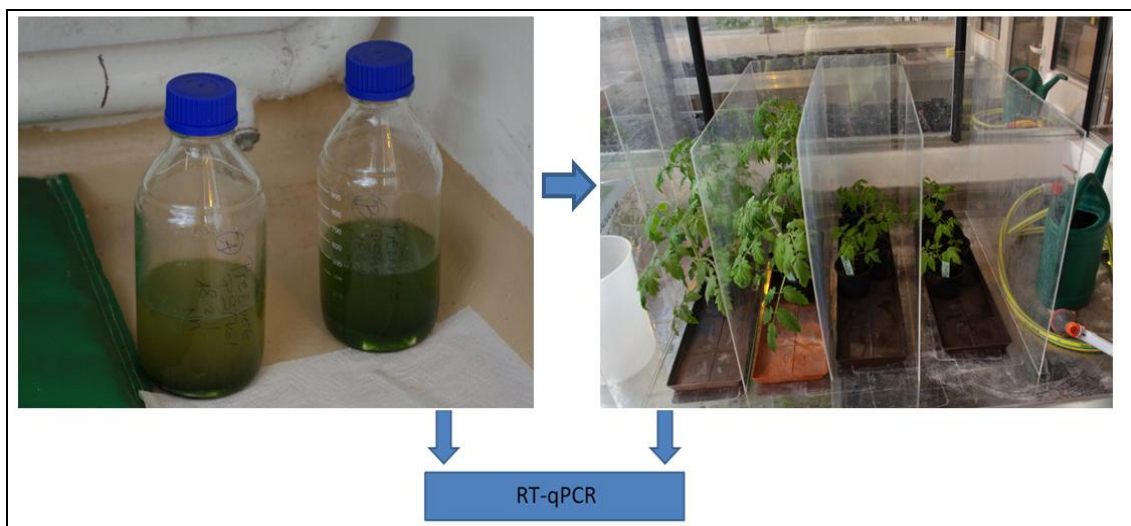
Slika 3: Shematski prikaz poskusa za določanje največje razredčenosti PepMV-Ch2 in PSTVd v vzorcu vode, s katerim še lahko okužimo testne rastline

Figure 3: The scheme of the experiment for determination of the highest dilution of PepMV-Ch2 and PSTVd in water samples that can still infect test plants

3.3 PREVERJANJE PREŽIVETJA PSTVd V VODNEM OKOLJU

11 g listov paradižnika cv. Moneymaker, okuženega s PSTVd, smo narezali na trakove in v 500 ml vodovodne vode mešali na mešalu 2 uri. Po dveh urah mešanja smo rastlinske ostanke precedili čez gazo. Precejeno vodo smo shranili v karantenski rastlinjak (Slika 4) in jo tik pred vsakim tedenskim preverjanjem dobro premešali. Tedensko smo preverjali prisotnost viroidne RNA v vodi z RT-qPCR ter njeno infektivnost z mehansko okužbo štirih testnih rastlin paradižnika cv. Moneymaker. Vršičke testnih rastlin smo pet tednov po mehanski okužbi analizirali z RT-qPCR.

Vzporedno smo pripravili podoben poskus, ki se je od zgoraj opisanega razlikoval zgolj v prvem koraku, in sicer smo v 500 ml vodovodne vode dali okužene liste, zmacerirane v vrečkah za ekstrakcijo (Bioreba, Švica) (Slika 4).



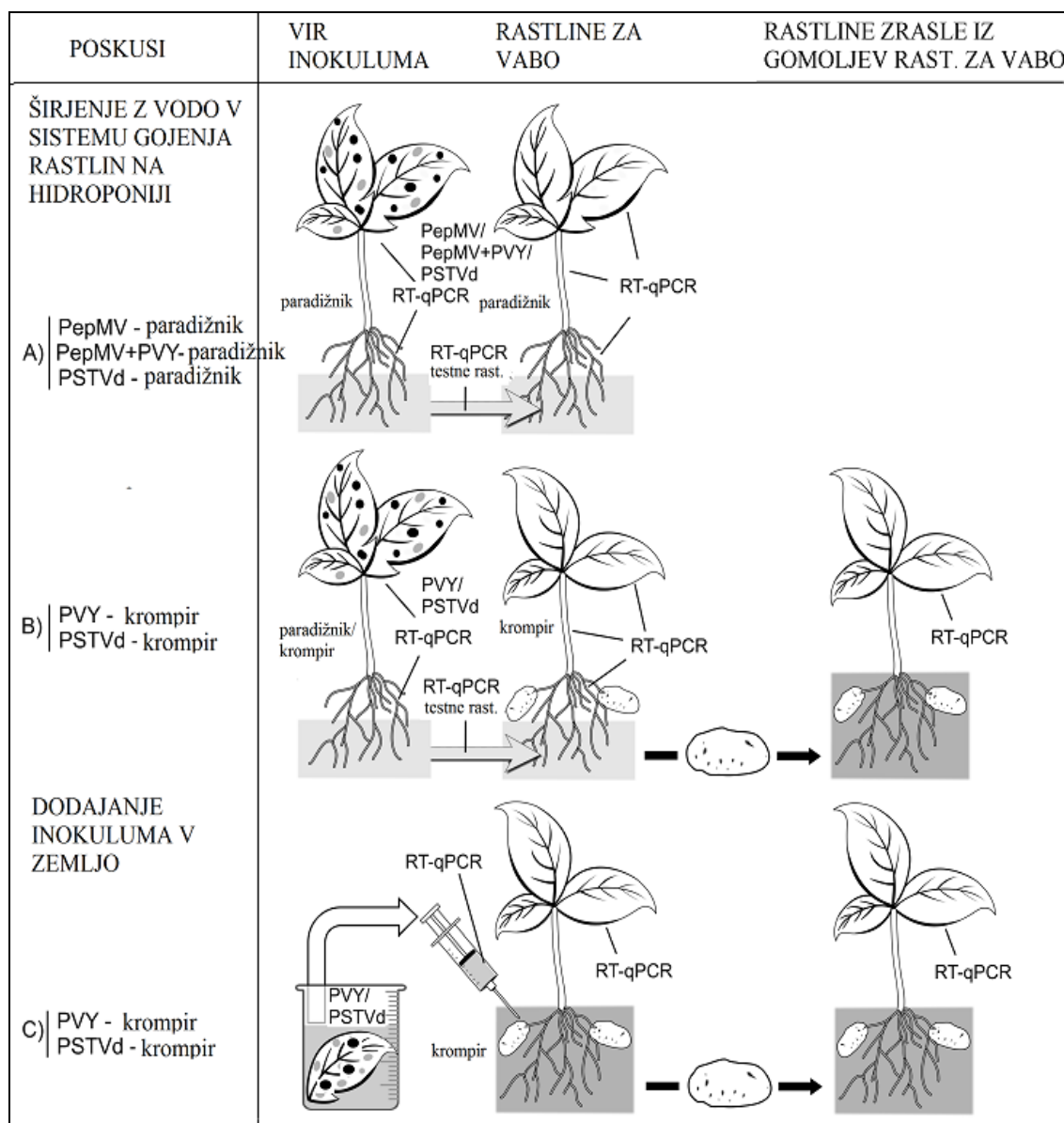
Slika 4: Shematski prikaz poskusa za ugotavljanje preživetja PSTVd v vodi, shranjeni v karantenskem rastlinjaku

Figure 4: The scheme of the experiment of the survival of PSTVd in water stored in a quarantined greenhouse

Levo: okužena voda, shranjena v karantenskem rastlinjaku, peti teden po pripravi (steklenica, označena z A, je iz poskusa, pri katerem smo liste za pripravo okužene vode narezali na trakove; steklenica, označena z B, pa iz poskusa, pri katerem smo liste za pripravo okužene vode strlji v ekstrakcijski vrečki); Desno: testne rastline paradižnika cv. Moneymaker tri tedne po mehanski okužbi (večje rastline) oziroma tik po mehanski okužbi (manjše rastline).

3.4 POSKUSI ŠIRJENJA PSTVd, PepMV-CH2 IN PVY^{NTN} Z VODO

Vse poskuse, s katerimi smo želeli ugotoviti možnost širjenja PSTVd, PepMV in PVY z vodo (Slika 5), smo izvajali v karantenskem rastlinjaku. Razmere rasti v karantenskem rastlinjaku so bile: 22 ± 2 °C v času osvetljevanja in 19 ± 2 °C v času teme; fotoperioda 16 ur svetlobe, 8 ur teme. Za kontrolo nenamerne kontaminacije bodisi z vektorji ali med delom v rastlinjaku smo periodično analizirali zdrave testne rastline z RT-qPCR, ki so bile v rastlinjaku v bližini in sočasno z rastlinami iz poskusa.



Slika 5: Shematski prikaz poskusov širjenja PepMV, PVY in PSTVd z vodo (sliko je narisal dr. Zdravko Podlesek) (Mehle in sod., 2014)

Figure 5: Overview of the water-mediated transmission experimental system (Figure: Dr. Zdravko Podlesek) (Mehle et al., 2014)

3.4.1 Dodajanje inokuluma v zemljo

V zemljo (Archut Fruhstorfer erde® mit vulkanton aus dem Vogelsberg, Nemčija) smo posadili zdrave gomolje krompirja cv. Hermes, Donald in Nicola (rastline za vabo). Za vsak poskus smo posadili štiri gomolje vsake sorte. Vsak gomolj smo posadili v svoj plastični lonec (premer lonca 18 cm). V vsak lonec smo v zemljo z injekcijsko iglo (Sliki 5c in 6) dodajali 120–165 ml sveže pripravljene okužene vode (vir inokuluma). Okuženo vodo smo dodajali dva meseca od posaditve gomoljev, in sicer vsak tretji oziroma četrti (v enem primeru šesti) dan (Priloga F). Ko so gomolji skalili, smo bili pri zalivanju z okuženo vodo zelo previdni, da ni prišla nobena kapljica okužene vode v stik z listi (Slika 6). Gomolje, ki smo jih imeli za kontrolo kontaminacije v rastlinjaku, smo na enak način zalivali z vodovodno vodo.

Okuženo vodo smo pripravili na sledeč način: PSTVd smo namnožili na rastlinah paradižnika cv. Moneymaker, PVY^{NTN} pa na navadnem tobaku cv. White Burley. V vrečkah za ekstrakcijo z mrežico (Bioreba, Švica) smo pripravili ekstrakt iz okuženih listov, ki smo ga razredčili v vodovodni vodi (razmerje redčenja: 0,5 g okuženih listov + 2 l vodovodne vode). Vzorec okužene vode smo vsakič po pripravi analizirali z RT-qPCR.

Dva meseca po začetku poskusa smo analizirali liste zraslih rastlin z RT-qPCR. Novo nastale gomolje smo očistili in presadili v nove lonce z neokuženo zemljo (Sliki 5c in 6). Le-te smo nato zalivali z vodovodno vodo. Rastline, ki so zrasle iz teh novo formiranih gomoljev (v nadaljevanju: rastline zrasle iz gomoljev rastlin za vabo), smo z RT-qPCR analizirali 10, 16 in 22 tednov po presaditvi.



Slika 6: Shematski prikaz poskusa, pri katerem smo inokulum dodajali v zemljo
Figure 6: The scheme of the experimental injection of the inoculum into the substrate

3.4.2 Poskusi v sistemu gojenja rastlin na hidroponijah

Možnost širjenja virusov oziroma viroida z vodo smo proučevali tudi v petih laboratorijskih poskusih gojenja rastlin na hidroponiji (Slika 5ab). Laboratorijske poskuse smo poimenovali po povzročitelju bolezni in po rastlinah, ki smo jih uporabili v poskusu kot vabo: PepMV-paradižnik, PepMV+PVY-paradižnik, PVY-krompir, PSTVd-paradižnik, PSTVd-krompir (Preglednica 3).

Rastline, ki smo jih gojili v poskusu kot vir inokuluma, smo prenesli v akvarij 3. (poskusi: PepMV-paradižnik, PepMV+PVY-paradižnik, PVY-krompir in PSTVd-paradižnik) ali 28. (poskus PSTVd-krompir) dan po mehanski okužbi. Te rastline smo zalivali s svežo, neokuženo hranilno raztopino (Prilogi E in I; Johnson in sod., 1994).

Od 2 do 10 dni po prenosu mehansko okuženih rastlin (vir inokuluma) v akvarij (PVY-krompir: 2 dni; PSTVd-krompir: 5 dni; PSTVd-paradižnik: 6 dni; PepMV-paradižnik in PepMV+PVY-paradižnik: 10 dni) smo v ločen akvarij prenesli zdrave rastline oziroma gomolje, ki smo jih uporabili nato v poskusu kot vabo (Preglednica 3). Rastline paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo, so bile, ko so bile prenesene v akvarij, velike približno 10 cm (4 tedne po sejanju). Rastline krompirja, vzgojene v tkivni kulturi, so bile v akvarij za vabo prenesene štiri tedne po presaditvi v zemljo. V poskusu PSTVd-krompir smo za vabo v akvarij posadili gomolje krompirja. Rastline oziroma gomolje za vabo smo zalivali s hranilno raztopino, ki smo jo pretočili iz akvarija z mehansko okuženimi rastlinami (Sliki 5ab in 7).

Preglednica 3: Pregled poskusov, izvedenih v sistemih, podobnih gojenju rastlin na hidroponiji
 Table 3: Overview of the experimental hydroponic systems

Ime poskusa	Proučevani virus / viroid	Mehansko okužene rastline = vir inokuluma (št.)	Rastline za vabo (št.)	Obdobje namakanja z okuženo hranilno raztopino	Testne rastline, ki smo jih mehansko okužili s hranilno raztopino
PepMV-paradižnik	PepMV-Ch2	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker (6)	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker (6)	5. 8. 2010– 14. 12. 2010	<i>Nicotiana glutinosa</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker, <i>Datura stramonium</i>
PepMV+PVY-paradižnik	PepMV-Ch2 in PVY ^{NTN}	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker (6)	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker (6)	5. 8. 2010– 14. 12. 2010	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker, <i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley
PVY-krompir	PVY ^{NTN}	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Igor – rastline iz tkivne kulture (6)	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Igor – rastline iz tkivne kulture (6)	4. 2. 2011– 15. 6. 2011	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley
PSTVd-paradižnik	PSTVd	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker (6)	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker (6)	2. 2. 2011– 13. 6. 2011	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker
PSTVd-krompir	PSTVd	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Moneymaker (6)	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Hermes (4), Donald (4), Nicola (4) – gomolji	18. 7. 2012– 20. 11. 2012	/



Slika 7: Pretakanje hranilne raztopine iz akvarija z mehansko okuženimi rastlinami (vir inokuluma) v akvarij z zdravimi rastlinami / gomolji (rastline za vabo)

Figure 7: Watering of bait plants/ tubers using the nutrient solution from the tank with the inoculated plants (the source of the inoculum)

Na sliki je poskus PSTVd-krompir 15. dan po začetku okuževanja s hranilno raztopino.

Pred prenosom rastlin v akvarij smo s korenin z vodovodno vodo sprali delce zemlje. V akvariju (material akvarija: steklo; dimenzije: 0,6 x 0,4 x 0,4 m) so bile rastline posajene v mineralno volno (Schiedel, UK), ki je bila položena v plastične lonce s premerom 10 cm. Pri sajenju gomoljev v akvarij je bila mineralna volna dodana na dno plastičnega lonca, gomolji pa so bili posajeni v zemljo. Poskus je bil zasnovan tako, da je bilo dotikanje med rastlinami za vabo in mehansko okuženimi rastlinami popolnoma onemogočeno. Preprečen je bil tudi kontakt med hranilno raztopino in zelenim delom rastlin, in sicer s stiroporom (širina stiropora: 3 cm; v akvarij je bil položen na višino približno 3 cm nad dnom) (Slika 7). Hranilno raztopino smo iz akvarija z mehansko okuženimi rastlinami prečrpavali preko cevi neposredno do korenin rastlin, ki so služile za vabo. Občasno smo rahlo, s stekleno palčko ali z roko, ranili korenine rastlin v poskusu, da bi tako posnemali razmere v pravem sistemu gojenja rastlin na hidroponiji, kjer do ranitev pride bodisi zaradi rasti korenin skozi substrat ali zaradi organizmov v sistemu. Rast alg v hranilni raztopini smo preprečili tako, da smo spodnji del akvarija ovili v aluminijasto folijo. S pregledom naključno izbranih vzorcev korenin (Priloga N) s svetlobnim mikroskopom (Zeiss) smo potrdili odsotnost glivnih spor, na primer glive iz rodov *Olpidium* ali *Pythium*, ki okužujejo korenine rastlin.

Periodično smo z RT-qPCR analizirali hranilno raztopino in različne dele rastlin iz poskusa (Slika 5ab), nekatere vzporedno tudi s testom ELISA (Priloga Č in D). Infektivnost hranilne raztopine smo preverjali z mehansko okužbo testnih rastlin (Preglednica 3). Periodično smo analizirali tudi svežo hranilno raztopino (Priloga I) ter številne testne rastline, ki smo jih imeli v rastlinjaku sočasno z rastlinami iz poskusa (Priloga J), da bi tako preverili morebitne kontaminacije.

Na koncu poskusa PVY-krompir in PSTVd-krompir smo gomolje, ki so v času trajanja poskusa zrasli na rastlinah, ki smo jih uporabili kot vabo, osušili in posadili v neokuženo zemljo (Slika 5b). Podobno smo tudi očiščena in osušena semena, ki so nastala v plodovih poskusa PSTVd-paradižnik, po desetih mesecih hranjenja v hladilniku posejali v svežo zemljo. Od 10 do 17 tednov po sejanju semen paradižnika oziroma sajenju gomoljev krompirja smo zrasle rastline (rastline zrasle iz semen/gomoljev rastlin za vabo) analizirali z RT-qPCR.

3.5 DIAGNOSTIČNE METODE

3.5.1 Mehanska okužba testnih rastlin

Zdrave testne rastline, ki smo jih potrebovali za preverjanje infektivnosti virusov / viroidov v vzorcih vode, smo vzgajali v rastni komori pri temperaturi 20 ± 2 °C v času osvetljevanja in 18 ± 2 °C v času teme. Osvetljevali smo jih z žarnicami Osram L36/W77, ki imajo gostoto pretoka fotonov $120\text{--}150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, in fotoperiodo regulirali na 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Relativna zračna vlaga v komori je bila 75 ± 2 %. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo. Posajene so bile v zemlji (Archut Fruhstorfer erde® mit vulkanton aus dem Vogelsberg, Nemčija).

Dva ali tri liste primerno starih rastlin (v stadiju od treh do štirih razvitih listov) smo naprašili s karborundom (0,062 mm, VWR International Prolado) in nato po njem premazali vzorec vode. Za kontrolo smo mehansko okužili testne rastline z vodovodno vodo. Zaradi možnih razlik v občutljivosti rastlin smo vedno okužili najmanj dve testni rastlini iste vrste. Karborund služi za ranitev rastline in skozi drobne rane, ki jih naredimo na ta način, lahko virus prodre v celico. Po 5 – 10 minutah smo rastline dobro sprali z vodo.

Mehansko okužene rastline smo prenesli v karantenski rastlinjak. Razmere rasti v karantenskem rastlinjaku so bile: 22 ± 2 °C v času osvetljevanja in 19 ± 2 °C v času teme; fotoperioda 16 ur svetlobe, 8 ur teme. Štiri do pet tednov po mehanski okužbi smo opazovali pojavljanje sprememb na rastlinah ter jih nato analizirali z molekularnimi in/ali serološkimi testi, ki so opisani v nadaljevanju. Analizirali smo mlajše liste v vršičku (liste, ki so se razvili po mehanski okužbi).

3.5.2 Serološke metode

3.5.2.1 ELISA

Vzorci rastlin smo analizirali z dvojnimi sendvič encimskoimunskim testom (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay; DAS-ELISA) s specifičnimi protitelesi za določanje PepMV (PRIME Diagnostics, Nizozemska) ali PVY (kataloška številka primarnih in konjugiranih protiteles: 112511 in 112521; Bioreba, Švica), pri čemer so bila sekundarna protitelesa konjugirana z alkalno fosfatazo. Vzorce smo trli v ekstrakcijskem pufru (Priloga A) v U-vrečkah za

ekstrakcijo z mrežico (Bioreba, Švica). Za substrat smo uporabljali p-nitrofenil fosfat (Loewe Biochemica, D-82054) v koncentraciji 1 mg/ml. Razredčene vzorce, protitelesa in substrat smo na mikrotitrne ploščice dodajali po 200 μ l v vsako luknjico. Vse vzorce smo na ploščico nanašali v dveh ponovitvah. Za negativno kontrolo smo uporabili ustrezna tkiva zdravih rastlin. Za kontrolo testa smo nanašali še pufer in pozitivno kontrolo. Namesto vzorcev in protiteles smo v robne luknjice nanašali bidestilirano vodo (kontrola ozadja). Mikrotitrne ploščice (Greiner F, Greiner Bio One) smo med inkubacijami pokrivali s prazno mikrotitrsko ploščico. Nevezana protitelesa in vzorce smo po inkubacijah spirali s spiralnikom za ELISA-ploščice (Tecan 96PW). Optično gostoto smo odčitavali z ELISA-čitalnikom Tecan SunriseTM, s programom MagellanTM, pri valovni dolžini 405 nm. Za pozitiven prag smo določili dvakratno vrednost ustrezne negativne kontrole. Vzorce z optično gostoto nad pragom smo označili kot pozitivne, vzorce z optično gostoto pod pragom pa kot negativne. Vzorce, katerih optična gostota ni dosegla praga, a je bila od ustreznih vrednosti negativnih kontrol višja za 1,5, smo označili kot sumljive. Sestava uporabljenih pufrov je navedena v poglavju Priloge (Priloga A). Shematski prikaz izvedbe testa ELISA, vključno s časom in temperaturo inkubacije ter razredčinami protiteles in vzorcev, je v poglavju Priloge (Priloga B).

3.5.2.2 Hitri diagnostični testi

Namnožitev PepMV in PVY v propagacijskih rastlinah smo preverili s hitrim serološkim diagnostičnim testom proizvajalca Forsite Diagnostics (York, UK). Analize smo izvedli po navodilih proizvajalca.

3.5.3 Molekularne metode

3.5.3.1 Izolacija RNA iz rastlinskega materiala

Izolacijo celokupne RNA iz rastlinskega materiala smo izvedli s kompletom RNeasy Plant Mini Kit po nekoliko spremenjenih navodilih proizvajalca (Qiagen, ZDA). Spremembe so bile sledeče: k približno 200 mg rastlinskega materiala smo dodali 900 μ l RLT ekstrakcijskega pufra, merkptoetanol pa nismo dodali. Vzorec smo strli s pomočjo aparature Fast prep v epicah z matriksom (kremenčev pesek in keramična kroglica). Vzorec smo v RLT pufu po homogenizaciji inkubirali 3 min pri 56 °C. Na koncu smo RNA izprali dvakrat s 50 μ l (skupno 100 μ l) vode, ki smo jo predhodno

segreli na 65 °C. Vodo smo pred centrifugiranjem inkubirali na koloni 5 min. Pri vsaki izolaciji smo vključili vsaj eno negativno kontrolo izolacije (NKI; Priloga G). NKI je kontrola kontaminacije med postopkom izolacije. Izolacijo za NKI smo izvajali vzporedno in na enak način kot za vzorce. Razlika je bila le v tem, da smo namesto rastlinskega materiala v postopek izolacije vključili le pufer. Izolirano RNA smo shranili pri –20 °C do poteka analize. Pred analizo smo izolirano RNA 10-krat redčili v vodi, da bi preprečili vpliv inhibitorjev. V vseh korakih smo uporabili vodo brez RNaz.

3.5.3.2 Izolacija RNA iz vzorcev vode

Izolacijo celokupne RNA iz vzorcev vode smo izvedli s kompletom QIAamp Viral RNA mini kit po nekoliko spremenjenih navodilih proizvajalca (Qiagen, ZDA; Gutierrez-Aguirre in Ravnikar, 2011). V 200 µl vodnega vzorca smo pred izolacijo dodali RNA luciferazo (LUC) (2 ng na vzorec), ki je služila za zunanjo kontrolo izolacije. Pri vsaki izolaciji smo vključili vsaj eno NKI (Priloga H). Izolirano RNA smo shranili pri –20 °C do poteka analize. Analizirali smo nerazredčeno RNA.

3.5.3.3 Obratno prepisovanje in PCR v realnem času v enem koraku

Obratno prepisovanje in PCR v realnem času (RT-qPCR) smo izvajali v enem koraku s kemikalijami kita AgPath-ID™ One-Step RT-PCR mix (Ambion, ZDA). Z RT-qPCR smo analizirali izolirano RNA, da bi preverili prisotnost PVY, PepMV in PSTVd z oligonukleotidnimi začetniki in sondami, navedenimi v Preglednici 4. V istih vzorcih, pri katerih smo analizirali prisotnost virusov oziroma viroida, smo obenem ugotavljali še gen za citokrom oksidazo (COX) oziroma RNA luciferaze (LUC), zaradi kontrole uspešnosti ekstrakcije RNA. COX je rastlinski gen in kot tak pomeni interno kontrolo (Preglednica 4).

Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki in sonde za analizo vzorcev z RT-qPCR
Table 4: Primers and probes used in the RT-qPCR

Tarča	Namen	Koncentracija smiselnega / protismiselnega začetnika / sonde	Vir informacij
PSTVd	določanje PSTVd	900 nM / 900 nM / 200 nM	Boonham in sod., 2004
	potrditev dvomljivih rezultatov z amplikonom, univerzalnim za pospiviroide	300 nM, 300 nM / 300 nM, 300 nM / 100 nM, 100nM	Monger in sod., 2010
PVY	določanje PVY s PVYuni amplikonom	300 nM / 300 nM / 150 nM	Kogovšek in sod., 2008
PepMV	določanje PepMV	200 nM, 200 nM / 200 nM, 200 nM / 400 nM	Ling in sod., 2007
	potrditev dvomljivih rezultatov z amplikonom Eur-cp ali Ch2&US2-cp	900 nM / 900 nM / 200 nM	Gutierrez-Aguirre in sod., 2009b
Citokrom oksidaza (COX)	kontrola ekstrakcije za vzorce rastlin	900 nM / 900 nM / 200 nM	Boonham in sod. (2003) [modificirano po Weller in sod. (2000)]
RNA luciferaze (LUC)	kontrola ekstrakcije za vzorce vode	1000 nM / 1000 nM / 500 nM	Toplak in sod., 2004

Končni volumen RT-qPCR je bil 10 µl. Sestava reakcijske mešanice je navedena v poglavju Priloge (Priloga C). Po 8 µl pripravljene reakcijske mešanice smo nanesti na optično ploščico s 384 luknjicami (Applied Biosystems, ZDA) in v vsako reakcijo pomnoževanja dodali 2 µl RNA. Vsak vzorec smo na ploščico nanesti v treh ponovitvah. V prvo in zadnjo reakcijsko mešanico smo namesto RNA dodali sterilno vodo, ki je služila kot kontrola kontaminacije (NTC; no template control). Poleg vzorcev in NTC smo v analizo vedno vključili tudi negativno kontrolo izolacije (NKI) in pozitivno kontrolo PCR (PK).

Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo, centrifugirali pri 1000 g 2 min in jo vstavili v detektor ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA). Aparatura ABI PRISM[®] 7900 je v osnovi sestavljena iz aparature za PCR in iz sistema za zaznavanje nastajajočih produktov PCR.

RT reakcija in pomnoževanje specifičnega odseka nukleotidnega zaporedja sta potekala po standardnem protokolu:

- 10 min, 48 °C (obratno prepisovanje RNA v cDNA)
- 10 min, 95 °C (aktivacija polimeraze)
- 45 ciklov:
 - 15 s, 95 °C (denaturacija DNA)
 - 1 min, 60 °C (vezava začetnih oligonukleotidov in prepisovanje DNA verige)

PCR v realnem času smo analizirali z računalniškim programom SDS 2.3 (Applied Biosystems, ZDA). Program je izrisal graf pomnoževanja produkta PCR, na katerem je bilo na os x nanoseno število ciklov PCR in na os y vrednosti ΔRn . Pri tem velja, da je

$$\Delta Rn = Rn^+ - Rn^- \quad \dots (1)$$

pri čemer je Rn^+ emisija fluorescence produkta v določenem času in Rn^- emisija pasivnega referenčnega barvila ROX. Med začetnimi cikli pomnoževanja vrednosti ΔRn niso presegle fluorescence ozadja. Vrednost Cq smo v programu SDS določili po avtomatski nastavitvi bazne linije (vrednost cikla pred dvigom fluorescence nad vrednost ozadja) in ročni nastavitvi vrednosti praga v eksponentnem območju pomnoževanja (0,8 za amplikon PSTVd in 0,2 za vse druge amplikone). Cq (threshold cycle) je cikel, pri katerem ΔRn preseže nastavljeni prag. Vrednost Cq je obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNA. Vrednosti Cq smo prenesli v program Microsoft Excel, v katerem smo izračunali povprečne vrednosti Cq . Vzorce smo ovrednotili kot pozitivne, kadar smo odčitali, da so vrednosti Cq manjše od 40 v vsaj dveh paralelkah od treh. Pripravili smo redčitvene vrste obeh virusov in viroida v vodi, koreninah in listih za določitev meje detekcije (Priloge K-M). Glede na rezultate analiz z RT-qPCR, za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA (Priloge K-M), bi bil lahko pozitiven prag višji, razen za analize prisotnosti PSTVd v vzorcih vode in hranilne raztopine. Za negativne kontrole PCR v nobenem primeru nismo odčitali signala (undetermined – ni bilo pomnoževanja). Z upoštevanjem, da je pozitiven prag vrednost Cq manjša od 40 v vsaj dveh paralelkah od treh, so vse negativne kontrole poskusov (sveža hranilna raztopine in zdrave testne rastline, ki so bile v rastlinjaku v bližini in sočasno z rastlinami iz poskusa) ustrezne - negativne (Priloge I in J). V primeru suma na kontaminacijo pri izolaciji PCR (signal za negativno kontrolo izolacije nad mejo detekcije) smo analize za sumljive vzorce ponovili (Priloge G-H).

Relativno količino virusa oziroma viroida smo zaradi lažje interpretacije nekaterih rezultatov ocenili z izračunom razlike med vrednostma C_q za COX oziroma za LUC in za virus ter jih antilogaritmirali. Vrednosti C_q amplikona COX so med vzorci zelo variirale, kar smo pričakovali, saj za izolacijo RNA nismo natančno tehtali vzorcev. Ker se je izražanje COX med različnimi vzorci izkazalo kot stabilno (Baebler in sod., 2009; Hren in sod., 2009), pričakujemo, da je tako tudi v različnih tkivih, in lahko COX uporabimo kot normalizator (Kogovšek in sod., 2011). Za vodne vzorce smo kot normalizator uporabili LUC, ki smo jo dodajali vedno v enaki količini v enak volumen vzorca. Na ta način smo ocenili, koliko je v vzorcu virusne ali viroidne RNA relativno glede na količino COX oziroma LUC.

4 REZULTATI

Izvedli smo poskuse, pri katerih smo ugotavljali, kakšna je največja razredčenost PepMV-Ch2 in PSTVd v vodi, da z njo še lahko okužimo testne rastline (glej 4.1). Nato smo preverili, ali lahko PSTVd v vodnem okolju pri pogojih, primernih za rast rastlin, preživi (glej 4.2). Možnost širjenja PSTVd, PepMV-Ch2 in PVY^{NTN} z vodo smo ugotavljali v različno zasnovanih poskusih (Slika 5): ugotavljali smo, ali se lahko rastline okužijo s PVY^{NTN} in s PSTVd, če dodajamo okuženo vodo v zemljo (glej 4.3.1) ter ali se lahko PSTVd, PepMV-Ch2 in PVY^{NTN} širijo s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji (glej 4.3.2). Večino tu prikazanih rezultatov smo objavili v Mehle in sod. (2014).

4.1 NAJVEČJA RAZREDČENOST PSTVd IN PepMV-CH2 V VODI, DA Z NJO ŠE LAHKO OKUŽIMO TESTNE RASTLINE

Določili smo največjo razredčenost PSTVd in PepMV-Ch2 v vodi, da z njo še lahko mehansko okužimo testne rastline. RT-qPCR je v primerjavi z biološkim testom bolj občutljiv (Preglednica 5). Z RT-qPCR, specifičnim za PSTVd, smo pozitiven signal odčitali do razredčine 10^{-8} , medtem ko je bila mehanska okužba testnih rastlin uspešna do razredčine 10^{-3} . Pri razredčini 10^{-3} je bila povprečna vrednost Cq vodnega vzorca za PSTVd 28. PepMV-Ch2 smo z RT-qPCR zaznali do razredčine 10^{-10} , z biološkim testom pa nedvoumno do razredčine 10^{-2} , pri čemer je bila povprečna vrednost Cq vodnega vzorca za PepMV 16. Šest tednov po mehanski okužbi testnih rastlin smo prisotnost PepMV dokazali tudi v rastlinah, okuženih z razredčinama 10^{-3} in 10^{-4} , vendar so rezultati teh analiz vprašljivi, saj so se nekateri listi teh rastlin, v obdobju med petim in šestim tednom po mehanski okužbi, dotikali listov rastlin, ki so bile okužene z razredčino 10^{-2} . Glede na kratek čas po okužbi (6 tednov) in glede na poskus na hidroponiji, kjer smo rastline za vabo okužili s hranilno raztopino, ki je imela Cq 26–29 (glej Prilogo X), lahko sklepamo, da so se rastline okužile z inokulumom.

Preglednica 5: Primerjava možnosti določanja prisotnosti PepMV-Ch2 in PSTVd z RT-qPCR ter z biološkim testom

Table 5: RT-qPCR *versus* biological assay for the detection of PepMV-Ch2 and PSTVd

Razred- čina inokuluma	PepMV-Ch2		PSTVd	
	RT-qPCR ^a	Biološki test ^b : analiza testnih rastlin z RT-qPCR štiri / šest tednov po okužbi	RT-qPCR ^a	Biološki test ^b : analiza testnih rastlin z RT-qPCR pet tednov po okužbi
10 ⁻¹ x	+ (13)	+ (14) / nt ^f	+ (21)	+ (20) ^{de}
10 ⁻² x	+ (16)	+ (15) / nt ^f	+ (24)	+ (19) ^e
10 ⁻³ x	+ (19)	- / + (26) ^{cg}	+ (28)	+ (19) ^e
10 ⁻⁴ x	+ (23)	- / + (30) ^{cg}	+ (31)	-
10 ⁻⁵ x	+ (26)	- / -	+ (33)	-
10 ⁻⁶ x	+ (29)	- / -	+ (34)	-
10 ⁻⁷ x	+ (32)	- / -	+ (36)	-
10 ⁻⁸ x	+ (33)	- / -	+ (39)	-
10 ⁻⁹ x	+ (33)	- / -	-	-
10 ⁻¹⁰ x	+ (38)	- / -	-	-
Voda	-	- / -	-	-

nt – ni testirano; – negativno; + pozitivno (pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne vrednosti C_q treh paralelk). Vrednosti ^aC_q za kontrolo izolacije RNA (LUC) so v Prilogah X in Y; vrednost ^bC_q za kontrolo izolacije RNA (COX) je bila med 15 in 21; ^cpozitiven rezultat je vprašljiv zaradi dotikanja nekaterih listov z rastlinami, okuženimi z razredčino 10⁻²; ^drezultat analize tri tedne po okužbi; ^erastline so bile manjše od neokuženih rastlin; ^fjasno vidni mehurji na listih rastlin; ^gna listih rastlin komaj opazne izbokline.

4.2 PREŽIVETJE PSTVd V VODNEM OKOLJU

V vodi, ki je shranjena pri temperaturi 20 ± 4 °C, lahko PSTVd preživi do sedem tednov (Preglednica 6). V poskusu A (listi, narezani na trakove) in v poskusu B (listi, strti v ekstrakcijski vrečki) smo pripravili okuženo vodo, v kateri je bilo dovolj PSTVd za uspešno mehansko okužbo testnih rastlin (Preglednica 6; časovna točka 0 tednov po pripravi okužene vode).

Infektivnost vode iz poskusa B smo potrdili prvi in drugi teden po hranjenju v karantenskem rastlinjaku. Tretji, četrti in šesti teden ni bila potrjena, vendar potrditev infektivnosti peti in sedmi teden po začetku poskusa kaže na to, da lahko PSTVd v vodi preživi vsaj do sedem tednov. Prvi, drugi in sedmi teden je bila infektivnost vode potrjena z vsemi štirimi testnimi rastlinami, peti teden pa le z dvema od štirih (Preglednica 6). S PSTVd okužene rastline so bile praviloma manjše od neokuženih rastlin (Slika 8).

Uspešnost okužbe s PSTVd je bila v poskusu A bistveno slabša kot v poskusu B (Preglednica 6). Infektivnost vode iz poskusa A smo potrdili le z eno od štirih testnih rastlin četrti teden po hranjenju v karantenskem rastlinjaku.

Preglednica 6: Preživetje PSTVd v vodi na temperaturi 20 ± 4 °C
 Table 6: The survival of PSTVd in water at 20 ± 4 °C

Št. tednov po pripravi okužene vode	Poskus A (listi, narezani na trakove)		Poskus B (listi, strti v ekstrakcijski vrečki)	
	Detekcija v vodi z RT- qPCR ^a	Infektivnost (št. okuženih rastlin / št. vseh analiziranih rastlin) ^b	Detekcija v vodi z RT- qPCR ^a	Infektivnost (št. okuženih rastlin / št. vseh analiziranih rastlin) ^b
0	+ (18)	+ (4 (16–18) / 4	+ (16)	4 (15–17) / 4
1	+ (23)	0 / 4	+ (20)	4 (17–34) / 4
2	+ (23)	0 / 4	+ (19)	4 (16–20) / 4
3	+ (22)	0 / 4	+ (20)	0 / 4
4	+ (22)	1 (35) / 4	+ (21)	0 / 4
5	+ (22)	nt	+ (21)	2 (15–26) / 4
6	+ (23)	0 / 4	+ (22)	0 / 4
7	+ (24)	0 / 4	+ (22)	4 (16–30) / 4
8	+ (24)	0 / 4	+ (24)	0 / 4
9	+ (24)	0 / 4	+ (23)	0 / 4
10	+ (25)	0 / 4	+ (24)	0 / 4
11	+ (24)	0 / 4	+ (25)	0 / 4
12	+ (26)	0 / 4	+ (25)	0 / 4
Negativna kontrola	–	0 / >4	–	0 / >4

nt – ni testirano; – negativno; + pozitivno (pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne vrednosti C_q treh paralelk). Vrednosti ^aC_q za kontrolo izolacije RNA (LUC) so v Prilogi Y; ^brastline so bile analizirane z RT-qPCR (vrednost C_q za kontrolo izolacije RNA (COX) je bila med 15 in 21).



Slika 8: Rastline paradižnika štiri tedne po mehanski okužbi z vodo, okuženo s PSTVd, ki je bila shranjena pri temperaturi 20 ± 4 °C en teden. Levo: rastline, mehansko okužene z vodo iz poskusa B (manjše rastline – v vršičkih rastlin smo dokazali prisotnost PSTVd); desno: rastline, mehansko okužene z vodo iz poskusa A (večje rastline – v vršičkih le ene rastline smo dokazali prisotnost PSTVd).

Figure 8: Tomato plants four weeks after mechanical inoculation with PSTVd-infested water that was stored one week at 20 ± 4 °C. Left: plants from the experiment B (PSTVd infected); right: plants from the experiment A (only one plant was infected with PSTVd).

4.3 MOŽNOST ŠIRJENJA PSTVd, PepMV-CH2 IN PVY^{NTN} Z VODO

4.3.1 Okužba rastlin s PVY^{NTN} in s PSTVd v primeru dodajanja okužene vode v zemljo

Gomolji, ki se razvijejo na rastlinah krompirja, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd, so lahko vir novih okužb. Možnosti okužbe rastlin s PVY^{NTN} v poskusu, ko smo dodajali okuženo vodo v zemljo, nismo potrdili (Preglednica 7).

Povprečna vrednost Cq inokuluma, ki smo ga dodajali v zemljo, je bila za PVY 20, za PSTVd pa 24 (podrobni rezultati analiz vzorcev inokuluma so v Prilogi F). Dva meseca po začetku zalivanju z okuženo vodo v zraslih nadzemnih delih rastlin krompirja (rastline za vabo; Slika 5c) z RT-qPCR nismo dokazali ne okužbe s PVY^{NTN} in ne s PSTVd (Preglednica 7). Na rastlinah tudi nismo opazili bolezenskih znamenj (Slika 9).

Preglednica 7: Prisotnost PSTVd / PVY^{NTN} v rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd / PVY^{NTN}, in v rastlinah, zraslih iz gomoljev teh rastlin

Table 7: The presence of PSTVd / PVY^{NTN} in plants grown in substrate treated with PSTVd / PVY^{NTN}-infested water, and in secondary plants germinated from tubers

Inokulum (Cq ^a)	Rastline za vabo			Rastline zrasle iz gomoljev rastlin za vabo (št. okuženih rastlin / št. zraslih rastlin) ^c		
	Kultivar posajenih gomoljev krompirja (št.)	Okužba nadzemnih delov ^b	Št. zraslih gomoljev	10 tednov po saditvi	16 tednov po saditvi	22 tednov po saditvi
PVY ^{NTN} (20)	Hermes (4)	–	13	0 / 0	0 / 4	0 / 4
	Donald (4)	–	22	0 / 4	0 / 9	0 / 9
	Nicola (4)	–	15	0 / 4	0 / 6	0 / 6
PSTVd (24)	Hermes (4)	–	16	0 / 1	0 / 4	0 / 4
	Donald (4)	–	11	0 / 2	3 (18–31) / 6	nt
	Nicola (4)	–	19	0 / 3	2 (17–31) / 5	nt
Negativna kontrola	Hermes (1)	–	5	0 / 0	0 / 2	nt
	Donald (1)	–	7	0 / 3	0 / 3	nt
	Nicola (1)	–	2	0 / 1	0 / 1	nt

nt – ni testirano; – negativno. ^apovprečen rezultat analize vzorcev inokuluma z RT-qPCR (Priloga F); ^brezultat analize z RT-qPCR dva meseca po začetku poskusa; ^canalizirani listi z RT-qPCR (pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne vrednosti Cq treh paralelk; vrednost Cq za kontrolo izolacije RNA (COX) je bila med 15 in 21).

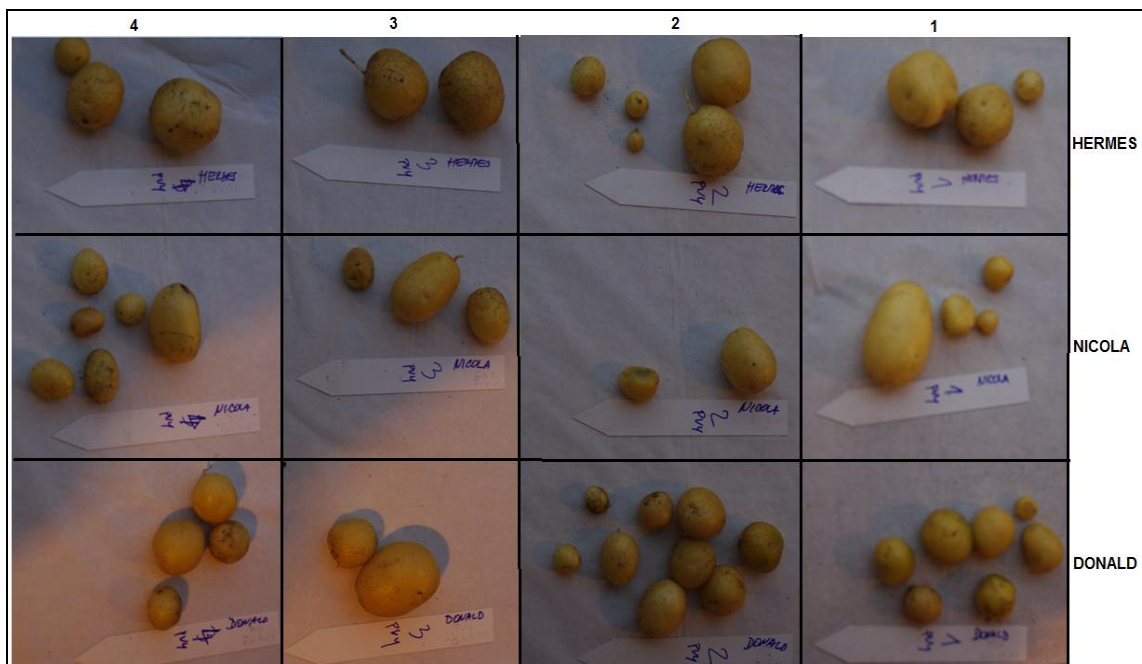


Slika 9: Rastline krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, en mesec po dodajanju inokuluma v zemljo (levo: PSTVd, desno: PVY)

Figure 9: Bait potato plants one month after injection of inoculum into the substrate (left: PSTVd; right: PVY)

Na rastlinah nismo opazili bolezenskih znamenj. V zemljo, kjer smo imeli rastline za kontrolo, smo injicirali vodovodno vodo.

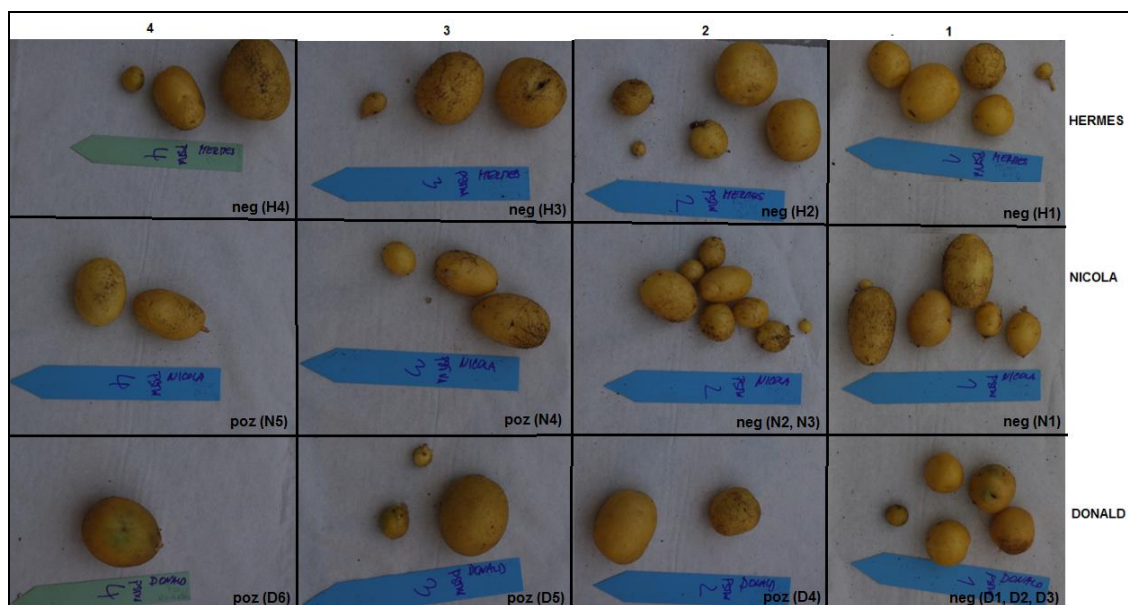
Na gomoljih, ki so zrastle na rastlinah za vabo (Preglednica 7), nismo opazili značilnih bolezenskih znamenj okužbe s PVY^{NTN} oziroma s PSTVd (Sliki 10 in 12). Te gomolje smo nato presadili v neokuženo zemljo in jih zalivali z neokuženo vodovodno vodo (Sliki 5 in 6). Deset tednov po posaditvi gomoljev, ki so zrastle na rastlinah, ki smo jih uporabili kot vabo, z RT-qPCR okužbe s PVY^{NTN} oziroma s PSTVd na rastlinah, zrastle iz teh gomoljev (Slika 13), nismo potrdili (Preglednica 7). Okužbe s PVY^{NTN} v nobeni rastlini zrastle iz gomoljev rastlin za vabo (Slika 11) nismo dokazali niti 22 tednov po saditvi (Preglednica 7). Okužbo s PSTVd pa smo dokazali 16. teden po saditvi v 5 rastlinah od 15 rastlin zrastle iz gomoljev rastlin za vabo (Slika 14; Preglednica 7). Okužene so bile tri od šestih rastlin cv. Donald in dve od petih rastlin cv. Nicola. V nobeni od štirih rastlin zrastle iz gomoljev rastlin za vabo cv. Hermes okužbe s PSTVd nismo dokazali niti 22. teden po saditvi (Preglednica 7). Vse okužene rastline so kalile v času med 10. in 16. tednom in so imele, v primerjavi z večino neokuženih rastlin zrastle iz gomoljev rastlin za vabo, močnejša stebela (Sliki 13 in 14).



Slika 10: Gomolji, ki so zrasli na rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PVY^{NTN}
Figure 10: Tubers obtained from the potato plants watered with PVY^{NTN}-infested water
Bolezenskih znamenj, značilnih za okužbo s PVY^{NTN}, na gomoljih ni bilo. Gomolji iz enega okvirja so zrasli na eni rastlini, ki smo jo uporabili v poskusu kot vabo, in so bili nato presajeni v en lonec.



Slika 11: Rastline zrasle 16 tednov po posaditvi gomoljev, ki so zrasli na rastlinah krompirja, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PVY^{NTN}
Figure 11: Secondary plants 16 weeks after the planting of tubers obtained from the potato plants watered with PVY^{NTN}-infested water
Z RT-qPCR v nobeni rastlini zrasli iz gomoljev rastlin za vabo nismo dokazali okužbe s PVY^{NTN}.



Slika 12: Gomolji, ki so zrasli na rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd
 Figure 12: Tubers obtained from the potato plants watered with PSTVd-infested water
 Bolezenskih znamenj, značilnih za okužbo s PSTVd, na gomoljih ni bilo. Gomolji iz enega okvirja so zrasli na eni rastlini, ki smo jo uporabili v poskusu kot vabo, in so bili nato presajeni v en lonec. Rezultat analize rastlin, zraslih iz teh gomoljev, je pripisan v desnem spodnjem kotu vsakega okvirja. V oklepaju je navedena oznaka vzorca (oznaka rastline zrasle 16 tednov po presaditvi gomoljev iz rastlin za vabo – glej Sliko 14).



Slika 13: Rastline zrasle deset tednov po posaditvi gomoljev, ki so zrasli na rastlinah krompirja, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd
 Figure 13: Secondary plants 10 weeks after the planting of tubers obtained from the potato plants watered with PSTVd-infested water
 Z RT-qPCR v nobeni rastlini zrasli iz gomoljev rastlin za vabo nismo dokazali okužbe s PSTVd. V oklepaju je navedena oznaka vzorca (oznaka rastline zrasle 16 tednov po presaditvi gomoljev iz rastlin za vabo – glej Sliko 14).



Slika 14: Rastline zrasle 16 tednov po posaditvi gomoljev, ki so zrasli na rastlinah krompirja, ki smo jih zalivali z vodo, okuženo s PSTVd

Figure 14: Secondary plants 16 weeks after the planting of tubers obtained from the potato plants watered with PSTVd-infested water

Rezultat analize RT-qPCR za PSTVd je pripisan poleg rastline. V oklepaju je navedena oznaka vzorca.

4.3.2 Širjenje PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji

PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd se lahko sprostijo iz korenin mehansko okuženih rastlin v hranilno raztopino. Zdrave rastline se lahko nato okužijo z okuženo vodo preko korenin, s PVY^{NTN} tudi gomolji krompirja (Preglednice 8–16).

4.3.2.1 Širjenje PepMV-Ch2 s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji

PepMV-Ch2 smo dokazali v koreninah mehansko okuženih rastlin paradižnika (Preglednica 8). Z RT-qPCR smo PepMV-Ch2 dokazali tudi v hranilni raztopini. Koncentracija PepMV-Ch2 v hranilni raztopini je bila, vsaj v nekaterih časovnih točkah,

dovolj visoka, da smo z njo lahko mehansko okužili testne rastline (Preglednica 8). S primerjalno analizo izbranih vzorcev smo potrdili, da je občutljivost testa ELISA, v primerjavi z molekularnimi metodami, bistveno manjša (Priloga Č).

V koreninah rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo, smo prisotnost PepMV-Ch2 potrdili v prvem mesecu po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednica 8).

Tri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino smo PepMV-Ch2 prvič dokazali v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo (Preglednica 8). Štiri mesece in pol po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino smo PepMV-Ch2 dokazali v nadzemnih delih pri 10 od 12 rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo (Preglednici 9 in 10). V rastlinah za vabo, ki so bile okužene, je bil PepMV-Ch2 razporejen zelo neenakomerno. Dokazali smo ga bodisi v starejših listih, v stebelu ali v vršičku (Preglednici 9 in 10). Okužba s PepMV-Ch2 je bila potrjena v enem zrelem plodu, analiziranem 100. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Priloga O). Ob koncu poskusa prisotnosti PepMV-Ch2 v nobenem izmed petih analiziranih plodov nismo potrdili (Preglednici 9 in 10).

Preglednica 8: Prisotnost PepMV-Ch2, določena z RT-qPCR (vrednosti Cq v oklepajih) in s testnimi rastlinami, v mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma), hranilni raztopini in v rastlinah za vabo
 Table 8: The presence of PepMV-Ch2 in the source plants, nutrient solutions and bait plants. RT-qPCR (Cq in brackets) and test plants were used for the the detection

Ime poskusa	Dni ^a	Vir inokuluma (paradižnik)		Hranilna raztopina		Rastline za vabo	
		Listi	Korenine	RT-qPCR	Št. poz. rast./št. vseh test. rast. ^b	Korenine	Nadzemni deli rastlin
PepMV-paradižnik	0–30	+(14)	+(13)	+(26–29)	2 (29–35) / 7	+(29–37)	neg
	31–60	nt	+(14)	+(27–31)	4 (27–36) / 16	+(18–31)	neg
	61–90	nt	nt	+(29)	0 / 6	+(21)	neg
	91–120	nt	+(16)	+(26–32)	0 / 6	+(23)	+(31–34) / neg ^c
	134	nt	+(11–13)	+(27)	0 / 3	+(21–29) ^d	+(25–33) / neg ^d
Neg. kontrole	0-134	neg	neg	neg	neg	neg	neg
PepMV+PVY-paradižnik (rezultati za PepMV)	0–30	+(12)	+(15)	+(26–30)	0 / 12	+(30–33)	neg
	31–60	nt	+(12–15)	+(28) / neg ^c	2 (27–34) / 12	+(22–25)	neg
	61–90	nt	+(12)	+(33)	0 / 4	+(21)	neg
	91–120	+(8)	+(12)	+(26–35)	1 (35) / 4	+(27)	+(36–38) / neg ^c
	134	nt	+(12–13)	+(27)	0 / 2	+(23–33) ^f	+(26–39) / neg ^e
Neg. kontrole	0-134	neg	neg	neg	neg	neg	neg

nt – ni testirano; neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedeni rangi povprečnih (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino; ^btestne rastline smo analizirali štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino; ^cnekateri analizirani vzorci so bili pozitivni, drugi negativni (Prilogi O in R); ^dglej Preglednico 9; ^eglej Preglednico 10.

Preglednica 9: Prisotnost PepMV-Ch2 v različnih delih rastlin za vabo iz poskusa PepMV-paradižnik 134. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino

Table 9: The presence of PepMV-Ch2 in different parts of bait plants 134 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution in the PepMV-tomato experimental hydroponic system

Rastlina	Korenine	Spodnji del stebela	Osrednji del stebela	Starejši listi	Vršiček	Plod
A	+ (22)	neg	neg	+ (29) / neg ^a	+ (33) / neg ^a	neg
B	+ (29)	neg	neg	neg / neg ^a	neg / neg ^a	nt
C	+ (29)	neg	+ (30)	neg / neg ^a	neg / neg ^a	nt
D	+ (27)	+ (30)	neg	+ (30; 33) ^a	+ (25) / neg ^a	neg / neg ^a
E	+ (21)	neg	neg	+ (29) / neg ^a	+ (25) / neg ^a	nt
F	+ (21)	neg	neg	neg	neg / neg ^a	nt

nt – ni testirano; neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. Podrobni prikaz rezultatov je v Prilogi P. ^aAnalizirana dva vzorca, ki sta bila odvzeta iz različnih delov iste rastline.

Preglednica 10: Prisotnost PepMV-Ch2 v različnih delih rastlin za vabo iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino

Table 10: The presence of PepMV-Ch2 in different parts of bait plants 134 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution in the PepMV+PVY-tomato experimental hydroponic system

Rastlina	Korenine	Spodnji del stebela	Osrednji del stebela	Starejši listi ^a	Vršiček ^a	Plod
A	+ (23)	neg	+ (35)	+ (31; 35)	neg / neg	neg
B	+ (32)	+ (26)	neg	+ (37) / neg	neg / neg	nt
C	+ (31)	+ (33)	neg	+ (29) / neg	neg / neg	nt
D	+ (26)	+ (29)	neg	+ (34) / neg	neg / neg	neg
E	+ (29)	neg	neg	+ (32) / neg	neg / neg	nt
F	+ (33)	neg	neg	+ (26; 39)	+ (29) / neg	nt

nt – ni testirano; neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. Podrobni prikaz rezultatov je v Prilogi S. ^aAnalizirana dva vzorca, ki sta bila odvzeta iz različnih delov iste rastline.

4.3.2.2 Širjenje PVY^{NTN} s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji

PVY^{NTN} smo dokazali v koreninah mehansko okuženih rastlin paradižnika in krompirja (Preglednici 3 in 11). Z RT-qPCR smo PVY^{NTN} dokazali tudi v hranilni raztopini, vendar je bila koncentracija PVY^{NTN} v hranilni raztopini, v vseh časovnih točkah, prenizka za uspešno mehansko okužbo testnih rastlin (Preglednica 11). S primerjalno analizo izbranih vzorcev smo ugotovili, da je občutljivost testa ELISA, v primerjavi z molekularnimi metodami, bistveno manjša (Priloga D).

V koreninah rastlin krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, smo prisotnost PVY^{NTN} potrdili v prvem mesecu, v koreninah rastlin paradižnika pa v drugem mesecu po

začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednica 11).

Tri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino smo PVY^{NTN} prvič dokazali v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo (Preglednica 11). Ob koncu poskusa smo z RT-qPCR dokazali prisotnost PVY^{NTN} v 1 od 6 rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo (Preglednica 12). Z ločenim analiziranjem posameznih delov okužene rastline smo PVY^{NTN} potrdili v starejših listih in ne v vršičku, plodovih ali stebelu (Preglednica 12).

V nadzemnih delih rastlin krompirja, ki smo jih uporabili za vabo, smo PVY^{NTN} dokazali 54. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednica 11, Priloga U). Nadzemni deli rastlin krompirja so, od tretjega meseca po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino, hitro propadali (Slika 15). Ob koncu poskusa smo z analiziranjem še ne popolnoma propadlih delov rastlin krompirja PVY^{NTN} dokazali v dveh rastlinah krompirja od šestih (Preglednica 13). Z ločenim analiziranjem stebela, starejših in mlajših listov smo prisotnost PVY^{NTN} potrdili pri eni rastlini v stebelu, pri drugi pa v starejših listih (Preglednica 13).

Preglednica 11: Prisotnost PVY^{NTN}, določena z RT-qPCR (vrednosti Cq v oklepajih) in s testnimi rastlinami, v mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma), hranilni raztopini in v rastlinah za vabo

Table 11: The presence of PVY^{NTN} in source plants, nutrient solutions and bait plants. RT-qPCR (Cq in brackets) and test plants were used for the detection

Ime poskusa	Dni ^a	Vir inokuluma		Hranilna raztopina		Rastline za vabo	
		Listi	Korenine	RT-qPCR	Št. poz. rast./št. vseh test. rast. ^b	Korenine	Na zemni deli rastlin
PepMV+PVY -paradižnik (rezultati za PVY)	0–30	+(15)	+(22)	+(36–39)	0 / 12	neg	neg
	31–60	nt	+(22–25)	+(38) / neg ^c	0 / 12	+(35–38)	neg
	61–90	nt	+(20)	neg	0 / 4	+(35)	neg
	91–120	+(14)	+(23)	+(36) / neg ^c	0 / 4	neg	+(39) / neg ^c
	134	nt	+(21–23)	+(34)	0 / 2	+(34–37) ^d	+(36) / neg ^d
Neg. kontrole	0-134	neg	neg	neg	neg	neg	neg
PVY-krompir	0–30	+(12–20)	+(18–29)	+(33–39)	0 / 12	+(36–38) / neg ^c	neg
	31–60	nt	nt	+(30–35)	0 / 12	+(27–37) / neg ^c	+(36) / neg ^c
	61–90	nt	nt	+(28–34)	0 / 12	+(26–37)	+(33–39) / neg ^c
	91–120	nt	nt	+(33–38)	0 / 3	+(24–36)	neg
	131	+(13–18)	+(19–22)	+(39)	nt	+(34–38) ^e	+(35–39) / neg ^e
Neg. kontrole	0-131	neg	neg	neg	neg	neg	neg

nt – ni testirano; neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedeni rangi povprečnih (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino; ^btestne rastline smo analizirali štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino; ^cnekateri analizirani vzorci so bili pozitivni, drugi negativni (Prilogi Š in U); ^dglej Preglednico 12; ^eglej Preglednico 13.

Preglednica 12: Prisotnost PVY^{NTN} v različnih delih paradižnika za vabo iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino

Table 12: The presence of PVY^{NTN} in different parts of bait plants 134 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution in the PepMV+PVY-tomato experimental hydroponic system

Rastlina	Korenine	Spodnji del stebela	Osrednji del stebela	Starejši listi ^a	Vršiček ^a	Plod
A	+ (34)	neg	neg	neg / neg	neg / neg	neg
B	+ (37)	neg	neg	neg / neg	neg / neg	nt
C	+ (36)	neg	neg	neg / neg	neg / neg	nt
D	+ (34)	neg	neg	neg / neg	neg / neg	neg
E	+ (35)	neg	neg	neg / neg	neg / neg	nt
F	+ (37)	neg	neg	+ (36) / neg	neg / neg	nt

nt – ni testirano; neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. Podrobni prikaz rezultatov je v Prilogi T. ^aAnalizirana dva vzorca, ki sta bila odvzeta iz različnih delov iste rastline.

Preglednica 13: Prisotnost PVY^{NTN} v različnih delih rastlin krompirja za vabo iz poskusa PVY-krompir 131. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino

Table 13: The presence of PVY^{NTN} in different parts of bait plants 131 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution in the PVY-potato experimental hydroponic system

Rastlina	Korenine	Spodnji del stebela	Osrednji del stebela	Zgornji del stebela	Starejši listi	Vršiček
A	+ (34)	neg	neg	neg	neg	neg
B	+ (34)	nt	nt	nt	nt	neg
C	+ (34)	neg	neg	neg	neg	neg
D	+ (35)	neg	neg	neg	+ (35)	neg
E	+ (34)	+ (39)	neg	neg	neg	neg
F	+ (38)	neg	neg	neg	neg	neg

nt – ni testirano (nadzemni deli rastline so bili posušeni); neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. Podrobni prikaz rezultatov je v Prilogi V.



Slika 15: Rastline krompirja za vabo iz poskusa PVY-krompir 131. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino

Figure 15: Bait potato plants from the PVY-potato experimental hydroponic system 131 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution

Na šestih mehansko okuženih rastlinah krompirja (vir inokuluma) iz poskusa PVY-krompir se je razvilo 11 gomoljev s tipičnimi bolezenskimi znamenji za okužbo s PVY^{NTN} (Slika 16). 15 tednov po posaditvi teh gomoljev v neokuženo zemljo je zrasla ena rastlina krompirja. Ta rastlina krompirja je imela na listih značilna znamenja okužbe z virusi in v njej smo dokazali prisotnost PVY z RT-qPCR (Preglednica 14). Na rastlinah krompirja, ki smo jih uporabili za vabo, se je razvilo skupno 25 gomoljev, od katerih jih je sedem imelo bolj ali manj značilna znamenja za okužbo s PVY^{NTN} (Slika 17). 15 tednov po posaditvi teh 25 gomoljev v neokuženo zemljo je zraslo sedem rastlin, od tega pet z znaki okužbe z virusi na listih (Slika 18). V rastlinah z bolezenskimi znamenji smo dokazali prisotnost virusa PVY z RT-qPCR, v obeh rastlinah brez bolezenskih znamenj pa ne (Preglednica 14).

Preglednica 14: Gomolji, zrasli na mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma) in na rastlinah za vabo v poskusu PVY-krompir, ter prisotnost virusa v rastlinah zraslih iz gomoljev teh rastlin

Table 14: Tubers of infected and bait plants from the PVY-potato experiment, and the presence of PVY in plants grown from these tubers

	Oznaka rastline	Št. gomoljev z bolezenskimi znamenji / št. vseh zraslih gomoljev	Rastline zrasle iz gomoljev vira inokuluma / rastlin za vabo	
			Št. rastlin z bolezenskimi znamenji / št. vseh rastlin	Rezultat analize listov z RT-qPCR 15 tednov po posaditvi
Vir inokuluma	A–F	11 / 11	1 / 1	+ (15)
Rastline za vabo	A–F	7 / 25	5 / 7	+ (27–32) / neg
Rastline za vabo (ločen prikaz po rastlinah)	A	1 / 4	0 / 1	neg
	B	1 / 2	1 / 1	+ (32)
	C	1 / 3	2 / 2	+ (29)
	D	1 / 3	1 / 1	+ (27)
	E	2 / 4	0 / 1	neg
	F	1 / 9	1 / 1	+ (28)

neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedeni rangi povprečnih (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J.



Slika 16: Gomolji, ki so zrasli na mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma) iz poskusa PVY-krompir
 Figure 16: Tubers obtained from the potato plants used as the source of inoculum in the PVY-potato experimental hydroponic system



Slika 17: Gomolji, ki so zrasli na rastlinah, ki smo jih uporabili v poskusu PVY-krompir kot vabo
Figure 17: Tubers obtained from the bait potato plants of the PVY-potato experimental hydroponic system

V oklepaju je pripisan rezultat analize listov rastlin, ki so zrasle iz teh gomoljev.



Slika 18: Rastline zrasle 15 tednov po posaditvi gomoljev, ki so se razvili na rastlini C za vabo iz poskusa PVY-krompir

Figure 18: Secondary plants 15 weeks after the planting of tubers obtained from bait plant C of the PVY-potato experimental hydroponic system

4.3.2.3 Širjenje PSTVd s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji

PSTVd smo dokazali v koreninah mehansko okuženih rastlin paradižnika (Preglednica 15). Z RT-qPCR smo viroid dokazali tudi v hranilni raztopini, vendar je bila koncentracija PSTVd v hranilni raztopini, v vseh časovnih točkah, prenizka za uspešno mehansko okužbo testnih rastlin (Preglednica 15).

V koreninah rastlin paradižnika in krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, smo prisotnost PSTVd potrdili v prvem oziroma v drugem mesecu po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednica 15). V koreninah enega paradižnika ter treh rastlin krompirja cv. Nicola PSTVd ob koncu poskusa nismo potrdili (Prilogi Ž in W).

Tri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino smo PSTVd prvič dokazali tudi v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili za vabo (Preglednica 15). Ob koncu poskusa (4 mesece in pol po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino) smo z RT-qPCR dokazali prisotnost PSTVd v 2 od 6 rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo (Preglednica 16). Z analizo posameznih delov rastlin smo ugotovili, da so bili s PSTVd na teh dveh rastlinah okuženi le poganjki, ki so izraščali na novo iz baze stbla (Preglednica 16). PSTVd v nadzemnih delih rastlin krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, nismo dokazali niti štiri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednica 15).

Preglednica 15: Prisotnost PSTVd, določena z RT-qPCR (vrednosti Cq v oklepajih) in s testnimi rastlinami, v mehansko okuženih rastlinah (vir inokuluma), hranilni raztopini in v rastlinah za vabo

Table 15: The presence of PSTVd in source plants, nutrient solutions and bait plantss. RT-qPCR (Cq in brackets) and test plants were used for the detection

Ime poskusa	Dni ^a	Vir inokuluma (paradižnik)		Hranilna raztopina		Rastline za vabo	
		Listi	Korenine	RT-qPCR	Št. poz. rast./št. vseh test. rast. ^b	Korenine	Nadzemni deli rastlin
PSTVd- paradižnik	0-30	+(15-26)	+(15-21)	+(34)/neg ^c	0 / 8	+(37-39)/ neg ^c	nt
	31-60	nt	nt	+(31-34)	0 / 12	+(30-39)	neg
	61-90	nt	nt	+(33-36)	0 / 12	+(31-33)	neg
	91-120	nt	nt	+(35-39)	0 / 7	+(26-32)	+(38)/ neg ^c
	141	+(17-22)	+(17-20)	+(36)	nt	+(32-39)/ neg ^d	+(38)/ neg ^d
Neg. kontrole	0-141	neg	neg	neg	neg	neg	neg
PSTVd- krompir	0-30	nt	nt	+(35-37)	nt	nt	nt
	31-60	nt	nt	+(34-37)	nt	+(32)/ neg ^c	neg
	61-90	+(21)	+(25)	+(36)	nt	+(30-31)	neg
	91-120	+(21)	+(24)	+(38)	nt	+(27-32)	neg
	125	+(19)	+(23)	+(38)	nt	+(32-34)/ neg ^c	neg
Neg. kontrole	0-125	neg	neg	neg	neg	neg	neg

nt – ni testirano; neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedeni rangi povprečnih (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino; ^btestne rastline smo analizirali pet tednov po mehanski okužbi s hranilno raztopino; ^cnekateri analizirani vzorci so bili pozitivni, drugi negativni (Priloge Z, Q in W); ^dglej Preglednico 16.

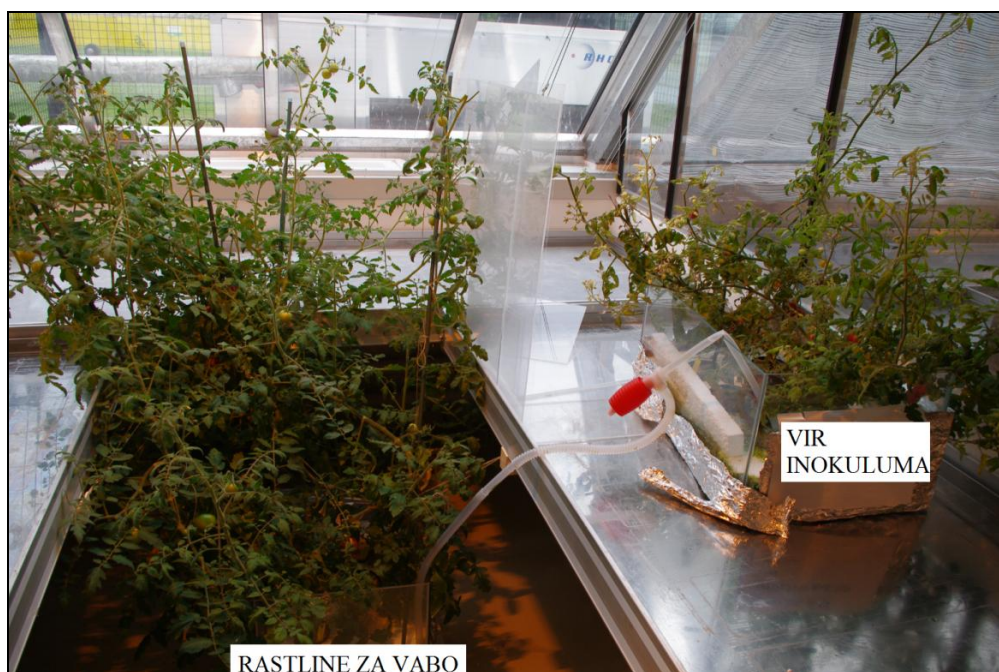
Preglednica 16: Prisotnost PSTVd v različnih delih rastlin paradižnika za vabo iz poskusa PSTVd-paradižnik 141. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino

Table 16: The presence of PSTVd in different parts of bait plants 141 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution in the PSTVd-tomato experimental hydroponic system

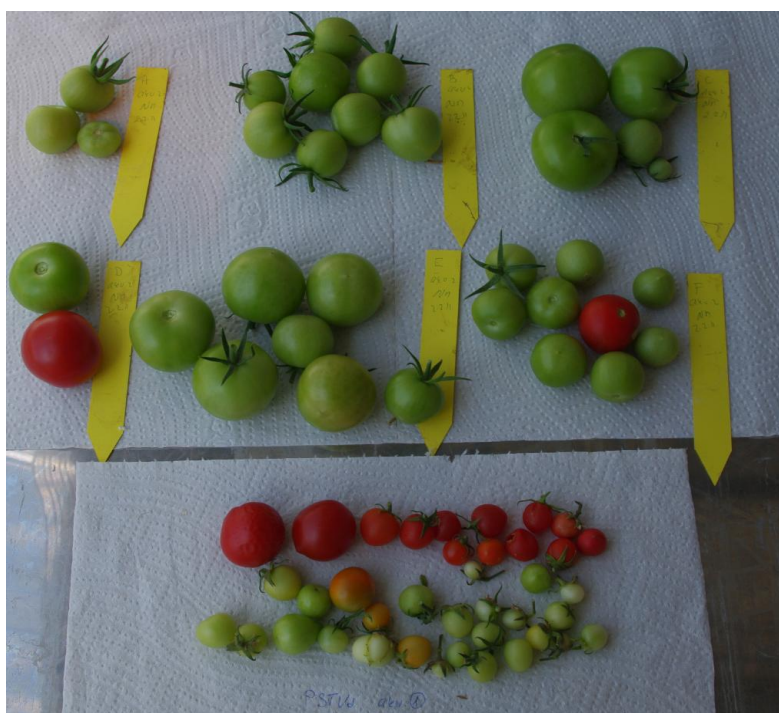
Rastlina	Korenine	Steblo	Starejši listi	Vršiček	Plod	Novi poganjki ^a
A	neg	neg	neg	neg	neg	neg
B	+ (35)	neg	neg	neg	neg	+ (38)
C	+ (39)	neg	neg	neg	neg	neg
D	+ (35)	neg	neg	neg	neg / neg ^b	neg
E	+ (31)	neg	neg	neg	neg	+ (38)
F	+ (33)	neg	neg	neg	neg / neg ^b	neg

neg negativno; + pozitivno [pri pozitivnih vzorcih so v oklepaju navedene povprečne (povprečje treh ponovitev) vrednosti Cq]. Rezultati negativnih kontrol so v Prilogi I in J. Podrobni prikaz rezultatov je v Prilogi Ž. ^aanaliziran vršiček poganjka, ki je izraščal na novo iz baze stebela; ^banalizirana dva vzorca, ki sta bila odvzeta iz različnih delov iste rastline.

Bolezenskih znamenj na rastlinah paradižnika, ki smo jih uporabili v poskusu PSTVd-paradižnik kot vabo, nismo opazili. Rast rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo, je bila v primerjavi z mehansko okuženimi rastlinami bujnejša (Slika 19). Plodovi na rastlinah za vabo so bili v primerjavi s plodovi mehansko okuženih rastlin večji in brez znamenj okužbe z viroidi (Slika 20). 30 semen iz plodov mehansko okuženih rastlin in 33 semen iz plodov rastlin za vabo smo očistili, posušili in shranili v hladilniku. Po 9,5 meseca smo jih posejali v neokuženo zemljo. Deset tednov po sejanju je iz semen mehansko okuženih rastlin zrastle devet rastlin, iz semen rastlin za vabo pa enajst rastlin. Z analizo z RT-qPCR v vršičkih zraslih rastlin nismo dokazali prisotnosti PSTVd niti v rastlinah, zraslih iz semen, pridobljenih iz plodov mehansko okuženih rastlin (podatki niso prikazani).



Slika 19: Poskus PSTVd-paradižnik 141. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino
Figure 19: The PSTVd-tomato experimental hydroponic system 141 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution



Slika 20: Plodovi iz poskusa PSTVd-paradižnik 141. dan od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino (zgoraj: plodovi rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo; spodaj: plodovi mehansko okuženih rastlin)
Figure 20: Tomato fruits from the PSTVd-tomato experimental hydroponic system 141 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution (above: fruit of bait plants; below: fruit of plants used as the source of inoculum)

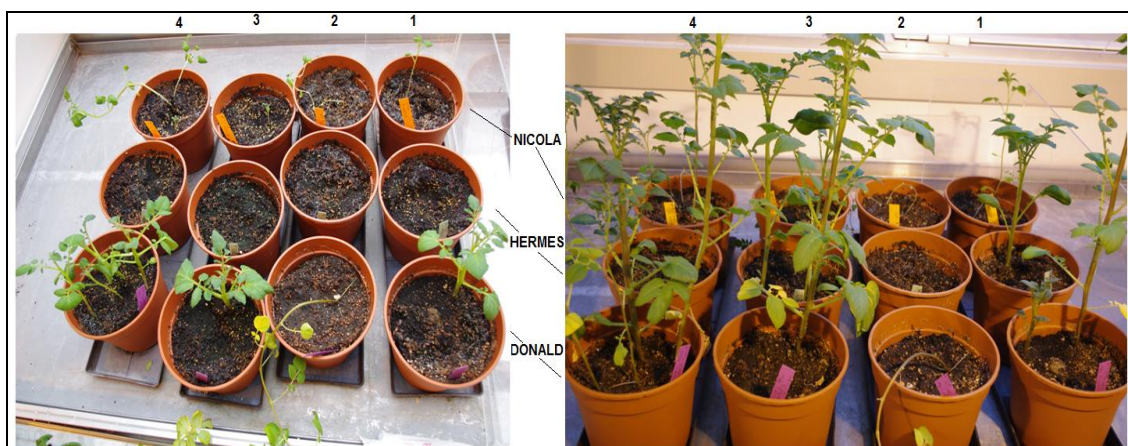
Na rastlinah krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, in na njihovih gomoljih nismo opazili bolezenskih znamenj, značilnih za okužbo s PSTVd (Sliki 21 in 22). Na 12 rastlinah krompirja (po štiri rastline cv. Nicola, cv. Hermes in cv. Donald), ki smo jih uporabili za vabo, se je razvilo 55 gomoljev (7 cv. Nicola, 27 cv. Hermes in 21 cv. Donald) (Slika 22), ki smo jih posadili v neokuženo zemljo. Po 15 tednih je iz teh gomoljev zrastle skupno 13 rastlin (6 cv. Nicola, 0 cv. Hermes in 7 cv. Donald), po 17,5 tedna pa skupno 18 rastlin (7 cv. Nicola, 3 cv. Hermes in 8 cv. Donald) (Slika 23). V nobeni izmed teh rastlin zraslih iz gomoljev rastlin za vabo z RT-qPCR nismo dokazali prisotnosti PSTVd (Priloga W).



Slika 21: Poskus PSTVd-krompir dva meseca od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino
Figure 21: The PSTVd-potato experimental hydroponic system two months after the initiation of irrigation with infested nutrient solution
Na rastlinah krompirja, ki smo jih uporabili v poskusu kot vabo, nismo opazili bolezenskih znamenj.



Slika 22: Gomolji, ki so zrastle na rastlinah za vabo iz poskusa PSTVd-krompir
Figure 22: Tubers obtained from the bait potato plants of the PSTVd-potato experimental hydroponic system
Bolezenskih znamenj, značilnih za okužbo s PSTVd, na gomoljih ni bilo.



Slika 23: Rastline zrasle 15 tednov (levo) in 17,5 tedna (desno) po posaditvi gomoljev, zrastleh na rastlinah, ki smo jih uporabili kot vabo v poskusu PSTVd-krompir
Figure 23: Secondary plants 15 (left) and 17.5 (right) weeks after the planting of tubers obtained from the bait plants of the PSTVd-potato experimental hydroponic system

5 RAZPRAVA

Cilj izvedenih poskusov je bil ugotoviti možnost širjenja PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd z vodo. V ta namen smo najprej izvedli poskuse, pri katerih smo ugotavljali, kakšna je največja razredčenost PepMV-Ch2 in PSTVd v vodi, da z njo še lahko okužimo testne rastline (glej 4.1). Nato smo preverili, ali lahko PSTVd v vodnem okolju pri pogojih, primernih za rast rastlin, preživi (glej 4.2). Možnost širjenja PSTVd, PepMV-Ch2 in PVY^{NTN} z vodo smo ugotavljali v različno zasnovanih poskusih (Slika 5). V prvem sklopu poskusov smo dodajali inokulum v zemljo (glej 4.3.1). V drugem sklopu poskusov smo možnost širjenja z vodo ugotavljali v sistemu, ki je posnemal gojenje rastlin na hidroponiji (glej 4.3.2). S poskusi na hidroponiji smo preverjali, ali se lahko omenjeni povzročitelji bolezni na rastlinah sproščajo iz mehansko okuženih rastlin preko korenin v vodno okolje, ali lahko v vodnem okolju preživijo ter ali lahko okužijo zdrave rastline preko korenin ali v času kalitve gomoljev. Preverjali smo tudi možnost širjenja PSTVd in PVY^{NTN} s semenskim materialom, če rastline, ki so izvor semen/gomoljev, namakamo z okuženo vodo (Slika 5c).

5.1 NAJVEČJA RAZREDČENOST PSTVd IN PepMV-CH2 V VODI, DA Z NJO ŠE LAHKO OKUŽIMO TESTNE RASTLINE

Z določanjem največje razredčenosti PSTVd in PepMV-Ch2 v vodi, ki je še zmožna mehanske okužbe testnih rastlin, smo ugotavljali korelacijo med rezultati analiz z visoko občutljivo metodo RT-qPCR in z manj občutljivim biološkim testom. Z RT-qPCR določamo prisotnost nukleinskih kislin, tudi tistih, ki niso del infektivnih virusnih ali viroidnih delcev. Poleg tega je pričakovano, da obstaja neka limita koncentracije virusnih in viroidnih delcev, ki so potrebni za uspešno okužbo testnih rastlin.

Infektivnost razredčine macerata listov, okuženih s PSTVd, v vodi smo potrdili do razredčenosti, ki je imela pri analizi z RT-qPCR vrednost C_q 28 (Preglednica 5). Podobne vrednosti C_q (C_q med 25 in 29) za razredčenosti, ki so še zmožne okužbe testnih rastlin, so ugotovili že v predhodnih raziskavah, pri katerih so redčili macerat listov, okuženih s PVY^{NTN}, v vodi (Vidic, 2011) ter očiščene delce PepMV-EU v pufru za mehansko okužbo (Delić, 2010). V podobnem predhodnem poskusu s PepMV-Ch2 je bila okužba testnih rastlin uspešna do razredčenosti okuženega macerata v vodi z vrednostjo C_q 18 (Prezelj in Gutierrez Aguirre, osebna komunikacija). Ne glede na to, da je težko primerjati vrednosti C_q različnih RT-qPCR in vrednosti C_q rezultatov poskusa različnih tarč (na primer razredčine očiščenih virusnih delcev in macerata

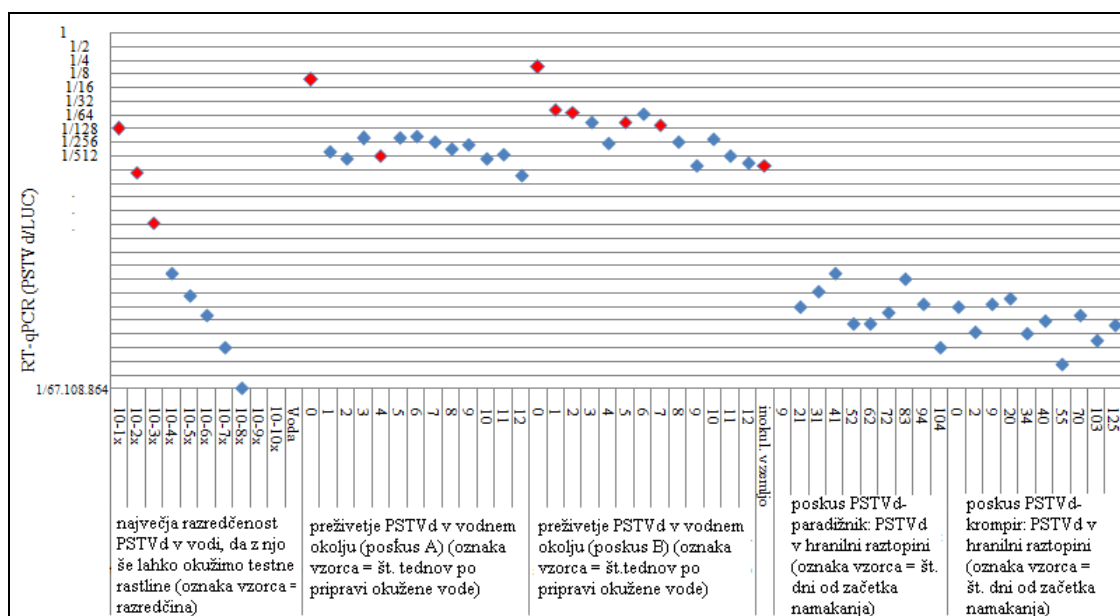
okuženih listov, razredčine v vodi in v pufru, različni virusi, različki), smo želeli rezultate omenjenega predhodnega poskusa za PepMV-Ch2 preveriti, ker so rezultate zaključili na podlagi rezultatov testa ELISA na vzorcih, odvzetih iz testnih rastlin dva tedna po mehanski okužbi. V preliminarnem poskusu smo namreč dokazali, da je ELISA bistveno manj občutljiva kot RT-qPCR (Prilogi Č in D), kar je znano tudi že iz predhodnih raziskav (Gutierrez-Aguirre in sod., 2009b). Če okužimo testne rastline z nizko koncentracijo virusa, pa je tudi velika verjetnost, da se virus v testnih rastlinah do meje detekcije namnoži z zakasnitvijo. Čeprav smo v ponovljenem poskusu testne rastline z RT-qPCR analizirali štiri tedne po mehanski okužbi, smo infektivnost PepMV-Ch2 v vzorcu vode potrdili le do razredčenosti z vrednostjo Cq 16 (Preglednica 5). Z analizo testnih rastlin šest tednov po mehanski okužbi pa smo infektivnost PepMV-Ch2 v vzorcu vode potrdili do razredčenosti z vrednostjo Cq 23 (Preglednica 5), kar potrjuje prej navedeno domnevo, da se virus v testnih rastlinah, okuženih z nizko koncentracijo virusa, do meje detekcije namnoži z zakasnitvijo. Inokulum za PepMV-Ch2 smo pripravili iz zamrznjenega rastlinskega materiala, zato je možno, da so delci PepMV-Ch2 v času hranjenja okuženih listov na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ postopoma izgubljali infektivnost, kar pa ne vpliva na detekcijo RNA z RT-qPCR.

5.2 PREŽIVETJE PSTVd V VODNEM OKOLJU

Dokazali smo, da PSTVd preživi v vodi na temperaturi $20 \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do sedem tednov (Preglednica 6). Stabilnost PSTVd v vodnem okolju omogoča sekundarna struktura molekule RNA (glej 2.2.3). V primerjavi z rezultati drugih poskusov (Pares in sod., 1992; Prezelj in sod., 2009; Vidic, 2011) je PSTVd v vodnem okolju, na temperaturi $20 \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, preživel dlje časa kot PepMV (Ch2 in EU genotip) in PVY^{NTN}, a manj kot ToMV in PMMoV. Za oba genotipa PepMV je bilo v podobnem poskusu namreč dokazano, da v vodi na temperaturi $20 \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ preživita do tri tedne (Prezelj in sod., 2009), PVY^{NTN} pa en teden (Vidic, 2011). Dokazano preživetje ToMV in PMMoV v vodnem mediju, na sobni temperaturi in na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pa je vsaj šest mesecev (Pares in sod., 1992). Pares in sod. (1992) so 80 in 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ očiščenih ToMV in PMMoV dodali v hranilno raztopino in v 0,06 M fosfatni pufer. Tako pripravljene suspenzije so postavili v rastlinjak in na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter infektivnost preverjali z opazovanjem pojavljanja bolezenskih znamenj na mehansko okuženih listih testnih rastlin *Nicotiana glutinosa*.

Infektivnosti vode, okužene s PSTVd, nismo dokazali 8–12 tednov po začetku poskusa, čeprav lahko glede na rezultate analize z RT-qPCR v vodi sklepamo, da je bila koncentracija viroidne RNA nad mejo, ki je potrebna za uspešno okužbo [primerjava

relativne količine PSTVd z rezultati poskusa določanja največje razredčenosti PSTVd v vodi, ki je še zmožna okužbe testnih rastlin (Slika 24)]. Predvidevamo, da se je viroidna RNA razgradila ali da je spremenila sekundarno strukturo in s tem izgubila zmožnost okužbe rastlin, nasprotno pa razgradnja RNA ali sprememba sekundarne strukture RNA ne vplivata v tolikšni meri na določanje z RT-qPCR.



Slika 24: Relativna količina RNA PSTVd glede na LUC v vzorcih vode oziroma hranilne raztopine
 Figure 24: The amount of PSTVd RNA relative to LUC in positive samples of the water/ nutrient solution
 Številke na osi y predstavljajo antilogaritem razlike med vrednostma Cq amplikona LUC in PSTVd (skala je logaritemska z osnovo 2). Rdeče točke označujejo vzorce vode, pri katerih smo prisotnost PSTVd potrdili tudi z mehansko okužbo testnih rastlin oziroma so se rastline, zalivane z okuženo vodo, okužile. Z modro so označeni vzorci, pri katerih prisotnosti PSTVd z mehansko okužbo testnih rastlin nismo potrdili oziroma se rastline z okuženo hranilno raztopino niso okužile. Manjkajoče točke pomenijo, da v vzorcu z RT-qPCR nismo dokazali prisotnosti PSTVd. Podrobne vrednosti so v Prilogi Y.

Infektivnosti vode, okužene s PSTVd, v poskusu B nismo potrdili tretji, četrti in šesti teden po začetku poskusa, čeprav je bila potrjena peti in sedmi teden (Slika 24). Infektivnost vode je bila peti teden potrjena le s polovico testnih rastlin (Preglednica 6). Podobno kot v poskusu B tudi v poskusu A infektivnosti vode nismo potrdili prvi, drugi in tretji teden, medtem ko je bila le-ta potrjena četrti teden (Slika 24). Razlog za neuspešno potrditev infektivnosti vode v vmesnih časovnih točkah bi bil lahko v različni dovzetnosti testnih rastlin za okužbo (glej točko 2.1.4) ali v neenakomerni razporejenosti PSTVd v okuženi vodi kot posledica nezadostnega mešanja vode pred okuževanjem testnih rastlin. Neenakomerna razporejenost viroidov v vodi je verjetna zaradi možnosti vezave le-teh na steno posode ali drobne ostanke v vodi. Možno je, da bi lahko dokazali infektivnost viroida tudi po daljšem časovnem obdobju, če bi

uporabili večje število testnih rastlin, kar je razvidno iz preglednice 6.

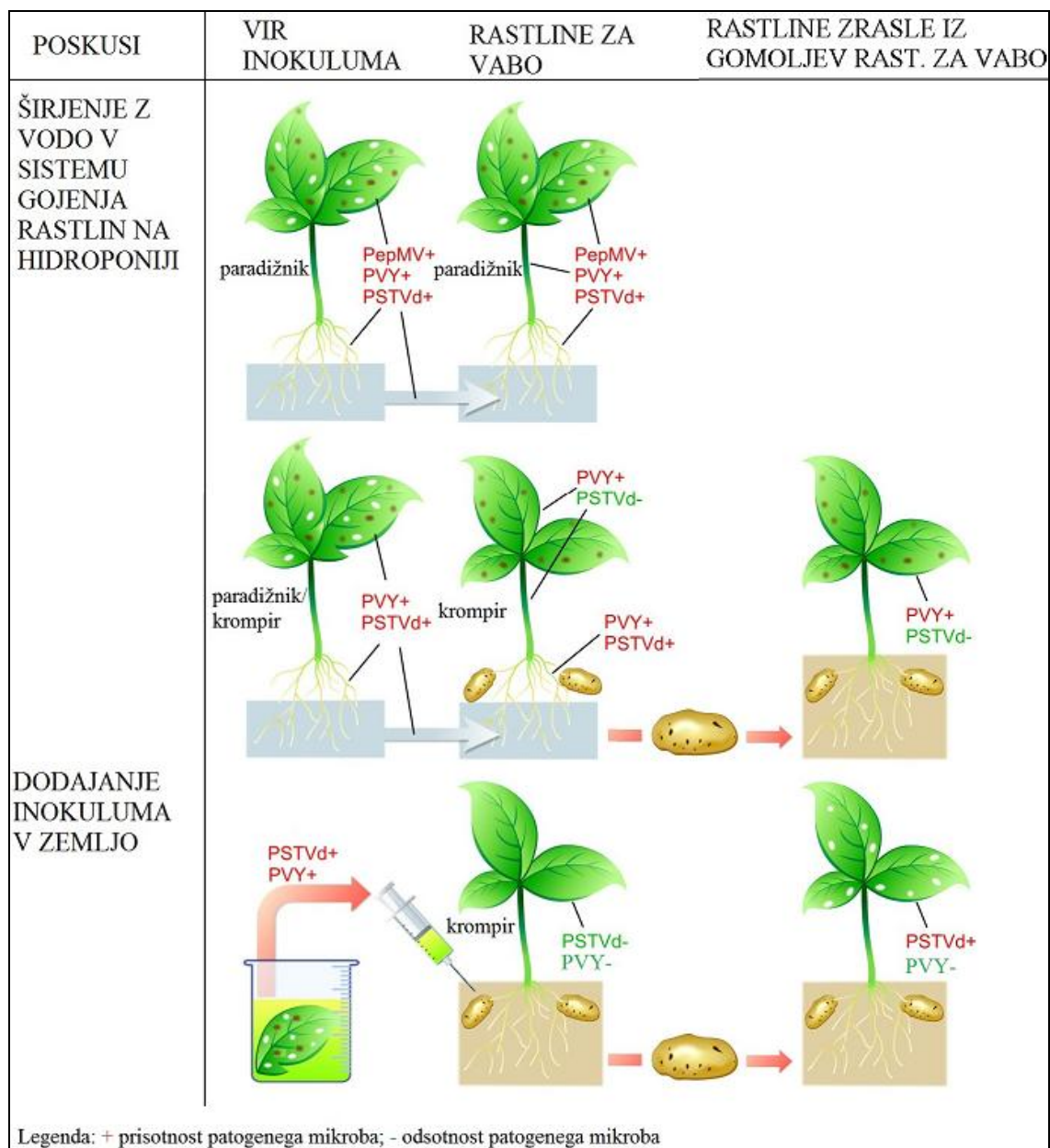
Preživetje virusov in tudi viroidov v *in vitro* pogojih je odvisno od eksperimentalnih pogojev (glej točko 2.3.3). Predvidevamo, da bi PSTVd pri nižji temperaturi v vodi preživel še dalj časa, saj je bilo v podobnem poskusu, na primer za PVY^{NTN}, že dokazano, da lahko v vodi, shranjeni na 4 °C, preživi do deset tednov (Mehle in sod., 2014), medtem ko je na temperaturi 20 ± 4 °C preživel le en teden (Vidic, 2011). Na preživetje PSTVd najverjetneje vpliva tudi medij, v katerem je viroid prisoten. Verhoeven in sod. (2010a) namreč navajajo, da so v primeru, ko so v vodi in v pufru zmacerirali okužene liste, po določenem času hranjenja pri 20 °C ugotovili večjo koncentracijo PSTVd v vodi kot v pufru. Podrobnih rezultatov tega poskusa (na primer čas od maceracije do izvedbe analiz, način preverjanja koncentracije) niso navedli.

Adsorpcija rastlinskih virusov na glinene delce ali organsko snov naj bi zaščitila le-te pred inaktivacijo v vodi (Koenig, 1986). Piazzolla in sod. (1986) razlagajo možnost preživetja občutljivega virusa CMV v vodi z vezavo na sedimentne delce, ki naj bi virus stabilizirali, vendar naj ne bi vplivali na njegovo infektivnost. V preglednem članku avtorice Koenig (1986) so navedeni primeri, ki to teorijo dokazujejo: TBSV, absorbiran na glinene delce tal, je bolj odporen proti visokim temperaturam (avtoklaviranje) kot neabsorbirani virusni delci ali virusi v pesku brez koloidov; PeAMV naj bi v zemlji z glinenimi delci preživel dvakrat dlje kot v rastlinskem soku; prosti virusni delci virusa TNV se inaktivirajo po izsuševanju v zemlji v enem dnevu, v ostankih okuženih korenin pa ostanejo infektivni vsaj 130 dni; ToMV je mnogo bolj odporen proti vročini v odmrlih ostankih rastlin kot v rastlinskem soku. Trdnost adsorpcije rastlinskih virusov na anorganske in organske snovi naj bi bila odvisna od virusa, adsorbirajočega materiala in okoljskih pogojev, kot so pH, soli in prisotnost drugih snovi. V naravnih pogojih naj bi se virusi stalno adsorbirali, deadsorbirali in potem znova adsorbirali. Podobno kot rastlinske viruse morda tudi adsorpcija viroidov na glinene delce ali organsko snov zaščiti viroide pred inaktivacijo v vodi, zato predvidevamo, da bi PSTVd ob prisotnosti le-teh v vodi preživel še dalj časa.

5.3 MOŽNOST ŠIRJENJA PSTVd, PVY^{NTN} IN PepMV-CH2 Z VODO

S poskusi gojenja rastlin na hidroponiji smo ugotovili, da se lahko PSTVd, PVY^{NTN} in PepMV-Ch2 sproščajo iz korenin mehansko okuženih rastlin (vir inokuluma) v hranilno raztopino in nato okužijo zdrave rastline (rastline za vabo) preko korenin (Slika 25). Dokazali smo, da so bili gomolji, ki so zrastle na rastlinah, ki smo jih uporabili v poskusu

kot vabo, vir novih okužb s PVY^{NTN}. S poskusom, pri katerem smo dodajali inokulum v zemljo, smo dokazali, da so lahko gomolji, ki se razvijejo na rastlinah, ki jih zalivamo z okuženo vodo, vir novih okužb tudi s PSTVd (Slika 25).



Slika 25: Povzetek rezultatov o dokazanih možnostih širjenja PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd z vodo (sliko je narisal dr. Zdravko Podlesek)
 Figure 25: Summary of the confirmed results of transmission of PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 and PSTVd through water (Figure: Dr. Zdravko Podlesek)

5.3.1 Okužba rastlin s PVY^{NTN} in PSTVd v primeru dodajanja okužene vode v zemljo

Prve poskuse o možnosti širjenja PSTVd z vodo so izvedli Seigner in sod. (2008) ter Verhoeven in sod. (2010a). V njihovih poskusih so uporabili kot vabo rastline paradižnika. Inokulum so v zemljo dodali enkrat (Seigner in sod., 2008) ali pet- oziroma desetkrat (v petih oziroma desetih dneh po začetku poskusa) (Verhoeven in sod., 2010a). V nobenem od teh poskusov možnosti širjenja PSTVd z vodo niso potrdili, kar glede na naše rezultate ni presenetljivo. Tudi v našem poskusu, pri katerem smo v zemljo dodali okuženo vodo 16-krat v dveh mesecih (Priloga F), se rastline krompirja, ki smo jih uporabili za vabo, niso okužile (Slika 25). Vendar smo z našim poskusom dokazali, da so lahko gomolji, ki se razvijejo na rastlinah, ki jih zalivamo z okuženo vodo (na rastlinah za vabo), vir novih okužb s PSTVd (Preglednica 7, Slika 25). Ker na nadzemnih delih rastlin za vabo nismo dokazali prisotnosti viroida in ker bolezenskih znamenj, značilnih za okužbo s PSTVd, na gomoljih nismo opazili (Slika 12), je možno, da je bila okužena le povrhnjica gomoljev in so se rastline, zrasle iz teh gomoljev, okužile z viroidom v času kalitve. Vse okužene rastline so kalile šele po 10. tednu po saditvi in so imele, v primerjavi z večino neokuženih rastlin, močnejša stebela (Sliki 13 in 14). Kaljenje rastlin po 10. tednu po saditvi z debelejšimi stebli smo opazili tudi pri rastlinah iz kontrole, zato poznejše izraščanje in debelejša stebela niso posledica okužbe s PSTVd. Teoretična verjetnost, da pride do okužbe s povzročitelji bolezni, če izraščajo debelejša stebela iz gomoljev, je večja. Razlog je v večji površini, ki pri kaljenju predre povrhnjico gomolja (če je bil PSTVd na povrhnjici gomoljev), ali v intenzivnejšem vsrkavanju hranil iz gomoljev (če je bil PSTVd tudi v gomoljih). S PSTVd so bile okužene rastline cv. Donald in Nicola, ne pa tudi rastline cv. Hermes, kar je najverjetneje posledica različne občutljivosti sort.

V poskusu s PVY^{NTN} pa okužbe nismo dokazali niti na rastlinah, zraslih iz gomoljev, ki so se razvili na rastlinah za vabo (Preglednica 7). Vrednosti Cq inokulumov so bile nižje kot vrednosti Cq, ki so jih (Vidic, 2011) določili za najmanjše razredčenosti v vodi, s katerimi še lahko mehansko okužimo testne rastline. Torej ocenjujemo, da je bila koncentracija PVY^{NTN} v inokulumu dovolj velika, da bi z njo lahko mehansko okužili testne rastline. V podobnem predhodnem poskusu (Vidic, 2011) so ugotovili, da se rastline paradižnika lahko okužijo preko korenin rastlin, gojenih v zemlji, s PepMV le, če jih zalivamo z močno okuženo vodo (Cq inokuluma 14). Takšnega načina okužbe s PepMV niso dokazali, če so bile rastline zalivane z vodo, ki je vsebovala nižje titre virusa (Cq inokuluma 24 in 30). Da je sistemsko razširjanje virusov po okužbi preko korenin najverjetneje povezano s koncentracijo virusa v hranilni raztopini, so opozarjali

že Pares in sod. (1992). Predvidevali so, da bi bila lahko koncentracija ToMV v hranilni raztopini razlog neujemanja njihovih rezultatov z rezultati iz poskusa, ki ga je izvedel Paludan leta 1985, v katerem številne rastline paradižnika, ki so se okužile s ToMV preko korenin, niso bile sistemsko okužene. V poskusu, ki so ga izvedli Pares in sod. (1992) so bile namreč vse rastline sistemsko okužene s ToMV že 35. dan poskusa. Zato predvidevamo, da bi bila okužba v našem poskusu s PVY^{NTN}, pa tudi s PSTVd, učinkovitejša, če bi za inokulum uporabili večjo koncentracijo virusa / viroida.

5.3.2 Širjenje PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd s hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji

5.3.2.1 PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd se v mehansko okuženih rastlinah paradižnika oziroma krompirja močno namnožijo

PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd so se namnožili v nadzemnih delih mehansko okuženih rastlin paradižnika oziroma krompirja in v njihovih koreninah (Preglednice 8, 11 in 15). Možnost namnožitve PVY, PepMV in PSTVd v koreninah paradižnika oziroma krompirja je bila dokazana tudi v drugih raziskavah (Mehle in sod., 2004; Soler-Aleixandre in sod., 2007; Khan in sod., 2009). Glede na vrednosti Cq ocenjujemo, da je bila koncentracija teh povzročiteljev bolezni v nadzemnih delih in v koreninah mehansko okuženih rastlin relativno visoka (Slike 27–29).

5.3.2.2 PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd se sproščajo iz okuženih korenin paradižnika oziroma krompirja v hranilno raztopino

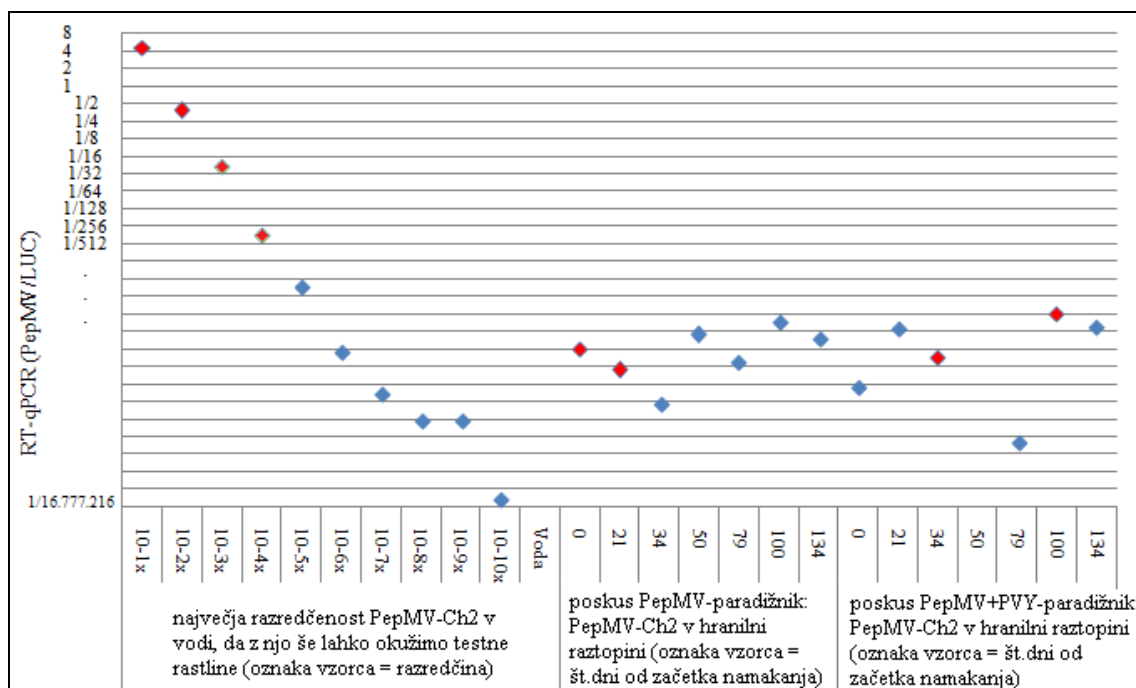
Z RT-qPCR smo oba virusa in viroid dokazali tudi v hranilni raztopini (Preglednice 8, 11 in 15). Naše raziskave so prve, ki dokazujejo, da se PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd sproščajo iz okuženih korenin v hranilno raztopino. Možnost sproščanja nekaterih drugih virusov, ki povzročajo bolezni na rastlinah, je bila sicer že dokazana, na primer za PepMV-EU (Schwarz in sod., 2010), ToMV (Pares in sod., 1992) in PFBV (Krczal in sod., 1995).

Pares in sod. (1992) so ToMV v krožeči hranilni raztopini, z elektronsko mikroskopijo po koncentriranju s centrifugiranjem, dokazali že tretji dan po okužbi listov, nato se je koncentracija virusnih delcev v hranilni raztopini postopoma zviševala. Pares in sod. (1992) so bili prvi, ki so skušali kvantificirati viruse v hranilni raztopini, in sicer z

metodo štetja delcev, opaženih z elektronsko mikroskopijo. Večje rastline imajo več tkiva, v katerem se ToMV lahko razmnožuje, hkrati imajo tudi večji koreninski sistem, skozi katerega se virus lahko sprošča v hranilno raztopino. Večje sproščanje ToMV v hranilno raztopino so opazili tudi, če so korenine ranili oziroma v času večjega propadanja korenin. Krczal in sod. (1995) so virus PFBV v hranilni raztopini s testom ELISA po ultracentrifugiranju zaznali v dveh tednih po mehanski okužbi. Tudi v njihovem primeru se je koncentracija virusnih delcev v hranilni raztopini nato dva tedna postopoma zviševala. Koncentracija PepMV-EU v hranilni raztopini pri poskusu, ki so ga izvedli Schwarz in sod. (2010), je bila nizka, saj so virus v hranilni raztopini po ultracentrifugiranju zaznali z RT-PCR in s testnimi rastlinami, ne pa z ELISA in IC-RT-PCR.

V našem poskusu je bila koncentracija PepMV-Ch2 v hranilni raztopini, vsaj v nekaterih časovnih točkah, dovolj visoka, da smo z njo lahko mehansko okužili testne rastline (Preglednica 8, Slika 26). Nasprotno je bila koncentracija PVY^{NTN} in PSTVd v hranilni raztopini, v vseh časovnih točkah, prenizka za uspešno mehansko okužbo testnih rastlin (Preglednici 11 in 15). Primerjava rezultatov tega poskusa z rezultati poskusa, opisanega v točki 4.1, kaže na to, da je bila koncentracija PepMV-Ch2 in PSTVd v hranilni raztopini pod mejo zmožnosti mehanske okužbe testnih rastlin (Sliki 24 in 26). Uspešno mehansko okužbo testnih rastlin s hranilno raztopino iz poskusov PepMV-paradižnik in PepMV+PVY-paradižnik lahko razlagamo na različne načine. Razlog je lahko v občutljivosti testnih rastlin (podrobna razlaga v točki 2.1.4) ali v mediju, v katerem je bil virus (v poskusu za ugotavljanje največje razredčenosti, ki je še zmožna okužbe testnih rastlin, je bil medij voda, v poskusu s hidroponije pa hranilna raztopina). Vsekakor ne smemo zanemariti bistvene razlike v načinu okužbe medija s PepMV-Ch2: v poskusu za ugotavljanje največje razredčenosti, ki je še zmožna okužbe, je bila voda okužena z dodajanjem macerata okuženih listov, v poskusu s hidroponije pa so se virusni delci sproščali iz korenin v hranilno raztopino. Poleg tega je bil macerat narejen iz zamrznjenih okuženih listov (glej 5.1), in ne nazadnje se lahko pri maceraciji listov sproščajo rastlinske substance, kot na primer proteaze, ki morda vplivajo na infektivnost virusa.

Manjše število testnih rastlin (običajno štiri) smo mehansko okužili le enkrat, medtem ko so se na hidroponiji virusi oziroma viroid kopičili dalj časa. Poleg tega so bile rastline, ki smo jih uporabili kot vabo, kar štiri mesece nepretrgoma v stiku z okuženo hranilno raztopino. Zaradi navedenega so rezultati, o katerih razpravljamo v nadaljevanju, pričakovani.



Slika 26: Relativna količina RNA PepMV-Ch2 glede na LUC v vzorcih vode oziroma hranilne raztopine
 Figure 26: The amount of PepMV-Ch2 RNA relative to LUC in the positive samples of water / nutrient solution

Številke na osi y predstavljajo antilogaritem razlike med vrednostma Cq amplikona LUC in PepMV (skala je logaritemska z osnovo 2). Rdeče točke označujejo vzorce, pri katerih smo prisotnost PepMV potrdili tudi z mehansko okužbo testnih rastlin, modre pa vzorce, pri katerih prisotnosti PepMV z mehansko okužbo testnih rastlin nismo potrdili. Manjkajoče točke pomenijo, da v vzorcu z RT-qPCR nismo dokazali prisotnosti PepMV. Podrobne vrednosti so v Prilogi X.

5.3.2.3 Možnost okužbe zdravih rastlin krompirja oziroma paradižnika s hranilno raztopino, okuženo s PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd, preko korenin v hidropnih sistemih

V koreninah rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo, smo prisotnost PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd potrdili v prvem ali najpozneje v drugem mesecu po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednice 8, 11 in 15). Po prvem mesecu izvajanja poskusa je opazen trend pomnoževanja virusa (manjšanja vrednosti Cq), najbolj očitno v primeru PepMV-Ch2 (Preglednica 8), za vzorce korenin rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo. To kaže na možnost, da je prišlo do množenja virusa / viroida v koreninah, ali pa je bilo to zgolj posledica večje vezave virusa / viroida na površino korenin. S primerjavo razlike med vrednostmi Cq za vzorce korenin (Slike 27–29) lahko trdimo, da je bila koncentracija obeh virusov in viroida v koreninah rastlin, ki smo jih uporabili kot

vabo, statistično pomembno manjša od koncentracije le-teh v koreninah mehansko okuženih rastlin.

V naših poskusih smo korenine občasno mehansko poškodovali, da bi čim bolj posnemali razmere v naravnem okolju, ker v naravi številni drugi faktorji, na primer mikrofavna, nematodi, rast korenin skozi substrat itd., lahko poškodujejo korenine in tako vplivajo na vstop virusov in viroidov v korenine.

Tri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino smo PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd prvič dokazali tudi v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo (Preglednice 8, 11 in 15). Ob koncu poskusa smo z RT-qPCR dokazali prisotnost PepMV-Ch2 v 10 od 12 rastlin paradižnika (Preglednica 10), PVY^{NTN} pa v eni od šestih (Preglednica 12) in PSTVd v dveh od šestih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo (Preglednica 16; in sicer v novo zraslih poganjkih iz baze stebela). V našem poskusu so se zdrave rastline okužile s PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd preko vode brez prisotnosti glivnih spor (glej točko 3.4.2). Podobno kot smo mi dokazali za PepMV-Ch2, so tudi Schwarz in sod. (2010) dokazali okužbo zdravih rastlin paradižnika s PepMV-EU preko vode. V podobnem poskusu, ki so ga izvedli Alfaro-Fernandez in sod. (2010), pa se je PepMV-EU prenesel preko vode na rastline paradižnika le, če so jih zalivali z drenažno vodo, dobljeno iz rastlin, okuženih s PepMV-EU in z glivo *O. virulentus*. V odsotnosti glive do okužbe s PepMV, v njihovem poskusu, ni prišlo.

V nadzemnih delih rastlin krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, smo PVY^{NTN} dokazali 54. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednica 11 in Priloga U). Ob koncu poskusa sta bili s PVY^{NTN} okuženi dve rastlini krompirja od šestih (Preglednica 13). PSTVd pa nismo dokazali v nadzemnih delih rastlin krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, niti štiri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino (Preglednica 15).

Prvi, ki so nedvoumno dokazali možnost, da se virusi lahko sproščajo iz korenin v hranilno raztopino, kjer lahko preživijo in nato okužijo druge rastline preko korenin brez dotika, so bili Pares in sod. (1992). To so dokazali na primeru okužbe paradižnika s ToMV. Deseti dan poskusa so opazili bolezenska znamenja na prej zdravih rastlinah, pri katerih korenine niso bile v stiku s koreninami mehansko okuženih rastlin. V vseh primerih so okužbo s ToMV na rastlinah, ki so jih uporabili v poskusu kot vabo, najprej zaznali v koreninah, pozneje pa tudi v listih, pri čemer so bile vse rastline sistemsko okužene že 35. dan poskusa. Krczal in sod. (1995) so dokazali prenos PFBV na rastline

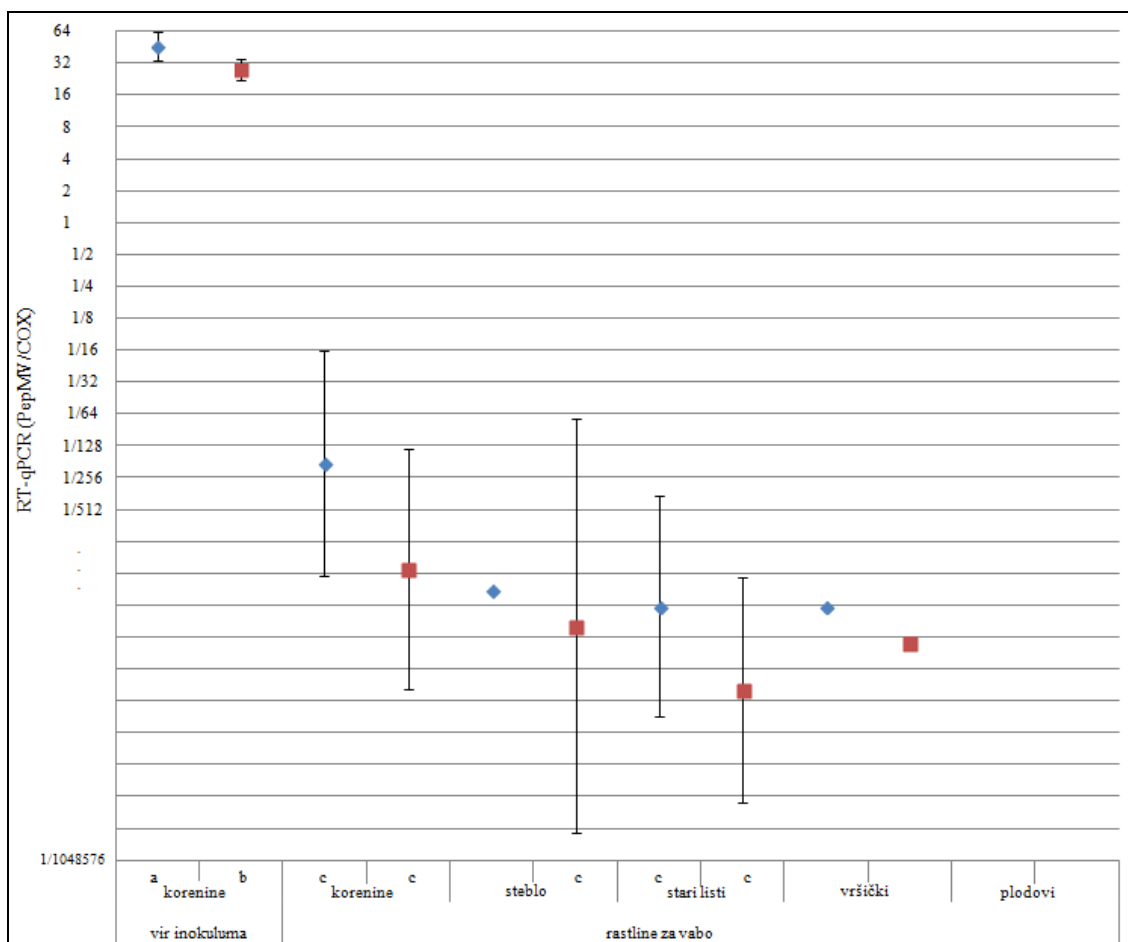
pelargonij s krožečo hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji. S pomočjo črpalke je v njihovem namakalnem sistemu hranilna raztopina zaokrožila trikrat na dan. Sedem tednov po okužbi so virus zaznali v prvih poganjkih prej zdravih rastlin, ki se tudi v tem primeru niso dotikale okuženih rastlin in so bile hkrati zaščitene pred morebitnimi žuželčjimi prenašalci. Odstotek okuženih rastlin se je postopoma povečeval in 15 tednov po okužbi so bile okužene vse rastline.

V poskusu, ki so ga izvedli Schwarz in sod. (2010) v klimatskih komorah, so hranilno raztopino od rastlin, okuženih s PepMV-EU, tedensko pretakali do korenin zdravih rastlin. Tudi v njihovem poskusu so bile zdrave rastline popolnoma ločene od rastlin, okuženih s PepMV-EU. PepMV-EU so v koreninah prvotno zdravih rastlin paradižnika cv. Castle Rock zaznali v času od enega do petih tednov po začetku poskusa. V listih in zelenih plodovih pa PepMV niso zaznali s testom ELISA niti 11 tednov po začetku poskusa. Ugotovili so, da se korenine tri tedne starih sadik lažje okužijo kot korenine pet tednov starih sadik. Drug poskus so izvedli v rastlinjaku, kjer je hranilna raztopina neprestano krožila (hitrost pretoka: 2 l min^{-1}). V tem drugem poskusu so prve okužbe korenin prej zdravih rastlin paradižnika cv. Hildares in Castle Rock zaznali v dveh oziroma v šestih tednih. Že en teden po okužbi korenin so virus potrdili tudi v mlajših, ne pa v starejših listih. V 11. tednu po začetku poskusa so virus v mlajših listih paradižnika cv. Hildares zaznali v 75 %, v starejših listih pa v 17 %. Enajsti teden so virus potrdili v vseh zrelih plodovih paradižnika cv. Hildares in 13. teden v 27 % plodov paradižnika cv. Castle Rock. Bolezenskih znamenj na listih, okuženih s PepMV preko korenin, niso opazili, pač pa se je zmanjšal pridelek paradižnika cv. Castle Rock. Njihovi rezultati kažejo na to, da se je virus iz korenin razširil s floemskim sokom. Ker je transport floema intenzivnejši v razvijajoče se dele rastlin (mlajši listi, plodovi), je rezultat pričakovan. Velike razlike, kdaj so virus lahko zaznali v koreninah in kakšna je bila uspešnost okužbe nadzemnih delov prej zdravih rastlin, niso pripisali le za virus različno občutljivim kultivarjem, temveč tudi drugačnim rastnim pogojem in starosti sadik, ki so v stiku z okuženo hranilno raztopino.

PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd so bili v nadzemnih delih rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo, neenakomerno razporejeni. PepMV-Ch2 smo dokazali v različnih kombinacijah, ali v plodu (Priloga O), stebelu, v starejših ali mlajših listih (listi v vršičku) paradižnika (Preglednici 9 in 10), PVY^{NTN} v starejših listih paradižnika (Preglednica 12) oziroma v stebelu ali v starejših listih krompirja (Preglednica 13), PSTVd pa v poganjkih, ki so izraščali na novo iz baze stebela paradižnika (Preglednica 16). PepMV-Ch2 smo v teh rastlinah pogosteje potrdili v starejših listih v primerjavi z mlajšimi (Preglednici 9 in 10), kar je v nasprotju z raziskavami, ki so jih opravili

Schwarz in sod. (2010) na primeru PepMV-EU. Le-ti so prisotnost PepMV-EU bolj pogosto zasledili v mlajših listih rastlin, okuženih preko korenin z vodo, in le občasno tudi v starejših listih. Razlike v rezultatih za PepMV-EU in PepMV-Ch2 so lahko posledica različne agresivnosti genotipov PepMV (Hanssen in sod., 2008), različnih kultivarjev in različnih pogojev gojenja.

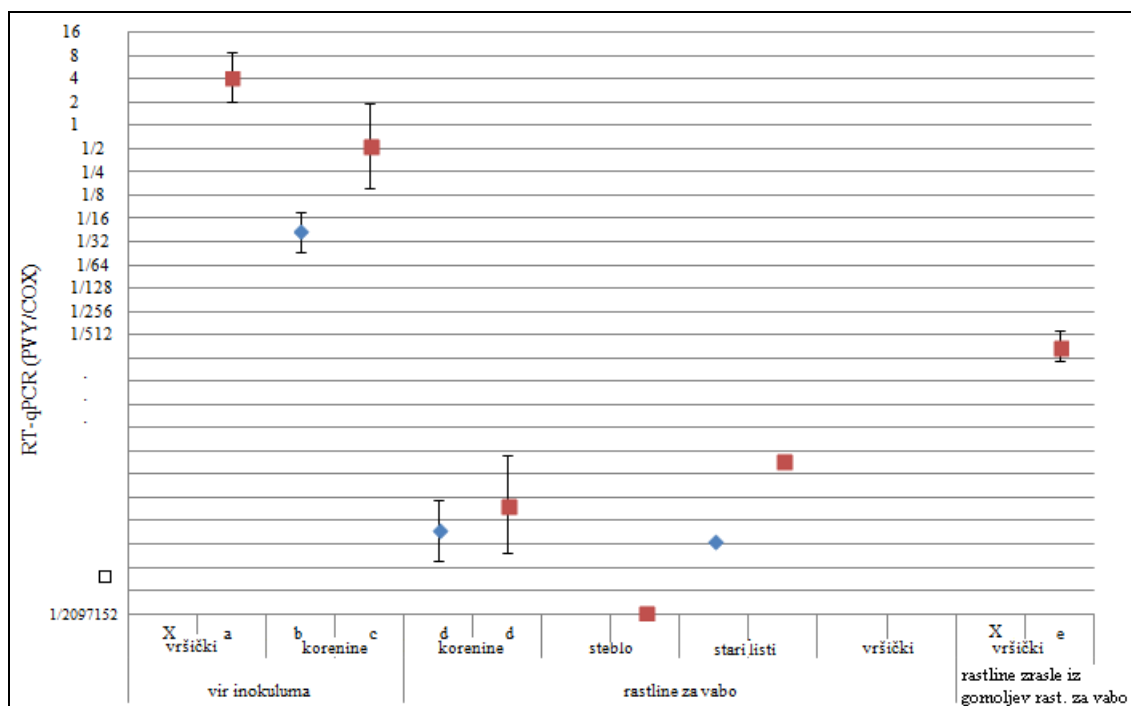
Ocenjena koncentracija PepMV-Ch2 v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo, ni bila statistično pomembno manjša od ocenjene koncentracije PepMV-Ch2 v koreninah teh istih rastlin (Slika 27). Razlika v ocenjenih koncentracijah PepMV-Ch2 v koreninah mehansko okuženih rastlin pri poskusu PepMV-paradižnik in poskusu PepMV+PVY-paradižnik je bila statistično pomembna, vendar statistično pomembnih razlik v koncentraciji PepMV-Ch2 na rastlinah, ki smo jih uporabili v obeh poskusih kot vabo, nismo opazili (Slika 27). Z RT-qPCR smo dokazali prisotnost PepMV-Ch2 v štirih od šestih rastlin paradižnika za vabo iz poskusa PepMV-paradižnik ter v vseh (šestih) rastlinah za vabo iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik. V vseh rastlinah za vabo iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik smo PepMV-Ch2 potrdili v starejših listih, pri štirih rastlinah tudi v steblu, medtem ko je bil okužen vršiček le ene rastline. Nasprotno smo z RT-qPCR prisotnost PepMV-Ch2 potrdili v vršičkih kar treh od štirih rastlin za vabo iz poskusa PepMV-paradižnik, pri katerih je bila okužba s PepMV-Ch2 potrjena. Prisotnost PepMV-Ch2 je bila v teh rastlinah potrjena tudi v starejših listih, v steblu pa smo z RT-qPCR okužbo s PepMV-Ch2 potrdili le pri dveh rastlinah. Te razlike so lahko posledica različne koncentracije PepMV-Ch2 v viru inokuluma (Slika 27), do katere bi lahko prišlo tudi zaradi sočasne okužbe rastlin, ki smo jih imeli v poskusu PepMV+PVY-paradižnik kot vir inokuluma, s PVY^{NTN}.



Slika 27: Relativna količina RNA PepMV-Ch2 glede na COX v pozitivnih vzorcih 134. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino v poskusu PepMV-paradižnik (modre točke) in v poskusu PepMV+PVY-paradižnik (rdeče točke)

Figure 27: The amount of PepMV-Ch2 RNA relative to COX in positive samples from the PepMV-tomato (blue spots) and PepMV+PVY-tomato (red spots) experimental hydroponic systems 134 days after the initiation of irrigation with infested nutrient solution

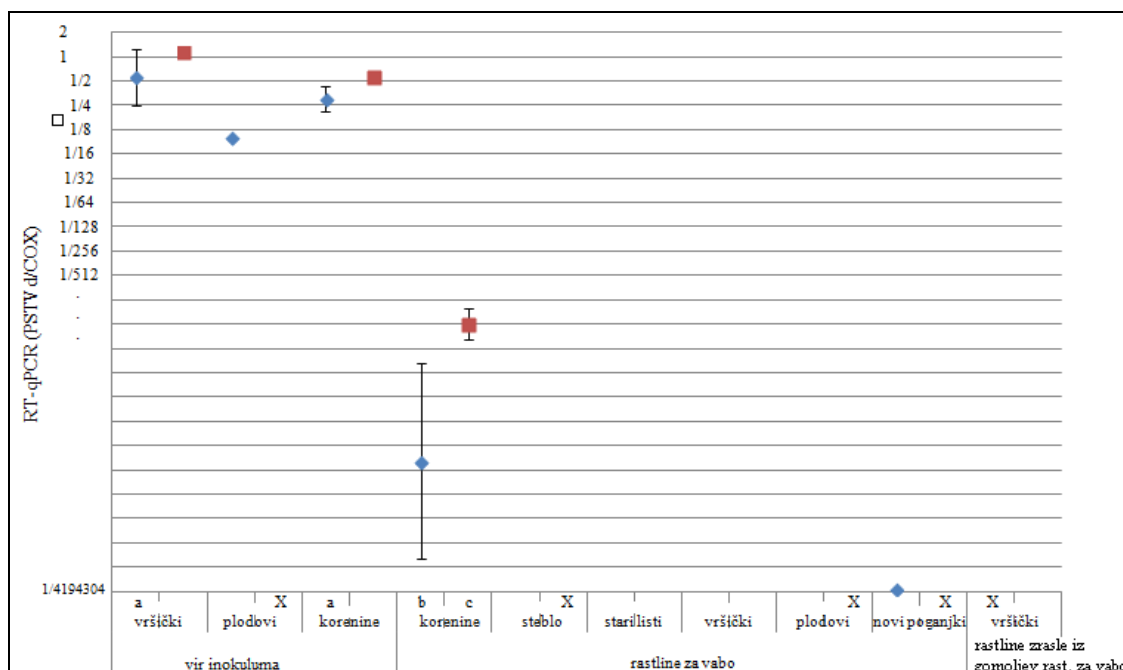
Številke na osi y predstavljajo antilogaritem povprečne razlike med vrednostma Cq amplicona COX in PepMV (skala je logaritemska z osnovo 2). Standarna napaka je prikazana le v primeru, ko so bili za isto tkivo pozitivni vsaj štiri vzorci. Vrednosti, označene z a, b in c, so statistično pomembno različne ($p < 0,05$). Manjkajoče točke pomenijo, da z RT-qPCR v nobenem vzorcu nismo dokazali prisotnosti virusa. Podrobne vrednosti in izračuni so v Prilogah P in S.



Slika 28: Relativna količina RNA PVY^{NTN} glede na COX v pozitivnih vzorcih 134. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino v poskusu PepMV+PVY-paradižnik (modre točke) in 131. dan v poskusu PVY-krompir (rdeče točke)

Figure 28: The amount of PVY^{NTN} RNA relative to COX in positive samples from the PepMV+PVY-tomato (blue spots) and PVY-potato (red spots) experimental hydroponic systems 134/131 days, respectively, after initiation of irrigation with infested nutrient solution

Številke na osi y predstavljajo antilogaritem povprečne razlike med vrednostma Cq amplikona COX in PVY (skala je logaritemska z osnovo 2). Standarna napaka je prikazana le v primeru, ko so bili za isto tkivo pozitivni vsaj trije vzorci. Vrednosti, označene z a, b, c, d in e, so statistično pomembno različne ($p < 0,05$). Manjkajoče točke pomenijo, da z RT-qPCR v nobenem vzorcu nismo dokazali prisotnosti virusa. Mesta, označena z X, pomenijo, da ni bilo analizirano. Podrobne vrednosti in izračuni so v Prilogah T in V.



Slika 29: Relativna količina RNA PSTVd glede na COX v pozitivnih vzorcih 141. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino v poskusu PSTVd-paradižnik (modre točke) in 125. dan v poskusu PSTVd-krompir (rdeče točke)

Figure 29: The amount of PSTVd RNA relative to COX in positive samples from the PSTVd-tomato (blue spots) and PSTVd-potato (red spots) experimental hydroponic systems 141/125 days, respectively, after initiation of irrigation with infested nutrient solution

Številke na osi y predstavljajo antilogaritem povprečne razlike med vrednostma Cq amplicona COX in PSTVd (skala je logaritemska z osnovo 2). Standardna napaka je prikazana le v primeru, ko so bili za isto tkivo pozitivni vsaj trije vzorci. Vrednosti, označene z a, b in c, so statistično pomembno različne ($p < 0,05$). Manjkajoče točke pomenijo, da z RT-qPCR v nobenem vzorcu nismo dokazali prisotnosti viroida. Mesta, označena z X, pomenijo, da ni bilo analizirano. Podrobne vrednosti in izračuni so v Prilogah Ž in W.

5.3.2.4 Možnost okužbe sadilnega materiala z okuženo hranilno raztopino v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji

Dokazali smo, da so lahko gomolji krompirja, ki zrastejo v okuženih hidroponskih sistemih, okuženi s PVY^{NTN}. Ocenjujemo, da je bila koncentracija PVY^{NTN} v rastlinah zraslih iz gomoljev rastlin za vabo, statistično pomembno večja kot v materinih rastlinah (rastlinah za vabo) (Slika 28).

Gomolji, ki so se formirali na rastlinah, ki smo jih uporabili v poskusu PSTVd-krompir kot vabo, niso bili okuženi; vsaj ne v taki meri, da bi iz njih zrasle okužene rastline. Razlog bi bil lahko v prenizki koncentraciji viroida v hranilni raztopini. Po oceni (Slika 24) je bila koncentracija viroida v hranilni raztopini manjša kot v poskusu, pri katerem

smo v zemljo vbrizgavali okuženo vodo in pri katerem smo dokazali možnost okužbe gomoljev, ki so se razvili na rastlinah, oziroma rastlin, zraslih iz teh gomoljev, s PSTVd.

V našem poskusu nismo dokazali možnosti prenosa PSTVd s semeni paradižnika niti, ko smo posejali semena, pridobljena iz plodov tistih rastlin paradižnika, ki smo jih okužili mehansko. Ker Diener in Raymer (1971) navajata, da so lahko tudi semena paradižnika vir okužbe s PSTVd, so lahko naši nepričakovani rezultati posledica premajhnega števila posejanih semen. Možno je namreč, da se, podobno kot PepMV (v poskusu, ki so ga izvedli Hanssen in sod. (2010), je bil prenos s semeni paradižnika dokazan v 0,026 % od 87.000 analiziranih rastlin), tudi PSTVd s semeni širi le v majhnem deležu. V poskusu PepMV-paradižnik smo okužbo s PepMV-Ch2 potrdili v enem zrelem plodu iz rastline, ki smo jo uporabili kot vabo, zato lahko sklepamo, da so bila okužena tudi semena v njem.

5.4 POMEN ŠIRJENJA PSTVd, PVY^{NTN} IN PepMV-CH2 Z VODO

Voda kot možna pot širjenja rastlinskih virusov in viroidov je bila v preteklosti spregledana, najverjetneje zaradi nizke koncentracije teh povzročiteljev boleznih v vodi. Nizke koncentracije povzročiteljev boleznih so problematične za določanje (Mehle in Ravnikar, 2012), hkrati se rastline z nizkimi koncentracijami okužijo z zakasnitvijo (točka 5.3.2.3). Rastline rastejo na hidroponiji več mesecev, rastline paradižnika skoraj vse leto, zato velika stabilnost teh povzročiteljev boleznih v vodnem okolju (točka 5.2) lahko omogoči kopičenje le-teh v sistemu. Vsekakor, če bi bila koncentracija PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd v hranilni raztopini večja, bi bila večja tudi učinkovitost okužbe rastlin preko korenin. To so že dokazali Pares in sod. (1992) za ToMV ter Vidic (2011) v poskusu namakanja rastlin paradižnika z različnimi koncentracijami PepMV-Ch2.

Dokazali smo, da se lahko PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd sproščajo iz poškodovanih korenin v vodno okolje in nato preko korenin okužijo zdrave rastline v sistemu gojenja rastlin na hidroponiji. V pogojih našega poskusa se je okužba teh rastlin s PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd pogosto omejila na korenine. Če so se okužili tudi poganjki, je do okužbe poganjkov prišlo z zakasnitvijo, hkrati je bila okužba v nadzemnih delih teh rastlin zelo neenakomerno razporejena. Voda torej ni najpomembnejši način za širjenje PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd med rastlinami, vendar se lahko okužba z ene rastline hitro razširi na sosednje rastline na druge načine, na primer mehansko ali z vektorji.

Poleg tega smo dokazali, da so lahko gomolji, ki se razvijejo na rastlinah, ki jih zalivamo z okuženo vodo, vir novih okužb s PVY^{NTN} in PSTVd. Zato možnosti širjenja virusov in viroidov z vodo ne smemo zanemariti, zlasti ne, če rastline gojimo na hidroponijah, kjer voda v sistemu kroži.

6 SKLEPI

Dokazali smo, da se lahko PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd, ekonomsko pomembni povzročitelji bolezni na rastlinah paradižnika oziroma krompirja, širijo tudi z vodo. V vodno okolje se lahko le-ti sproščajo iz korenin okuženih rastlin. Za PSTVd smo dokazali, da v vodi pri temperaturi 20 ± 4 °C preživi do sedem tednov. Iz vode lahko povzročitelji bolezni, nedvoumno dokazano vsaj za PepMV-Ch2 in PVY^{NTN}, preidejo v zdrave rastline preko korenin. Dokazali smo, da so lahko gomolji, ki se razvijejo na rastlinah, ki jih zalivamo z vodo, okuženo s PSTVd ali PVY^{NTN}, vir novih okužb.

Nedvomno je širjenje PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd z vektorji ali preko mehansko poškodovane listne površine učinkovitejše od širjenja z vodo, vendar možnosti širjenja z vodo v študijah epidemiologije in pri pripravah ocen tveganja ne smemo zanemariti, zlasti ne, če rastline rastejo na hidroponijah, kjer voda v sistemu neprestano kroži. Do okužbe rastlin z okuženo vodo lahko pride, tudi če so koncentracije povzročiteljev bolezni pod mejo detekcije s klasičnimi diagnostičnimi metodami. Zato je nujna uporaba metod za koncentriranje vodnih vzorcev ter visoko občutljivih diagnostičnih metod, ki so primerne za izvajanje monitoringa vod.

7 POVZETEK (summary)

7.1 POVZETEK

V vodah je bila potrjena prisotnost številnih rastlinskih virusov, vendar za številne viruse, najdene v vodnih virih, možnost preživetja v vodi in njihovo širjenje z vodo nista raziskana. Razlog je predvsem v tem, da so za to potrebne dolgotrajne in kompleksne raziskave. V komercialnih proizvodnih nasadih paradižnika in krompirja pogosto gojijo rastline na hidroponijah ali nasade intenzivno namakajo, zato smo se odločili raziskati, ali je lahko voda vir okužbe s tremi razmeroma stabilnimi in kužnimi rastlinskimi patogenimi mikrobi, ki povzročajo velike ekonomske izgube na rastlinah paradižnika oziroma krompirja: genotip Ch2 virusa mozaika pepina (*Pepino mosaic virus* genotype Ch2; PepMV-Ch2), nekrotični različek krompirjevega virusa Y (*Potato virus Y strain NTN*; PVY^{NTN}) in viroid vretenatosti gomoljev krompirja (*Potato spindle tuber viroid*; PSTVd). Poznavanje teh možnosti je nujno za uspešno preprečevanje širjenja povzročiteljev bolezni in s tem povezanih velikih izgub za prehrano pomembnih kmetijskih pridelkov, ki bi jih virus / viroid lahko povzročil.

Ugotavljali smo možnost preživetja PSTVd v vodi na temperaturi 20 ± 4 °C. Možnost širjenja PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd z vodo preko korenin ali v času kalitve gomoljev v nadzemne dele rastlin ali v razmnoževalni material smo ugotavljali s poskusi gojenja rastlin na hidroponiji in s poskusi, pri katerih smo v zemljo dodajali okuženo vodo. Prisotnost virusov / viroida v rastlinskih delih in v hranilni raztopini / vodi smo preverjali z RT-PCR v realnem času (RT-qPCR), kužnost hranilne raztopine / vode pa z mehansko okužbo testnih rastlin. V preliminarnih poskusih smo preverili, kakšna je največja razredčenost PSTVd in PepMV-Ch2 v vodi, da je okužba testnih rastlin še možna. V primerjavi z RT-qPCR je bil biološki test manj občutljiv za 5–8 velikostnih razredov. Z RT-qPCR določamo prisotnost nukleinskih kislin, tudi tistih, ki niso del infektivnih virusnih ali viroidnih delcev. Ne glede na to smo s tem poskusom dokazali, da obstaja neka limita koncentracije virusnih in viroidnih delcev, ki so potrebni za uspešno okužbo testnih rastlin.

Za ugotavljanje preživetja PSTVd v vodi smo okužene liste macerirali in inkubirali v vodi. Precejeno vodo smo shranili v karantenski rastlinjak. Tedensko smo preverjali prisotnost viroidne RNA v vodi z RT-qPCR ter njeno infektivnost z mehansko okužbo testnih rastlin. V našem poskusu smo dokazali, da je PSTVd zelo stabilen v vodnem okolju, saj lahko preživi v vodi na temperaturi 20 ± 4 °C do sedem tednov. Z RT-qPCR pa smo prisotnost viroidne RNA potrdili tudi v poznejšem obdobju.

V poskusih gojenja rastlin na hidroponiji smo kot vir inokuluma uporabili hranilno raztopino, v katero so se, iz korenin okuženih rastlin paradižnika oziroma krompirja, sproščali PepMV-Ch2, PVY^{NTN} ali PSTVd. S to hranilno raztopino smo 125–141 dni namakali zdrave rastline paradižnika / krompirja, ki smo jih v poskusu uporabili za vabo. Poskusi so bili zasnovani tako, da je bilo dotikanje med rastlinami za vabo in mehansko okuženimi rastlinami popolnoma onemogočeno. Preprečen je bil tudi kontakt med hranilno raztopino in zelenim delom rastlin. Občasno smo med poskusom rahlo ranili korenine rastlin, da bi posnemali razmere gojenja rastlin na hidroponiji, pri katerem do ranitev pride zaradi rasti korenin skozi substrat ali zaradi organizmov v sistemu. Periodično smo analizirali hranilno raztopino in različne dele rastlin iz poskusa z RT-qPCR ter infektivnost hranilne raztopine preverjali z mehansko okužbo testnih rastlin. Na koncu poskusa smo gomolje, ki so zrastle na rastlinah, ki smo jih uporabili v poskusu kot vabo, posadili v neokuženo zemljo. V času od 15 do 17 tednov po sajenju gomoljev krompirja smo zrasle rastline (rastline zrasle iz gomoljev rastlin za vabo) analizirali z RT-qPCR. V drugem sklopu poskusov smo sveže pripravljeno vodo z maceratom iz okuženih listov dodajali z injekcijsko iglo v zemljo. Z dodajanjem okužene vode v zemljo smo začeli takoj po posaditvi zdravih gomoljev krompirja in, v intervalih od tri do štiri dni, na ta način dodajali okuženo vodo v zemljo dva meseca. Ob koncu poskusa smo analizirali liste zraslih rastlin (rastline za vabo) z RT-qPCR. Novo nastale gomolje smo presadili v neokuženo zemljo, jih zalivali z vodovodno vodo ter 10–22 tednov po posaditvi analizirali z RT-qPCR rastline, ki so zrasle iz teh gomoljev (rastline zrasle iz gomoljev rastlin za vabo).

Dokazali smo, da se PVY^{NTN}, PepMV-Ch2 in PSTVd v mehansko okuženih rastlinah paradižnika oziroma krompirja močno namnožijo in da se lahko sproščajo iz korenin v hranilno raztopino. Koncentracija virusa PepMV-Ch2 v hranilni raztopini je bila, vsaj v nekaterih časovnih točkah, dovolj visoka, da smo z njo lahko mehansko okužili testne rastline. Nasprotno je bila koncentracija PVY^{NTN} in PSTVd v hranilni raztopini, v vseh časovnih točkah, prenizka za uspešno mehansko okužbo testnih rastlin. V koreninah rastlin, ki smo jih uporabili za vabo, smo prisotnost PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd potrdili v prvem oziroma v drugem mesecu po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino. V pogojih našega poskusa se je okužba rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo, pogosto omejila na korenine. Če so se okužili tudi poganjki, je do okužbe poganjkov prišlo z zakasnitvijo, hkrati je bila okužba v nadzemnih delih teh rastlin zelo neenakomerno razporejena:

- PepMV-Ch2: v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo, smo okužbo s PepMV-Ch2 prvič potrdili tri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino. Ob koncu poskusa je bilo okuženih 10 od 12

rastlin, in sicer je bil okužen ali le plod ali le steblo oziroma starejši ali mlajši listi.

- PVY^{NTN}: v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo, smo okužbo s PVY^{NTN} prvič potrdili po treh mesecih in pol, v krompirju pa že 54. dan po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino. Ob koncu poskusa so bile okužene ena od šestih rastlin paradižnika in dve od šestih rastlin krompirja. Z analiziranjem stebela, starejših in mlajših listov smo okužbo dokazali le v stebelu ali v starejših listih. Okužbo s PVY^{NTN} smo dokazali tudi v gomoljih štirih od šestih rastlin za vabo, saj so iz njih zrastle okužene rastline.
- PSTVd: v nadzemnih delih rastlin paradižnika, ki smo jih uporabili kot vabo, smo okužbo s PSTVd prvič potrdili tri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino. Ob koncu poskusa je bila okužba v izredno nizki koncentraciji potrjena v dveh poganjkih, ki sta izraščala na novo iz baze stebela. Glede na to, da kontaminacij v poskusu in v postopku analize nismo imeli, lahko zaključimo, da se je malo delcev PSTVd preneslo preko korenin v rastline paradižnika. PSTVd v nadzemnih delih rastlin krompirja, ki smo jih uporabili kot vabo, nismo dokazali niti štiri mesece po začetku namakanja z okuženo hranilno raztopino. Vendar smo za PSTVd dokazali, da so gomolji, ki se razvijejo na rastlinah, ki jih zalivamo z vodo, okuženo s PSTVd, vir novih okužb.

Voda kot možna pot širjenja rastlinskih virusov in viroidov je bila v preteklosti spregledana, najverjetneje zaradi nizke koncentracije teh povzročiteljev boleznih v vodi. Nizke koncentracije povzročiteljev boleznih so problematične za določanje, hkrati se rastline v tem primeru okužijo z zakasnitvijo. Zaradi velike stabilnosti PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd v vodnem okolju in ker rastline rastejo na hidroponiji več mesecev, rastline paradižnika skoraj vse leto, se lahko le-ti v sistemu, kjer voda kroži, kopičijo.

Prenos z vodo sicer ni najhitrejši način za širjenje PepMV-Ch2, PVY^{NTN} in PSTVd med rastlinami, vendar se lahko patogen mikrob z ene same rastline z vodo nato hitro razširi na sosednje rastline na druge načine, na primer mehansko ali z vektorji. In ker smo dokazali, da so lahko gomolji, ki se razvijejo na rastlinah, ki jih zalivamo z okuženo vodo, tudi vir novih okužb s PVY^{NTN} in PSTVd, možnosti širjenja virusov in viroidov z vodo ne smemo zanemariti, še zlasti ne, če rastline gojimo na hidroponijah, kjer voda v sistemu kroži.

Rezultate smo objavili v Mehle in sod. (2014).

7.2 SUMMARY

A large number of plant viruses have been detected in aqueous environments, although the documentation concerning their survival in water and their potential for water-borne infection is scarce. This is mainly because the required studies would be long and complex. In the commercial production of tomato and potato, hydroponic systems and/or intensive irrigation are used widely, so we have explored the possibility that water is a source of infection of these two crops, using three relatively stable and transmissible plant pathogens: *Pepino mosaic virus* genotype Ch2 (PepMV-Ch2), *Potato virus Y NTN* strain (PVY^{NTN}), and Potato spindle tuber viroid (PSTVd). These pathogens pose a serious threat to tomato and potato production. This knowledge is necessary for the effective prevention of the spread of the diseases.

In our study, we investigated the survival of PSTVd in water at $20 \pm 4^\circ\text{C}$, and the spread of PepMV-Ch2, PVY^{NTN} and PSTVd through roots and during the sprouting of tubers, and into the green plant parts, and into tubers that develop on the plants. This was followed using an experimental hydroponic system and with inoculum injection of the substrate, to test the hypothesis that water is an alternative pathway to plant infection with PepMV-Ch2, PVY^{NTN} and PSTVd. Reverse-transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used as the main method for the detection of selected pathogens in nutrient solution/ water, and in plant tissues. In addition, the infectivity of the nutrient solution/ water was investigated using mechanical inoculation of test plants. In preliminary studies, the highest dilution that retained the ability to cause infection was determined for PSTVd and PepMV-Ch2. In comparison with RT-qPCR, the biological assay was shown to be five to eight orders of magnitude less sensitive. RT-qPCR detects the presence of nucleic acids, which are not necessarily a part of the infective viral particle. The results indicate that there is a limit of the viral particle concentration that can no longer infect the plants.

For the survival experiment, infected leaves from test plants were macerated and incubated in water at $20 \pm 4^\circ\text{C}$. The plant debris was removed by passing the samples through gauze, and the resulting infested water was stored in a quarantined greenhouse. This infested water was tested weekly for the presence of the viroid using RT-qPCR. The water infectivity was monitored by mechanical inoculation of test plants. The development of symptoms was observed, and confirmed with molecular analysis. The experiment showed that PSTVd is stable in an aqueous environment. It remained infectious in water at $20 \pm 4^\circ\text{C}$ for 7 weeks. After the viroid lost its infectivity, it was still detected by RT-qPCR.

In the experimental hydroponic system, inoculated tomato or potato plants were used as a source of PepMV-Ch2, PVY^{NTN} or PSTVd release into the nutrient solution. Healthy (bait) plants/ tubers were irrigated with the nutrient solution from the tank with the inoculated plants. Over the 4 months of the experiments, special care was taken to prevent any contact between the mechanically inoculated plants and the bait plants, and between the nutrient solution from the inoculate plants and the green parts of the bait plants. Occasionally, the roots of the inoculated and bait plants were gently stirred with a glass rod, to imitate the real conditions in a hydroponic system, where injuries to the root systems can be expected, due to the presence of macrobiota and the growth of the roots through the glass wool. Periodically, the nutrient solution and different parts of both the inoculated and bait plants were analyzed separately by RT-qPCR. In addition, the infectivity of the nutrient solution was checked with mechanical inoculation of test plants. At the end of the experiments, the tubers that developed on the potato bait plants were planted into substrate. Four months after planting, the newly grown potato plants were tested by RT-qPCR. For the injection of the inocula into the substrate, PSTVd- and PVY^{NTN}-infested water were prepared by macerating infected leaves in water, followed by removal of the plant debris. The administration of PSTVd- and PVY^{NTN}-infested water was initiated immediately after the potato seed tubers were planted. Freshly prepared infested water was added to the substrate with a syringe, every 3 or 4 days. Two months after planting, the upper leaves of the newly grown plants were tested using RT-qPCR. The cleaned and dried tubers that developed on these plants were planted into new pots, and watered with non-infested water. Then, 10-22 weeks after planting, the newly grown potato plants were tested using RT-qPCR.

PepMV-Ch2, PVY^{NTN} and PSTVd were detected in the upper, non-inoculated leaves and also in the roots of systemically infected tomato/ potato plants, which were therefore used as the source of the inocula. PepMV-Ch2, PVY^{NTN} and PSTVd can be released from injured plant roots into the nutrient solution. Both viruses and viroid were detected in the nutrient solution using RT-qPCR, from the first month after initiation of irrigation until the end of the study. Interestingly, we failed to confirm the infectivity of the nutrient solution in almost all cases, as this was only seen for 12% of the test plants that were mechanically inoculated with PepMV-Ch2-infested nutrient solution. The presence of viruses/ viroid in root samples of the tomato/ potato bait plants was confirmed in the first to the second month after initiation of irrigation with infested nutrient solution. Under our experimental conditions, the infections acquired through the roots were sometimes restricted to the roots, or, if not, they became systemic in the shoots after a significant delay, and showed uneven distributions through the plants:

- PepMV-Ch2: in the upper parts of the tomato bait plants, PepMV-Ch2 was

detected 3 months after initiation of the irrigation with infested nutrient solution. At the end of the study, a separate analysis confirmed the presence of PepMV-Ch2 in 10 of 12 bait plants. It was detected in fruit, stems and in old and new leaves.

- PVY^{NTN}: in the upper parts of the tomato bait plants, PVY^{NTN} was detected 3.5 months from the initiation of irrigation with infested nutrient solution, while in the potato bait plants, it was detected earlier (54 days from the initiation of irrigation with infested nutrient solution). At the end of the study, a separate analysis confirmed the presence of PVY^{NTN} in 1 of 6 tomato and in 2 of 6 potato bait plants. The presence of PVY^{NTN} was confirmed in stems and old leaves, but not in young leaves. In addition, the presence of PVY^{NTN} was confirmed in plants grown from the tubers obtained from 4 of 6 potato bait plants.
- PSTVd: this was first observed in the upper green parts of the tomato bait plants 3 months after initiation of irrigation with PSTVd-infested nutrient solution. At the end of the study, a separate analysis with RT-qPCR confirmed the presence of PSTVd in 2 of 6 tomato bait plants. Moreover, it was only detected in new shoots growing from the lower parts of the plants. As no contamination was observed during either sample analysis or greenhouse manipulation, we can conclude that PSTVd transmission occurred, although with a low efficiency. In contrast, PSTVd was not detected in the upper green parts of the potato bait plants at any time over the 4 months of the study, and it was also not confirmed in the newly formed tubers of these potato bait plants. However, tubers developed by plants grown in the substrate watered with PSTVd-infested water were confirmed to be a source of viroid infection.

Water has been overlooked as a virus/ viroid infection pathway, most probably due to the low pathogen concentrations in aqueous media. These pathogens are difficult to detect at low concentrations, although this might also be due to the slower water-mediated plant infection rather than mechanical transmission between the green parts of the plants. In hydroponic systems, plants like tomato are typically grown for several months – tomato, in particular, is grown for almost a year. Therefore, the high stability of these pathogens in aqueous environments might allow them to accumulate in and on root systems. Certainly, higher concentrations of PepMV-Ch2, PVY^{NTN} and PSTVd in the recirculating nutrient solution would result in higher infection rates.

Our data indicate that water appears not to be the most important mode of transmission

of PepMV-Ch2, PVY^{NTN} and PSTVd between plants. It can, however, enable infection of individual plants, after which both viruses and viroids can then rapidly and effectively spread to neighboring plants, either mechanically or by vectors, or in other ways. In addition, tubers developed on plants grown in substrate/ hydroponic system watered with PSTVd/PVY^{NTN}-infested water were confirmed to be the source of PSTVd/PVY^{NTN} infection. For all of these reasons, the potential of water as a transmission route for plant viruses/ viroids should not be ignored, especially in hydroponic systems where recycled water is used.

Our results are presented in Mehle et al. (2014).

8 VIRI

- Abraham W.R. 2011. Megacities as sources for pathogenic bacteria in rivers and their fate downstream. *International Journal of Microbiology*, Article ID 798292, doi:10.1155/2011/798292: 13 str.
- Accotto G.P., Navas-Castillo J., Noris E., Moriones E., Louro D. 2000. Typing of *Tomato yellow leaf curl viruses* in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 2: 179-186
- Adams I.P., Glover R.H., Monger W.A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M., Samuitiene M., Boonham N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10, 4: 537-545
- Agindotan B.O., Shiel P.J., Berger P.H. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 142, 1-2: 1-9
- Agrios G.N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. USA, Elsevier Academic Press: 922 str.
- Aguilar J.M., Hernandez-Gallardo M.D., Cenis J.L., Lacasa A., Aranda M.A. 2002. Complete sequence of the *Pepino mosaic virus* RNA genome. *Archives of Virology*, 147, 10: 2009–2015
- Ahmadvand R., Takács A., Taller J., Wolf I., Polgár Z. 2012. Potato viruses and resistance genes in potato. *Acta Agronomica Hungarica*, 60, 3: 283-298
- Alfaro-Fernandez A., Cordoba-Selles M.D.C., Herrera-Vasquez J.A., Cebrian M.D.C., Jorda C. 2010. Transmission of *Pepino mosaic virus* by the fungal vector *Olpidium virulentus*. *Journal of Phytopathology*, 158, 4: 217-226
- Angly F.E., Felts B., Breitbart M., Salamon P., Edwards R.A., Carlson C., Chan A.M., Haynes M., Kelley S., Liu H., Mahaffy J.M., Mueller J.E., Nulton J., Olson R., Parsons R., Rayhawk S., Suttle C.A., Rohwer F. 2006. The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biology*, 4, 11, e368: 2121-2131
- Antignus Y., Lachman O., Pearlsman M. 2007. Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Disease*, 91: 47-50
- Aw T.G., Rose J.B. 2012. Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 3: 422-430
- Baebler Š., Krečič-Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., Kok E.J., Gruden K., Kovač M., Žel J., Pompe-Novak M., Ravnikar M. 2009. PVY^{NTN} elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology*, 10: 263-275
- Beczner L., Horvath J., Romhanyi I., Förster H. 1984. Studies on the etiology of tuber

- necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27: 339-352
- Bekele B., Hodgetts J., Tomlinson J., Boonham N., Nikolić P., Swarbrick P., Dickinson M. 2011. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology*, 60: 345–355
- Bergmayer H.U. 1986. *Antigens and antibodies 2. V: Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. Bergmayer, J., Grassl, M. (eds.). Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 474-481
- Boben J., Kramberger P., Petrovič N., Cankar K., Peterka M., Štrancar A., Ravnikar M. 2007. Detection and quantification of *Tomato mosaic virus* in irrigation waters. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 1: 59-71
- Bokx J.A., Huttinga H. 1981. *Potato virus Y*: 242. V: Descriptions of plant viruses. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242> (28. jul. 2013)
- Boonham N., Walsh K., Hims M., Preston S., North J., Barker I. 2002. Biological and sequence comparisons of *Potato virus Y* isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology*, 51, 2: 117-126
- Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal of Virological Methods*, 108, 2: 181-187
- Boonham N., Gonzalez Perez L., Mendez M.S., Lilia Peralta E., Blockley A., Walsh K., Barker I., Mumford R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116, 2: 139-146
- Boonham N., Tomlinson J., Mumford R. 2007. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 307-328
- Boonham N., Walsh K., Mumford R., Barker I. 2000. Use of multiplex real-time PCR (TaqMan) for the detection of potato viruses. *EPPO Bulletin*, 30: 427-430
- Botermans M., van de Vossen B.T.L.H., Verhoeven J.Th.J., Roenhorst J.W., Hooftman M., Dekter R., Meekes E.T.M. 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43-50
- Branović, K., Forcic, D., Ivancic, J., Strancar, A., Barut, M., Kosutic-Gulija, T., Zgorelec, R., Mazuran, R. 2003. Application of short monolithic columns for improved detection of viruses. *Journal of Virological Methods*, 110: 163-171
- Breitbart M., Salamon P., Andresen B., Mahaffy J.M., Segall A.M., Mead D., Azam F., Rohwer F. 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 22: 14250-14255

- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L., Zurcher E.J. (eds.) 1996 dalje. 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.'
<http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie> (15. avg. 2011).
- Bühlmann A., Pothier J.F., Tomlinson J.A., Frey J.E., Boonham N., Smits T.H.M., Duffy, B. 2013. Genomics-informed design of loop-mediated isothermal amplification for detection of phytopathogenic *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* at the intraspecific level. *Plant Pathology*, 62: 475-484
- Büttner C., Bandte M., Echevarria Laza H.J., Paschek C., Ulrichs D., Schwarz D., Pestemer W. 2008. Transmission of viruses in soilless cultivation systems. V: 9th International Congress of Plant Pathology, Turin 24-28th August: 1 str.
<http://www.schoenmuth.de/Posterdok/Posterdokumentation-PM2008/2008-Turin/Abstracts/Buettner-Vortrag-abstract-ICPP-torino%209-07-fp.pdf> (16. maj 2013)
- Büttner C., Jacobi V., Koenig R. 1987. Isolation of *Carnation Italian ringspot virus* from creek in a forested area south west of Bonn. *Journal of Phytopathology*, 118: 131-134
- Büttner C., Nienhaus F. 1989. Virus contamination of waters in two forest districts of the Rhineland area (FRG). *European Journal of Forest Pathology*, 19: 206-211
- Bystricka D., Lenz O., Mraz I., Piherova L., Kmoch S., Sip M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 128, 1-2: 176-182
- Campbell R.N. 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 87-108
- Candresse T., Hammond R.W., Hadidi A. 1998. Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reactions (PCR). V: *Plant virus disease control*. Hadidi A., Khetrpal R.K., Koganezawa H. (ur.). St. Paul, APS Press: 409-410
- Carrington J.C., Kasschau K.D., Mahajan S.K., Schaad M.C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell*, 8: 1669-1681
- Carter M.J. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 6: 1354-1380
- Casteel M.J., Sobsey M.D., Mueller J.P. 2006. Fecal contamination of agricultural soils before and after hurricane-associated flooding in North Carolina. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41: 173-184
- Castello J.D., Lakshman D.K., Tavantzis S.M., Rogers S.O., Bachand G.D., Jagels R., Charlisle J., Liu Y. 1995. Detection of infectious *Tomato mosaic tobamovirus* in

- fog and clouds. *Phytopathology*, 85: 1409-1412
- Castello J.D., Rogers S.O., Starmer W.T., Catranis C.M., Ma L., Bachand G.D, Zhao Y., Smith J.E. 1999. Detection of *Tomato mosaic tobamovirus* RNA in ancient glacial ice. *Polar Biology*, 22: 207-212
- 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
- Colariccio A., Chaves A.L.R., Eiras M., Chagas C.M., Roggero P. 2005. Detection of varicosavirus and ophiovirus in lettuce associated with lettuce big-vein symptoms in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 4: 416-419
- Colariccio A., Eiras M., Chaves A.L.R., Harakava R., Chagas C.M. 2004. *Tomato chlorotic spot virus* in hydroponically-grown lettuce in Sao Paulo State, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 307-311
- Cordoba M.C., Martinez-Priego L.I., Jorda C. 2004. New natural hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Plant Disease*, 88, 8: 906-906
- Córdoba-Sellés M.C., García-Rández A., Alfaro-Fernández A., Jordá-Gutiérrez C. 2007. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91, 10: 1250-1254
- Costigliola V., Quagliata F. 2010. Bioterrorism: A potential weapon for terrorist attacks through food and water contamination: Evolution of our understanding of the use of chemical and bacteriological weapons. V: Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi. NATO Science for Peace and Security, Series A: Chemistry and Biology, Part 1: 3-23
- Cotillon A.C., Girard M., Ducouret S. 2002. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of Pepino mosaic virus (PepMV). *Archives of Virology*, 147: 2231-2238
- Crescenzi A., Fanigliulo A., Comes S. 2005. Characterisation of the *Potato virus Y* isolate PVY-LF02 inducing necrosis in tomato. *Acta Horticulturae*, 695: 331-337
- Culley A.I., Lang A.S., Suttle C.A. 2006. Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities. *Science*, 312: 1795-1798
- Culver J.N., Padmanabhan M.S. 2007. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 221-243
- Čepin U., Gutierrez-Aguirre I., Balažic L., Pompe Novak M., Gruden K., Ravnihar M., 2010. A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of Virological Methods*, 170, 1-2: 47-56
- Danks C., Preston S., Sheperd V., Barker I. 2007. Pregnancy testing, potatoes and tomatoes: the development of on-site test kits for the detection of damaging plant

- virus diseases of major arable and horticultural crops. York, Central Science Laboratory: 1 str.
<http://www.csl.gov.uk> (12. maj 2007)
- Delić D. 2010. Improvement of methods for diagnosis of tomato viruses. Doctoral dissertation, Ljubljana, Biotechnical Faculty: 125 str.
- Deng D., McGrath P.F., Robinson D.J., Harrison B.D. 1994. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology*, 125: 327-336
- Diaz-Vivancos P., Clemente-Moreno M.J., Rubio M., Olmos E., Garcia J.A., Martinez-Gomez P., Hernandez J.A. 2008. Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. *Journal of Experimental Botany*, 59, 8: 2147-2160
- Diener T.O., Raymer W.B. 1971. Potato spindle tuber "virus". Description of plant viruses (okt. 1971).
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=66> (16. feb. 2013)
- Diener TO, 1971. Potato spindle tuber "virus": IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, 45: 411-428
- Dijkstra J., De Jager C.P. 1998. Practical plant virology – protocols and exercises. Berlin, Springer-Verlag Heidelberg: 459 str.
- Ding B., Itaya A. 2007. Viroid: A useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 1: 7-20
- Ding B., Itaya A., Zhong X. 2005. Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 6: 606-612
- Ding B., Kwon M.-O., Hammond R., Owens R. 1997. Cell-to cell movement of Potato spindle tuber viroid. *The Plant Journal*, 12, 4: 931-936
- Djikeng A., Kuzmickas R., Anderson N.G., Spiro D.J. 2009. Metagenomic Analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS One*, 4, 9, e7264: 1-14
- Dovas C.I., Katis N.I., Avgelis A.D. 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease*, 86: 1345-1349
- EPPO. 2012a. *Pepino mosaic virus*. Paris, EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization (2012-03).
http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/viruses/PEPMV0.htm (3. feb. 2013)
- EPPO. 2012b. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Paris, EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization (2012-09). <http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm> (16. feb. 2013)

- Fakhro A., von Barga S., Bandte M., Büttner C., Franken P., Schwarz D. 2011. Susceptibility of different plant species and tomato cultivars to two isolates of *Pepino mosaic virus*. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 579-590
- 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 taxonomy of viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 12-32
- Ferguson G. 2009. Management of *Pepino mosaic virus* in greenhouse tomatoes. Ontario, OMAFRA – The Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (Publication date: 03/01, last reviewed: 08/09).
<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/01-017.htm> (12. feb. 2013)
- Fillhart R.C., Bachand G.D., Castello J.D. 1998. Detection of infectious tobamovirus in forest soils. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 1430-1435
- Flores R., Hernández C., Martínez de Alba A.E., Daròs J.A., Di Serio F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 117-139
- Francois P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.J., Boehme C.C., Notomi T., Perkins M.D., Schrenzel J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62: 41-48
- Freeman W.M., Walker S.J., Vrana KE. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, 26: 112-125
- French C.J., Bouthillier M., Bernardy M., Sabourin M., Johnson R.C., Masters C., Godkin S., Mumford R. 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease*, 85, 10: 1121-1121
- Fuchs E., Schlufter C., Kegler H. 1996. Occurrence of a plant viruses in the Northern sea. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 30: 365-366
- FURS. 2008. Viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev (Potato spindle tuber viroid). Ljubljana, FURS – Fitosanitarna uprava Republike Slovenije.
<http://www.furs.si/svn/zvr/PSTVd.asp> (14. feb. 2013)
- Gallitelli D., Di Franco A., Vovlas C., Martelli G.P. 1989. Coat protein derived small particles in a tombusvirus from river Lato. *Journal of Phytopathology*, 126: 213-218
- Gerba C.P., Schaiberger G.E. 1975. Effect of particulates on virus survival in seawater. *Water Environment Federation, Journal (Water Pollution Control Federation)*, 47, 1: 93-103
- Gilbertson R.L., Lucas W.J. 1996. How do viruses traffic on the 'vascular highway'? *Trends in Plant Science*, 1, 8: 260-268
- Gleick P.H. 2006. Water and terrorism. *Water Policy*, 8: 481-503

- Gosalvez B., Navarro J.A., Lorca A., Botella F., Sanchez-Pina M.A., Pallas V. 2003. Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*, 113: 87-93
- Griffin D.W., Donaldson K.A., Paul J.H., Rose J.B. 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 1: 129-143
- Günter A. 2006. Significant ways to spread plant virus diseases in agricultural ecosystems: is agro terrorism possible? V: *Virus diseases and crop biosecurity*. Cooper I., Kühne T., Polishchuk V.P. (ur.). Springer: 45-54
- Gutierrez-Aguirre I., Banjac M., Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Peterka M., Štrancar A., Ravnikar M. 2009a. Concentrating rotaviruses from water samples using monolithic chromatographic supports. *Journal of Chromatography A*, 1216: 2700-2704
- Gutierrez-Aguirre I., Ravnikar M. 2011. Koncentriranje in diagnostika rotavirusov iz okoljskih vzorcev vode na mestu odvzema. V: Dermastia, M. (ur.). *Vdor patogenih mikrobov v nova okolja : hitra diagnostika in ocena tveganja*, (Knjižna zbirka Vse živo, zv. 2). Ljubljana: Nacionalni inštitut za biologijo: 9-23
- Gutierrez-Aguirre I., Steyer A., Banjac M., Kramberger P., Poljšak-Prijatelj M., Ravnikar M. 2011. On-site reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction detection of rotaviruses concentrated from environmental water samples using methacrylate monolithic supports. *Journal of Chromatography A*, 1218: 2368-2373
- Gutierrez-Aguirre I., Mehle N., Delić D., Gruden K., Mumford R., Ravnikar M. 2009b. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, 162, 1-2: 46-55
- Hamza I.A., Jurzik L., Überla K., Wilhelm M. 2011. Evaluation of *Pepper mild mottle virus*, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Research*, 45, 3: 1358-1368
- Handley M.K., Horst R.K. 1988. The effect of temperature and light on *Chrysanthemum stunt viroid* infection of florists chrysanthemum. *Acta Horticulturae*, 234: 89-98
- Hanssen I.M., Mumford R., Blystad D.-R., Cortez I., Hasiów-Jaroszewska B., Hristova D., Pagán I., Pereira A.M., Peters J., Pospieszny, H., Ravnikar, M., Stijger, I., Tomasolli, L., Varveri, C., van der Vlugt, R., Lykke Nielsen S. 2010. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 145-152
- Hanssen I.M., Paeleman A., Wittemans L., Goen K., Lievens B., Bragard C., Vanachter A.C.R.C., Thomma B.P.H.J. 2008. Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination.

- European Journal of Plant Pathology, 121: 131-146
- Hanssen I.M., Thomma B.P.H.J. 2010. *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology*, 11, 2: 179-189
- Harries P., Ding B. 2011. Cellular factors in plant virus movement: At the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology*, 411: 237-243.
- Hartono S., Natsuaki T., Sayama H., Atarashi H., Okuda S. 2003. Yellowing disease of tomatoes caused by *Tomato infectious chlorosis virus* newly recognized in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 69: 61-64
- Hasiów B., Borodynko N., Pospieszny H. 2008. Complete genomic RNA sequence of the Polish *Pepino mosaic virus* isolate belonging to the US2 strain. *Virus Genes*, 36: 209-214
- Herbers K., Tacke E., Hazirezaei M., Krause K.P., Melzer M., Rohde W., Sonnewald U. 1997. Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *The Plant Journal*, 12, 5: 1045-1056
- Herbers K., Takahata Y., Melzer M., Mock H.-P., Hajirezaei M., Sonnewald U. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of *Potato virus Y* with tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 1, 1: 51-59
- Hollings M., Huttinga H. 1976. *Tomato mosaic virus*: 156. V: Descriptions of plant viruses.
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=156> (14. avg. 2011)
- Hong C.X., Moorman G.W. 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 3: 189-208
- Horvath J., Pocsai E., Kazinczi G. 1999. Plant virus contamination of natural waters in Hungary. V: Zbornik predavanj in referatov. 4. Slovensko posvetovanje o varstvu rastlin, Portorož, 3-4 mar. 1999. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 353-356
- Hren M., Nikolić P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden, K. 2009. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, 10: 460 (doi:10.1186/1471-2164-10-460)
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/460>.
- Iglesias V.A., Meins F.Jr. 2000. Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *The Plant Journal*, 21, 2: 157-166
- Jacobi V., Castello J.D. 1991. Isolation of *Tomato mosaic virus* from waters draining forest strands in New York State. *Phytopathology*, 81: 1112-1117

- James H.E., Ebert K., McGonigle R., Reid S.M., Boonham N., Tomlinson J.A., Hutchings G.H., Denyer M., Oura C.A., Dukes J.P., King D.P. 2010. Detection of *African swine fever virus* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 164: 68-74
- Johnson J.F., Allan D.L., Vance C.P. 1994. Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiology*, 104, 2: 657-665
- Jones D.R., Sansford C., Reed P., Mumford R., Giltrap N., Bartlett P., Lammers W., Horn N. 2005. Pest risk analysis for *Pepino mosaic virus*. York, CSL - Central science laboratory (29. apr. 2005): 26 str.
www.defra.gov.uk/planth/pra/pepino.pdf (22. sept. 2007)
- Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E. 1980. *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology*, 94: 61-68
- Jones R.A.C. 2004. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Research*, 100: 5-30
- Jorda C., Lazaro-Perez A., Martinez-Culebras P.V., Lacasa A. 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. *Plant Disease*, 85, 12: 1292-1292
- Kerlan C. 2006. *Potato virus Y*. Description of plant viruses (okt. 2006).
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414> (12. feb. 2013)
- Khan A.S., Swerdlow D.L., Juranek D.D. 2001. Precautions against biological and chemical terrorism directed at food and water supplies. *Public Health Reports*, 116, 1: 3-14
- Khan M.S., Timmermann C., Hoque M.I., Sarker R.H., Mühlbach H.P. 2009. Detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in minute amounts of potato (*Solanum tuberosum* L.) leaf tissue by hybridization techniques and, together with potato viruses, by multiplex RT-PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116, 3: 97-105
- Kim C., Hung Y.C., Brackett R.E. 2000. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 2-3: 199-207
- Kiraly Z., Barna B., Kecskes A., Fodor J. 2002. Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Radical Research*, 36, 9: 981-991
- Knutsson R., van Rotterdam B., Fach P., De Medici D., Fricker M., Lofstrom C., Agren J., Segerman B., Andersson G., Wielinga P., Fenicia L., Skiby J., Schultz A.C., Ehling-Schulz M. 2011. Accidental and deliberate microbiological contamination in the feed and food chains - How biotraceability may improve the response to bioterrorism. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 123-128
- Koenig R. 1986. Plant viruses in rivers and lakes. *Advances in Virus Research*, 31: 321-

333

- Koenig R. 1988. Detection in surface waters of plant viruses with known and unknown natural hosts. V: *Developments in Applied Biology II*. Cooper J.I., Asher M.J.C. (ur.). Wellesbourne, Association of Applied Biologists: 305-313
- Koenig R., Lesemann D.E. 1985. Plant viruses in German rivers and lakes. *Phytopathologische Zeitschrift*, 112: 105-116
- Koenig R., Lesemann D.E., Burgermeister W. 1988. Isolation of *Carnation ringspot virus* from a canal near a sewage plant cDNA Hybridization analysis, serology and cytopathology. *Journal of Phytopathology*, 121: 346-356
- Koenig R., Pfeilstetter E., Kegler H., Lesemann D.E. 2004. Isolation of two strains of a new Tombusvirus (Havel river virus, HaRV) from surface waters in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 429-433
- Koenig R., Rüdell M., Lesemann D.E. 1989. Detection of *Petunia asteroid mosaic*, *Carnation ring spot* and *Tobacco necrosis viruses* in ditches and drainage canals in a grapevine-growing area in West Germany. *Journal of Phytopathology*, 127: 169-172
- Kogovšek P., Gow L., Pompe Novak M., Gruden K., Foster G.D., Boonham N., Ravnikar M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates. *Journal of Virological Methods*, 149, 1: 1-11
- Kogovšek P., Pompe-Novak M., Baebler Š., Rotter A., Gow L., Gruden K., Foster G. D., Boonham N., Ravnikar M. 2010. Aggressive and mild *Potato virus Y* isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. *Plant Pathology*, 59: 1121-1132
- Kogovšek P., Kladnik A., Mlakar J., Tušek-Žnidarič M., Dermastia M., Ravnikar M., Pompe Novak M. 2011. Distribution of *Potato virus Y* in potato plant organs, tissues and cells. *Phytopathology*, 101, 11: 1292-1300
- Kontzog H.G., Kleinhempel H., Kegler, H. 1988. Detection of plant pathogenic viruses in waters. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 24: 171-172
- Kostrzynska M., Bachard A. 2006. Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 1: 1-8
- Kovač K., Gutierrez-Aguirre I., Banjac M., Peterka M., Poljšak-Prijatelj M., Ravnikar M., Mijovski J.Z., Schultz A.C., Raspor P. 2009. A novel method for concentrating hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water. *Journal of Virological Methods*, 162: 272-275
- Kramberger P., Petrovič N., Strancar A., Ravnikar M. 2004. Concentration of plant viruses using monolithic chromatographic supports. *Journal of Virological*

- Methods, 120: 51-57
- Krczal G., Albouy J., Damy I., Kusiak C., Deogratias J.M., Moreau J.P., Berkelmann B., Wohanka W. 1995. Transmission of *Pelargonium flower break virus* (PFBV) in irrigation systems and by Thrips. *Plant Disease*, 79: 163-166
- Krzymowska M., Henning J. 1997. Simple and rapid technique to detect PVY presence in some Solanaceae plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19, 2: 95-99
- Kubota R., Vine B.G., Alvarez A.M., Jenkins D.M. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 98: 1045-1051
- Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 107-115
- Labelle R.L., Gerba C.P. 1980. Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 4: 749-755
- Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez M.A., Jordá C., Bielza P., Contreras J., Alcázar A., Cano A. 2003. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on *Pepino mosaic virus* (PepMV) spread on tomato crops. *Plagas*, 29, 3: 393
- Lanter J.M., McGuire J.M., Goode M.J. 1982. Persistence of *Tomato mosaic virus* in tomato debris and soil under field conditions. *Plant Disease*, 66: 552-555
- Lee G.P., Min B.E., Kim C.S., Choi S.H., Harn C.H., Kim S.U., Ryu K.H. 2003. Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamoviruses. *Journal of Virological Methods*, 110: 19-24
- Lenarčič R., Morisset D., Mehle N., Ravnikar M. 2012. Fast real-time detection of Potato spindle tuber viroid by RT-LAMP. *Plant Pathology*, doi: 10.1111/ppa.12017
- Li Z., Burritt D.J. 2003. The influence of *Cocksfoot mottle virus* on antioxidant metabolism in the leaves of *Dactylis glomerata* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 5: 285-295
- Ling K.S. 2007. Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes*, 34: 1-8
- Ling K.S., Li R., Bledsoe M. 2013. *Pepino mosaic virus* genotype shift in North America and development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid genotype identification. *Virology Journal*, 10, 117: 12 str.
<http://www.virologyj.com/content/10/1/117> (17. maj 2013)
- Ling K.S. 2008. Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Disease*, 92: 1683-1688
- Ling K.S., Wechter W.P., Jordan R. 2007. Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, 144, 1-2, 65-72
- Liu M., Lau A.K., Lo K.V. 1999. Ultrafiltration tests for the reutilization of greenhouse

- wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 34, 6: 1101-1110
- Lopez C., Soler S., Nuez F. 2005. Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: size variability of the TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Archives of Virology*, 150: 619-627
- López R., Asensio C., Guzman M.M., Boonham N. 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of *Potato yellow vein virus* (PYVV). *Journal of Virological Methods*, 136, 1-2: 24-29
- Louie R., Abt J.J., Knoke J.K. 1992. *Maize white line mosaic virus* transmission to maize seedlings in hydroponic culture. *Plant Disease*, 76: 1069-1073
- Love A.J., Martin T., Graham I.A., Milner J.J. 2005. Carbohydrate partitioning and sugar signalling in *Cauliflower mosaic virus*-infected turnip and *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 2: 83-91
- Mackie E., McKirdy S.J., Rodoni B., Kumar S. 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31, 3: 311
- Mansilla C., Sánchez F., Ponz F. 2003. The diagnosis of the tomato variant of *Pepino mosaic virus*: an IC-RT-PCR approach. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 2: 139-146
- Mardis E.R. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24, 3: 133-141
- Maroon-Lango C.J., Guaragna M.A., Jordan R.L., Hammond J., Bandla M., Marquardt S.K. 2005. Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of Virology*, 150: 1187-1201
- Matsuura S., Matsushita Y, Kozuka R., Shimizu S., Tsuda S. 2010. Transmission of Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in tomato plants. *European journal of Plant Pathology*, 126: 111-115
- Matthews R.E.F. 1992. *Fundamentals of plant virology*. USA, Academic Press: 403 str.
- Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden, K., Ravnikar M. 2004. Spread of *Potato virus Y*^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 6: 293-300
- Mehle N., Ravnikar M. 2012. Plant viruses in aqueous environment: survival, water mediated transmission and detection. *Water Research*, 46, 16: 4902-4917
- Mehle N., Gutierrez-Aguirre I., Prezelj N., Delić D., Vidic U., Ravnikar M. 2014. Survival and transmission of *Potato virus Y*, *Pepino mosaic virus*, and Potato spindle tuber viroid in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4: 1455-1462.
- Milavec M., Ravnikar M., Kovač M. 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in

- susceptible potato infected with *Potato virus Y*(NTN). *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 891-898
- Monger W., Tomlinson J., Boonham N., Viršček Marn M., Mavrič Pleško I., Molinero-Demilly V., Tassus X., Meekes E., Toonen M., Papayiannis L., Perez-Egusquiza Z., Mehle N., Jansen C., Lykke Nielsen S. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169, 1: 207-210
- Morris T.J., Wright N.S. 1975. Detection on polyacrylamide-gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *American Potato Journal*, 52: 57-63
- Mumford R., Jones R.A.C. 2005. *Pepino mosaic virus*: 411. V: Descriptions of plant viruses. Warwick, Commonwealth Mycological Institute / Association of Applied Biologists (dec. 2005): 9 str.
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=411> (12. feb. 2013)
- Mumford R.A., Jarvis B., Harju V., Boonham N., Skelton A. 2006. First report of *Broad bean wilt virus 2* in the UK: findings in foxglove and salvia. *Plant Pathology*, 55, 6: 819-819
- Mumford R.A., Metcalfe E.J. 2001. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology*, 146: 2455-2460
- Mumford R.A., Walsh K., Barker I., Boonham N. 2000. Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 90, 5: 448-453
- Mysore K.S., Ryu C-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 10: 1360-1385
- Navarro J.A, Torok V.A, Vetten H.J., Pallas V. 2005. Genetic variability in the coat protein genes of *Lettuce big-vein associated virus* and *Mirafiori lettuce big-vein virus*. *Archives of Virology*, 150: 681-694
- Nelson R.S., van Bel A.J.E. 1998. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Cell Biology and Physiology*, 59: 477-533
- Nemoto M., Imagawa H., Tsujimura K., Yamanaka T., Kondo T., Matsumura T. 2010. Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Veterinary Medical Science*, 72, 6: 823-826
- Newton C.R., Graham A. 1994. PCR-polymerase chain reaction. Oxford, Bios Scientific Publishers: 9-53
- Ohshima K., Sako K., Nakagawa A., Matsuo K., Ogawa T., Shikata E., Sako N. 2000. Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease Occurring in Japan: Its Association with *Potato virus Y* Necrotic Strain. *Plant Disease*, 84, 10: 1109-1115

- Oparka K.J., Cruz S.S. 2000. The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual reviews*: 323-347
- Owens R.A., Diener T.O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of Potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, 213: 670-672
- Owens R.A. 2007. Potato spindle tuber viroid: the simplicity paradox resolved? *Molecular Plant Pathology*, 8, 5: 549-560
- Pagan I., Cordoba-Selles M.D.C., Martinez-Priego L., Fraile A., Malpica J.M., Jorda C., Garcia-Arenal F. 2006. Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology*, 96: 274-279
- Paludan N. 1985. Spread of viruses by recirculated nutrient solutions in soilless cultures. *Tidsskrift for Planteavl*, 89: 467-474
- Pares R.D., Gunn L.V., Cresswell G.C. 1992. *Tomato mosaic virus* infection in a recirculating nutrient solution. *Journal of Phytopathology*, 135, 3: 192-198
- Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18: 407-421
- Park W.M., Lee G.P, Ryu K.H., Park K.W. 1999. Transmission of *Tobacco mosaic virus* in recirculating hydroponic system. *Scientia Horticulturae*, 79: 217-226
- Pategas K.G., Schuenger A.C., Wetter C. 1989. Management of *Tomato mosaic virus* in hydroponically grown pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Disease*, 73: 570-573
- Peters I.R., Helps C.R., Hall E.J. 2004. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunological Methods*, 286: 203-217
- Pfannenstiel M.A., Slack S.A. 1980. Response of potato cultivars to infection by the Potato spindle tuber viroid. *Phytopathology*, 70: 922-926
- Piazzolla P., Castellano M.A., De Stradis A. 1986. Presence of plant viruses in some rivers of southern Italy. *Journal of Phytopathology*, 116: 244-246
- Piche L.M., Singh R.P., Nie X., Gudmestad N.C. 2004. Diversity among *Potato virus Y* isolates obtained from potatoes grown in the United States. *Phytopathology*, 94, 12: 1368-1375
- Ping T.S.T. 2010. Terrorism - A new perspective in the water management landscape. *International Journal of Water Resources Development*, 26, 1: 51-63
- Pleše N., Juretić N., Mamula D., Polak Z., Krajačić M. 1996. Plant viruses in soil and water of forest ecosystems in Croatia. *Horn, Austria, Phytion*, 36, 1: 135-143
- Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. *Potato virus Y* induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 3-5: 237-247

- Pop M., Salzberg S.L. 2008. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends in Genetics*, 24, 3: 142-149
- Prezelj N., Delić D., Gutierrez-aguirre I., Tušek-Žnidarič M., Mehle N., Ravnikar M. 2009. Preživetje in infektivnost virusa mozaika pepina (PepMV) v vodnem okolju. V: Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Maček J. (ur.). Nova Gorica, 4.-5. marec 2009. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 457-460
- Puchta H., Herold T., Verhoeven K., Roenhors A., Ramm K., Schmidt-Puchta W., Sängler H.L. 1990. A new strain of Potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology*, 15: 509–511
- Querci M., Owens R.A., Bartoli I., Lazarte V., Salazar L.F. 1997. Evidence for heterologous encapsidation of Potato spindle tuber viroid in particles of *Potato leafroll virus*. *Journal of General Virology*, 78: 1207-1211
- Querci M., Owens R.A., Vargas C., Salazar L.F. 1995. Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease*, 79: 196-202
- Rao A.L., Varma N. 1984. Transmission studies with *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Journal of Phytopathology*, 109, 4: 325-331
- Ravnikar M., Mehle N., Pirc M., Dreo T., Dermastia M., Tušek Žnidarič M., Camloh M., Kogovšek P., Naglič T., Prijatelj Novak Š., Blatnik A., Matičič L., Mihevc A., Dobnik S. 2013. Program strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin: diagnosticiranje bakterijskih in virusnih bolezni: končno poročilo o opravljenem delu na strokovni nalogi za leto 2012. Ljubljana: Nacionalni inštitut za biologijo: 195 str.
- Reynolds K.A., Mena K.D., Gerba C.P. 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 192: 117-158
- Riley M.R., Gerba C.P., Elimelech M. 2011. Biological approaches for addressing the grand challenge of providing access to clean drinking water. *Journal of Biological Engineering*, 5, 2: 1-10
- Rogers S.O., Starmer W.T., Castello J.D. 2004. Recycling of pathogenic microbes through survival in ice. *Medical Hypotheses*, 63: 773-777
- Roossinck M.J. 2012. Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology. *Annual Review of Genetics*, 46: 359-369
- Roossinck M.J., Saha P., Wiley G.B., Quan J., White J.D., Lai H., Chavarria F., Shen G., Roe B.A. 2010. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Molecular Ecology*, 19: 81-88
- Rosales I.M., Sepulveda P., Bruna A. 2004. First report of *Lettuce big-vein virus* and

- Mirafiori lettuce virus* in Chile. *Plant Disease*, 88, 11: 1286
- Rosario K., Nilsson C., Lim Y.W., Ruan Y., Breitbart M. 2009a. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental Microbiology*, 11: 2806-2820
- Rosario K., Symonds E.M., Sinigalliano C., Stewart J., Breitbart M. 2009b. *Pepper mild mottle virus* as an indicator of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 22: 7261-7267
- Roselló S., Díez M.J., Nuez F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The *Tomato spotted wilt virus* - a review. *Scientia Horticulturae*, 67, 3-4: 117-150
- Rosner A., Lachman O., Pearlsman M., Feigelson L., Maslenin L., Antignus Y. 2006. Characterisation of *Cucumber leaf spot virus* isolated from recycled irrigation water of soil-less cucumber cultures. *Annals of Applied Biology* 149, 3: 313-316
- Rudolfs W., Falk L.L., Ragotzkie R.A. 1950. Literature review on the occurrence and survival of enteric, pathogenic, and relative organisms in soil, water, sewage, and sludges, and on vegetation: I. Bacterial and virus diseases. V: Sewage and industrial wastes. *Water environment federation*, 22, 10: 1261-1281
- Runia W.T. 1995. A review of possibilities for disinfection of recirculation water from soilless cultures. *Acta Horticulturae*, 382: 221-229
- Rupar M., Ravnikar M., Tušek-Žnidarič M., Kramberger P., Glais L., Gutierrez-Aguirre I. 2013. Fast purification of the filamentous *Potato virus Y* using monolithic chromatographic supports. *Journal of Chromatography, A*, 1272: 33-40
- Ruščić J., Gutierrez-Aguirre I., Urbas L., Kramberger P., Mehle N., Škorić D., Barut M., Ravnikar M., Krajačić M. 2013. A novel application of methacrylate based short monolithic columns: concentrating Potato spindle tuber viroid from water samples. *Journal of Chromatography, A*, 1274: 129-136
- Sajnani C., Zurita J.L., Roncel M., Ortega J.M.B.M., Ducruet J.M. 2007. Changes in photosynthetic metabolism induced by tobamovirus infection in *Nicotiana benthamiana* studied in vivo by thermoluminescence. *New Phytologist*, 175: 120-130
- Salomone A., Roggero P. 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology*, 84, 1: 65-68
- Schnitzler W.H. 2004. Pest and disease management of soilless culture. *Acta Horticulturae*, 648: 191-203
- Schnolzer M., Haas B., Ramm K., Hofmann H., Sanger H.L. 1985. Correlation between structure and pathogenicity of Potato spindle tuber viroid (PSTVd). *EMBO Journal*, 4: 2181-2190
- Schuerger A.C., Hammer W. 1995. Effects of temperature on disease development of

- Tomato mosaic virus* in *Capsicum annuum* in hydroponic systems. *Plant Disease*, 79, 9: 880-884
- Schwarz D., Beuch U., Bandte M., Fakhro A., Büttner C., Obermeier C. 2010. Spread and interaction of *Pepino mosaic virus* (PepMV) and *Pythium aphanidermatum* in a closed nutrient solution recirculation system: effects on tomato growth and yield. *Plant Pathology*, 59, 3: 443-452
- Segerman B., De Medici D., Ehling-Schulz M., Fach P., Fenicia L., Fricker M., Wielinga P., van Rotterdam B., Knutsson R. 2011. Bioinformatic tools for using whole genome sequencing as a rapid high resolution diagnostic typing tool when tracing bioterror organisms in the food and feed chain. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 167-176
- Seigner L., Kappen M., Huber C., Kistler M., Köhler D. 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental *Solanaceae* to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115, 3: 97-101
- Seron K., Haenni A.L. 1996. Vascular movement of plant viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 6: 435-442
- Shamloul A.M., Hadidi A., Zhu S.F., Singh R.P., Sagredo B. 1997. Sensitive detection of Potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89-96
- Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones R.A.C., Kerlan C., Schubert J. 2008. Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of virology*, 153, 1-13
- Soler S., Prohens J., Diez M.J., Nuez F. 2002. Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* species in Central and Southern Peru. *Journal of Phytopathology*, 150, 2: 49-53
- Soler-Aleixandre S., Lopez C., Cebolla-Cornejo J., Nuez F. 2007. Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomato. *Hortscience*, 42, 1: 40-45
- Spence N.J., Basham J., Mumford R.A., Edmondson R., Jones D.R. 2006. Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology*, 55, 5: 595-606
- Stanghellini M.E., Rasmussen S.L. 1994a. Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease*, 78: 1129-1137
- Stanghellini M.E., Rasmussen S.L. 1994b. Identification and origin of plant pathogenic microorganisms in recirculating nutrient solutions. *Advances in Space Research*, 14, 11: 349-355
- Stewart-Wade S.M. 2011. Plant pathogens in recycled irrigation water in commercial plant nurseries and greenhouses: their detection and management. *Irrigation*

- Science, 29, 4: 267-297
- Strange R.N., Scott P.R. 2005. Plant Disease: A threat to global food security. Annual Review of Phytopathology, 43, 1: 83-116
- Studholme D.J., Glover R.H., Boonham N. 2011. Application of high-throughput DNA sequencing in phytopathology. Annual Review of Phytopathology, 49: 87 -105
- Szewzyk U., Szewzyk R., Manz W., Schleifer K.H. 2000. Microbiological safety of drinking water. Annual Review of Microbiology, 54: 81-127
- Škorić D., Conerly M, Szychowski J.A, Semancik J.S. 2001. CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature-sensitive reaction. Virology, 280, 1: 115-123
- Teakle D.S., Morris T.J. 1981. Transmission of *Southern bean mosaic virus* from soil to bean seeds. Plant Diseases, 65: 599-600
- Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N. 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. Letters in Applied Microbiology, 51: 650-657
- Tomlinson J.A., Faithfull E.M. 1980. Studies on the control of lettuce big-vein disease in recirculated nutrient solutions. Acta Horticulturae, 98: 325-332
- Tomlinson J.A., Faithfull E.M. 1984. Studies on the occurrence of *Tomato bushy stunt virus* in English rivers. Annals of Applied Biology, 104: 485-495
- Tomlinson J.A., Faithfull E.M., Flewett T.H., Beards G. 1982. Isolation of infective *Tomato bushy stunt virus* after passage through the human alimentary tract. Nature, 300: 637-638
- Tomlinson J.A., Faithfull E.M., Webb M.J.W., Fraser R.S.S., Seeley N.D. 1983. Chenopodium necrosis: a distinctive strain of *Tobacco necrosis virus* isolated from river water. Annals of Applied Biology, 102: 135-147
- Tomlinson J.A., Thomas B.J. 1986. Studies on *Melon necrotic spot virus* disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Olpidium radicale*). Annals of Applied Biology, 108, 1: 71-80
- Toplak N., Okršlar V., Stanič D., Gruden K., Žel J. 2004. A high-throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants with real-time PCR analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 22, 3: 237-250
- Tošić M., Tošić D. 1984. Occurrence of *Tobacco mosaic virus* in water of the Danube and Sava rivers. Journal of Phytopathology, 110: 200-202
- Toze S. 2006. Reuse of effluent water – benefits and risks. Agricultural Water Management, 80: 147-159
- Tsutsumi N., Yanagisawa H., Fujiwara Y., Ohara T. 2010. Detection of Potato spindle tuber viroid by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan, 46: 61-67

- Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001 Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74: 157-175
- Van der Vlugt R. A. A. 2009. *Pepino mosaic virus*. *Hellenic Plant Protection Journal*, 2: 47-56
- Van der Vlugt R., Bergervoet J., Peters J., de Weerd M., Verstappen E., van Raaij H., van Beckhoven J. 2011. xMAP multiplex-detection of plant viruses. V: Book of abstract: 4th conference of the international working group on legume and vegetable viruses (IWGLVV), Spain, May 17-20, 2011: 35
- van der Vlugt R.A.A., Stijger C.C.M.M., Verhoeven J.Th.J., Lesemann D.E. 2000. First report of *Pepino mosaic virus* in tomato. *Plant Disease*, 84,1: 103-103
- Verbeek M., Piron P.G.M., Dullemans A.M., Cuperus C., Van Der Vlugt R.A.A. 2010. Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN and Wilga strains of *Potato virus Y*. *Annals of Applied Biology*, 156, 1: 39-49
- Verhoeven J.Th.J. 2010. Identification and epidemiology of pospoviroids. Thesis, Wageningen, Nizozemska, Wageningen University: 135 str.
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C, Roenhorst J.W., Flores R., De la Pena M. 2009. Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research*, 144: 209-214
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C, Willemsen T.M., Kox L.F.F., Owens R.A., Roenhorst J.W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis* viroid, *Columna* latent viroid, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823-831
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C., Botermans M., Roenhorst J.W. 2010b. Epidemiological evidence that vegetatively propagated, solanaceous plant species act as source of *Potato spindle tuber viroid* inoculum for tomato. *Plant Pathology*, 59: 3-12
- Verhoeven J.Th.J, Jansen C.C.C., Roenhorst J.W., Steyer S., Michelante D. 2007. First report of *Potato spindle tuber viroid* in tomato in Belgium. *Plant Disease*, 91: 1055
- Verhoeven J.Th.J., Roenhorst J.W. 2010. High stability of original predominant pospiviroid genotypes upon mechanical inoculation from ornamentals to potato and tomato. *Archives of Virology*, 155: 269-274
- Verhoeven J.Th.J., van der Vlugt R.A.A., Roenhorst J.W. 2003. High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 5: 419-425
- Verhoeven J.Th.J. Hüner L., Viršček Marn M., Mavrič Pleško I., Roenhorst J.W. 2010a. Mechanical transmission of *Potato spindle tuber viroid* between plants of *Brugmansia suaveoles*, *Solanum jasminoides* and potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417-421

- Vidic U. 2011. Preživetje filamentoznih virusov v vodnem okolju in možnost okužbe rastlin preko korenin. Diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 58 str.
- Vuorinen A.L., Kelloniemi J., Valkonen J.P.T. 2011. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Science*, 181: 355-363.
- Ward E.R., Payne G.B., Moyer M.B., Williams S.C., Dincher S.S., Sharkey K.C., Beck J.J., Taylor H.T., Ahl-Goy P., Meins F.Jr., Ryals J.A. 1991. Differential regulation of β -1,3-Glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiology*, 96, 2: 390-397
- Weidemann H.L., Buchta U. 1998. A simple and rapid method for the detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1-8
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66,7: 2853-2858
- Wintermantel W.M. 2011. A comparison of disinfectants to prevent spread of potyviruses in greenhouse tomato production. Online. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2011-0221-01-RS.
- Wong S.M., Lee S.C., Loi J.S. 1992. First report of *Zucchini yellow mosaic virus* in Singapore. *Plant Disease*, 76: 972
- Wyss U. 1982. Virus-transmitting nematodes: feeding behavior and effect on root cells. *Plant Disease*, 66, 8: 639-644
- Xu P., Blancaflor E.B., Roossinck M.J. 2003. In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with *Cucumber mosaic virus* and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 6: 467-476
- Yarwood C.E. 1960. Release and preservation of virus by roots. *Phytopathology*, 50: 111-114
- Yi L., Lesemann D.E., Koenig R., Rüdell M., Pfeilstetter E. 1992. Isometric plant viruses in ditches and streams in agricultural areas: Recovery of previously found viruses and identification of hitherto unrecorded carmo- and tombusviruses including *Grapevine Algerian latent virus*. *Journal of Phytopathology*, 134: 121-132
- Zhang T., Breitbart M., Lee W.H., Run J.Q., Wei C.L., Soh S.W.L., Hibberd M.L., Liu E.T., Rohwer F., Ruan Y. 2006. RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biology*, 4, 1, e3: 108-118
- Zhang Y., Shen Z.J., Zhong J., Lu X.L., Cheng G., Li R.D. 2003. Preliminary characterization of *Pepino mosaic virus* Shanghai isolate (PepMV-Sh) and its

detection with ELISA. *Acta Agriculturae Shanghai*, 19: 90-92

Zhu Y., Green L., Woo Y.-M., Owens R., Ding B. 2001. Cellular basis of Potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology*, 279: 69-77

.

ZAHVALA

Prva in največja zahvala vsekakor velja najboljši mentorici prof. dr. Maji Ravnikar. Maja: tisočkrat hvala za vse.

Hvala prof. dr. Branki Javornik (predsednica komisije za oceno in zagovor) in prof. dr. Mladenu Krajačić (član komisije za oceno in zagovor) za sodelovanje pri pripravi dispozicije predloga doktorske disertacije in za pregled disertacije.

Hvala Nacionalnemu inštitutu za biologijo (NIB) za financiranje študija. Delo vključeno v to doktorsko disertacijo je bilo financirano deloma iz ARRS projekta L1-2278, deloma iz projekta MORS (4300-117/2009) in deloma v okviru Centra odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo (COBIK). Hvala vsem, ki ste bili kakorkoli vpleteni v prijavi teh projektov.

Hvala dr. Ionu Gutierrez-Aguirre ter ostalim soavtorjem za njihov prispevek k celoti članka, ki je ključen za doktorat.

Hvala dr. Zdravkotu Podlesek za skice, ki so članku in tudi doktoratu dale lep izgled.

Iskrena hvala prof. dr. Andreju Blejec za veliko pomoč pri statistični obdelavi rezultatov.

Izolat virusa PepMV, na katerem so slonele raziskave, nam je dal dr. Rene van der Vlugt (PRI, Nizozemska), izolat PSTVd pa dr. Neil Boonham (Fera, Anglija) – hvala. Hvala mag. Petru Dolničarju (Kmetijski inštitut Slovenije) za zdrave gomolje krompirja.

Hvala dr. Magdi Tušek Žnidarič za pomoč pri mikroskopiranju. Hvala tudi Tini Naglič za skrb, da poskusi v času mojega dopusta niso propadli, Lidiji Matičič za rastline iz tkivne kulture, dr. Poloni Kogovšek za razlago o relativni kvantifikaciji, Živi Ramšak za osvetlitev izračunavanja t-testa, dr. Manci Pirc za reševanje računalniški zagat, Selmi Dobnik in Ani Mihevc za vso pomoč pri administrativnih zadevah, Lučki Glavač za pregled oblikovne ustreznosti disertacije, ter seveda vsem, ki ste previdno zalivali rastline, skrbeli za nabavo kemikalij, čistočo itd.

Hvala prof. dr. Marini Dermastia, dr. Maruši Pompe Novak, prof. dr. Jani Žel in dr. T

atjani Tišler za pomoč pri iskanju slovenskih strokovnih izrazov. Hvala lektorici slovenščine Barbari Jarc in lektorju angleščine Berrie Christopher.

Hvala vsem sodelavcem Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo za spodbudno in iskrivo okolje.

Hvala mojim trem fantom, ki so z razumevanjem sprejeli vse. In seveda hvala staršem - brez njiju ne bi bila to kar sem.

PRILOGE

Priloga A

Sestava pufrov za ELISA

KARBONATNI (COATING) PUFER (pH = 9,6; za 1000 ml):

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g

PBS PUFER ZA SPIRANJE (pH = 7,4; za 1000 ml):

NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,14 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml

EKSTRAKCIJSKI PUFER (pH = 7,4):

PBS - Tween pufer	1000 ml
PVP (polivinilpirolidon, viskoznost K40)	20 g
BSA (bovine serum albumin)	2 g

KONJUGATNI PUFER ZA PVY (pH = 7,4):

PBS - Tween pufer	100 ml
PVP (polivinil pirolidon 40.000)	2,0 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,02 g

KONJUGATNI PUFER ZA PepMV (pH = 7,4):

PBS - Tween pufer	100 ml
PVP (polivinil pirolidon 40.000)	2,0 g
BSA (bovine serum albumin)	0,2 g

SUBSTRATNI PUFER (pH = 9,8; za 1000 ml):

Dietanolamin	97 ml
MgCl ₂	0,2 g

Pufre smo hranili v hladilniku pri 4 ± 2 °C.

Priloga B

Shematski prikaz izvedbe ELISA za določanje PepMV in PVY

Korak pri izvedbi DAS-ELISA	specifikacija
Polnjenje mikrotiterskih ploščic s primarnimi protitelesi (razredčena v karbonatnem pufru)	protitelesa : pufer = 1: 2000
Inkubacija	4 ure pri 37 °C
Spiranje	4 krat po 5 min
Dodajanje homogeniziranih vzorcev (razredčeni v ekstrakcijskem pufru)	vzorec : pufer = 1: 20
Inkubacija	čez noč (od 17 do 19 ur) pri 4 °C
Spiranje	1 krat in nato še 4 krat po 5 minut
Dodajanje konjugiranih protiteles (razredčena v ustreznem konjugatnem pufru)	protitelesa : pufer = 1 : 2000
Inkubacija	4 ure pri 37 °C
Spiranje	5 krat po 5 min
Dodajanje raztopine substrata p-nitrofenil fosfata	1 mg ml ⁻¹
Odčitavanje rezultatov pri 405 nm	po 30 minutah, 1 uri, 2 urah

Priloga C

Sestava reakcijskih mešanic za RT-qPCR

Reakcijska mešanica za COX:

Kemikalija / začetni oligonukleotid / sonda	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina za 1 reakcijo (μl)
Voda brez nukleaz			0,0
RT-PCR pufer* (AgPath)	2x	1x	5,0
COX_F	10 μM	0,9 μM	0,9
COX_RW	10 μM	0,9 μM	0,9
COX_S	2,5 μM	0,2 μM	0,8
RT-PCR encim (AgPath)	25x	1x	0,4

Reakcijska mešanica za LUC:

Kemikalija / začetni oligonukleotid / sonda	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina za 1 reakcijo (μl)
Voda brez nukleaz			0,1
RT-PCR pufer* (AgPath)	2x	1x	5,0
Luc_F	10 μM	1 μM	1,0
Luc_R	10 μM	1 μM	1,0
Luc_S	10 μM	0,5 μM	0,5
RT-PCR encim (AgPath)	25x	1x	0,4

Reakcijska mešanica za PVY:

Kemikalija / začetni oligonukleotid / sonda	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina za 1 reakcijo (μl)
Voda brez nukleaz			1,7
RT-PCR pufer* (AgPath)	2x	1x	5,0
PVY-uni_F	10 μM	0,3 μM	0,3
PVY-uni_R	10 μM	0,3 μM	0,3
PVY-uni_S	5 μM	0,15 μM	0,3
RT-PCR encim (AgPath)	25x	1x	0,4

Reakcijska mešanica za PepMV - amplikon s katerim določamo vse genotipe:

Kemikalija / začetni oligonukleotid / sonda	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina za 1 reakcijo (μl)
Voda brez nukleaz			1,4
RT-PCR pufer* (AgPath)	2x	1x	5,0
F1: KL05-48	10 μM	0,2 μM	0,2
R1: KL05-51	10 μM	0,2 μM	0,2
F2: KL05-49	10 μM	0,2 μM	0,2
R2: KL05-52	10 μM	0,2 μM	0,2
S: KL05-50	10 μM	0,4 μM	0,4
RT-PCR encim (AgPath)	25x	1x	0,4

Reakcijska mešanica za PepMV - amplikona Eur-cp ali Ch2&US2-cp:

Kemikalija / začetni oligonukleotid / sonda	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina za 1 reakcijo (μl)
Voda brez nukleaz			0,0
RT-PCR pufer* (AgPath)	2x	1x	5,0
F	10 μM	0,9 μM	0,9
R	10 μM	0,9 μM	0,9
S	2,5 μM	0,2 μM	0,8
RT-PCR encim (AgPath)	25x	1x	0,4

Reakcijska mešanica za PSTVd:

Kemikalija / začetni oligonukleotid / sonda	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina za 1 reakcijo (μl)
Voda brez nukleaz			0,0
RT-PCR pufer* (AgPath)	2x	1x	5,0
PSTVd231F	10 μM	0,9 μM	0,9
PSTVd296R	10 μM	0,9 μM	0,9
PSTVd251T	2,5 μM	0,2 μM	0,8
RT-PCR encim (AgPath)	25x	1x	0,4

Reakcijska mešanica za pospiviroide:

Kemikalija / začetni oligonukleotid / sonda	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina za 1 reakcijo (μl)
Voda brez nukleaz			0,6
RT-PCR pufer* (AgPath)	2x	1x	5,0
Pospi-F356a	10 μM	0,3 μM	0,3
Pospi-F356b	10 μM	0,3 μM	0,3
Pospi-R96	10 μM	0,3 μM	0,3
Pospi-R102	10 μM	0,3 μM	0,3
Pospi-P12	2,5 μM	0,1 μM	0,4
Pospi-P22	2,5 μM	0,1 μM	0,4
RT-PCR encim (AgPath)	25x	1x	0,4

*RT-PCR pufer (AgPath) vsebuje pasivno referenčno barvilo ROX in kemikalije potrebne za potek reakcije RT-qPCR. Točno sestavo pufera proizvajalec ne navaja.

Priloga Č

Primerjava občutljivosti ELISA in RT-qPCR za določanje PepMV na vzorcih iz poskusa PepMV-paradižnik

dni ^a	0	13	21	34	50	59	79	100
vir inokuluma - listi:								
A-F	+ (14,4) / poz	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
vir inokuluma - korenine:								
A-F	nt	+ (12,9) / poz	nt	+ (13,7) / poz	nt	nt	nt	+ (16,3) / poz
hranilna raztopina:								
	+ (27,8) / neg	+ (26,4) / neg	+ (29,1) / neg	+ (30,8) / neg	+ (27,1) / neg	nt	+ (28,6) / neg	+ (26,2) / neg
rezultat analize testnih rastlin štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino:								
<i>D. stramonium</i> 1	- / neg	nt	+ (29,1) / neg	- / neg	- / neg	+ (31,6) / neg	- / neg	- / neg
<i>D. stramonium</i> 2	- / neg	nt	nt	- / neg	- / neg	+ (28,4) / neg	- / neg	- / neg
<i>N. glutinosa</i> 1	+ (34,9) / neg	nt	- / neg	nt	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg
<i>N. glutinosa</i> 2	- / neg	nt	- / neg	nt	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg
<i>L. esculentum</i> 1	nt	nt	nt	- / neg	- / neg	+ (26,8) / sum	- / neg	- / neg
<i>L. esculentum</i> 2	nt	nt	nt	- / neg	- / neg	+ (36,2) / neg	- / neg	- / neg
rastline za vabo - korenine:								
A-F	nt	+ (29,4) / neg	+ (37,1) / neg	+ (31,1) / neg	+ (18,3) / poz	+ (22,6) / poz	+ (20,9) / poz	+ (22,7) / poz
rastline za vabo - nadzemni deli rastlin:								
A-F	nt	- / neg	nt	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	+ (30,8) / neg

Prva vrednost je rezultat analize z RT-qPCR [- negativno; + pozitivno; v oklepaju je podana vrednost C_q za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk)], za poševnico pa rezultat analize z ELISA (neg - negativno; sum - sumljivo; poz - pozitivno; vzorci analizirani v dveh paralelkah). ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino; nt - ni testirano; pomen barvnih oznak:

-
 pozitiven rezultat z RT-qPCR in z ELISA
-
 negativen rezultat z RT-qPCR in z ELISA
-
 pozitiven rezultat z RT-qPCR, a negativen rezultat z ELISA

Priloga D

Primerjava občutljivosti ELISA in RT-qPCR za določanje PVY na vzorcih iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik

dni ^a	0	13	21	34	50	59	79	100
vir inokuluma - listi:								
A-F	+ (14,6) / poz	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+ (13,7) / poz
vir inokuluma - korenine:								
A-F	nt	+ (22,1) / neg	nt	+ (21,6) / neg	+ (24,1) / neg	+ (24,5) / neg	+ (20,2) / neg	+ (22,5) / neg
hranilna raztopina:								
	+ (38,2) / neg	+ (38,8) / neg	+ (36,2) / neg	+ (37,8) / neg	- / neg	nt	- / neg	+ (35,7) / neg
rezultat analize testnih rastlin štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino:								
<i>L. esculentum</i> 1	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg
<i>L. esculentum</i> 2	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg
<i>N. tabacum</i> 1	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg
<i>N. tabacum</i> 2	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg
rastline za vabo - korenine:								
A-F	nt	- / neg	- / neg	+ (34,7) / neg	+ (36,9) / neg	+ (38,4) / neg	+ (34,6) / neg	- / neg
rastline za vabo - nadzemni deli rastlin:								
A-F	nt	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg	- / neg

Prva vrednost je rezultat analize z RT-qPCR [- negativno; + pozitivno; v oklepaju je podana vrednost Cq za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk)], za poševnico pa rezultat analize z ELISA (neg - negativno; sum -sumljivo; poz - pozitivno; vzorci analizirani v dveh paralelkah). ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino; nt - ni testirano; pomen barvnih oznak:

 pozitiven rezultat z RT-qPCR in z ELISA

 negativen rezultat z RT-qPCR in z ELISA

 pozitiven rezultat z RT-qPCR, a negativen rezultat z ELISA

Priloga E

Sestava hranilne raztopine

10 x koncentrirana hranilna raztopina za zalivanje (pH = 5,5; za 1000 ml) (Johnson s sod., 1994):

KNO ₃	3,03 g
NH ₄ NO ₃	2 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,455 g
KH ₂ PO ₄	680 mg
H ₃ BO ₄	13,6 mg
NaFeEDTA	44 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	6,8 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	3,9 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,07 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,011 mg

Raztopino smo hranili pri temperaturi 4 ± 2 °C.

Zalivali smo z raztopino, ki je bila razredčena v vodovodni vodi.

Priloga F

Vzorci okužene vode, ki smo jo injicirali v zemljo – rezultati analiz z RT-qPCR

datum zalivanja	volumen inokuluma na 1 gomolj	Voda okužena s PVY		Voda okužena s PSTVd	
		PVY (Cq)	LUC (Cq)	PSTVd (Cq)	LUC (Cq)
6.7.2012	165 ml	19,6	15,4	26,5	15,5
10.7.2012	160 ml	18,7	15,5	25,8	15,3
16.7.2012	160 ml	18,8	15,5	24,5	15,4
20.7.2012	160 ml	20,3	15,2	24,3	15,3
24.7.2012	160 ml	20,4	15,0	24,8	15,2
27.7.2012	160 ml	21,2	15,0	24,1	15,0
31.7.2012	160 ml	21,5	14,6	23,3	14,9
3.8.2012	120 ml	20,8	14,7	22,9	15,2
7.8.2012	120 ml	19,9	14,9	23,6	15,4
10.8.2012	120 ml	20,2	13,3	22,9	13,5
14.8.2012	120 ml	20,2	13,4	22,2	13,5
17.8.2012	120 ml	20,4	13,4	23,5	13,1
21.8.2012	120 ml	20,8	13,7	23,9	13,4
24.8.2012	120 ml	20,3	13,3	23,4	13,4
27.8.2012	120 ml	20,7	13,6	24,6	13,5
31.8.2012	120 ml	19,3	14,0	24,7	13,3
	povprečje	20,2	14,4	24,1	14,4
	najmanjša vrednost	18,7	13,3	22,2	13,1
	največja vrednost	21,5	15,5	26,5	15,5
	SD	0,8	0,9	1,1	1,0

Priloga G

Negativne kontrole izolacij z RNeasy Plant Mini kitom (NKI) - rezultati analiz z RT-qPCR

datum izolacije	vzorci za analizo na:	Vrednost Cq za NKI:			opombe ^a
		PVY	PepMV	PSTVd	
11.10.2010	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
23.11.2010	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
9.12.2010	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
10.12.2010	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
27.12.2010	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
28.12.2010a	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
28.12.2010b	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
28.12.2010c	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
25.1.2011	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
10.2.2011	PVY, PSTVd	undet		undet	
		undet		undet	
16.2.2011	PVY, PSTVd	undet		40,8	Le dva vzorca iz te serije sta bila analizirana na prisotnost PVY. Vrednost Cq za PVY je bila za oba vzorca < 20, zato analize nismo ponavljali.
		Undet		undet	
		40,8		undet	
		39,4		undet	
		undet		undet	
21.2.2011	PVY, PSTVd	undet		undet	Vsi vzorci iz te serije, ki so bili analizirani na prisotnost PVY, in so imeli vrednost Cq > 35, so bili izključeni iz analize zaradi suma na kontaminacijo med izolacijo.
		38,5		undet	
		undet		40,7	
		undet		undet	
		40,5		undet	
17.3.2011a	PVY, PSTVd, PepMV	undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
17.3.2011b		undet		undet	
		undet		undet	
17.3.2011c		undet		undet	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge G (Negativne kontrole izolacij z RNeasy Plant Mini kitom (NKL)-rezultati analiz z RT-qPCR)

datum izolacije	vzorci za analizo na:	Vrednost C _q za NKL:			opombe ^a
		PVY	PepMV	PSTVd	
17.3.2011c	PVY, PSTVd	undet		undet	
		undet		undet	
24.3.2011	PVY, PSTVd, PepMV	undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
29.3.2011a	PVY, PSTVd, PepMV	undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
29.3.2011b	PVY, PSTVd	undet		39,4	V tej seriji je bilo na PSTVd pozitivnih 9 vzorcev rastlin z vrednostjo C _q < 20; analize za te vzorce nismo ponovili. Vzorci rastlin, ki so imeli vrednost C _q > 35, so bili, zaradi suma na kontaminacijo med izolacijo, še enkrat izolirani in analizirani.
		undet		40,1	
		undet		39,4	
30.3.2011a	PVY, PSTVd, PepMV	undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
30.3.2011b	PVY, PSTVd, PepMV	undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
6.5.2011	PSTVd			undet	
				undet	
				undet	
10.5.2011	PVY, PSTVd	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
10.5.2011	PSTVd			undet	
				undet	
				undet	
12.5.2011	PVY, PSTVd	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
30.3.2012	PVY, PSTVd	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
2.4.2012	PVY, PSTVd	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
4.4.2012	PVY	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
6.4.2012	PVY	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
10.4.2012	PVY	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
16.4.2012	PSTVd			undet	
				undet	
				undet	
17.4.2012	PSTVd			undet	
				undet	
				undet	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge G (Negativne kontrole izolacij z RNeasy Plant Mini kitom (NKI) - rezultati analiz z RT-qPCR)

datum izolacije	vzorci za analizo na:	Vrednost Cq za NKI:			opombe ^a
		PVY	PepMV	PSTVd	
20.4.2012	PSTVd			38,0 38,6 37,0	V tej seriji je bilo na PSTVd pozitivnih 14 vzorcev rastlin: 11 vzorcev s Cq < 22,0 in trije vzorci s Cq 31-35. Slednji so bili vzorci korenin, pri katerih je bila prisotnost PSTVd potrjena v predhodnih analizah, zato analize nismo ponavljali.
20.4.2012	PSTVd			undet undet undet	
20.4.2012	PSTVd			38,8 39,5 undet	Na PSTVd so bili v tej seriji pozitivni štirje vzorci rastlin s Cq med 16,0 in 29,6, zato analize nismo ponavljali.
17.7.2012	PSTVd			undet undet undet	
6.8.2012	PSTVd, PVY	undet undet undet		undet undet undet	
23.8.2012	PSTVd, PVY	undet undet undet		undet undet undet	
7.9.2012	PSTVd, PVY	undet undet undet		undet 41,0 undet	
10.9.2012	PSTVd			undet undet undet	
26.9.2012	PSTVd, PVY	undet undet undet		undet undet undet	
30.10.2012	PSTVd, PVY	undet undet undet		undet undet undet	
23.11.2012	PSTVd, PVY	undet undet undet		undet 41,1 41,6	
19.12.2012	PepMV, PSTVd		undet undet undet	undet undet undet	
2.1.2013	PepMV, PVY, PSTVd	undet undet undet	undet undet undet	39,0 39,3 38,7	Iz te serije sta bila na PSTVd pozitivna dva vzorca rastlin z vrednostma Cq 19,5 oziroma 21,3, zato analize nismo ponavljali.
3.1.2013	PepMV, PSTVd		undet undet undet	39,3 40,4 undet	Vzorci rastlin, ki so bili pozitivni na PSTVd v tej seriji, so imeli vrednosti Cq od 17,0 do 31,3, zato analize nismo ponavljali.
22.2.2013	PVY, PSTVd	undet undet undet		undet undet undet	
7.3.2013	PSTVd			undet undet undet	

^aVzorci smo zaključili kot pozitivne, kadar smo odčitali vrednosti Cq manjše od 40 v vsaj dveh od treh paralelkah. Negativne kontrole PCR (NTC1 in NTC2) so bile za vse tri tarče vedno pod mejo detekcije (ni bilo pomnoževanja). Undet - okrajšano od undetermined (ni pomnoževanja).

Priloga H

Negativne kontrole izolacij s QIAamp Viral RNA mini kitom (NKI) – rezultati analiz z RT-qPCR

datum	vzorci za	Vrednosti Cq za NKI:			opombe ^a
		PVY	PepMV	PSTVd	
17.8.2010	PVY, PepMV	undet	undet		
		undet	undet		
		undet	40,6		
15.3.2011	PVY, PSTVd, PepMV	undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
24.3.2011a	PVY, PSTVd, PepMV	38,9	undet	undet	Na PVY pozitivni in sumljivi vzorci vode iz te serije so bili še enkrat izolirani in analizirani.
		38,9	undet	undet	
		38,9	undet	undet	
31.3.2011	PVY, PSTVd, PepMV	undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
		undet	undet	undet	
17.5.2012	PSTVd, PVY	undet		42,8	
		undet		undet	
		undet		undet	
17.7.2012	PSTVd, PVY	38,6		undet	Vzorci vode, ki so bili pozitivni na PVY v tej seriji, so imeli vrednosti Cq < 20.
		undet		undet	
		undet		undet	
7.8.2012	PSTVd, PVY	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
23.8.2012	PSTVd, PVY	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
11.9.2012	PSTVd, PVY	undet		undet	
		undet		undet	
		undet		undet	
26.11.2012	PSTVd, PepMV		30,3	undet	Vzorci vode za analizo na prisotnost PepMV iz te serije so bili še enkrat izolirani in analizirani.
			30,1	undet	
			30,3	undet	
21.12.2012	PepMV		undet		
			undet		
			undet		

^aVzorci smo zaključili kot pozitivne, kadar smo odčitali vrednosti Cq manjše od 40 v vsaj dveh od treh paralelkah. Negativne kontrole PCR (NTC1 in NTC2) so bile za vse tri tarče vedno pod mejo detekcije (ni bilo pomnoževanja).

Undet - okrajšano od undetermined (ni pomnoževanja).

Priloga I

Sveža hranilna raztopina (pred dolivanjem v akvarij z mehansko okuženimi rastlinami) - rezultati analiz z RT-qPCR

tarča (poskus)	število dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino				
	0-30	31-60	61-90	91-120	120-134
PepMV (PepMV- paradižnik)	undet/undet/undet	undet/undet/undet	nt	nt	undet/undet/undet
PepMV (PepMV+PVY- paradižnik)	undet/undet/undet	undet/undet/undet	nt	nt	undet/undet/undet
PVY (PepMV+PVY- paradižnik)	undet/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet
PVY (PVY- krompir)	undet/undet/undet; undet/undet/undet; 38,9/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet	nt	undet/undet/undet; 40,8/undet/undet
PSTVd (PSTVd- paradižnik)	undet/undet/40,1; 43,9/43,1/undet	undet/39,6/undet; undet/undet/undet; undet/undet/undet	nt	nt	undet/undet/undet; undet/undet/39,0
PSTVd (PSTVd- krompir)	undet/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet	nt	nt

V preglednici so prikazani rezultati analiz (vrednosti Cq) vzorcev sveže hranilne raztopine v treh paralelkah (rezultati posamezne paralelke so ločeni s poševnico; s podpičjem so ločeni rezultati analiz različnih vzorcev sveže hranilne raztopine). Undet - okrajšano od undetermined (ni pomnoževanja); nt – ni analizirano.

Opomba: vzorce smo zaključili kot pozitivne, kadar smo odčitali vrednosti Cq manjše od 40 v vsaj dveh od treh paralelkah.

Priloga J

Testne rastline, ki so bile v rastlinjaku v bližini in sočasno z rastlinami iz poskusov (negativne kontrole poskusov) – rezultati analiz z RT-qPCR

tarča (poskus)	število dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino				
	0-30	31-60	61-90	91-120	120-134
PepMV (PepMV- paradižnik)	undet/undet/undet; undet/undet/undet	nt	undet/undet/undet	nt	nt
PepMV (PepMV+PVY- paradižnik)	nt	undet/undet/undet	undet/undet/undet	undet/undet/undet	nt
PVY (PepMV+PVY- paradižnik)	nt	nt	nt	undet/undet/undet	undet/undet/undet
PVY (PVY- krompir)	nt	undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/39,1; undet/undet/undet
PSTVd (PSTVd- paradižnik)	41,0/undet/undet; undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet	undet/undet/undet; undet/undet/undet
PSTVd (PSTVd- krompir)	nt	undet/undet/undet	undet/undet/undet	undet/undet/undet	undet/undet/undet

V preglednici so prikazani rezultati analiz (vrednosti Cq) vzorcev kontrolnih rastlin v treh paralelkah (rezultati posamezne paralelke so ločeni s poševnico; s podpičjem so ločeni rezultati analiz različnih vzorcev kontrolnih rastlin). Undet - okrajšano od undetermined (ni pomnoževanja). Nt – ni analizirano.

Opomba: vzorce smo zaključili kot pozitivne, kadar smo odčitali vrednosti Cq manjše od 40 v vsaj dveh od treh paralelkah.

Priloga K

Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PepMV (Ling in sod., 2007), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika

razredčina PepMV (RNA)	vrednost C _q za razredčine pozitivne RNA v negativnem vzorcu RNA izoliranem iz:		
	vode in hranilne raztopine	korenin paradižnika	listov paradižnika
10x	29,3	28,7	28,6
	28,9	28,8	28,8
	28,7	28,6	28,7
	28,7	28,8	28,8
	28,6	28,5	28,8
10 ²	31,7	32,6	32,5
	32,2	32,9	33,2
	32,9	32,8	32,7
	32,0	32,2	32,9
	31,7	32,4	32,6
3x10 ²	34,2	38,8	34,1
	33,2	35,9	34,3
	32,9	35,3	33,9
	33,0	33,1	33,1
	33,8	34,1	34,3
9x10 ²	undet	undet	undet
	40,5	42,2	39,4
	34,8	undet	undet
	undet	undet	undet
	33,6	38,3	undet
2,7x10 ³	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
8,1x10 ³	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
2,4x10 ⁴	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge K (Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PepMV (Ling in sod., 2007), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika)

razredčina PepMV (RNA)	vrednost C _q za razredčine pozitivne RNA v negativnem vzorcu RNA izoliranem iz:		
	vode in hranilne raztopine	korenin paradižnika	listov paradižnika
negativen vzorec RNA (ponovitev 1)	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
negativen vzorec RNA (ponovitev 2)	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
Kontrole RT-qPCR		vrednost C _q (ponovitev 1)	Vrednost C _q (ponovitev 2)
NTC1		undet	undet
NTC2		undet	undet
Poz PepMV		25,2	24,9

Undet - okrajšano od undetermined (ni pomnoževanja).

Priloga L

Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PVY (Kogovšek in sod., 2008), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika

razredčina PVY (RNA)	vrednost Cq za razredčine pozitivne RNA v negativnem vzorcu RNA izoliranem iz:		
	vode in hranilne raztopine	korenin paradižnika	listov paradižnika
10x	29,6	29,3	29,5
	29,5	29,5	29,4
	29,6	29,5	29,3
	29,6	29,5	29,4
	29,5	29,4	29,3
10 ²	32,9	32,3	32,3
	32,6	32,4	32,7
	33,0	32,7	32,4
	32,8	32,7	32,8
	32,9	32,8	32,7
10 ³	36,3	36,1	36,4
	35,5	35,1	37,2
	36,5	36,3	37,3
	38,6	35,9	35,9
	35,2	undet	40,8
3x10 ³	37,5	38,7	undet
	36,4	39,6	37,2
	38,3	37,5	37,2
	37,8	42,6	40,2
	39,6	39,4	41,2
9x10 ³	43,0	undet	undet
	37,8	40,2	37,0
	undet	undet	39,3
	38,9	undet	undet
	39,5	undet	39,7
2,7x10 ⁴	undet	42,7	38,7
	39,2	41,8	40,0
	undet	42,3	42,6
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
8,1x10 ⁴	undet	undet	undet
	undet	40,0	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge L (Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PVY (Kogovšek in sod., 2008), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika)

razredčina PVY (RNA)	vrednost Cq za razredčine pozitivne RNA v negativnem vzorcu RNA izoliranem iz:		
	vode in hranilne raztopine	korenin paradižnika	listov paradižnika
2,4x10 ⁵	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
negativen vzorec RNA (ponovitev 1)	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
negativen vzorec RNA (ponovitev 2)	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
Kontrole RT-qPCR	vrednost Cq (ponovitev 1)	Vrednost Cq (ponovitev 2)	
NTC1	undet	undet	
NTC2	undet	undet	
poz PVY	26,2	26,2	

Undet - okrajšano od undetermined (ni pomnoževanja).

Priloga M

Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PSTVd (Boonham in sod., 2004), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika

razredčina PSTVd (RNA)	vrednost C _q za razredčine pozitivne RNA v negativnem vzorcu RNA izoliranem iz:		
	vode in hranilne raztopine	korenin paradižnika	listov paradižnika
10 ^x	29,0	28,5	28,8
	28,9	28,7	28,6
	28,5	28,6	28,7
	28,8	28,5	28,7
	28,8	28,7	28,6
10 ²	31,7	31,5	31,9
	31,6	31,6	32,0
	32,0	31,7	32,0
	31,7	31,7	31,8
	31,8	31,6	31,9
10 ³	34,5	34,6	34,6
	35,0	35,0	34,9
	34,9	34,7	34,6
	35,1	34,8	34,8
	34,9	34,9	34,9
3x10 ³		36,6	37,3
	37,5	36,7	37,4
	37,5	37,1	37,3
	36,8	36,6	37,3
	36,9	37,6	38,0
9x10 ³	39,3	40,2	41,2
	39,8	38,6	38,8
	40,0	39,3	40,0
	38,9	41,4	40,2
	38,5	38,7	39,4
2,7x10 ⁴	40,1	undet	43,2
	40,1	40,7	42,1
	40,7	42,2	undet
	39,6	undet	44,7
	undet	39,8	43,6
8,1x10 ⁴	43,8	undet	undet
	43,8	undet	undet
	undet	undet	undet
	41,7	undet	44,6
	43,4	undet	43,3

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge M (Rezultati analiz z RT-qPCR, specifičnim za PSTVd (Boonham in sod., 2004), za desetkratne oziroma trikratne razredčine pozitivnega vzorca RNA v negativnem vzorcu RNA, izoliranem iz vode oziroma hranilne raztopine ter korenin in listov paradižnika)

razredčina PSTVd (RNA)	vrednost Cq za razredčine pozitivne RNA v negativnem vzorcu RNA izoliranem iz:		
	vode in hranilne raztopine	korenin paradižnika	listov paradižnika
2,4x10 ⁵	42,8	undet	undet
	42,7	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
7,3x10 ⁵	43,7	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
2,2x10 ⁶	44,2	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
negativen vzorec RNA (ponovitev 1)	43,4*	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
	undet	undet	undet
negativen vzorec RNA (ponovitev 2)	undet	undet	undet
	43,8*	undet	undet
	undet	undet	undet
	43,4*	undet	undet
Kontrole RT-qPCR	vrednost Cq (ponovitev 1)	Vrednost Cq (ponovitev 2)	
NTC1	undet	undet	
NTC2	undet	undet	
poz PSTVd	25,4	25,6	

Undet - okrajšano od undetermined (ni pomnoževanja).

*Negativen vzorec vode in hranilne raztopine smo najverjetneje kontaminirali s PSTVd med izolacijo RNA.

Priloga N

Vzorci korenin, ki smo jih pregledali s svetlobno mikroskopijo, da bi preverili, ali so v njih morebiti prisotne glivne spore

Poskus	dni ^a	št. pregledanih vzorcev korenin mehansko okuženih rastlin	št. pregledanih vzorcev korenin rastlin za vabo
PVY-krompir	76	1	0
PSTVd-paradižnik	72	0	4
	83	3	2
	94	0	1
	121	0	1
PSTVd-krompir	40	2	2

^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino

Priloga O

Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PepMV-paradižnik

	dni ^a	0	13	21	34	50	59	79	100	112	134
vir inokuluma - listi:											
A-F		+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(14,4)									
vir inokuluma - korenine:											
A-F		nt	+	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	glej Prilogo P
			(12,9)		(13,7)				(16,3)		
hranilna raztopina:											
		+	+	+	+	+	nt	+	+	+	+
		(27,8)	(26,4)	(29,1)	(30,8)	(27,1)		(28,6)	(26,2)	(31,6)	(27,4)
rezultat analize testnih rastlin štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino:											
<i>D. stramonium</i> 1		-	nt	+	-	-	+	-	-	nt	-
				(29,1)			(31,6)				
<i>D. stramonium</i> 2		-	nt	nt	-	-	+	-	-	nt	nt
							(28,4)				
<i>N. glutinosa</i> 1		+	nt	-	nt	-	-	-	-	nt	-
		(34,9)									
<i>N. glutinosa</i> 2		-	nt	-	nt	-	-	-	-	nt	nt
<i>L. esculentum</i> 1		nt	nt	nt	-	-	+	-	-	nt	-
							(26,8)				
<i>L. esculentum</i> 2		nt	nt	nt	-	-	+	-	-	nt	nt
							(36,2)				
rastline za vabo - korenine:											
A-F		nt	+	+	+	+	+	+	+	nt	glej Prilogo P
			(29,4)	(37,1)	(31,1)	(18,3)	(22,6)	(20,9)	(22,7)		
rastline za vabo - nadzemni deli rastlin:											
A-F		nt	-	nt	-	-	-	-	+(30,8)	+(34,4)	glej Prilogo P
									/ _{-b}	/ _{-c}	

V oklepaju so podane vrednosti Cq za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk). Pomen oznak: + pozitivno; - negativno; nt ni testirano. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino (od 0-112 dni: analiziranje kumulativnih vzorcev 6 rastlin (A-F); 134. dan: ločeno analiziranje šestih mehansko okuženih rastlin in šestih rastlin za vabo); ^bpozitiven zrel plod, negativni listi; ^cpozitivni starejši listi, negativni vršički in nezrel plod. Pomen barvnih oznak:

	Povprečne vrednosti Cq za COX med 15 in 17; vrednosti Cq za LUC med 12 in 14
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 17 in 19
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 19 in 21
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 21 in 23
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 23 in 25

Priloga P

Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PepMV-paradižnik 134. dan

	oznaka vzorca	PepMV (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PepMV
vir inokuluma	koreninaA	10,9	16,5	5,6
	koreninaB	13,4	19,1	5,7
	koreninaC	12,9	17,8	4,9
	koreninaD	12,3	17,9	5,6
	koreninaE	12,4	18,2	5,8
rastline za vabo	koreninaA	22,1	16,5	-5,6
	koreninaB	29,3	18,6	-10,7
	koreninaC	29,4	19,1	-10,3
	koreninaD	27,3	16,7	-10,6
	koreninaE	20,6	17,5	-3,1
	koreninaF	20,7	15,7	-5
	steblo sp.A	neg	17,4	/
	steblo sp.B	neg	18,9	/
	steblo sp.C	neg	17,5	/
	steblo sp.D	30,4	18,6	-11,8
	steblo sp.E	neg	20,3	/
	steblo sp.F	neg	18,5	/
	steblo sr.A	neg	17,6	/
	steblo sr.B	neg	18,0	/
	steblo sr.C	30,4	19,2	-11,2
	steblo sr.D	neg	18,4	/
	steblo sr.E	neg	19,5	/
	steblo sr.F	neg	19,3	/
	stari listiA1	28,7	19,2	-9,5
	stari listiA2	neg	18,9	/
	stari listiB1	neg	18,6	/
	stari listiB2	neg	17,1	/
	stari listiC1	neg	18,8	/
	stari listiC2	neg	17,2	/
	stari listiD1	29,6	17,5	-12,1
	stari listiD2	33,3	18,5	-14,8
	stari listiE1	28,9	17,2	-11,7
stari listiE2	neg	17,0	/	
stari listiF	neg	16,7	/	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge P (Podrobni prikaz rezultatov analiz vzorcev iz poskusa PepMV-paradižnik 134. dan)

	oznaka vzorca	PepMV (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PepMV
rastline za vabo	vršičekA1	33,3	15,0	-18,3
	vršičekA2	neg	15,8	/
	vršičekB1	neg	16,7	/
	vršičekB2	neg	16,3	/
	vršičekC1	neg	15,7	/
	vršičekC2	neg	16,5	/
	vršičekD1	neg	16,1	/
	vršičekD2	24,6	15,5	-9,1
	vršičekE1	25,2	16,5	-8,7
	vršičekE2	neg	16,1	/
	vršičekF1	neg	15,4	/
	vršičekF2	neg	16,9	/
	plodA	neg	19,2	/
	plodD1	neg	17,9	/
	plodD2	neg	18,2	/

^apovprečne vrednosti treh paralelk

Povprečna relativna količina tarčne RNA v pozitivnih vzorcih glede na količino RNA COX po posameznih tkivih:


	tkivo	\bar{x}	SD	n = št. poz. vzorcev	SE = SD / \sqrt{n}	D = SE × TINV(0,05;n-1)	2 \bar{x}	Ci min = 2 \bar{x} - 2 $\sqrt{(\bar{x}-D)}$	Ci max = 2 \bar{x} + 2 $\sqrt{(\bar{x}+D)}$
vir									
inokuluma	korenine	5,5	0,4	5	0,2	0,4	45,88656794	12,12037872	16,47099049
	korenine	-7,6	3,4	6	1,4	3,5	0,00533609	0,00487736	0,05673380
rastline za vabo	steblo	-11,5	/	2	/	/	0,00034527	/	/
	stari listi	-12,0	2,2	4	1,1	3,5	0,00023995	0,00021815	0,00240119
	vršički	-12,0	/	3	/	/	0,00023856	/	/
	plodovi	/	/	0	/	/	/	/	/


Priloga R


Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PepMV za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik


dni ^a	0	13	21	34	50	59	79	100	112	134
vir inokuluma - listi:										
A-F	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt
	(12,1)							(8,2)		
vir inokuluma - korenine:										
A-F	nt	+	nt	+	+	+	+	+	nt	glej prilogo S
		(14,6)		(12,4)	(14,7)	(15,2)	(12,3)	(11,7)		
hranilna raztopina:										
	+	+	+	+	-	nt	+	+	+	+(26,8)
	(29,9)	(30,3)	(26,4)	(28,2)			(33,2)	(26,0)	(35,4)	
rezultat analize testnih rastlin štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino:										
<i>L. esculentum</i> 1	-	-	-	+	-	-	-	-	nt	-
				(27,3)						
<i>L. esculentum</i> 2	-	-	-	-	-	+	-	-	nt	-
						(34,0)				
<i>N. tabacum</i> 1	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	nt
								(35,1)		
<i>N. tabacum</i> 2	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt
rastline za vabo - korenine:										
A-F	nt	+	+	+	+	+	+	+	nt	glej prilogo S
		(30,0)	(33,4)	(24,9)	(21,7)	(23,7)	(20,8)	(27,1)		
rastline za vabo - nadzemni deli rastlin:										
A-F	nt	-	-	nt	-	-	-	+(38,4)	+(36,0)	glej prilogo S
								/ _{-b}	/ _{-c}	


V oklepaju so podane vrednosti Cq za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk). Pomen oznak: + pozitivno; - negativno; nt ni testirano. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino (od 0-112 dni: analiziranje kumulativnih vzorcev 6 rastlin (A-F); 134. dan: ločeno analiziranje šestih mehansko okuženih rastlin in šestih rastlin za vabo); ^bpozitivni listi, negativen nezrel plod; ^cpozitivni starejši listi, negativen nezrel plod, steblo z izrastki in vršički. Pomen barvnih oznak:


 Povprečne vrednosti Cq za COX med 15 in 17; vrednosti Cq za LUC med 12 in 14

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 17 in 19

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 19 in 21

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 21 in 23

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 23 in 25

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 25 in 27

Priloga S

Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PepMV za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan

	oznaka vzorca	PepMV (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PepMV
vir inokuluma	koreninaA	12,7	17,3	4,6
	koreninaB	13,3	17,8	4,5
	koreninaC	12,5	17,5	5
	koreninaD	12,2	16,7	4,5
	koreninaE	12,9	18,2	5,3
	koreninaF	12,8	17,7	4,9
rastline za vabo	koreninaA	23,2	17,5	-5,7
	koreninaB	31,5	18,0	-13,5
	koreninaC	30,5	17,4	-13,1
	koreninaD	25,7	18,3	-7,4
	koreninaE	28,8	18,0	-10,8
	koreninaF	32,6	18,0	-14,6
	steblo sp.A	neg	17,9	/
	steblo sp.B	25,6	17,5	-8,1
	steblo sp.C	32,5	17,6	-14,9
	steblo sp.D	28,5	18,0	-10,5
	steblo sp.E	neg	17,8	/
	steblo sp.F	neg	17,9	/
	steblo sr.A	34,7	17,6	-17,1
	steblo sr.B	neg	19,0	/
	steblo sr.C	neg	18,0	/
	steblo sr.D	neg	18,2	/
	steblo sr.E	neg	18,7	/
	steblo sr.F	neg	18,6	/
	stari listiA1	30,6	17,9	-12,7
	stari listiA2	35,1	18,2	-16,9
	stari listiB1	37,0	18,6	-18,4
	stari listiB2	neg	17,9	/
	stari listiC1	28,6	18,3	-10,3
	stari listiC2	neg	18,8	/
	stari listiD1	34,1	18,0	-16,1
	stari listiD2	neg	18,1	/
stari listiE1	31,6	18,1	-13,5	
stari listiE2	neg	18,8	/	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge S (Podrobni prikaz rezultatov analiz na PepMV za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan)

	oznaka vzorca	PepMV (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PepMV
rastline za vabo	stari listiF1	26,3	17,9	-8,4
	stari listiF2	38,7	17,7	-21
	vršičekA1	neg	15,6	/
	vršičekA2	neg	15,8	/
	vršičekB1	neg	16,5	/
	vršičekB2	neg	16,2	/
	vršičekC1	neg	15,9	/
	vršičekC2	neg	16,5	/
	vršičekD1	neg	16,3	/
	vršičekD2	neg	15,9	/
	vršičekE1	neg	15,7	/
	vršičekE2	neg	15,3	/
	vršičekF1	29,1	15,9	-13,2
	vršičekF2	neg	16,3	/
	plodA	neg	16,7	/
	plodD	neg	17,0	/

^apovprečne vrednosti treh paralelk

Povprečna relativna količina tarčne RNA v pozitivnih vzorcih glede na količino RNA COX po posameznih tkivih:

	tkivo	\bar{x}	SD	n = št. poz. vzorcev	SE = SD / \sqrt{n}	D = SE × TINW(0,05;n-1)	2 \bar{x}	2 \bar{x} - 2 $\sqrt{\bar{x} \cdot D}$	2 \bar{x} + 2 $\sqrt{\bar{x} \cdot D}$
vir inokuluma	korenine	4,8	0,3	6	0,1	0,3	27,85761803	5,82502830	7,36506309
	korenine	-10,9	3,6	6	1,5	3,8	0,00054178	0,00050211	0,00685649
rastline za vabo	steblo	-12,7	4,1	4	2,0	6,5	0,00015559	0,00015388	0,01400939
	stari listi	-14,7	4,2	8	1,5	3,5	0,00003856	0,00003522	0,00040626
	vršički	-13,2	/	1	/	/	0,00010627	/	/
	plodovi	/	/	0	/	/	/	/	/

Priloga Š

Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PVY za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik

	dni ^a	0	13	21	34	50	59	79	100	112	134
vir inokuluma - listi:											
A-F		+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt
		(14,6)							(13,7)		
vir inokuluma - korenine:											
A-F		nt	+	nt	+	+	+	+	+	nt	glej prilogo T
			(22,1)		(21,6)	(24,1)	(24,5)	(20,2)	(22,5)		
hranilna raztopina											
		+	+	+	+	-	nt	-	+	-	+
		(38,2)	(38,8)	(36,2)	(37,8)				(35,7)		(34,3)
rezultat analize testnih rastlin štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino:											
<i>L. esculentum</i> 1		-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-
<i>L. esculentum</i> 2		-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-
<i>N. tabacum</i> 1		-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt
<i>N. tabacum</i> 2		-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt
rastline za vabo - korenine:											
A-F		nt	-	-	+	+	+	+	-	nt	glej prilogo T
					(34,7)	(36,9)	(38,4)	(34,6)			
rastline za vabo - nadzemni deli rastlin:											
A-F		nt	-	-	-	-	-	-	- / - ^b	+(39,4) /- ^c	glej prilogo T

V oklepaju so podane vrednosti Cq za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk). Pomen oznak: + pozitivno; - negativno; nt ni testirano. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino; ^bločeno analizirani listi in nezrel plod; ^cpozitivni starejši listi, negativen nezrel plod, steblo z izrastki in vršički. Pomen barvnih oznak:

	Povprečne vrednosti Cq za COX med 15 in 17; vrednosti Cq za LUC med 12 in 14
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 17 in 19
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 19 in 21
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 21 in 23
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 23 in 25
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 25 in 27

Priloga T

Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PVY za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan

	oznaka vzorca	PVY (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PVY
vir inokuluma	koreninaA	22,0	17,3	-4,7
	koreninaB	23,4	17,8	-5,6
	koreninaC	22,8	17,5	-5,3
	koreninaD	21,0	16,7	-4,3
	koreninaE	21,5	18,2	-3,3
	koreninaF	22,0	17,7	-4,3
rastline za vabo	koreninaA	34,0	17,5	-16,5
	koreninaB	36,8	18,0	-18,8
	koreninaC	35,5	17,4	-18,1
	koreninaD	34,0	18,3	-15,7
	koreninaE	34,9	18,0	-16,9
	koreninaF	36,6	18,0	-18,6
	steblo sp.A	neg	17,9	/
	steblo sp.B	neg	17,5	/
	steblo sp.C	neg	17,6	/
	steblo sp.D	neg	18,0	/
	steblo sp.E	neg	17,8	/
	steblo sp.F	neg	17,9	/
	steblo sr.A	neg	17,6	/
	steblo sr.B	neg	19,0	/
	steblo sr.C	neg	18,0	/
	steblo sr.D	neg	18,2	/
	steblo sr.E	neg	18,7	/
	steblo sr.F	neg	18,6	/
	stari listiA1	neg	17,9	/
	stari listiA2	neg	18,2	/
	stari listiB1	neg	18,6	/
	stari listiB2	neg	17,9	/
	stari listiC1	neg	18,3	/
	stari listiC2	neg	18,8	/
	stari listiD1	neg	18,0	/
	stari listiD2	neg	18,1	/
	stari listiE1	neg	18,1	/
	stari listiE2	neg	18,8	/
	stari listiF1	35,8	17,9	-17,9

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge T (Podrobni prikaz rezultatov analiz na PVY za vzorce iz poskusa PepMV+PVY-paradižnik 134. dan)

	oznaka vzorca	PVY (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PVY
rastline za vabo	stari listiF2	neg	17,7	/
	vršičekA1	neg	15,6	/
	vršičekA2	neg	15,8	/
	vršičekB1	neg	16,5	/
	vršičekB2	neg	16,2	/
	vršičekC1	neg	15,9	/
	vršičekC2	neg	16,5	/
	vršičekD1	neg	16,3	/
	vršičekD2	neg	15,9	/
	vršičekE1	neg	15,7	/
	vršičekE2	neg	15,3	/
	vršičekF1	neg	15,9	/
	vršičekF2	neg	16,3	/
	plodA	neg	16,7	/
	plodD	neg	17,0	/

^apovprečne vrednosti treh paralelk

Povprečna relativna količina tarčne RNA v pozitivnih vzorcih glede na količino RNA COX po posameznih tkivih:

	tkivo	\bar{x}	SD	n = št. poz vzorcev	SE = SD / \sqrt{n}	D = SE × TINV(0,05;n-1)	$2^{\bar{x}}$	Ci min = $2^{\bar{x}-D}$	Ci max = $2^{\bar{x}+D}$
vir inokuluma	korenine	-4,6	0,8	6	0,3	0,9	0,04171375	0,01875290	0,03406904
	korenine	-17,4	1,3	6	0,5	1,3	0,00000565	0,00000338	0,00000839
rastline za vabo	steblo	/	/	0	/	/	/	/	/
	stari listi	-17,9	/	1	/	/	0,00000409	/	/
	vršički	/	/	0	/	/	/	/	/
	plodovi	/	/	0	/	/	/	/	/

Priloga U

Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PVY-krompir

	dni ^a	4	14	24	34	44	54	66	76	88	97	112	119	126
vir inokuluma - listi:														
A		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(18,4)	(13,8)											
B		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(16,0)	(12,1)											
C		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(15,4)	(12,8)											
D		nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
E		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(18,7)	(12,9)											
F		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(19,8)	(14,1)											
vir inokuluma - korenine:														
A		+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(22,7)	(23,4)	(23,0)										
B		+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(28,8)	(26,1)	(25,9)										
C		+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(23,0)	(24,7)	(24,9)										
D		nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
				(17,9)										
E		+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(22,3)	(24,1)	(20,9)										
F		+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(18,3)	(17,8)	(23,4)										
hranilna raztopina:														
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt
		(35,5)	(39,1)	(32,9)	(30,2)	(30,0)	(34,9)	(33,5)	(30,8)	(28,2)	(32,7)	(37,6)		nt
rezultat analize testnih rastlin štiri tedne po mehanski okužbi s hranilno raztopino:														
<i>N. tabacum</i> 1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt
<i>N. tabacum</i> 2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt
<i>N. tabacum</i> 3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt
<i>N. tabacum</i> 4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt
rastline za vabo - korenine:														
A		nt	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	nt	nt
									(36,5)	(32,4)	(31,3)	(34,3)		
B		nt	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	nt	nt
								(36,1)	(33,8)	(32,9)	(35,6)	(31,3)		
C		nt	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	nt	nt
				(37,5)	(27,0)			(35,4)	(31,8)	(32,6)	(30,3)	(32,2)		
D		nt	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	nt	nt
								(35,2)	(26,2)	(29,9)	(33,0)	(33,4)		
E		nt	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	nt	nt
			(37,8)		(31,0)			(37,4)	(34,3)	(32,8)	(30,6)	(32,9)		
F		nt	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	nt	nt
			(35,8)		(36,8)		(28,4)	(34,8)	(30,9)	(33,0)	(33,4)	(23,6)		

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge U (Podrobni prikaz rezultatov analiz vzorcev iz poskusa PVY-krompir)

	dni ^a	4	14	24	34	44	54	66	76	88	97	112	119	126
rastline za vabo - nadzemni deli rastlin:														
A	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-	-/-
B	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	nt	nt
										(38,6)				
C	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-/-	-	-
										(34,6)				
D	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	nt	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
							(35,6)							
F	nt	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-/-	-	-
									(33,3)					

V oklepaju so podane vrednosti Cq za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk). Pomen oznak: + pozitivno; - negativno; nt ni testirano. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino (rezultati za 131. dan so v Prilogi V). Pomen barvnih oznak:

	Povprečne vrednosti Cq za COX med 15 in 17; vrednosti Cq za LUC med 12 in 14
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 17 in 19; vrednosti Cq za LUC med 14 in 16
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 19 in 21
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 21 in 23
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 23 in 25
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 25 in 27
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 27 in 29

Priloga V

Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PVY-krompir 131. dan

	oznaka vzorca	PVY (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PVY	
vir inokuluma	vršičekA	12,9	15,5	2,6	
	vršičekB	15,8	16,6	0,8	
	vršičekC	16,0	17,1	1,1	
	vršičekD	15,3	17,1	1,8	
	vršičekE	13,2	16,3	3,1	
	vršičekF	17,9	21,0	3,1	
	koreninaA	20,9	18,4	-2,5	
	koreninaB	21,6	20,6	-1	
	koreninaC	20,3	20,5	0,2	
	koreninaD	19,0	17,1	-1,9	
	koreninaE	18,7	16,6	-2,1	
	koreninaF	21,9	24,0	2,1	
	rastline za vabo	koreninaA	33,8	19,0	-14,8
		koreninaB	33,9	16,7	-17,2
koreninaC		33,9	19,7	-14,2	
koreninaD		34,5	18,6	-15,9	
koreninaE		34,2	18,3	-15,9	
koreninaF		37,8	18,0	-19,8	
steblo sp.A		neg	18,7	/	
steblo sp.C		neg	19,1	/	
steblo sp.D		neg	18,3	/	
steblo sp.E		39,3	18,4	-20,9	
steblo sp.F		neg	18,9	/	
steblo sr.A		neg	20,2	/	
steblo sr.C		neg	21,4	/	
steblo sr.D		neg	19,2	/	
steblo sr.E		neg	19,6	/	
steblo sr.F		neg	21,1	/	
steblo zg.A		neg	22,2	/	
steblo zg.C		neg	22,9	/	
steblo zg.D		neg	19,0	/	
steblo zg.E		neg	20,7	/	
steblo zg.F		neg	25,8	/	
stari listiA		neg	20,1	/	
stari listiC		neg	18,5	/	
stari listiD	34,8	20,4	-14,4		

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge V (Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PVY-krompir 131. dan)

	oznaka vzorca	PVY (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PVY
rastline za vabo	stari listiE	neg	18,5	/
	stari listiF	neg	20,0	/
	vršičekA ^d	neg	17,3	/
	vršičekB ^c	neg	15,6	/
	vršičekC ^d	neg	18,4	/
	vršičekD ^d	neg	18,5	/
	vršičekE ^d	neg	20,4	/
	vršičekF ^d	neg	17,5	/
rastline zrasle iz gomoljev rastlin za vabo ^b	vršičekA	neg	18,5	/
	vršičekB	31,5	21,7	-9,8
	vršičekC	28,8	19,0	-9,8
	vršičekD	26,7	17,7	-9
	vršičekE	neg	19,1	/
	vršičekF	28,4	19,1	-9,3

^apovprečne vrednosti treh paralelk; za vršičke rastlin, ki smo jih uporabili v poskusu kot vabo, pa povprečje vseh analiziranih vzorcev iste rastline.

^banalizirane rastline zrasle iz gomoljev rastlin, ki smo jih uporabili v poskusu kot vabo, 15 tednov po posaditvi v neokuženo zemljo; ^canaliziran vršiček poganjka, ki je izraščal na novo iz baze stebila (vsi ostali poganjki te rastline so bili posušeni); ^dločeno analiziranje vršičkov, ki so izraščali iz iste baze (na eno rastlino je bilo le-teh 3-7; posušeni poganjki niso bili analizirani).

Povprečna relativna količina tarčne RNA v pozitivnih vzorcih glede na količino RNA COX po posameznih tkivih:

	tkivo	\bar{x}	SD	n = št. poz. vzorcev	SE = SD / \sqrt{n}	D = SE * TINV(0,05; n-1)	$2^{\bar{x}}$	Ci min = $2^{\bar{x}-D}$	Ci max = $2^{\bar{x}+D}$
vir inokuhma	vršički	2,1	1,0	6	0,4	1,1	4,23785238	2,19451349	4,55138611
	korenine	-0,9	1,7	6	0,7	1,8	0,54841249	0,39422288	1,40214868
rastline za vabo	korenine	-16,3	2,0	6	0,8	2,1	0,00001239	0,00000950	0,00004078
	steblo	-20,9	/	1	/	/	0,00000051	/	/
	stari listi	-14,4	/	1	/	/	0,00004626	/	/
	vršički	/	/	0	/	/	/	/	/
rast. zrasle iz gomoljev rast. za vabo	vršički	-9,5	0,4	4	0,2	0,6	0,00140521	0,00049603	0,00076665

Priloga Z

Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-paradižnik








	dni ^a	9	21	31	41	52	62	72	83	94	104	107	121	136
vir inokuluma - listi:														
A		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(25,7)	(15,7)											
B		+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(26,4)												
C		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(23,6)	(15,7)											
D		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(23,7)	(15,0)											
E		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(24,4)	(15,4)											
F		+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(24,8)												
vir inokuluma - korenine:														
A		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(19,6)	(17,2)											
B		+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(21,0)												
C		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(21,2)	(16,7)											
D		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(18,8)	(16,0)											
E		+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(18,1)	(15,2)											
F		+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
		(18,7)												
hranilna raztopina:														
		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	+	+
			(34,0)	(32,6)	(30,9)	(34,2)	(35,4)	(35,9)	(33,2)	(35,3)	(38,5)		(37,4)	(35,6)
rezultat analize testnih rastlin pet tednov po mehanski okužbi s hranilno raztopino:														
<i>L. esculentum</i> 1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt
<i>L. esculentum</i> 2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt
<i>L. esculentum</i> 3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt
<i>L. esculentum</i> 4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt
rastline za vabo - korenine:														
A		nt	-	+	+	+	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt
				(35,4)	(34,7)	(30,8)	(31,6)				(25,9)			
B		nt	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt
			(37,0)	(35,7)	(33,1)	(31,9)	(32,7)				(32,2)			
C		nt	-	+	+	+	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt
				(38,6)	(31,3)	(31,1)	(31,0)				(30,7)			
D		nt	-	+	+	+	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt
				(34,9)	(31,9)	(32,4)	(30,5)				(26,9)			
E		nt	-	+	+	+	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt
				(38,6)	(31,9)	(29,9)	(31,7)				(27,2)			
F		nt	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt
			(39,0)	(37,0)	(32,9)	(31,2)	(30,7)				(28,0)			

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge Z (Podrobni prikaz rezultatov analiz vzorcev iz poskusa PSTVd-paradižnik)

	dni ^a	9	21	31	41	52	62	72	83	94	104	107	121	136
rastline za vabo - nadzemni deli rastlin:														
A	nt	nt	-	-	-	-	-	nt	nt	-	-	nt	-	-
B	nt	nt	-	-	-	-	-	nt	nt	-	-	nt	-	-
C	nt	nt	-	-	-	-	-	nt	nt	-	-	nt	-	-
D	nt	nt	-	-	-	-	-	nt	nt	-	-	nt	-	-
E	nt	nt	-	-	-	-	-	nt	nt	-	-	nt	-	-
F	nt	nt	-	-	-	-	-	nt	nt	-	+	(37,6)	-	-

V oklepaju so podane vrednosti Cq za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk). Pomen oznak: + pozitivno; - negativno; nt ni testirano. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino (rezultati za 141. dan so v Prilogi Ž). Pomen barvnih oznak:

	Povprečne vrednosti Cq za COX med 15 in 17; vrednosti Cq za LUC med 12 in 14
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 17 in 19; vrednosti Cq za LUC med 14 in 16
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 19 in 21
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 21 in 23
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 23 in 25
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 25 in 27
	Povprečne vrednosti Cq za COX med 27 in 29

Priloga Ž

Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-paradižnik 141. dan

	oznaka vzorca	PSTVd (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PSTVd	
vir inokuluma	vršičekA	22,2	19,4	-2,8	
	vršičekB	17,1	17,3	0,2	
	vršičekC	18,9	18,1	-0,8	
	vršičekD	17,9	17,0	-0,9	
	vršičekE	17,7	16,7	-1	
	vršičekF	19,1	19,3	0,2	
	plod1	20,9	18,3	-2,6	
	plod2	22,2	18,2	-4	
	koreninaA	19,7	18,4	-1,3	
	koreninaB	19,0	16,8	-2,2	
	koreninaC	19,1	16,9	-2,2	
	koreninaD	17,4	16,0	-1,4	
	koreninaE	18,3	16,2	-2,1	
	koreninaF	18,6	17,5	-1,1	
	rastline za vabo	koreninaA	neg	16,3	/
		koreninaB	34,5	16,7	-17,8
koreninaC		39,2	17,6	-21,6	
koreninaD		35,2	19,2	-16	
koreninaE		31,4	18,0	-13,4	
koreninaF		32,9	18,5	-14,4	
stebloA		neg	17,7	/	
stebloB		neg	20,0	/	
stebloC		neg	18,4	/	
stebloD		neg	20,1	/	
stebloE		neg	18,5	/	
stebloF		neg	18,5	/	
steblo-izrastkiA		neg	17,3	/	
steblo-izrastkiB		neg	17,1	/	
steblo-izrastkiC		neg	16,7	/	
steblo-izrastkiD		neg	16,6	/	
steblo-izrastkiE		neg	17,8	/	
steblo-izrastkiF		neg	17,0	/	
stari listiA		neg	19,8	/	
stari listiB		neg	19,0	/	
stari listiC		neg	20,5	/	
stari listiD		neg	19,5	/	
stari listiE	neg	20,2	/		

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge Ž (Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-paradižnik 141. dan)

	oznaka vzorca	PSTVd (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PSTVd
rastline za vabo	stari listiF	neg	19,8	/
	vršičekA ^b	neg	16,5	/
	vršičekB ^b	neg	18,4	/
	vršičekC ^b	neg	18,0	/
	vršičekD ^b	neg	18,7	/
	vršičekE ^b	neg	19,4	/
	vršičekF ^b	neg	18,9	/
	plodA	neg	17,9	/
	plodB	neg	17,0	/
	plodC	neg	17,4	/
	plodD1	neg	19,2	/
	plodD2	neg	16,3	/
	plodE	neg	17,5	/
	plodF1	neg	17,5	/
	plodF2	neg	18,5	/
	novi poganjkiA ^c	neg	16,1	/
	novi poganjkiB ^c	38,3	16,9	-21,4
	novi poganjkiC ^c	neg	18,2	/
	novi poganjkiD ^c	neg	16,4	/
	novi poganjkiE ^c	37,6	15,2	-22,4
novi poganjkiF ^c	neg	17,8	/	

^apovprečne vrednosti treh paralelk; za vršičke rastlin, ki smo jih uporabili v poskusu kot vabo, pa povprečje vseh analiziranih vzorcev iste rastline; ^bvršički pobrani na poganjkih, ki so bili večji od 40 cm; ^cvršički vzorčeni na poganjkih, ki so izraščali na novo iz baze stebela (velikost teh poganjkov od 5-10 cm).

Povprečna relativna količina tarčne RNA v pozitivnih vzorcih glede na količino RNA COX po posameznih tkivih:


	tkivo	\bar{x}	SD	n = št. poz. vzorcev	SE = SD / \sqrt{n}	D = SE × TINV(0,05;n-1)	2 \bar{x}	Ci min = 2 \bar{x} - 2*(\bar{x} -D)	Ci max = 2*(\bar{x} +D) - 2 \bar{x}
vir inokuluma	vršički	-0,9	1,1	6	0,4	1,2	0,55478474	0,30529494	0,67887734
	plodovi	-3,3	1,0	2	0,7	/	0,10153155	/	/
	korenine	-1,7	0,5	6	0,2	0,5	0,30425088	0,09332886	0,13462506
rastline za vabo	korenine	-16,6	3,2	5	1,4	4,0	0,00000979	0,00000919	0,00014877
	steblo	/	/	0	/	/	/	/	/
	stari listi	/	/	0	/	/	/	/	/
	vršički	/	/	0	/	/	/	/	/
	plodovi	/	/	0	/	/	/	/	/
	novi poganjki	-21,9	0,7	2	0,5	/	0,00000026	/	/


Priloga Q


Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-krompir


dni ^a	vir inokuluma			rastline za vabo					
			hranilna raztopina	cv. Hermes		cv. Donald		cv. Nicola	
	listi	korenine		korenine	listi	korenine	listi	korenine ^d	listi
0	nt	nt	+(34,7)	nt	nt	nt	nt	nt	nt
2	nt	nt	+(36,7)	nt	nt	nt	nt	nt	nt
9	nt	nt	+(34,7)	nt	nt	nt	nt	nt	nt
20	nt	nt	+(34,6)	nt	nt	nt	nt	nt	nt
34	nt	nt	+(35,3)	nt	nt	nt	nt	nt	nt
40	nt	nt	+(34,4)	nt	nt	nt	nt	nt	nt
54	nt	nt	nt	+(32,3)	- / - ^b	+(31,6)	-	-	-
55	nt	nt	+(37,4)	nt	nt	nt	nt	nt	nt
70	+(21,0)	+(25,3)	+(36,2)	+(29,9)	-	+(31,2)	-	nt	-
103	+(21,2)	+(24,2)	+(37,9)	+(29,8)	- / - ^c	+(27,3)	- / - ^c	+(31,7)	- / - ^c
125	+(18,5)	+(22,9)	+(37,6)	+(33,6)	- / - ^c	+(32,3)	- / - ^c	+(31,5) / - ^e	- / - ^c


V oklepaju so podane vrednosti Cq za pozitivne vzorce (povprečje treh paralelk). Pomen oznak: + pozitivno; - negativno; nt ni testirano. ^ašt. dni od začetka namakanja z okuženo hranilno raztopino (podroben prikaz rezultatov za 125. dan je v Prilogi W); ^bločeno analiziranje vršičkov in cvetov; ^cločeno analiziranje vršičkov in starejših listov; ^dkoreninski sistem bistveno slabše razvit kot pri rastlinah cv. Hermes in cv. Donald; ^enegativne korenine treh rastlin. Pomen barvnih oznak:


 Povprečne vrednosti Cq za COX med 15 in 17; vrednosti Cq za LUC med 12 in 14

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 17 in 19; vrednosti Cq za LUC med 14 in 16

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 19 in 21

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 21 in 23

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 23 in 25

 Povprečne vrednosti Cq za COX med 25 in 27

Priloga W

Podrobni prikaz rezultatov analiz za vzorce iz poskusa PSTVd-krompir 125. dan

	oznaka vzorca	PSTVd (Cq) ^a	COX (Cq) ^a	X = Cq COX – Cq PSTVd
vir inokuluma (paradižnik)	vršiček	18,5	18,7	0,2
	korenine	22,9	22,1	-0,8
rastline za vabo	korenine Hermes	33,6	22,8	-10,8
	korenine Donald	32,3	21,0	-11,3
	korenine Nicola1	neg	24,0	/
	korenine Nicola2	neg	28,5	/
	korenine Nicola3	neg	26,3	/
	korenine Nicola4	31,5	20,6	-10,9
	stari listi Hermes	neg	19,9	/
	stari listi Donald	neg	19,9	/
	stari listi Nicola	neg	19,1	/
	vršiček Hermes	neg	17,0	/
	vršiček Donald	neg	17,9	/
	vršiček Nicola	neg	18,0	/
	rastline zrasle iz gomoljev rastlin za vabo ^b	vršiček Hermes	neg	14,5
vršiček Donald		neg	16,1	/
vršiček Nicola		neg	15,8	/

^apovprečne vrednosti treh paralelk; v primeru rastlin, ki so zrasle iz gomoljev rastlin, ki smo jih uporabili v poskusu kot vabo, pa povprečje vseh analiziranih vzorcev; ^banalizirane rastline zrasle iz gomoljev rastlin, ki smo jih uporabili kot vabo, 17,5 tednov po posaditvi v neokuženo zemljo.

Povprečna relativna količina tarčne RNA v pozitivnih vzorcih glede na količino RNA COX po posameznih tkivih:

	tkivo	\bar{x}	SD	n = št. poz. vzorcev	SE = SD / \sqrt{n}	D = SE * TINV(0,05;n-1)	2* \bar{x}	Ci min = 2* \bar{x} - 2*(\bar{x} -D)	Ci max = 2*(\bar{x} +D) - 2* \bar{x}
vir inokuluma	vršički	0,2	/	1	/	/	1,14869835	/	/
	korenine	-0,8	/	1	/	/	0,57434918	/	/
rastline za vabo	korenine	-11,0	0,3	3	0,2	0,7	0,00048828	0,00017867	0,00028177
	stari listi	/	/	0	/	/	/	/	/
	vršički	/	/	0	/	/	/	/	/
rast. zrasle iz gomoljev									
rast. za vabo	vršički	/	/	0	/	/	/	/	/

Priloga X

Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PepMV-Ch2 za vzorce vode in hranilne raztopine

poskus	oznaka vzorca	PepMV (Cq)	LUC (Cq)	Cq LUC – Cq PepMV
	10 ⁻¹ x	13,4	15,6	2,2
	10 ⁻² x	15,7	14,3	-1,4
največja razredčenost	10 ⁻³ x	19,2	14,6	-4,6
PepMV-Ch2 v vodi, da z njo še lahko okužimo testne rastline (točka 4.1) (oznaka vzorca = razredčina)	10 ⁻⁴ x	22,8	14,3	-8,5
	10 ⁻⁵ x	26,3	14,8	-11,5
	10 ⁻⁶ x	29,2	14,0	-15,2
	10 ⁻⁷ x	31,6	14,0	-17,6
	10 ⁻⁸ x	33,3	14,2	-19,1
	10 ⁻⁹ x	33,4	14,3	-19,1
	10 ⁻¹⁰ x	37,7	14,1	-23,6
	Voda	neg	14,1	/
poskus PepMV-paradižnik:	0	27,8	12,8	-15
	21	29,1	12,9	-16,2
PepMV-Ch2 v hranilni raztopini (točka 4.3.2.1) (oznaka vzorca = št.dni od začetka namakanja)	34	30,8	12,7	-18,1
	50	27,1	12,9	-14,2
	79	28,6	12,8	-15,8
	100	26,2	12,7	-13,5
	134	27,4	13,0	-14,4
poskus PepMV+PVY-paradižnik:	0	29,9	12,7	-17,2
	21	26,4	12,6	-13,8
PepMV-Ch2 v hranilni raztopini (točka 4.3.2.1) (oznaka vzorca = št.dni od začetka namakanja)	34	28,2	12,7	-15,5
	50	neg	12,8	/
	79	33,2	12,9	-20,3
	100	26	13,0	-13
	134	26,8	13,0	-13,8

Z rdečo so označeni vzorci, v katerih smo prisotnost PepMV potrdili z mehansko okužbo testnih rastlin, z modro pa vzorci, ki so bili z RT-qPCR pozitivni, vendar prisotnosti PepMV z mehansko okužbo testnih rastlin nismo potrdili. V vzorcih označenimi z rumeno je bil pozitiven rezultat mehanske okužbe vprašljiv zaradi dotikanja nekaterih listov (v obdobju med petim in šestim tednom po mehanski okužbi) z rastlinami okuženimi z razredčitvijo 10⁻².

Priloga Y

Podrobni prikaz rezultatov analiz prisotnosti PSTVd za vzorce vode in hranilne raztopine

poskus	oznaka vzorca	PSTVd (Cq)	LUC (Cq)	Cq LUC – Cq PSTVd
največja razredčenost PSTVd v vodi, da z njo še lahko okužimo testne rastline (točka 4.1) (oznaka vzorca = razredčina)	10 ⁻¹ x	20,9	13,9	-7,0
	10 ⁻² x	23,6	13,4	-10,2
	10 ⁻³ x	27,6	13,7	-13,9
	10 ⁻⁴ x	30,7	13,2	-17,5
	10 ⁻⁵ x	32,7	13,6	-19,1
	10 ⁻⁶ x	34,0	13,4	-20,6
	10 ⁻⁷ x	36,0	13,1	-22,9
	10 ⁻⁸ x	39,1	13,2	-25,9
	10 ⁻⁹ x	neg	13,3	/
	10 ⁻¹⁰ x	neg	13,6	/
	Voda	neg	13,2	/
preživetje PSTVd v vodnem okolju (točka 4.2; poskus A) (oznaka vzorca = št. tednov po pripravi okužene vode)	0	17,7	14,3	-3,4
	1	22,6	14,0	-8,6
	2	23,0	13,9	-9,1
	3	21,5	13,8	-7,7
	4	22,3	13,3	-9,0
	5	21,5	13,9	-7,6
	6	23,3	15,8	-7,5
	7	23,8	15,9	-7,9
	8	24,1	15,7	-8,4
	9	24,0	15,9	-8,1
	10	25,2	16,1	-9,1
	11	24,3	15,5	-8,8
	12	26,4	16,1	-10,3
preživetje PSTVd v vodnem okolju (točka 4.2; poskus B) (oznaka vzorca = št. tednov po pripravi okužene vode)	0	16,4	13,9	-2,5
	1	19,5	13,9	-5,6
	2	19,4	13,6	-5,8
	3	20,4	13,9	-6,5
	4	20,6	12,6	-8,0
	5	20,7	14,2	-6,5
	6	21,5	15,6	-5,9
	7	22,2	15,5	-6,7
	8	23,6	15,7	-7,9
	9	23,0	13,4	-9,6

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice iz Priloge Y (Podrobni prikaz rezultatov analiz na prisotnost PSTVd za vzorce vode in hranilne raztopine)

poskus	oznaka vzorca	PSTVd (Cq)	LUC (Cq)	Cq LUC – Cq PSTVd
	10	23,7	16,0	-7,7
	11	24,5	15,6	-8,9
	12	25,3	15,9	-9,4
poskus dodajanja okužene vode v zemljo (točka 4.3.1)	povp.	24,1	14,4	-9,7
	9	neg	13,8	/
	21	34,0	14,0	-20,0
poskus PSTVd-paradižnik: PSTVd v hranilni raztopini (točka 4.3.2.3)	31	32,6	13,8	-18,8
(oznaka vzorca = št. dni od začetka namakanja)	41	30,9	13,4	-17,5
	52	34,2	13,0	-21,2
	62	35,4	14,2	-21,2
	72	35,9	15,5	-20,4
	83	33,2	15,3	-17,9
	94	35,3	15,6	-19,7
	104	38,5	15,6	-22,9
	0	34,7	14,7	-20,0
	2	36,7	14,9	-21,8
poskus PSTVd-krompir: PSTVd v hranilni raztopini (točka 4.4.2.3)	9	34,7	15,0	-19,7
(oznaka vzorca = št. dni od začetka namakanja)	20	34,6	15,3	-19,3
	34	35,3	13,4	-21,9
	40	34,4	13,4	-21,0
	55	37,4	13,3	-24,1
	70	36,2	15,6	-20,6
	103	37,9	15,5	-22,4
	125	37,6	16,3	-21,3

Z rdečo so označeni vzorci, pri katerih smo prisotnost PSTVd potrdili z mehansko okužbo testnih rastlin oziroma so se rastline zalivane z okuženo vodo okužile. Z modro so označeni vzorci pozitivni z RT-qPCR, pri katerih prisotnosti PSTVd z mehansko okužbo testnih rastlin nismo potrdili oziroma se rastline z okuženo hranilno raztopino niso okužile.