

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nina PREZELJ

**MOLEKULSKE INTERAKCIJE FITOPLAZEMSKIH POVZROČITELJIC
TRSNIH RUMENIC Z VINSKO TRTO (*Vitis vinifera* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN PHYTOPLASMA CASUAL
AGENTS OF GRAPEVINE YELLOWS DISEASE AND GRAPEVINE (*Vitis vinifera*
L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21. 9. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje zanost o celici. Za mentorja je bil imenovana prof. dr. Marina Dermastia.

Večina dela je bila opravljena na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo, praktični del metabolomike pa je bil opravljen v laboratoriju Molecular Systems Biology (Mosys), Fakultät für Lebenswissenschaft, Universität Wien.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Jernej JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Maja RUPNIK
Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13. 10. 2014

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

Nina Prezelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK 582.821:632(043.3)=163.6
KG Fitoplazme/vinska trta/*Vitis vinifera*/trsne rumenice/Bois noir/Flavescence doree/
metabolomika/izražanje genov
AV PREZELJ Nina, univ. dipl. biokem.
SA DERMASTIA, Marina (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni študij Bioznanosti,
področje znanost o celici
LI 2014
IN MOLEKULSKE INTERAKCIJE FITOPLAZEMSKIH POVZROČITELJIC
TRSNIH RUMENIC Z VINSKO TRTO (*Vitis vinifera* L.)
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 116 str., 16 pregl., 44 sl., 147 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Z metodo kvantitativnega PCR v realnem času smo med rastno sezono spremljali količino fitoplazme Flavescence dorée (FDf) v različnih tkivih vinske trte. Njeno prisotnost smo prvič dokazali v cvetovih in viticah, visok titer pa smo določili v jagodah. Med rastno sezono je titer FDF v tkivih z bolezenskimi znamenji naraščal. Ugotovili smo, da FDF lahko detektiramo že v začetku rastle sezone, pred pojavom bolezenskih znamenj, kadar je infekcijski pritisk velik. Študija izražanja izbranih štirinajstih genov med rastno sezono je pokazala statistično značilno različno izražanje genov v zdravih in s FDF okuženih rastlin avgusta, v času bolezenskih znamenj. Izražanje je bilo podobno kot v predhodnih raziskavah interakcije trte s fitoplazmo Bois noir (BNf). Statistična analiza PCA je pokazala, da na podlagi izražanja izbranih genov lahko poleti ločimo rastline glede na njihov zdravstveni status. V času bolezenskih znamenj smo v listih rastlin okuženih s fitoplazmama BNf ali FDF pokazali povečano količino sladkorjev, predvsem saharoze in škroba. V rastlinah okuženih s FDF smo pokazali tudi višjo aktivnost encima saharoza sintaza (SUSY), ne pa tudi spremenjene aktivnosti encimov ADP-glukoza pirofosforilaza (AGPaza) in nevtralana invertaza (nINV). S pomočjo tehnike GC-MS smo ugotovili, da fitoplazmi BNf in FDF povzročata različen metabolni profil, ki pa je lahko posledica različne sorte trte pri obeh interakcijah in/ali različnega tipa fitoplazme. Na podlagi količine vseh metabolitov je analiza PCA pokazala, da se rastline lahko ločijo glede na njihov zdravstveni status, vendar pa so metaboliti, ključni za ločevanje, različni pri obeh interakcijah. Pri obeh interakcijah pa smo pokazali statistično značilno višjo vsebnost heksoza 6-fosfatov, ki so kot začetne komponente glikolize domnevni vir energije za fitoplazme. Predpostavljamo, da je patogenost fitoplazem med drugim posledica slabšega nalaganja saharoze v floem, kar zmanjša transport sladkorjev do drugih ponornih tkiv, predvsem jagod, ki ne morejo kopičiti zadostne količine sladkorjev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 582.821:632(043.3)=163.6
CX Phytoplasma/grapevine/*Vitis vinifera*/grapevine yellows/Bois noir/Flavescence dorée/metabolomics/gene expression
AU PREZELJ Nina, univ. dipl. biokem.
AA DERMASTIA, Marina (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field Cell Sciences
PY 2014
IN MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN PHYTOPLASMAL CASUAL AGENTS OF GRAPEVINE YELLOWS DISEASE AND GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.)
DT Doctoral dissertation
NO XIV, 116 p., 16 tab., 44 fig., 147 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Quantitative real time PCR was used to follow the seasonal changes of the Flavescence dorée phytoplasma (FDp) titre in different grapevine tissues. FDp presence was determined in flowers and tendrils with a high concentration in berries. In tissues with symptoms a trend of an increasing FDp titre throughout the growing season was recorded. Early detection of FDp in symptomless tissues was possible and positively correlated with high infection pressure. A gene expression analysis of fourteen selected genes during the growing season revealed that statistically significant differences between healthy and FDp infected plants occur in August at the time of symptoms. At this time the gene expression was similar to previous studies on the grapevine - Bois noir phytoplasma (BNp) interaction. From gene expression profiles we could distinguish the health status of plants sampled in summer. In August we determined higher amounts of sugars, mainly sucrose and starch, in BNp and FDp infected plants compared to healthy plants. Additionally, we determined higher activity of the sucrose synthase (SUSY) enzyme but unchanged activity of the ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) and neutral invertase (nINV) enzymes in FDp infected plants. Using the GC-MS technique we determined that both phytoplasmas (BNp and FDp) cause a different metabolic fingerprint, which can be the consequence of a different grapevine cultivar used in the interaction study and/or a different phytoplasma type. The PCA analysis based on all metabolites showed a separation of healthy and phytoplasma infected samples. The main metabolites responsible for the health status separation are however different in both interactions. Both phytoplasmas induce higher levels of hexose 6-phosphates, which as the starting molecule of glycolysis could be the main energy source for phytoplasmas. Phytoplasma pathogenicity is presumably due to a decreased sucrose loading in phloem, which slows down sugar transport to sink tissues, this leading to an insufficient sugar accumulation in berries and harvest loss.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1. VINSKA TRTA.....	3
2.2. OGLJIKOVI HIDRATI V RASTLINAH.....	4
2.2.1. Floem in transport saharoze	4
2.3. FITOPLAZME	7
2.3.1. Fitoplazme vinske trte	9
2.4. INTERAKCIJA FITOPLAZEM Z RASTLINSKIMI GOSTITELJI	10
2.5. ŠIRJENJE IN RAZPOREDITEV FITOPLAZEM V RASTLINAH	13
2.6. CILJI DOKTORSKE NALOGE.....	14
2.7. DELOVNE HIPOTEZE DOKTORSKE NALOGE	14
3 MATERIALI IN METODE.....	15
3.1. MATERIAL VINSKE TRTE	15
3.2. IZRAŽANJE GENOV	17
3.2.1. Izolacija RNA	17
3.2.2. Odstranitev genomske DNA.....	18
3.2.3. Kontrola kakovosti RNA	18
3.2.4. Obratno prepisovanje RNA	19
3.2.5. Izbor genov	20
3.2.6. Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR).....	20
3.2.6.1. Relativna kvantifikacija	23
3.2.6.2. Statistična analiza podatkov.....	24
3.3. METABOLOMIKA	26
3.3.1. Ekstrakcija polarnih metabolitov.....	27
3.3.2. Derivatizacija.....	27
3.3.3. Analiza vzorcev z GC-MS	27
3.3.4. Obdelava GC-MS podatkov	28
3.3.5. Statistična analiza podatkov	29
3.4. DOLOČANJE VSEBNOSTI OGLJIKOVH HIDRATOV	29

3.4.1.	Določanje topnih sladkorjev	29
3.4.2.	Določanje škroba.....	31
3.5.	AKTIVNOST ENCIMOV METABOLIZMA OGLJIKOVIH HIDRATOV	32
3.5.1.	Ekstrakcija encimov	32
3.5.2.	Test aktivnosti AGPaza	33
3.5.3.	Test aktivnosti SuSy.....	34
3.5.4.	Izračun encimske aktivnosti.....	36
3.6.	DOLOČANJE TITRA IN RAZŠIRJENOSTI FDF PO RASTLINI MED RASTNO SEZONO.....	37
3.6.1.	Izolacija DNA	37
3.6.2.	Detekcija in kvantifikacija FDF.....	37
3.7.	PREVERJANJE ZDRAVSTVENEGA STANJA RASTLIN	38
3.7.1.	Določanje prisotnosti fitoplazem	38
3.7.2.	Določanje prisotnosti virusov.....	39
4	REZULTATI	40
4.1.	TITER IN RAZŠIRJENOST FDF PO RASTLINI MED RASTNO SEZONO....	40
4.1.1.	Razvoj bolezenskih znamenj	40
4.1.2.	Obseg boleznih zlate trsne rumenice v vinogradu v Izoli	42
4.1.3.	Detekcija FDF v vinogradu v Straži.....	43
4.1.4.	Detekcija FDF v vinogradu v Izoli.....	46
4.2.	IZRAŽANJE GENOV	49
4.2.1.	Izolacija RNA	49
4.2.2.	Stabilnost izražanja referenčnih genov.....	49
4.2.3.	Statistične analiza izražanja genov.....	50
4.3.	METABOLOMIKA	69
4.3.1.	Interakcija trte sorte modra frankinja s FDF	71
4.3.2.	Interakcija trte sorte chardonnay z BNf.....	73
4.3.3.	Primerjava sorte chardonnay in modra frankinja	75
4.4.	VSEBNOST OGLJIKOVIH HIDRATOV	77
4.5.	ENCIMSKA AKTIVNOST.....	79
5	RAZPRAVA	82
5.1.	TITER IN RAZŠIRJENOST FDF PO RASTLINI V ČASU RASTNE SEZONE83	
5.2.	SPREMENJEN METABOLIZEM OKUŽENIH RASTLIN VINSKE TRTE.....	84
5.2.1.	Oksidativni metabolizem	86
5.2.2.	Izražanje genov povezanih z obrambo in patogenezo	87
5.2.3.	Okužba vinske trte s fitoplazmo spremeni metabolizem ogljikovih hidratov	88
5.2.4.	Spremembe metabolitov cikla TCA	92
5.2.5.	Vpliv fitoplazem na vsebnost aminokislin	93
5.2.6.	Spremembe sekundarnega metabolizma	94

5.2.7.	Domnevna patogeneza fitoplazem povezana s spremenjenim sladkornim metabolizmom gostitelja (Slika 44)	96
5.2.8.	Razlike med fitoplazmama BNf in FDF	97
6	SKLEPI	99
7	POVZETEK	100
7.1.	POVZETEK	100
7.2.	SUMMARY	102
8	VIRI.....	104
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Vzorčenje rastlin vinske trte tekom ravnih sezon v posameznih vinogradih	17
Pregl. 2: Reakcijska mešanica za reakcijo razgradnje genomske DNA v vzorcih RNA...	18
Pregl. 3: Sestava 50-kratnega pufra TAE.	19
Pregl. 4: Sestava nanašalnega pufra.	19
Pregl. 5: Reakcijska mešanica za reakcijo obratnega prepisovanja RNA v cDNA.	20
Pregl. 6: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov in sond uporabljenih za pomnoževanje PCR v realnem času.	22
Pregl. 7: Reakcijske mešanice za določanje glukoze, fruktoze in saharoze s SUFRG kitom.	30
Pregl. 8: Reakcijske mešanice za test aktivnosti AGPaza.	34
Pregl. 9: Reakcijske mešanice za test aktivnosti SuSy.	36
Pregl. 10: Zanesljivost detekcije FDF v posameznih tkivih tekom ravnih sezon.	44
Pregl. 11: Relativna kvantifikacija FDF v različnih tkivih z (S) in brez (AS) bolezenskih znamenj v sezoni 2010 in 2011 v vinogradu v Straži.	45
Pregl. 12: Relativna kvantifikacija FDF v različnih tkivih z (S) in brez (AS) bolezenskih znamenj v sezoni 2011 v vinogradu v Izoli	47
Pregl. 13: Ocena stabilnosti izražanja genov.	50
Pregl. 14: Rezultati analize dvosmerna ANOVA.	50
Pregl. 15: Mann-Whitney neparametrični test.	51
Pregl. 16: Seznam identificiranih metabolitov, katerih vrednosti se statistično značilno razlikujejo med zdravimi in okuženimi vzorci trte v posamezni interakciji oziroma med zdravimi rastlinami različnih sort vinske trte.	69

KAZALO SLIK

Sl. 1: Sestava floema in transport saharoze.....	5
Sl. 2: Elektronska mikrofotografija fitoplazem v sitastih ceveh floema madagaskarskega zimzelena (<i>Catharanthus roseus</i>) (Fotografiji: M. Tušek Žnidarič).	8
Sl. 3: Vinorodne dežele Slovenije (vir: http://www.krasevka.si/ponudba/vina/).....	16
Sl. 4: Shematski prikaz GC-MS.	26
Sl. 5: Shematski prikaz encimskih reakcij v testu AGPaza.	33
Sl. 6: Shematski prikaz encimskih reakcij v testu SuSy.	35
Sl. 7: Razvoj bolezenskih znamenj rastlin tekom rastne sezone.	41
Sl. 8: Obseg okuženosti vinograda v Izoli v Avgustu 2010 (a) in Avgustu 2011 (b).	42
Sl. 9: Relativna kvantifikacija FDF v listnih žilah in celih jagodah tekom rastnih sezon 2010 in 2011 v vinogradu v Straži.....	46
Sl. 10: Relativna kvantifikacija FDF v listnih žilah in celih jagodah tekom rastne sezone 2011 v vinogradu v Izoli.....	48
Sl. 11: Izolacija RNA iz vzorcev listnih žil vinske trte vzorčenih med rastno sezono v vinogradu v Straži, vizualizirane pod UV svetlobo po agarozni gelski elektroforezi.	49
Sl. 12: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvGLC2</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	52
Sl. 13: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvAGPL</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	53
Sl. 14: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvSUSY</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	54
Sl. 15: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvINV2</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	55
Sl. 16: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvSWEET1</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	56
Sl. 17: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvSWEET10-15</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	56
Sl. 18: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvSWEET16/17</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	57
Sl. 19: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvDMR6</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	58
Sl. 20: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvF3H1</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	59
Sl. 21: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvF3H2</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	60
Sl. 22: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvAPX</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	61

Sl. 23: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvGPX</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	62
Sl. 24: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvOLP</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	63
Sl. 25: Grafikoni kvantilov za izražanje gena <i>VvHP</i> v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	64
Sl. 26: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na transkriptomskih podatkih vzorcev iz vinograda v Izoli.	65
Sl. 27: Analiza glavnih komponent 14 genov na vzorcih vinske trte iz vinograda v Izoli..	66
Sl. 28: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na transkriptomskih podatkih vzorcev iz vinograda v Straži.	67
Sl. 29: Analiza glavnih komponent 14 genov na vzorcih vinske trte iz vinograda v Straži.	68
Sl. 30: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na metabolomskih podatkih interakcije vinske trte s FDF.....	72
Sl. 31: Analiza glavnih komponent 247 komponent na vzorcih interakcije vinske trte s FDF	73
Sl. 32: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na metabolomskih podatkih interakcije vinske trte z BNF.	74
Sl. 33: Analiza glavnih komponent (PCA) 202 komponent na vzorcih interakcije vinske trte z BNF.	75
Sl. 34: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na metabolomskih podatkih zdravih rastlin vinske trte sort chardonnay in modra frankinja.	76
Sl. 35: Analiza glavnih komponent (PCA) 258 komponent na zdravih vzorcih vinske trte sort chardonnay in modra frankinja.	76
Sl. 36: Graf kvantilov vsebnosti sladkorjev v vzorcih vinske trte iz vinograda v Vipolžah, kjer je prisotna fitoplazma BNF.	77
Sl. 37: Grafi kvantilov vsebnosti sladkorjev v vzorcih vinske trte iz vinogradov v Straži (levo) in Izoli (desno), kjer je prisotna fitoplazma FDF.....	78
Sl. 38: Grafi kvantilov za vsebnost škroba v vzorcih vinske trte iz vinogradov v Izoli in Straži, kjer je prisotna fitoplazma FD.....	79
Sl. 39: Kinetika encima AGPaze.	79
Sl. 40: Kinetika encima SuSy.	80
Sl. 41: Encimska aktivnost encimov AGPaze (zgoraj), SuSy (na sredini) in nINV (spodaj) v zdravih in z FDF okuženih vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).....	81
Sl. 42: Shema diferencialno akumuliranih metabolitov in diferencialno izraženih genov izbranih metabolnih poti primarnega metabolizma vinske trte, glede na analizo metaboloma (Preglednica 16) in analizo izražanja genov (Preglednica 15).....	85
Sl. 43: Shema diferencialno akumuliranih metabolitov in diferencialno izraženih genov izbranih metabolnih poti sekundarnega metabolizma, glede na analizo metaboloma (Preglednica 16) in analizo izražanja genov (Preglednica 15).	95

Sl. 44: Delovni model patogeneze fitoplazem..... 98

KAZALO PRILOG

- Pril. A: Rezultat testiranja trsov iz vinograda v Izoli na prisotnost virusov vinske trte.
- Pril. B: Rezultat testiranja trsov iz vinograda v Straži na prisotnost virusov vinske trte.
- Pril. C: Rezultat testiranja trsov iz vinograda v Vipolžah na prisotnost virusov vinske trte.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16SrXII	skupina fitoplazem Stolbur group, v katero spada fitoplazma, ki povzroča navadno trsno rumenico (ali počrnelost lesa) na vinski trti
16SrV	skupina fitoplazem Elm yellows, v katero spada fitoplazma, ki povzroča zlato trsno rumenico na vinski trti
18S	18S rRNA
AGPL	gen ADP-glukoza pirofosforilaza
AGPaza	encim ADP-glukoza pirofosforilaza
ANOVA	analiza variance
APX	askorbat preoksidaza
ArMV	virus mozaika repnjaka (<i>Arabidopsis mosaic virus</i>)
AS	vzorci brez bolezenskih znamenj
bdH2O	bidestilirana voda
BN	bolezen Bois noir (navadna trsna rumenica)
BNf	fitoplazma Bois noir
Cq	cikel PCR v realnem času, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag (threshold cycle)
COX	citokrom oksidaza
DEPC H2O	voda tretirana z dietilpirokarbonatom
DMR6	rezistentni gen 6 proti peronospori (angl. »Downey mildew resistant gene 6«)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimsko imunsko metoda (enzyme linked immunosorbent assay)
F3H	flavanon 3-hidroksilaza
FD	bolezen Flavescence dorée (zlata trsna rumenica)
FDf	fitoplazma Flavescence dorée
GC-MS	plinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo
GFkV	virus marmoriranosti vinske trte (<i>Grapevine fleck virus</i>)
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte (<i>Grapevine fanleaf virus</i>)
GLC2	glukanaza
GLRaV	virus povezan z zvijanjem listov vinske trte (<i>Grapevine leafroll associated virus</i>)
GPX	glutation peroksidaza
GVA	virus A vinske trte (<i>Grapevine virus A</i>)
GVB	virus B vinske trte (<i>Grapevine virus B</i>)
GY	bolezni trsnih rumenic
H2O2	vodikov peroksid
HP	histidin vsebujoč fosfo-transferni protein vpleten v citokinsko signalno transdukcijo
INV	invertaza

INV2	kisla vakuolna invertaza2
cwINV	invertaza celične stene
vINV	vakuolna invertaza
nINV	nevtralna invertaza (citosolna invertaza)
OLP	osmotinu podoben protein
PCA	metoda glavnih komponent
PCR	verižna reakcija s polimerazo
qPCR	kvantitativni PCR v realnem času
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove spojine
S	vzorci z bolezenskimi znamenji
SPP	saharoza fosfataza
SPS	saharoza fosfat sintaza
SUC/SUT	transportni protein za vnos sladkorjev v celice
SUSY	saharoza sintaza
SWEET	transportni protein za izvoz sladkorjev v apoplast
TCA	cikel citronske kisline
UBICF	ubikvitin konjugacijski faktor

1 UVOD

Fitoplazme so bakterije brez celične stene iz razreda Mollicutes. Imajo zelo majhen genom (530-1350 kbp), v katerem ni genov za nekatere ključne metabolne poti (Lee in sod., 2000). Zaradi okrnjenega genoma so fitoplazme obligatni zajedavci, katerih preživetje in pomnoževanje je odvisno od dveh zelo različnih gostiteljev – rastlin in žuželk iz reda enakokrilcev (Homoptera). Slednji se hranijo s floemskim sokom rastlin in okuženega prenašajo na zdrave rastline. Po okužbi se fitoplazme premikajo po rastlini s floemskim sokom, v katerem tudi živijo in se razmnožujejo. V rastlinskih gostiteljih so fitoplazme neenakomerno razporejene, njihova koncentracija v floemu pa je nizka (Firrao in sod., 2007). Temeljno znanje o fitoplazmah je zelo pomanjkljivo, saj so bile kot organizmi, podobni mikoplazmam, prepoznane šele leta 1967 in kot fitoplazme v devetdesetih letih prejšnjega stoletja (Lee in sod., 2000). Ker fitoplazem še ne znamo gojiti v čisti kulturi, jih na podlagi biokemičnih in fizioloških lastnosti ne moremo določiti in uvrščati v sistem. Zato so za take bakterije leta 1995 vpeljali koncept *Candidatus*. V skladu s tem je bila leta 2004 za fitoplazme predlagana taksonomska skupina '*Candidatus* Phytoplasma' (IRPCM, 2004). Z uporabo sodobnih molekularnih pristopov je bil v zadnjem času narejen velik napredek pri klasifikaciji in ekologiji fitoplazem, še vedno pa vemo zelo malo o mehanizmih njihove patogenosti in njihove fiziološke ter genetske lastnosti le slabo razumemo.

Fitoplazme okužujejo številne ekonomsko pomembne rastline, kot so vinska trta, sadno drevje, koruza, riž, kokosova palma (Bertaccini in Duduk, 2009) paradižnik, krompir (Arocha in sod., 2007) in mnoge druge. Na vinski trti fitoplazme povzročajo bolezni trsnih rumenic, ki so prisotne v večini vinorodnih dežel po vsem svetu. Običajna bolezenska znamenja trsnih rumenic so uvihavanje listnih robov navzdol, listi postanejo krhki, pojavi se rdečenje pri rdečih in rumenenje pri belih sortah, neenakomerna olesenelost poganjkov, odsotnost cvetenja, ne dozorevanje in odpadanje grozdov. Bolezenska znamenja se na trtah začnejo pojavljati v juniju in se do trgatve stopnjujejo. Zadnja stopnja bolezni je odmiranje in propad trsov, kar vodi v zmanjšan obseg in kakovost pridelka. Razporeditev fitoplazem po rastlinah načeloma velja za neenakomerno, malo pa je znanega o njihovi prisotnosti v različnih tkivih vinske trte tekom rastne sezone.

Glavni povzročiteljici trsnih rumenic v Evropi sta fitoplazmi, ki povzročata navadno trsno rumenico ali počrnelost lesa (Bois Noir, BN) in zlato trsno rumenico (Flavescence dorée, FD) (Boudon-Padieu, 2003). Fitoplazemski povzročiteljici BN in FD sta *Candidatus* Phytoplasma solani (v nadaljevanju BNf) in fitoplazma FDf. Povzročata enaka bolezenska znamenja, vendar pa je slednja bolj agresivna, se hitreje širi in povzroča večjo ekonomsko škodo. Fitoplazma FDf je kot karantenski škodljivi organizem uvrščena v prilogo IIA2 direktive Sveta 2000/29/ES (FURS) in na seznam patogenov A2 Evropske organizacije za zaščito rastlin (European Plant Protection Organization –

<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>). Ker karantenski status fitoplazme FDF zahteva takojšnjo odstranitev okuženih trsov (FURS - <http://www.furs.si>), so študije njene interakcije z vinsko trto zelo omejene. Posledično je biologija te fitoplazme praktično neznana. Zaradi enake simptomatike in domnevno podobnega metabolizma med fitoplazmama FDF in BNf, so kot poskusni model uporabili vinsko trto, okuženo s fitoplazmo BNf. Rezultati transkriptomskih študij listov vinske trte, okužene s fitoplazmo BNf, so pokazali, da okužba povzroči diferencialno izražanje obrambnih genov, genov metabolizma ogljikovih hidratov in fotosinteznih genov (Hren in sod., 2009a; Albertazzi in sod., 2009). Na nivoju proteoma sta študiji interakcije vinske trte s FDF pokazali spremenjen profil proteinov v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Margaria in Palmano, 2011; Margaria in sod., 2013). Za boljše razumevanje, kako se produkti teh in drugih metabolnih poti presnavljajo pri interakcijah vinske trte s fitoplazmami, so potrebne dodatne študije na ravni metaboloma in na ravni aktivnosti encimov sladkornega metabolizma. Študij metaboloma s fitoplazmami okuženih rastlin je trenutno zelo malo, zato smo v doktorsko nalogo vključili študijo metaboloma rastlin vinske trte okuženih s fitoplazmo BNf oziroma FDF. Pri proučevanju interakcije rastlin vinske trte s fitoplazmo FDF smo se osredotočili na sladkorni metabolizem, kjer smo spremljali izražanje izbranih genov med rasto sezono in v poletnih mesecih določali aktivnost nekaterih encimov sladkornega metabolizma ter vsebnost sladkorjev. Nova znanja bi pripomogla k boljšemu razumevanju interakcije in k uspešnejši vinogradniški praksi.

2 PREGLED OBJAV

2.1. VINSKA TRTA

Vinska trta (*Vitis vinifera* L.) je plezalka in spada v družino vinovk (*Vitaceae*). Znotraj družine je približno 1000 vrst razdeljenih v 17 rodov, ki so tipično grmičevje ali olesenele ovijalke/plezalke. Vse gojene trte spadajo ali v rod *Muscadinia* ali pa v rod *Vitis*. *Vitis vinifera* L. je edina evropska predstavnica tega rodu in je danes med najpomembnejšimi gojenimi rastlinami (Markus Keller, 2010).

Vinsko trto, kot jo poznamo, so najbrž udomačili že 4000 let pr.n.št. iz divje vrste trte, *V. silvestris*, in sicer na območju od današnjega severo-vzhodnega Afganistana do juga Črnega in Kaspijskega morja. Kasnejše arheološke najdbe v Iranu pa so to obdobje premaknile še nekoliko bolj nazaj v zgodovino (5400-5000 let pr. n. št.). Najbolj zgodnji dokazi o gojenju vinske trte in uporabi grozdja segajo v zgodnjo bronasto dobo (3500 do 2300 let pr. n. št.) v dolino reke Jordan, kjer so našli dokaze o uporabi svežega grozdja, rozin, grozdnega soka in pijače iz fermentiranega grozdnega soka, vina. Od tu se je v naslednjih 2000 letih gojenje vinske trte razširjalo vzdolž starih trgovskih poti in z migracijo plemen v vzhodne, severne in zahodne dele Evrazije, vse do severne Afrike (Aradhya in sod., 2003).

Vinska trta je več letna rastlina, katere starost lahko presega več 100 let. Najstarejša slovenska trta na Lentu v Mariboru naj bi imela čez 450 let (sorta žametna črnina). Trto sestavljajo vegetativni organi (korenine, deblo, poganjki, listi in vitice) in reproduktivni organi (socvetja in jagode). Floem vinske trte se obnavlja na dve leti. Glavne faze rasti vinske trte po skali BBCH vključujejo odganjanje in razvoj brstov, razvoj listov, pojav socvetij, cvetenje, razvoj plodičev, zorenje jagod in senescenca po trgatvi (Coombe, 1995).

Danes obstaja več kot 6000 sort, pridobljenih s klonskim razmnoževanjem. Polovica od teh je belih, polovica rdečih sort grozdja. Razlika med rdečimi in belimi jagodami je v prisotnosti, oz. odsotnosti sinteze antocianov v slojih celic, ki sestavljajo kožo grozdne jagode. Pri *V. vinifera* sintezo antocianov v koži jagod nadzirata dva gena, *Vv_MYBA1* in *Vv_MYBA2* iz družine regulatorjev transkripcije MYB, ki ležita na istem lokusu. V belih sortah sta oba gena nefunkcionalna, zato je sinteza antocianov onemogočena (Walker in sod., 2007). Rezultati te študije so pokazali, da imajo vse bele sorte vinske trte skupen izvor in, da sta dve redki mutaciji na dveh blizu ležečih genih odgovorni, da lahko danes uživamo ob belem vinu in belem jedilnem grozdju.

2.2. OGLJIKOVI HIDRATI V RASTLINAH

Ogljikovi hidrati v rastlinah nastajajo v procesu fotosinteze in se nato po floemu transportirajo do porabniških tkiv. Poleg njihove vloge kot vira energije in ogrodja za izgradnjo molekul, pa v rastlinah neposredno ali posredno nadzorujejo številne procese, vključno s fotosintezo, transportom sladkorjev, vnosom dušika, obrambo rastlin, sekundarnim metabolizmom in hormonskim ravnotežjem (Smeekens in sod., 2010). Nadzor temelji predvsem na uravnavanju izražanja genov, lahko pa vplivajo tudi na stabilnost mRNA in translacijo ter stabilnost proteinov (Lecourieux in sod., 2013). Monosaharidi (glukoza, fruktoza, manoza ali galaktinol) in disaharidi (saharoza, trehaloza in analogi saharoze) lahko vplivajo na izražanje številnih genov. Med njimi so geni, ki kodirajo transporterje sladkorjev, komponente fotosistema (vezavni protein za klorofil a/b, plastocianin), encime metabolizma ogljikovih hidratov (majhno podenoto encima rubisko, α -amilazo, invertazo, saharoza sintazo in ADP-glukoza-pirofosforilazo), encime sekundarnega metabolizma (fenilalanina amonijevega liaza in drugi encimi fenil propanoidne poti) in transkripcijske dejavnike (Koch, 1996; Roitsch, 1999; Smeekens, 2000; Belhadj in sod., 2008; Agasse in sod., 2009; Smeekens in sod., 2010; Nicolas in sod., 2013; Tognetti in sod., 2013).

Saharoza je nereducirajoči disaharid iz molekule glukoze in fruktoze, ki sta povezani z α -1,2 glikozidno vezjo. Nastaja kot končni produkt fotosinteze in je pri večini rastlin glavna transportna oblika sladkorja. Saharoza se sintetizira v citosolu iz v fotosintezi vezanega ogljika, iz zaloga škroba ali iz lipidov. V sintezo saharoze so vključeni encimi saharoza fosfat sintaza (SPS), ki katalizira pretvorbo UDP-glukoze in fruktoze-6-fosfat v saharoza-6-fosfat, encim saharoza fosfataza (SPP) pa pretvori saharoza-6-fosfat v saharozo. Poleg omenjenih encimov lahko saharozo iz UDP-glukoze in fruktoze sintetizira tudi encim saharoza sintaza (SUSY), vendar pa je enim večinoma prisoten v tkivih ponora in katalizira obratno reakcijo, razgradnjo saharoze (Wind in sod., 2010). Saharoza, ki nastane v fotosintezni aktivnih tkivih se lahko transportira do drugih tkiv, shrani v vakuoli ali pa metabolizira.

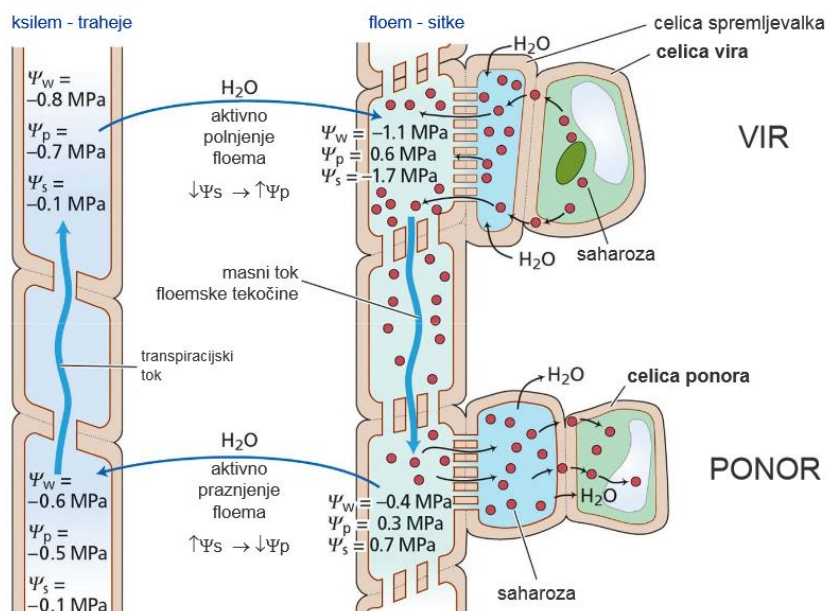
2.2.1. Floem in transport saharoze

Floem je del žilnega sistema rastlin, po katerem poteka transport fotoasimilatov od vira (fotosintezni aktivnih tkiv) do ponora (porabniška tkiva). Vsi listi začnejo svoje življenje kot ponorno tkivo, saj morajo najprej ojačati fotosintezni aparat, preden lahko tvorijo dovolj sladkorjev za svoje potrebe in za transport v druga porabniška tkiva. Prehod listov iz ponornega v izvorno tkivo je postopen. Običajno začne list izvažati asimilate ko doseže približno 1/3 končne velikosti, sprejema pa jih vse do takrat, ko doseže približno 1/2 končne velikosti. List je popolnoma izvorni, ko je na poganjku približno 5-6 od njega mlajših listov (Markus Keller, 2010).

Floem je sestavljen iz celic sitastih cevi (sitast element) in celic spremljevalk, ki so med seboj povezane s plazmodezmami. Celice sitastih cevi so relativno velike, brez jedra in vakuole ter z zmanjšanim številom Golgijevih cistern, ribosomov in elementov citoskeleta. Celice sitastih cevi se povežejo preko kompleksa por v celičnih stenah, imenovanega sitaste plošče. Celice sitastih cevi in celice spremljevalke povezujejo posebne poraste plazmodezme in tako slednje oskrbujejo in omogočajo delovanje prvih. Celice spremljevalke pa so preko plazmodezem na drugi strani povezane tudi s parenhimskimi celicami.

Floem sestavljajo tri funkcionalne enote: zbiralni floem, transportni floem in odlagalni floem. Zbiralni floem je v majhnih žilah izvornih listov in je odgovoren za vstop saharoze v listne žile. Odlagalni floem je v tkivih ponora asimilatov in iz njega saharoza izstopi v okoliško tkivo za shranjevanje, sintezo molekul ali za pretvorbo v energijo. Zbiralni in odlagalni floem sta povezana s transportnim floemom (Van Bel, 2003).

Princip transporta po floemu kot tok pod tlakom je postavil že Ernest Muench leta 1930. V floemu sok teče od mesta z visokim turgorskim tlakom do mesta z nizkim turgorskim tlakom. Saharoza vstopi v zbiralni floem in zaradi povečane koncentracije vstopi v celice sitastih cevi voda iz ksilema, kar dvigne turgorski tlak. Sok steče do ponora saj se saharoza tam odstranjuje in z njo (zaradi ozmoze) tudi voda in je turgorski tlak posledično nižji (Slika 1). Ponorna tkiva tekmujejo za asimilate tako, da znižajo tlak v celicah sitastih cevi, oziroma da znižajo koncentracijo asimilatov (osmotsko generirana razlika v tlaku) (Markus Keller, 2010).



Slika 1: Sestava floema in transport saharoze.
Figure 1: Phloem composition and sucrose transport.
 Vir: predavanje prof. dr. Dominik Vodnik

Saharoza, namenjena izvozu iz mezofilnih celic izvornih listov, potuje simplastično preko plazmodezem do parenhimskih celic floema (citoplazme vseh celic so s plazmodezmami povezane v simplast). Predpostavljeni so trije možni načini, kako se saharoza nato nalaga v zbiralni floem listov izvora. Eden od možnih načinov je simplastično nalaganje saharoze, kjer ta potuje iz parenhimskih celic floema še naprej preko plazmodezem v celice sitastih cevi zbiralnega floema. Po predpostavki, da je koncentracija saharoze znotraj floema manjših žil nižja kot v okoliških mezofilnih celicah, gre za pasivno nalaganje saharoze saj ta potuje v smeri koncentracijskega gradienta in transport ne potrebuje energije. Drugi možni način nalaganja saharoze v zbiralni floem pa je apoplastično nalaganje. Apoplast je ekstracelularni prostor zunaj simplasta, ki je obdan s plazmalemo in vključuje celično steno in medcelični prostor. Iz parenhimskih celic se saharoza najprej transportira v apoplast s pomočjo transportnih proteinov SWEET, nato pa jo celice spremljevalke importirajo s pomočjo transportnih proteinov SUC. Iz celic spremljevalk gre saharoza nato preko plazmodezem v celice sitastih cevi zbiralnega floema, od kjer se transportira do ponomnih tkiv. Zaradi izjemno velike razlike v koncentraciji saharoze med apoplastom in floemom, je za apoplastično nalaganje saharoze proti koncentracijskemu gradientu potrebna energija v obliki ATP. Kot tretji način nalaganja saharoze se omenja tako imenovano ujetje polimerov (ang. polymer trapping), kjer naj bi saharoza iz parenhimskih celic prešla v posebne celice spremljevalke preko plazmodezem, nato pa bi se sintetizirala v rafinozo ali stakihozo. Slednje postanejo prevelike za difuzijo nazaj v parenhimske celice in se transportirajo preko floemskih plazmodezem (ki so večje) v zbiralni floem in nato do ponomnih tkiv (Braun in sod., 2014). Glavni transportni sladkor pri vinski trti je saharoza, zato je zadnji način nalaganja saharoze vprašljiv (Markus Keller, 2010). Vsekakor pa je verjetno, da rastline sočasno uporabljajo več kot samo en tip nalaganja saharoze v zbiralni floem, tudi znotraj ene žile (Braun in sod., 2014).

Proteini SWEET (SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTERS) so novo identificirana družina transporterjev sladkorjev, ki omogočajo njihov prenos preko celične membrane proti koncentracijskemu gradientu v apoplast (Chen in sod., 2010, 2012). V navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) je 17 genov za proteine SWEET, pri rižu pa je 21 genov. Glede na navadni repnjakovec so pri vinski trti našli 16 homologov SWEET proteinov (Lecourieux in sod., 2013). Pri navadnem repnjakovcu so identificirali 6 proteinov *AtSWEET10* do *15*, ki transportirajo saharozo skozi plazmaleme. Od teh se dva zelo sorodna gena, *AtSWEET11* in *AtSWEET12*, preferenčno izražata v parenhimskih celicah floema. Sočasna mutacija obeh genov povzroči akumulacijo sladkorjev v listih in slabšo rast rastlin (Chen in sod., 2012).

Proteini SUC (oziroma SUT) vsebujejo 12 transmembranskih domen, ki tvorijo pore v membrani in omogočajo prenos saharoze. Gre za protonske simporterje, ki prenašajo saharozo s pomočjo energije v obliki gradienta protonov skozi membrane. Proteine SUC kodira multigenska družina in primerjave zaporedij genov za proteine SUC so razlikovale

številne klade teh proteinov. Študije so pokazale, da je izražanje proteinov SUC na plazmalemi zelo kritično pri rastlinah s prevladujočim apoplastičnim nalaganjem saharoze (povzeto po Braun in sod., 2014). Proteini SUC so na tonoplastu in so pomembni tudi pri transportu sladkorjev iz vakuole (Ludewig in Flügge, 2013). Vinska trta naj bi imela štiri transporterje saharoze SUC. Tri transporterje so klonirali iz trt sorte shiraz in cabernet sauvignon in jih določili kot protonsko odvisne transporterje saharoze: *VvSUC11*, *VvSUC12* in *VvSUC27* (povzeto po Lecourieuxv in sod., 2013). Protein SUC27 je najbolj podoben (59 %) transporterju saharoze SUC2 pri navadnem repnjakovcu in naj bi bil označevalec floema listov (povzeto po Santi in sod., 2013a).

Po vstopu saharoze v floem ta skupaj z drugimi asimilati, aminokislinami in minerali potuje do ponornih tkiv. Hitrost transporta je odvisna tako od sinteze in količine saharoze v izvornih listih kot od sposobnosti njenega odstranjevanja iz floema v ponornih tkivih. Transportni floem zaradi prisotnosti plazmodezem pušča in del asimilatov se počasi sprošča v parenhimske celice ob floemu. Od tukaj pa se lahko asimilati tudi aktivno povrnejo nazaj v floem. Ko saharoza prispe do ponornih tkiv, se transportira iz odlagalnega floema. Odlaganje saharoze lahko poteka simplastično preko plazmodezem saj je koncentracija saharoze v floemu višja kot v parenhimskih celicah ponora. Lahko pa je odlaganje tudi apoplastično s pomočjo transportnih proteinov SUT ali pa s pomočjo simporterjev proton/heksoza, ki transportirajo heksoze po hidrolizi saharoze s pomočjo invertaze celične stene (Ruan in sod., 2010). Grozdne jagode so posebno tkivo ponora, kjer najprej poteka simplastično odlaganje saharoze, ki v času zorenja (ko jagode pričnejo spreminjati barvo) preide v apoplastično odlaganje. Preskok v apoplastično odlaganje se prične, ko se v jagodah pričnejo kopičiti heksoze (Ludewig in Flügge, 2013). V posameznem celičnem organu lahko potekata sočasno oba načina odlaganja saharoze (Braun in sod., 2014).

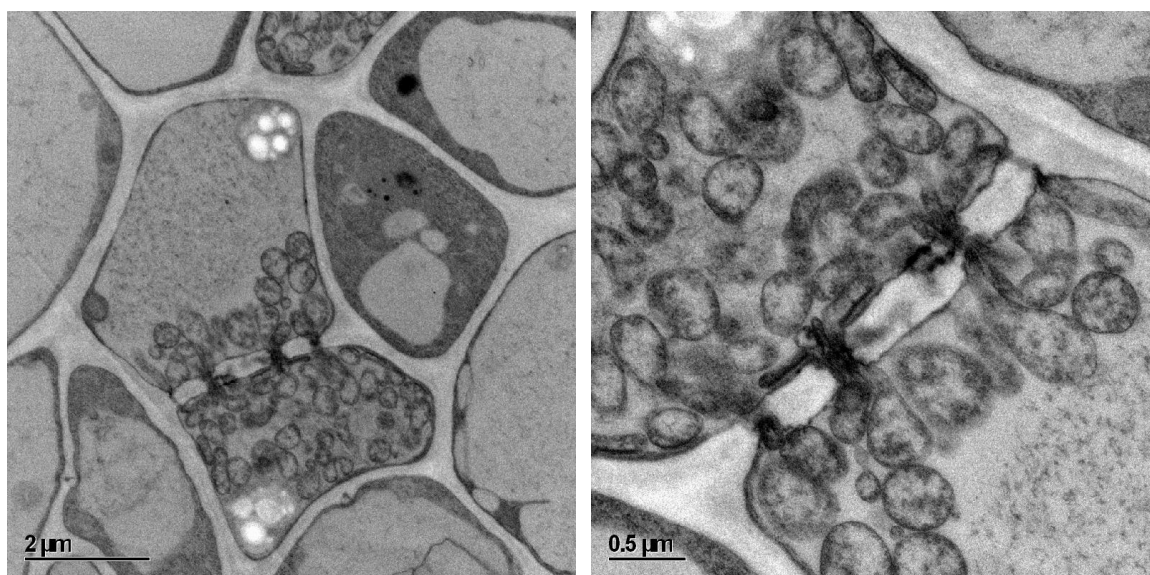
Ko saharoza prispe v celice ponora se po odlaganju iz floema s pomočjo encima invertaze (INV) hidrolizira v glukozo in fruktozo ali pa se razgradi s pomočjo encima SUSY. Encim INV je lahko na celični steni (cwINV), v vakuoli (vINV) ali pa v citosolu (nINV). Posamezne INV kodirajo različni geni. Encim nINV je prisoten v citosolu, in tudi v kloroplastih, mitohondrijih in jedru (Wang in Ruan, 2013). Encim SUSY naj bi bil biokemijski označevalec jakosti ponora (Braun in sod., 2014). Poleg celic spremljevalk so pokazali, da je encim prisoten tudi v sitastih celicah floema, kjer predvsem razgrajuje saharozo v razmerah, ko je koncentracija kisika nižja (Koch, 2004). V primerjavi z INV je razgradnja saharoze s SUSY energetske manj potratna, saj tvori že fosfatni sladkor.

2.3. FITOPLAZME

Fitoplazme so odkrili leta 1967 (Doi in sod., 1967), vendar so jih takrat imenovali mikoplazmam podobni organizmi (angl. mycoplasma like organisms – MLO). Izraz MLO

so leta 1994 spremenili v trivialno ime »fitoplazme« (IRCPM, 2004) in se uporablja kot skupen izraz za rastlinske patogene bakterije, brez celične stene iz razreda Mollicutes (Slika 2). Fitoplazme so tako po velikosti celic (premer od 200 – 800 nm), kakor tudi po velikosti njihovega genoma (530 – 1350 kbp) med najmanjšimi bakterijami.

Fitoplazme so obligatni zajedavci, katerih preživetje in pomnoževanje je odvisno od dveh zelo različnih gostiteljev – rastlin in žuželk iz reda enakokrilcev (Hemiptera). Fitoplazme v rastlinah naseljujejo skoraj izključno sitaste celice floema. Po okužbi zelnih rastlin s pomočjo žuželčjega prenašalca se fitoplazme usmerijo proti aktivno rastočim območjem v rastlini, kamor je usmerjen tudi tok hranilnih snovi in metabolitov. Sčasoma se lahko razširijo po celotni rastlini. Širjenje in končna razporeditev fitoplazem po tkivih gostitelja sta pomembni informaciji za razumevanje interakcije in igrata pomembno vlogo pri izražanju bolezenskih znamenj (povzeto po Marcone in sod., 2009). Lokacija in titer fitoplazem se pri različnih fitoplazmah in gostiteljskih rastlinah razlikujeta.



Slika 2: Elektronska mikrografija fitoplazem v sitastih ceveh floema madagaskarskega zimzelena (*Catharanthus roseus*) (Fotografiji: M. Tušek Žnidarič).

Figure 2: Electron micrography of phytoplasma in phloem sieve tube cells of periwinkle (*Catharanthus roseus*) (Photography: Magda Tušek Žnidarič).

Do danes so raziskovalci identificirali različne vrste fitoplazem v vseh družinah kritosemenk. Pri mnogih, vključno s številnimi gospodarsko pomembnimi rastlinami, povzročajo značilna bolezenska znamenja. Najpogostejša so: virescenca (zelenenje cvetov), tvorba filodijev (razvoj cvetnih delov v listom podobne organe), sterilnost, podaljšanje internodijev, spremembe na cvetovih, rumenenje ali rdečenje listov, povečana razvejanost aksilarnih poganjkov, čarovniške metle (bujna rast poganjkov iz ene točke in je

značilno za lesne rastline), vihanje listov in slabša rast rastline. Učinek fitoplazem je v splošnem na rastline zmeraj škodljiv (Choi in sod., 2004; Lee in sod., 2004a; Kakizawa, 2008), lahko pa so znamenja pri različnih negojenih rastlinah tudi prikrita in take rastline predstavljajo rezervoar okužbe za gojene rastlinske vrste.

Fitoplazme ostajajo ene izmed najslabše okarakteriziranih rastlinskih patogenov, kar je verjetno posledica nezmožnosti gojenja fitoplazem v čisti kulturi. Koncept vrste *Candidatus* so vpeljali za bakterije, ki jih ni mogoče gojiti v čisti kulturi. Predstavlja vrste, določene le na podlagi molekularnih metod, npr. na podlagi podobnosti nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNA in primerjave vzorca fragmentov s polimorfizmom dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) na 16S rRNA. Tako so trenutno fitoplazme razvrščene v 28 filogenetskih skupin (npr. 16SrI, 16SrII...) (Lee in sod., 2000; IRPCM, 2004) znotraj katerih je skoraj tridesetim fitoplazmam pripisan status *Candidatus* (Lee in sod., 1998).

Do danes so znani le štirje celotni genomi fitoplazem in sicer *Candidatus* Phytoplasma asteris (skupina 16SrI) seva OY-M (853 kb) in AY-WB (707 kb), *Ca. P. australiense* (skupina 16SrXII-B) (880 kb) in *Ca. P. mali* (skupina 16SrX-A) (602 kb) (Oshima in sod., 2004; Bai in sod., 2006; Kube in sod., 2008; Tran-Nguyen in sod., 2008). Za nekaj fitoplazem pa so na voljo osnutki celotnih genomskih zaporedij, med njimi tudi za fitoplazmo *Ca. P. solani* (BNf) (skupina 16SrXII-A) (Mitrović in sod., 2014).

Študije genoma so pokazale prisotnost številnih mobilnih genskih elementov kot so plazmidi, bakteriofagi, potencialne mobilne enote (PMU), geni za transpozaze in insercijska zaporedja (Nejat in Tan, 2014). Genomske študije so pokazale, da morajo fitoplazme od gostitelja pridobiti zelo veliko molekul, saj jim zaradi reduktivne evolucije genoma manjkajo geni za številne metabolne poti. Med drugimi nimajo genov za pentoza-fosfatni cikel in genov, povezanih s sintezo aminokislin, maščobnih kislin in nukleotidov. Fitoplazme so prvi odkriti organizmi, ki ne vsebujejo niti enega gena za katero od podenot ATP-sintaze (Oshima in sod., 2004). Manipulacija fiziologije gostiteljskih rastlin preko izločanja efektorskih molekul omogoča fitoplazmam preživetje. Efektorske molekule so odkrili s pomočjo analize zaporedij genoma in s pristopom funkcionalne genomike (Bai in sod., 2009; Hoshi in sod., 2009). Do sedaj odkriti efektorji vplivajo na spremenjeno delovanje transkripcijskih faktorjev, kar na koncu vodi do bolezenskih znamenj (Sugio in sod., 2014).

2.3.1. Fitoplazme vinske trte

Trsne rumenice (angl. grapevine yellows – GY) so izraz za skupino boleznih, ki jih povzročajo različne fitoplazme, vendar imajo enaka bolezenska znamenja. Pojav boleznih trsnih rumenic so prvič opazili na vinski trti v Franciji v petdesetih letih prejšnjega stoletja (Bonfils in Schwester, 1960). Od odkritja so o tej bolezni vinske trte poročali v Nemčiji, povsod v Franciji, Italiji, tudi v Sloveniji in nekaterih drugih evropskih državah, Izraelu,

Avstraliji in ZDA. Naravno širjenje GY je odvisno od žuželčjih prenašalcev. Žuželka lahko pridobi fitoplazmo iz alternativnega gostitelja ali okužene vinske trte, ko se hrani s floemskim sokom teh rastlin. Do okužbe pa pride, ko se taka žuželka hrani na zdravi trti. Prenos fitoplazme in z njo boleznimi trsnih rumenic je mogoč tudi s cepljenjem okuženih rozg na zdrave podlage, torej s sadilnim materialom, vendar pa je prenos zelo slab (Izsledki projekta CRP V4-1103: Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja).

V Evropi sta glavni povzročiteljici GY fitoplazma FdF, ki povzroča bolezen zlato trsno rumenico (Flavescence dorée) in spada v taksonomsko skupino 16SrV (Martini in sod., 2002; Duduk in sod., 2003; Boudon-Padieu, 2005) ter fitoplazma *Ca. P.* solani (Quaglino in sod., 2013) (v nadaljevanju BNf), ki povzroča bolezen navadno trsno rumenico (Bois noir) in spada v skupino 16SrXII-A (skupina stolbur) (Boudon-Padieu, 2005). Filogenetske študije skupine 16SrV so pokazale, da obstaja več različnih sevov FdF, ki jih razvrščamo v tri skupine. V skupini FD1 je sev FD70 prisoten v Franciji. Skupino FD2 sestavljajo sevi FD88 in FD92 iz Francije ter sev FD-D iz Italije. V skupino FD3 pa sodi sev FD-C, ki izvira iz Italije (Lee in sod., 2004b). FdF je edina fitoplazma trsnih rumenic, ki je uvrščena na IIAII listo karantenskih škodljivih organizmov Evropske skupnosti (EPPO/CABI, 2003). Fitoplazmo BNf prenaša predvsem *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Sforza in sod., 1999), kot možni prenašalec pa se je pokazal tudi *Reptalus panzeri* (Cvrković in sod., 2014). *H. obsoletus* je polifagni prenašalec in hranjenje na vinski trti pomeni zanj slepo ulico, saj na njej ne more preživeti dolgo (Lessio in sod., 2007) in je širjenje BN povezano s prenosom BNf iz plevelnih rastlin, kot so koprive in slak, na vinsko trto (Sforza in sod., 1999). Prenašalec FdF pa je monofagni ameriški škržatek (*Scaphoides titanus* Ball), ki se hrani samo z vinsko trto in širi bolezen FD med trtami. Obvladovanje boleznimi trsnih rumenic danes temelji predvsem na zatiranju in obvladovanju prisotnosti prenašalcev fitoplazemskih povzročiteljic trsnih rumenic.

2.4. INTERAKCIJA FITOPLAZEM Z RASTLINSKIMI GOSTITELJI

Zaradi narave fitoplazem so systemske študije interakcije težavne predvsem zaradi omejenih možnosti inokulacije rastlin s fitoplazmami. V primerjavi z drugimi rastlinskimi patogeni, npr. virusi, kjer je možna enostavna mehanska inokulacija rastlin, je inokulacija rastlin s fitoplazmami bolj zapletena. Največkrat se uporabljata sistema cepljenja okuženih poganjkov na zdrave poganjke in inokulacija rastlin z okuženimi žuželčjimi prenašalci. V prvem primeru rastlino zelo močno ranimo in v njej induciramo odziv na ranitev, ki lahko zamegli odziv rastline na fitoplazmo. Drugi način pa je manj nadzorovan in ima zelo slabo in nepredvidljivo učinkovitost prenosa. Posledično je težko načrtovati poskuse, kjer bi v nadzorovanih razmerah primerjali zdrave in okužene rastline. Študije interakcij fitoplazem z gospodarsko pomembnimi rastlinami tako pogosto izvajamo v obliki poljskih poskusov, ki pa nam na drugi strani omogočajo sočasno proučevanje vpliva okolja na interakcijo. Poskusi v bolj nadzorovanih pogojih, v rastnih komorah, vključujejo gostiteljsko rastlino

madagaskarski zimzelen (*Chataranthus roseus*), v kateri se fitoplazme v veliki meri namnožijo in je njihov prenos s cepljenjem uspešen.

Odziv rastlin na okužbo s fitoplazmami je razmeroma slabo raziskan. Prve študije so proučevale posamezne metabolite, predvsem sladkorje. Pri rastlinah, okuženih s fitoplazmami so histološke študije pokazale povečano nalaganje kaloze na sitastih ploščah celic sitastih cevi (Brzin in sod., 2004). Odvisno od tipa fitoplazme in občutljivosti gostitelja na okužbo, lahko celice sitastih cevi nekrotizirajo, kar inhibira transport po floemu (Catlin in sod., 1975; Braun & Sinclair, 1976; Sinclair in Braun, 1978; Kartte in Seemüller, 1991). Na modelni rastlini fižola, okuženi s FDF so pokazali, da fitoplazma vpliva na vdor kalcijevih ionov v sitaste celice floema kar privede do nalaganja kaloze (Musetti in sod., 2013). Nalaganje kaloze v celicah sitastih cevi in povečano izražanje gena za encim kalozna sintaza v listih vinske trte okužene z BNF so pokazali tudi Santi in sod. (2013). Študije na rastlinah madagaskarskega zimzelena (Lepka in sod., 1999; Choi in sod., 2004), papaje (Guthrie in sod., 2001), kokosove palme (Maust in sod., 2003), koruze (Junqueira in sod., 2004) in vinske trte (Bertamin in Nedunchezhan, 2001) so pokazale, da se v zrelih listih okuženih rastlin kopičijo sladkorji, kar je lahko posledica okrnjenega delovanja floema. Da fitoplazme vplivajo na spremenjen metabolizem ogljikovih hidratov gostiteljske rastline kažejo tudi študije interakcije paradižnika in madagaskarskega zimzelena s fitoplazmo BNF, kjer so pokazali spremenjeno encimsko delovanje različnih invertaz (Machenaud in sod., 2007). Encimsko delovanje encima saharoza sintaza se je spremenilo pri koruzi, okuženi s fitoplazmo grmičaste pritlikavosti koruze (Brzin, 2004). Transkriptomaska študija interakcije fitoplazme BNF z vinsko trto je pokazala povečano izražanje genov za encima vakuolna invertaza in saharoza sintaza v okuženih listih (Hren in sod., 2009a). Pomembnejša encima, udeleženca v modelu, naj bi bila saharoza sintaza in alkoholna dehidrogenaza I (Hren in sod., 2009b).

Spremenjen metabolizem ogljikovih hidratov s fitoplazmami okuženih rastlin je povezan s količino klorofila v listih (Musetti, 2010). Zmanjšano količino klorofila so opazili pri okuženih rastlinah vinske trte (Bertamin in Nedunchezhan, 2001), madagaskarskega zimzelena (Tan in Whitlow, 2001) in pri koruzi (Junqueira in sod., 2004). Rastline vinske trte, okužene s fitoplazmo BNF, so imele zmanjšano izražanje fotosinteznih genov (Hren in sod., 2009a), pokazali pa so tudi inhibicijo fotosistema II (Bertamini in sod., 2002b).

Fitoplazme vplivajo tudi na spremembo sekundarnih metabolitov v okuženih rastlinah. Pri vinski trti, okuženi s fitoplazmo BNF, so opazili povečano izražanje nekaterih encimov flavonoidne poti (Hren in sod., 2009a). Biokemične analize so pokazale povečano vsebnost polifenolov v okuženih rastlinah sliv, jablan (Musetti in sod., 2000) in koruze (Junqueira in sod., 2004). Študija metabolnega profila zdravih in s fitoplazmami okuženih rastlin madagaskarskega zimzelena z uporabo 1H-NMR spektroskopije je pokazala, da fitoplazme lahko povzročijo povečano vsebnost metabolitov fenilpropanoidne biosintezne poti in

terpenoid indol alkaloidov. Njihovo vlogo avtorji povezujejo z obrambnimi mehanizmi rastline proti fitoplazmi (Choi in sod., 2004).

Znano je, da se pri biotskem in abiotskem stresu inducirajo proteini povezani s patogenezo (proteini PR). Njihovo izražanje v rastlinah inducirajo tudi fitoplazme (Zhong in Shen, 2004; Hren in sod., 2009a; Albertazzi in sod., 2009; Nikolić, 2011, Margaria in Palmano, 2011; Margaria in sod., 2013).

Bolezenska znamenja, ki jih povzroča okužba s fitoplazmami kažejo na motnje v hormonalnem ravnovesju, delovanju floema in/ali spremenjeno sestavo floemskega soka (Lee in sod., 2000). Analiza genov povezanih z razraščanjem božične zvezde, ki ga povzroča fitoplazma, je pokazala možno vlogo prenašalca fosforja, ki vsebuje histidin. Encim naj bi bil povezan s histidinskimi kinaznimi receptorji rastlinskih hormonov citokininov (Sheen, 2002; Nicolaisen in Christensen, 2007).

Metabolizem ogljikovih hidratov igra pomembno vlogo tudi pri patogenosti bakterije *Spiroplasma citri*, ki tako kot fitoplazme spada v razred Mollicutes, kjer je glavna sladkorna komponenta fruktoza (Renaudin, 2006). Katera oblika sladkorja je preferenčna za fitoplazme in kakšna je vloga sladkorjev pri interakciji fitoplazem z gostitelji še ni popolnoma znano. Brzin in sod. (2011) so predlagali model patogeneze fitoplazem, kjer opisujejo kompeticijo med fitoplazmami in gostiteljem za fruktozo. Posledica naj bi bil povišan metabolizem sladkorjev, ki vodi v pomanjkanje kisika v floemu. Prav tako je pomanjkljivo znanje o biokemičnih spremembah in njihovo sosledje, ki vodi v razvoj bolezenskih znamenj. Uporaba različnih tehnik metabolomike za določanje velikega števila metabolitov (metabolnega profila) omogoča pregled nad biokemičnim stanjem rastlin (Choi in sod., 2004).

Poleg neznanih vzorcev patogeneze fitoplazem, je prav tako malo znanega o mehanizmih odpornosti, ki so vključeni v interakcije med fitoplazmo in gostiteljsko rastlino. Eden od takih mehanizmov je pojav okrevanja rastline ali spontana izguba bolezenskih znamenj v bolni rastlini. Poleg odsotnosti bolezenskih znamenj pa fitoplazem pri rastlinah v okrevanju tudi ne moremo več detektirati. Okrevanje so opazili v simptomatičnih trtah, ki so bile okužene tako s fitoplazmo FDF kot z BNF, okrevale so tudi jablane in marelice, okužene s fitoplazmami (Osler in sod., 1993; Carraro in sod., 2004; Musetti in sod., 2004). Naravno okrevanje so zasledili v različnih sortah vinske trte v različnih vinorodnih deželah (Garau in sod., 2004; Romanazzi in Murolo, 2008; Riedle-Bauer in sod., 2010). Okrevanje pa lahko tudi sprožimo z izkoreninjenjem obolele rastline in njeno presaditvijo (Osler in sod., 1993; Romanazzi in Murolo, 2008), z obsežnejšim obrezovanjem rastline (Borgo in Angelini, 2002; Zorloni in sod., 2002; Riedle-Bauer in sod., 2010) ali z eksperimentalnim škropljenjem s kemičnimi pripravki (Romanazzi in sod., 2009). Okrevanje rastlin povezujejo s kopičenjem vodikovega peroksida v rastlinah (Musetti in sod., 2004, 2007, 2011; Santi in sod., 2013b; Gambino in sod., 2013). Vodikov peroksid, skupaj s

superoksidnim in hidroksilnim radikalom, spada med reaktivne kisikove spojine (ROS), ki se v rastlinah inducirajo med biotskim in abiotskim stresom. Študije interakcij rastlin trte s fitoplazmami so pokazale spremenjeno izražanje številnih genov metabolizma ROS v okuženih in v okrevalih rastlinah (Musetti in sod., 2007; Hren in sod., 2009a; Albertazzi in sod., 2009; Gambino in sod., 2013).

2.5. ŠIRJENJE IN RAZPOREDITEV FITOPLAZEM V RASTLINAH

Pri spremljanju širjenja fitoplazme FDF po testni rastlini boba, so fitoplazmo še pred pojavom bolezenskih znamenj zaznali v koreninah, kasneje pa se je razširila po vsej rastlini in dosegla največjo koncentracijo v zgornjih delih aksilarnih poganjkov (Lherminier in sod., 1994). Kasnejša študija kinetike razmnoževanja FDF v fižolu je pokazala, da ima temperatura pomemben vpliv na razmnoževanje FDF in je le to hitrejše pri 25 °C v primerjavi z 20 °C (Salar in sod., 2012).

V Avstraliji okužujeta vinsko trto 'Ca. *Phytoplasma australiense* (CPA) in fitoplazma tomato big bud (TBB). CPA je uvrščena v taksonomsko skupino 16SrXII-B in je sorodna fitoplazmi BNf, ki je prisotna na vinski trti v Evropi in uvrščena v taksonomsko skupino 16SrXII-A. Constable in sod. (2003) so dve leti spremljali pojavljanje CPA in TBB v koreninah, deblu, kordonih in listih ter steblih poganjkov posameznih trsov. Fitoplazmi so detektirali v vseh tkivih, vendar nobeno od testiranih tkiv ni bilo pozitivno v vseh vzorčenjih v celotni sezoni in redko so bila vsa tkiva trsa enega vzorčenja pozitivna. To kaže na sistemsko, a neenakomerno razporeditev fitoplazem po rastlini. Poleti so bili simptomatični poganjki bolj zanesljiv vir detekcije fitoplazme v primerjavi z nesimptomatičnimi poganjki, pozimi in spomladi pa je bila najbolj zanesljiva detekcija v kordonih in v deblu. Najmanj zanesljiva je bila detekcija v koreninah. Razširjenost fitoplazme BNf po rastlini vinske trte sta skozi celotno rastno sezono opazovala Terlizzi in Credi (2007). Poleti je bila detekcija fitoplazme najbolj zanesljiva v listih simptomatičnih poganjkov, nasprotno pa je bila prisotnost fitoplazme BNf potrjena le v posameznih vzorcih nesimptomatičnih listov. Pozimi je bil delež pozitivnih trsov zelo majhen (19 %) in fitoplazma BNf je bila prisotna le v dormantnih poganjkih, kordonu in koreninah. V deblu fitoplazma BNf ni bila nikoli potrjena. Tudi v tej študiji noben simptomatičen trs v vseh tkivih enega vzorčenja ni bil pozitiven na prisotnost fitoplazme BNf. Da je detekcija fitoplazme BNf v koreninah trsov slaba, so pokazali tudi Škorić in sod. (1998), saj nobeden od okuženih trsov ni bil pozitiven na prisotnost BNf v tem tkivu. Od testiranih tkiv listnih žil, korenin, poganjkov in lesa pod mestom cepitve je bila prisotnost fitoplazme BNf največkrat potrjena v listnih žilah, velikokrat pa so bile določene tudi v sekundarnem floemu. Kljub temu, da so bile fitoplazme v nesimptomatičnih tkivih zaznane redkeje in manj zanesljivo kot v simptomatičnih tkivih, njihova prisotnost nakazuje, da razširjenost simptomatičnih rastlin v vinogradu ne odraža tudi dejanskega stanja prisotnosti fitoplazem in okuženosti rastlin.

Za enkrat ni znano ali so fitoplazme vinske trte prisotne tudi v cvetovih, jagodah ali viticah. Prav tako ni znano ali so morda to tkiva, v katerih se fitoplazme lahko kopičijo preden povzročijo nastanek bolezenskih znamenj. Možnost detekcije fitoplazem pred pojavom bolezenskih znamenj bi prispevala k bolj realni sliki okuženosti vinograda in k bolj učinkovitem obvladovanju bolezní.

2.6. CILJI DOKTORSKE NALOGE

- Spremljati titer fitoplazme FDF v času rastne sezone v različnih tkivih vinske trte kot so listni peclji, listne žile, listna lamina, floem enoletnega in dvoletnega lesa, vitice, cvetovi, grozdni pecelj, jagodni pecelj, cele jagode, jagodna kožica in sredica.
- Ugotoviti, kako zgodaj v rastni sezoni lahko detektiramo FDF v okuženih rastlinah in ali je možna detekcija FDF v tkivih, ki ne kažejo bolezenskih znamenj.
- Ker so znamenja bolezní posledica spremenjenega delovanja metabolizma in so tista, ki jih povzročata BNf in FDF enaka, preveriti na ravni metaboloma in na nivoju izražanja izbranih genov ali FDF sproža podoben fiziološki odziv trte kot BNf. Poleg tega smo želeli preveriti ali se spremenjen metabolizem ogljikovih hidratov okuženih rastlin odraža v spremenjeni aktivnosti izbranih encimov metabolizma ogljikovih hidratov.

2.7. DELOVNE HIPOTEZE DOKTORSKE NALOGE

- Fitoplazme so v največji meri prisotne v tkivih, kamor je usmerjen tok hranilnih snovi in metabolitov, zato predvidevamo, da je njihova koncentracija v tkivih kot so cvetovi ali grozdne jagode velika.
- Pri okužbi vinske trte s fitoplazmama FDF in BNf se spremeni metabolizem ogljikovih hidratov, kar zaznamo na ravni diferencialno izraženih genov, vključenih v ta metabolizem, kot tudi na ravni spremenjenih aktivnosti encimov, ki so povezani s tem metabolizmom, kot sta npr. ADP-glukoza-pirofosforilaza in saharoza sintaza.
- Trsi, okuženi s fitoplazmo FDF ali BNf, imajo spremenjen metabolni profil v primerjavi z neokuženimi trsi.
- V trsih, okuženih s fitoplazmo FDF, so geni, povezani s fenolnim metabolizmom, diferencialno izraženi v primerjavi z zdravimi rastlinami.

3 MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIAL VINSKE TRTE

Za raziskave smo vzorce vinske trte nabrali v treh delujočih vinogradih, iz različnih vinorodnih dežel Slovenije, z različno sorto vinske trte ter prisotnostjo različnih fitoplazem trsnih rumenic (Slika 3).

- **Vinograd v Vipolžah** (Goriška Brda, 45°58' N, 13°32' E), primorska regija, sorta charddonay, okužba s fitoplazmo *Ca. P. solani* (BNf).

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo, oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo so spremljali interakcijo rastlin vinske trte z BNf v vinogradu že od leta 2004 naprej (Nikolić, 2011). Tako smo v raziskave vključili rastline, katerih zgodovina okužbe je poznana in po potrebi vključili nekaj novih rastlin, okuženih z BNf. Na vsaki rastlini smo vzorčili ločeno dva poganjka. V rastni sezoni 2009 smo vzorčili avgusta v času bolezenskih znamenj, v sezoni 2010 pa smo vzorčili junija pred pojavom bolezenskih znamenj in avgusta.

- **Vinograd v Izoli** (Primorska, 45°31' N, 13°40' E), primorska regija, sorta refošk, okužba s FDF.

V rastni sezoni 2010 so na Nacionalnem inštitutu za biologijo v okviru strokovne naloge s področja varstva rastlin za naročnika Ministrstva za kmetijstvo in okolje, uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin potrdili prisotnost fitoplazme FDF v vinogradu. Rastline z bolezenskimi znamenji je moral lastnik vinograda sicer odstraniti, a smo se, glede na pričakovan visok infekcijski pritisk FDF, odločili spremljati vinograd tudi v sezoni 2011. Prvič smo v rastni sezoni vzorčili rastline vinske trte februarja, nato pa smo od meseca maja do avgusta vzorčili vsak mesec. Vzorčenje je v začetku rastle sezone, ko še ni bilo vidnih izrazitih bolezenskih znamenj na listih, potekalo nesistematično. Izkazalo se je, da smo v tem času vzorčili manjše število zdravih¹ rastlin kot smo pričakovali, saj so se na večini rastlin zaradi izjemno visokega infekcijskega pritiska kasneje pojavila bolezenska znamenja.

- **Vinograd v Straži** (Dolenjska, 45°47' N, 15°4' E), posavska regija, sorta modra frankinja, okužba s FDF

V vinogradu v Straži smo v sezoni 2010 izbrali eno vrsto rastlin, v kateri smo v štirih rastlinah potrdili prisotnost FDF. Preko cele vrste rastlin smo z dovoljenjem fitosanitarne uprave republike Slovenije postavili karantenski mrežnik in tako preprečili obvezno izkoreninjenje okuženih rastlin ter omogočili njihovo opazovanje v naslednjih rastleh sezonah. V sezoni 2010 smo vzorčili julija, avgusta in oktobra, v sezoni 2011 pa smo vzorčili marca in nato od maja do avgusta vsak mesec.

¹ Izraz »zdrava rastlina« pomeni v nadaljnjem besedilu rastlino, v kateri je bila količina fitoplazme FDF pod mejo detekcije z metodo PCR v realnem času. V takih rastlinah so bili lahko prisotni virusi.



Slika 3: Vinorodne dežele Slovenije (vir: <http://www.krasevka.si/ponudba/vina/>).

Figure 3: Slovenian grapevine growing regions (source: <http://www.krasevka.si/ponudba/vina/>).

Za različne raziskave smo v posameznih vinogradih vzorčili različna tkiva rastlin na različnih način (Preglednica 1). Vzorčili smo zdrave (H) in s fitoplazmami okužene rastline (I).

- Za **študijo izražanja izbranih genov** in za **metabolomiko** samo vzorčili glavne listne žile iz tretjega do petega lista s konca poganjka, ki so bili že popolnoma razviti in primerno veliki. Žile smo že na terenu s skalpelom izrezali iz listne ploskve in jih takoj zamrznili v tekočem dušiku. Za vsak vzorec smo uporabili svoj skalpel in par rokavic. Vsi vzorci trt so bili nabrani na isti dan med 10:00 in 13:00 v roku dveh ur, 1-2 m nad tlemi na osončeni strani.
- Za **določanje vsebnosti sladkorjev** in **merjenje encimskih aktivnosti** smo vzorčili cele liste v velikosti dlani, 1-2 m nad tlemi na osončeni strani. Vsi vzorci trt so bili nabrani na isti dan med 10:00 in 13:00 uro in smo jih takoj zamrznili v tekočem dušiku.
- Za **določanje titra in razširjenosti FDF po rastlini vinske trte med rastno sezono** smo vzorčili le okužene rastline. V vsakem vzorčenju smo vzorčili različna tkiva glede na njihovo razpoložljivost med sezono (Preglednica 10). Vsa tkiva ene rastline so bila v posameznem vzorčenju načeloma vzorčena iz istega poganjka in kadar je bilo mogoče smo vzorčili ločeno poganjke brez in z bolezenskimi znamenji (z izjemo julija 2010, kjer smo v vinogradu v Straži jagodna tkiva na poganjkih brez in z bolezenskimi znamenji vzorčili skupaj). FDF smo določali v listnih pecljih, glavnih treh listnih žilah, listni lamini, v floemu enoletnega in dvoletnega lesa, viticah, cvetovih, grozdnem peclju, jagodnem peclju, v celih jagodah, v jagodni kožici in sredici. Približno 10 jagod smo nabrali naključno po

izbranem jagodnem grozdu. Ločili smo jagodne peclje od celih jagod. Polovico jagod (5) je predstavljalo vzorec celih jagod, iz druge polovice pa smo naredili vzorca jagodne kožice in jagodne sredice, kjer smo slednjo preprosto iztislili iz kožice. Pri vzorčenju smo med tkivi menjali skalpele in/ali rokavice. Vsa tkiva smo na terenu spravili v hladilne torbe in jih nato do analize shranili na -80°C . Celokupno smo vzorčili in analizirali 528 tkivnih vzorcev iz vinogradov v Straži in Izoli.

Preglednica 1: Vzorčenje rastlin vinske trte tekom rastnih sezon v posameznih vinogradih

Table 1: Grapevine plants sampling during the growing seasons in individual vineyards

	BNf-Chardonay (vinograd Vipolže)	FDf-Modra frankinja (vinograd Straža)	FDf-Refošk (vinograd Izola)
Izražanje genov		2011/5-8: 6xH, 4xI	2011/5-8: 4xH, 6I
Metabolomika	2010/8: 11xH, 7xI	2010/7: 4xH, 4xI	
Sladkorji	2009/8: 4xH, 3xI 2010/6: 3xH, 4xI 2010/8: 13xH, 7xI	2010/7: 3xH, 4xI	2011/8: 3xH, 4xI
Encimska aktivnost		2010/7: 3xH, 4xI	2011/8: 3xH, 4xI
Titer in razširjenost fitoplazem		2010/7-8, 10: 4xI 2011/3, 5-8: 4xI	2011/2, 5-8: 6-10XI

V preglednici je navedeno leto in mesec vzorčenja ter število zdravih (H) in število okuženih (I) vzorčenih rastlin.

Za vsako vzorčeno rastlino v raziskavi smo preverili njeno zdravstveno stanje, to je okuženost s fitoplazmami in virusi. V ta namen smo avgusta, v času bolezenskih znamenj, dodatno vzorčili liste na poganjkih in jih spravili v hladilne torbe ter kasneje na -20°C za ELISA testiranje na prisotnost virusov in izolacijo DNA ter določanje prisotnosti fitoplazem s qPCR.

3.2. IZRAŽANJE GENOV

3.2.1. Izolacija RNA

Celokupno RNA smo izolirali s pomočjo kompleta RNeasy Plant Mini (Qiagen) z modifikacijami, ki omogočajo učinkovito izolacijo RNA iz listov vinske trte. Vzorce smo najprej v tekočem dušiku in terilnicah strli v prah. Sledila je inkubacija v pufru za lizo. Le ta vsebuje gvanidijev izotiocianat, ki de aktivira RNaze. Sledi odstranjevanje delcev na kolonah QIAshredder, obarjanje proteinov z absolutnim etanolom, reverzibilna vezava RNA na silikagelno membrano kolone RNeasy Mini, spiranje nečistoč in nazadnje raztapljanje RNA v vodi.

Opis postopka: 100-150 mg zmletega tkiva smo dodali 1 mL modificiranega pufru za lizo RLC, premešali in inkubirali 3 min pri 56°C . Pufer RLC smo pred uporabo modificirali,

tako da smo mu dodali 10 mg PVP Mw 40000 (SIGMA) za vsak mL pufra RLC ter ga segreli na 65 °C. Modifikacija se je izkazala za nujno zaradi visoke vsebnosti polifenolov v vzorcih vinske trte, ki motijo izolacijo RNA. Sledilo je centrifugiranje 1 min pri 10000 rpm (obratih na minuto), prenos supernatanta na kolono QIAshredder v dveh korakih in centrifugiranje 2 min pri 14000 rpm. Filtrat obeh centrifugiranj smo prenesli v novo 2 mL mikrocentrifugirko, dodali polovico volumna absolutnega etanola in vzorec nanesti na kolono RNeasy Mini. Po centrifugiranju 20 s pri 10000 rpm smo supernatant zavrgli. Korak smo zaradi večje količine materiala ponovili še enkrat. Po spiranju s pufroma RW1 (1x 700 µL) in RPE (2x 500 µL) smo na kolono nanesti 30 µL segrete DEPC vode in inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. RNA smo nato raztopili z 2-minutnim centrifugiranjem pri 10000 rpm. Korak smo še enkrat ponovili. Izolirano RNA smo shranili pri -80 °C.

3.2.2. Odstranitev genomske DNA

Pri izolaciji RNA se poleg RNA izolira tudi nekaj genomske DNA. Le ta lahko moti nadaljnje analize in jo je zato potrebno odstraniti. V ta namen smo uporabili encim DNazo (Invitrogen).

Na ledu smo pripravili 40 µL reakcijske mešanice (Preglednica 2).

Preglednica 2: Reakcijska mešanica za reakcijo razgradnje genomske DNA v vzorcih RNA.

Table 2: Reaction mix for the genomic DNA digestion in RNA samples

Reagent/Material	Volumen
RNA	20 µL
10x pufer	4 µL
DEPC voda	15,5 µL
DNaza I (1U/µL)	0,5 µL
Skupaj	40 µL

Reakcija razgradnje DNA je potekala pri sobni temperaturi. Po 15 min smo jo prekinili in inaktivirali encim z dodatkom 1 µL 25 mM EDTA v vsak vzorec RNA in 10-minutno inkubacijo pri 65 °C.

3.2.3. Kontrola kakovosti RNA

Količino izolirane RNA smo vzorcem izmerili z inštrumentom NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies) po navodilih proizvajalca. Za vsako analizo smo porabili 1,5 µL RNA.

Za vsak vzorec smo kakovost in količino RNA obdelano z DNazoI preverjali tudi z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1,2 % agarozni gel v pufu TAE (Preglednica 3) z 10 mg/mL etidijevega bromida – EtBr (Sigma) za vizualizacijo nukleinskih kislin. Gel smo razlili na nosilec in počakali, da se je strdil.

Preglednica 3: Sestava 50-kratnega pufra TAE.

Table 3: 50 x TAE buffer composition.

50 x TAE pufer	
Tris Base	242 g
Ledocetna kislina	57,1 mL
0,5 M EDTA (pH 8)	100 mL
bd H ₂ O	dopolnimo do končnega volumna
Skupaj	1000 mL

Mešanico RNA (2 μ L), nanašalnega pufra (6 μ L) (Preglednica 4) in vode DEPC (4 μ L) smo nanegli v jamice gela. Za kontrolo smo v prvo in zadnjo jamico na gelu nanegli 1 μ L označevalca velikosti DNA 100 bp (MBI Fermentas) zmešanega z enako količino nanašalnega pufra in vode. RNA smo ločevali 30 min pri napetosti 100 V. Uporabili smo napajalnik POWER / PAC 1000 (BIO-RAD). Po koncu ločevanja z elektroforezo smo gel slikali s sistemom GelDoc Mega (program: UVI Photo MW, Biosystematica).

Preglednica 4: Sestava nanašalnega pufra.

Table 4: Loading buffer composition.

6 x nanašalni pufer	
bromfenol modro	0,05 g
ksilen cianol FF	0,05 g
glicerol	4,76 mL
bd H ₂ O	20 mL

3.2.4. Obratno prepisovanje RNA

Z uporabo kompleta High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) smo celokupno RNA, obdelano z DNazoI, prepisali v cDNA. Uporabili smo naključne oligonukleotidne začetnike, ki omogočajo prepisovanje RNA neodvisno od nukleotidnega zaporedja matrične molekule RNA.

Na ledu smo pripravili 20 μ L reakcijske mešanice (Preglednica 5). Sledila je denaturacija RNA (5 min na 80 °C). Takoj za tem smo reakcijsko mešanico združili s 30 μ L denaturirane RNA. Reakcija RT je potekala 10 min pri 25 °C in nato 120 min pri 37 °C. Reakcijo smo izvedli v aparaturi GeneAmp® PCR System 9700HT (Applied Biosystems). Po končani inkubaciji smo dobljeno cDNA shranili pri -20 °C.

Preglednica 5: Reakcijska mešanica za reakcijo obratnega prepisovanja RNA v cDNA.

Table 5: Reaction mix for the reverse transcription RNA in to cDNA.

Reagent/Material	Volumen
DEPC voda	4,5 µL
10 x RT pufer	5 µL
25 x dNTP (4mM)	2 µL
10 x naključni heksameri (5 µM)	5 µL
Inhibitor RNase* (1U/ µL)	1 µL
Mul V transkriptaza (5U/ µL)	2,5 µL
Skupaj mešanica	20 µL
RNA (denaturirana: 5 min 80°C)	30 µL
Skupaj	50 µL

* Reagent ni vključen v komplet. Proizvajalec je Applied Biosystems.

3.2.5. Izbor genov

V predhodni raziskavi na vinski trti, okuženi s fitoplazmo BNF, je bilo z oligomikromrežami pregledano izražanje 15 000 genov (Hren, 2007). Na osnovi analize rezultatov te raziskave so bili izbrani geni iz različnih metabolnih poti, ki so bili najbolj diferencialno izraženi v zdravih in okuženih rastlinah ter natančneje analizirani z metodo PCR v realnem času (qPCR) na rastlinah trte okužene z BNF (Nikolić, 2011). Ker fitoplazmi BNF in FDF povzročata enaka bolezenska znamenja smo želeli preveriti ali povzročata tudi enak odgovor rastline na okužbo. V ta namen smo iz raziskav rastlin vinske trte okužene z BNF izbrali v testiranje gene ADP-glukoza pirofosforilazo (*VvAGPL*), Downey mildew resistant gene 6 (*VvDMR6*), protein za prenos fosfata, ki vsebuje histidin in je vključen v citokininsko signalno transdukcijo (*VvHP*), osmotinu podoben protein (*VvOLP*), askorbat peroksidazo (*VvAPX*), glutation peroksidazo (*VvGPX*), glukanazo 2 (*VvGLC2*), vakuolno kislino invertazo 2 (*VvINV2*) in gen za saharoza sintazo (*VvSUSY*) (Hren, 2007; Nikolić, 2011). Dodatno smo izbrali tudi gena za flavanon 3-hidroksilazo (*VvF3H1* in *VvF3H2*) (Gutha in sod., 2010) in gene za membranske transporterje sladkorjev (*VvSWEET1*, *VvSWEET10-15*, *VvSWEET16/17*) (Marko Chersicola, NIB).

3.2.6. Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Za spremljanje izražanja izbranih genov v vzorcih vinske trte smo izbrali metodo kvantitativnega PCR v realnem času (angl. "real-time polymerase chain reaction" ali "quantitative polymerase chain reaction", qPCR). Metoda temelji na pomnoževanju manjšega odseka cDNA z verižno reakcijo s polimerazo. Z razliko od navadne reakcije PCR zaznavamo pri qPCR nastajanje produktov med samo reakcijo pomnoževanja DNA, v realnem času. Detekcija poteka na osnovi merjenja sproščanja fluorescence, ki se med reakcijo povečuje ali zmanjšuje, odvisno od kemije reakcije. Zaradi fluorescenčnega

označevanja nastajajočih produktov PCR, je njihova količina sorazmerna izmerjeni fluorescenci. In ker fluorescenco merimo ves čas poteka reakcije, lahko izrišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov pomnoževanja amplikona. Računalniški program preračuna spremembo v signalu fluorescence (ΔR_n) po enačbi $\Delta R_n = R_{n+} - R_n$, kjer je R_{n+} fluorescenca produkta v katerikoli časovni točki med pomnoževanjem, R_n pa fluorescenca ozadja v isti časovni točki. Točko, pri kateri fluorescenca vzorca (ΔR_n) preseže fluorescentni prag, imenujemo C_q (quantification cycle). Več kot je tarčne cDNA/DNA, ki jo pomnožujemo v vzorcu, prej je presežen fluorescenčni prag pomnoževanja in nižje so vrednosti C_q .

Za zaznavanje produkta PCR se najpogosteje uporabljata dve kemiji: nespecifična fluorescenčna barvila (npr. SYBR Green), ki se neodvisno od nukleotidnega zaporedja vežejo na dvoveržno DNA (dsDNA) in ob vezavi začnejo oddajati fluorescenco. Druga kemija pa so s fluorescenčnimi barvili označene sonde ali začetni oligonukleotidi, ki se specifično vežejo na nukleotidno zaporedje tarčne DNA (najbolj znana in najpogosteje je uporabljena kemija TaqMan).

V vsakem vzorcu cDNA smo preverili izražanje vseh tarčnih genov (3.2.5, Preglednica 6) in notranjih kontrolnih genov, ki smo jih v procesu relativne kvantifikacije uporabili kot normalizatorje. Za kontrolne gene smo izbrali gen za 18S ribosomalno RNA (*18S*, Eucaryotic 18S rRNA Applied Biosystems) in gen za citokrom oksidazo (*COX*) (Weller in sod., 2000), preizkusili pa smo tudi gen za ubikvitin konjugacijski faktor (*VvUBICF*) (Castellarin in sod., 2007). Izražanje genov *VvOLP*, *VvHP*, *VvDMR6*, *VvAGPL*, *VvSWEET10-15*, *VvUBICF*, *VvF3H1* in *VvF3H2* smo v reakciji qPCR preverjali s kemijo SYBR Green, izražanje ostalih genov *18S*, *COX*, *VvSWEET1*, *VvSWEET16/17*, *VvAPX*, *VvGPX* in *VvGLC2* pa s kemijo TaqMan. Za vsak vzorec smo z amplikonom FDgen (Hren in sod., 2007) določili tudi prisotnost fitoplazme FD.

Ne glede na uporabljeno kemijo detekcije qPCR (SYBR Green, TaqMan) smo uporabljali 5 μ L reakcije, ki so vsebovale 2 μ L ustrezno razredčino cDNA in 3 μ L reakcijske mešanice. V primeru kemije SYBR Green smo uporabili Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), v primeru kemije TaqMan pa TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems). Oba reagenta vsebujeta barvilo ROX™ kot pasivno referenco, ki se uporablja za normalizacijo fluorescence reporterskega barvila SYBR Green oz. barvila sonde. Vsi oligonukleotidni začetniki so bili proizvedeni pri MWG Biotech in sonde pri Applied Biosystems. Koncentracije oligonukleotidnih začetnikov so bile v primeru kemije SYBR 300 nM, v primeru kemije TaqMan pa 900 nM, sonde pa 250 nM.

Preglednica 6: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov in sond uporabljenih za pomnoževanje PCR v realnem času.

Table 6: Primer pair / probe characteristics for real-time PCR amplification.

Gen	Orientacija oliga	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Končna koncentracija (nM)	Referenca
<i>VvSWEET1*</i>	Začetni	ATACTGTACGCCATCTACTGCAAAA	900	Marko Chersicola (NIB)
	Končni	CATGTCCACCGGCTTGCT	900	
	Sonda	FAM CAGCGCCAGATTC 5 NFQ	250	
<i>VvSWEET10-15</i>	Začetni	TATCTGCGGATTCGGTTCCA	300	Marko Chersicola (NIB)
	Končni	ACGCTTAGCGAGAACACGAGAC	300	
<i>VvSWEET16/17*</i>	Začetni	CCTCATATACGCACCGGCAAAA	900	Marko Chersicola (NIB)
	Končni	GCTAGAAAACCCACATCCAAGAG	900	
	Sonda	FAMCAGAGCGACGGTTTTG 5NFQ	250	
<i>VvSUSY</i>	Začetni	TGTTAAGGCTCCTGGATTCAATTA	900	Hren, 2007
	Končni	AGCCAAATCTTGGCAAGCA	900	
<i>VvAGPL</i>	Začetni	GAGTGTAAGTTTGGGAAGACGATG	300	Nikolić, 2011
	Končni	ACAGGACAGATAACCACTGC	300	
<i>VvHP</i>	Začetni	AGCAACAAATTTTGGCAGC	300	Nikolić, 2011
	Končni	GCCATTTGCTCTCTTGCTC	300	
<i>VvDMR6</i>	Začetni	GCAGGCTCTATGGTTTTTCC	300	Nikolić, 2011
	Končni	GCTTCATCTTCTCCTCCACC	300	
<i>VvINV2</i>	Začetni	CCAACCAAGGCGATCTATG	900	Nikolić, 2011
	Končni	TTGAGGCAGTGATGCTGG	900	
	Sonda	AGCTCAGCTCTATGTCTTCAACAATGCTAC	100	
<i>VvOLP</i>	Začetni	TCGCCAGTCTAACTACTAGG	300	Nikolić, 2011
	Končni	CGTAGAAAAGTTGTTGCATGAG	300	
<i>VvGLC2</i>	Začetni	CCATCATCAGCTTCCTGGTCAAAA	900	Nikolić, 2011
	Končni	GTCCCGGGTGTACCAATGTA	900	
	Sonda	CCCCTGCTTGTTAAC	250	
<i>VvAPX</i>	Začetni	TCGAAGATTTCAAGAATGCCTACATCA	900	Nikolić, 2011
	Končni	CTGTTGAAACGTTGTTGTTTCAGGAAT	900	
	Sonda	TTGCACCAGAATTCAC	250	
<i>VvGPX</i>	Začetni	CGTGTAATGGCCCTGATGCT	900	Nikolić, 2011
	Končni	CCAAGAAATCCACTTTGTGTGCTT	900	
	Sonda	CCAGTCTACAAATTC	250	
<i>VvF3H1</i>	Začetni	CCAATCATAGCAGACTGTCC	300	Gutha <i>in sod.</i> , 2010
	Končni	TCAGAGGATACACGGTTGCC	300	
<i>VvF3H2</i>	Začetni	CTGTGGTGAACCTCCGACTGC	300	Gutha <i>in sod.</i> , 2010
	Končni	CAAATGTTATGGGCTCCTCC	300	

* – proizvajalec in oblikovalec oligov in sond – Applied Biosystems

qPCR smo izvedli na inštrumentu ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Vse reakcije smo izvedli v optičnih ploščicah formata 384 (384 Well Clear Optical Reaction Plates, Applied Biosystems) prekritimi z optičnimi adhezivnimi folijami (Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems) pri univerzalnih razmerah: 2 minuti pri 50 °C in 10 minut pri 95 °C (aktivacija polimeraze) ter nato 40 ciklov pri pogojih: 10 sekund pri 95 °C in 1 minuta pri 60 °C. V primeru SYBR Green kemije smo na koncu reakcije dodali še korak za analizo disociacijske krivulje: 15 s pri 95 °C, 15 s pri 60 °C in 15 s pri 95 °C, da bi preverili specifičnost nastalih produktov ter morebitno pojavljanje dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Vsak vzorec cDNA smo za vsak amplikon testirali v dveh razredčinah in dveh ponovitvah (štiri reakcije pomnoževanja). Za namen relativne kvantifikacije smo pripravili serijo desetkratnih in/ali petkratnih razredčin izbranega standardnega vzorca in jih nanесли na vsako ploščico za vsak amplikon. Standardni vzorec je bil sestavljen iz enakovrednih delov vseh vzorcev cDNA.

Začetno analizo podatkov PCR v realnem času smo izvedli v programu ViiA™ 7 RUO Software v1.2.2 (Applied Biosystems). Za nastavitev bazne linije (vrednost cikla pred dvigom fluorescence nad vrednost ozadja) in za določitev fluorescenčnega praga (intenziteta fluorescence, ki je značilno višja od ozadja) smo izbrali avtomatsko opcijo. Za vsak amplikon smo preverili ali je fluorescenčni prag postavljen v eksponentnem delu krivulje pomnoževanja. Vrednosti Cq smo iz programa ViiA™ 7 RUO Software v1.2.2 (Applied Biosystems) izvozili v program Microsoft Excel, kjer smo izvedli nadaljnjo obdelavo podatkov.

3.2.6.1. Relativna kvantifikacija

V procesu relativne kvantifikacije smo z uporabo programa NormFinder (dodatek za Excel, (Andersen in sod., 2004)) najprej preverili stabilnost izražanja kontrolnih genov *18S*, *COX* in *UBICF*.

Uporabili smo metodo relativne kvantifikacije z uporabo standardne umeritvene krivulje. Za vsak amplikon kontrolnega gena smo iz serije razredčin standardnega vzorca izrisali umeritvene krivulje in sicer smo nanесли vrednosti Cq v odvisnosti od log₁₀ količine kontrolne cDNA. Za to ne potrebujemo absolutne začetne količine kontrolne cDNA v standardnem vzorcu, ampak lahko izberemo arbitrarne količine, pomembno je le, da se začetna količina kontrolne cDNA med redčenji zmanjšuje s faktorjem redčitve. Določili smo učinkovitost pomnoževanja (enačba 1) in naklon premice pomnoževanja. Slednjo smo določili tudi za posamezen vzorec cDNA (iz dveh razredčin).

$$E = 10^{(1/naklon)} \quad \dots(1)$$

Iz enačbe premice umeritvene krivulje in izmerjene vrednosti C_q v posamezni reakciji vzorca (2 razredčini po 2 paralelki) smo določili relativno število kopij kontrolne cDNA za posamezno razredčino vzorca (naredili smo povprečje obeh paralelek). Po enačbah 2 in 3 smo na koncu za posamezno razredčino vsakega vzorca določili referenčno število kopij, kjer je povprečno število kopij *18S* in *COX* povprečje relativnega števila kopij posamezne kontrolne cDNA vseh vzorcev.

$$\text{relativnošt.kopij18S(norm)} = \frac{\text{relativnošt.kopij18S} * \text{povprecnošt.kopijCOX}}{\text{povprecnošt.kopij18S}} \dots(2)$$

$$\text{ref.št.kopij} = \frac{\text{relativnošt.kopij18S(norm)} + \text{relativnošt.kopijCOX}}{2} \dots(3)$$

Za vsak amplikon tarčnega gena smo za posamezno razredčino vsakega vzorca določili relativno količino tarčne cDNA na enak način kot smo to določili za prej opisane kontrolne gene. Relativno število kopij tarčne cDNA za posamezno razredčino vzorca smo nato normalizirali, tako, da smo vrednost delili z referenčnim številom kopij ustreznega vzorca. Iz povprečja normaliziranih vrednosti dveh razredčin posameznega vzorca smo dobili tako imenovano normalizirano relativno število kopij tarčne cDNA v vzorcu.

Pri kvantifikaciji smo upoštevali naslednje kriterije:

- Za vsak amplikon razlika v vrednosti C_q med paralelkami posamezne razredčine cDNA vzorca ne sme biti večja od 0,5 oziroma mora biti naklon premice pomnoževanja iz treh reakcij od štirih v mejah od -2,8 do -4,2.
- Za posamezen amplikon razlika v naklonu premic med umeritveno krivuljo in vzorcem ne sme biti večja od 0,6.
- Za vsak amplikon smo s pomočjo umeritvene krivulje določili tudi limito kvantifikacije (LOQ). LOQ predstavlja vrednost C_q višje razredčine, kjer je učinkovitost pomnoževanja med zaporednima razredčinama med 2,28 in 1,73. Idealna 100 % učinkovitost pomnoževanja predstavlja E vrednost 2.
- Kadar so vrednosti C_q nižje razredčine nad LOQ in paralelke ustrezne, vrednosti C_q višje razredčine pa so pod LOQ, upoštevamo rezultat samo nižje razredčine.
- Kadar so vrednosti C_q obeh razredčin pod LOQ uporabimo relativno število kopij tarčne cDNA za vzorec iz umeritvene krivulje in sicer uporabimo vrednost, ki je ena pod LOQ, in jo delimo z referenčnim številom kopij vzorca.

3.2.6.2. Statistična analiza podatkov

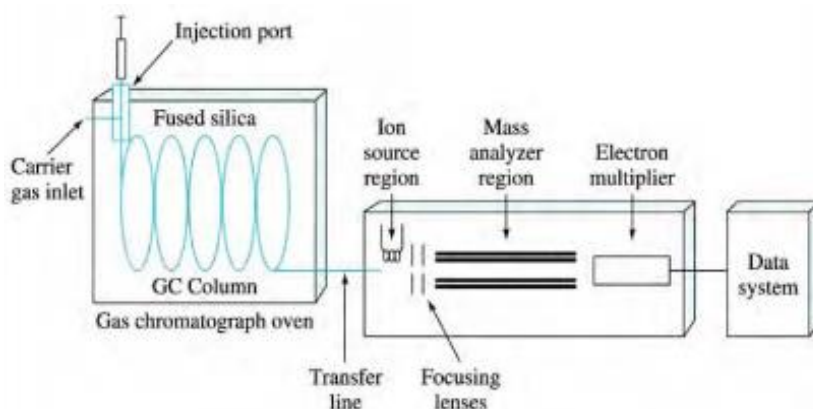
Z ne parametričnim statističnim testom Mann-Whitney smo izračunali ali so bile razlike v relativnem izražanju posameznega gena med zdravimi in okuženimi vzorci v posamezni časovni točki (za posamezno sorto vinske trte) statistično značilne ($p < 0.05$).

Podatke relativne kvantifikacije smo analizirali z metodo dvosmerna ANOVA (two-way ANOVA), kjer smo ugotavljali ali je izražanje genov odvisno od dveh dejavnikov, okužbe s FDF in časa ter ali obstaja interakcija med obema dejavnikoma, ki vpliva na izražanje genov. Pred obdelavo podatkov (normalizirana relativna števila kopij tarčnih cDNA v posameznih vzorcih) smo vrednosti transformirali z \log_2 , da smo se približali normalni porazdelitvi. Analizo dvosmerne ANOVA smo izvedli v programu OriginPro8 (OriginLab Corporation), kjer smo uporabili test Tukey in mejo signifikantnosti 0,05. Pri analizi vpliva dejavnika časa smo primerjali izražanje posameznega gena v vseh rastlinah (zdrave in s FDF okužene) med posameznimi časovnimi točkami. Pri analizi vpliva dejavnika okužbe pa smo primerjali zdrave rastline s FDF okuženimi rastlinami iz vseh časovnih točk skupaj.

Podatke relativne kvantifikacije smo analizirali tudi z metodo glavnih komponent (ang. principal component analysis – PCA). Namen metode glavnih komponent je opisati dani sistem z manjšim številom spremenljivk (s faktorji oz. glavnimi komponentami oz. eigen vektorji), ki so linearne kombinacije izvornih spremenljivk. Tako znižamo dimenzionalnost podatkov, hkrati pa ohranimo čim večjo količino informacij iz izhodnih podatkov. Prva glavna komponenta - PC1 vsebuje največ variabilnosti, druga glavna komponenta - PC2, ki je pravokotna na PC1, nekoliko manj, tretja in naslednje komponente še manj. Tako vse podatke reduciramo v manj-dimenzionalni prostor in pri tem izgubimo le malo informacij. Ugotavljali smo ali lahko ločimo zdrave rastline od okuženih na podlagi rezultatov izražanja izbranih genov (spremenljivk). PCA analizo smo izvedli z uporabo programa XLSTAT (Addinsoft), ki je dodatek za program Excel. Pred analizo smo podatke transformirali z \log_2 .

3.3. METABOLOMIKA

Za analizo metaboloma vinske trte smo uporabili tehniko GC-MS, ki je kombinacija dveh analiznih tehnik. Molekule v vzorcu se s pomočjo plinske kromatografije (GC) ločijo po času, masni spektrometer (MS) pa prispeva informacijo o masi, ki nam pomaga pri strukturalni identifikaciji molekul oz. komponent (Slika 4). Metoda je omejena na analite, ki so hlapni oziroma jih lahko z derivatizacijo pretvorimo v hlapne.



Slika 4: Shematski prikaz GC-MS.
Figure 4: The block diagram of a typical GC-MS.

Ko vzorec potuje skozi kromatografsko kolono, se molekule zaradi svojih kemijskih lastnosti in različne afinitete za stacionarno fazo kolone med seboj ločijo. Masni spektrometer, postavljen za kolono molekule ionizira, pospeši in loči glede na njihovo razmerje mase z nabojem (m/z).

Pri GC-MS sta v uporabi predvsem dva načina ionizacije, ionizacija s trkom elektronov (angl. "electron impact", EI) in kemijska ionizacija (angl. "chemical ionisation", CI). Pri EI z elektroni obstreljujemo preiskovane molekule, ki pri tem na ponovljiv način razpadejo na specifične pozitivno nabite fragmente. Molekule tvorijo unikatne vzorce fragmentacije, katere skupaj z njihovimi retencijskimi časi (t_r čas od injiciranja do detekcije) omogočajo kvalitativno in kvantitativno identifikacijo.

Za ločevanje ionov glede na njihovo razmerje mase z nabojem (m/z) je na voljo več masnih analizatorjev med katerimi so pogosto uporabljeni kvadrupolni. Kvadrupol sestavljajo štiri vzporedne kovinske cevi, ki ustvarijo električno polje, v katerem potujejo ionizirani fragmenti. Pri določeni električni napetosti dosežejo detektor samo ioni z določenim m/z . Kvadrupol deluje kot filter za določene ione, pri katerem lahko z zveznim spreminjanjem napetosti pregledamo celotno območje m/z vrednosti.

3.3.1. Ekstrakcija polarnih metabolitov

Vzorci smo v sterilnih posodah v tekočem dušiku strli v prah. 80 mg tkiva smo dodali 1 mL MCW mešanice (mešanica vode, metanola in kloroforma v razmerju 5:2:1), premešali in inkubirali 8 minut na ledu. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 4 minute pri 4 °C in 14000 g. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dodali 500 µL vode. Ponovno smo premešali in centrifugirali 2 minuti pri 4 °C in 14000 g. Po 500 µL zgornje faze vzorca (spodaj ostane kloroform) smo prenesli v dve sveži mikrocentrifugirki. Vzorce smo posušili na evaporatorju (EZ-2PLUS, GeneVac) in jih do nadaljnjega shranili na -80 °C.

Pred derivatizacijo smo vzorcem dodali 5 µL standarda ¹³C-sorbitol (0,1 g/L) (Sigma-Aldrich, ZDA) in jih ponovno posušili na evaporatorju.

3.3.2. Derivatizacija

Komponente v vzorcu smo z derivatizacijo kemijsko spremenili v nove komponente z večjo hlapnostjo primerno za analizo z GC-MS. Z derivatizacijo smo zmanjšali kompleksnost sladkorjev, stabilizirali karbonilne skupine in zmanjšali polarnost polarnih skupin (amino-, karbonil-, karbosksil-,...) in tako povečali njihovo hlapnost.

Vzorci smo najprej termostatirali na sobno temperaturo. Sledila je metoksiaminacija, kjer smo vzorce raztopili v 20 µL 40 % metoksiaminhidroklorida (Sigma-Aldrich, ZDA) (w/v) raztopljenega v piridinu. Mešanico smo inkubirali 90 minut pri 30 °C. Po inkubaciji je sledila silylacija, kjer smo vzorcem dodali 80 µL reagenta MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide; Sigma-Aldrich, ZDA) in inkubirali mešanico 30 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali na sobni temperaturi 2 minuti pri 14000 g. 50 µL supernatanta smo prenesli v GC-mikroviale in jih pokrili s pokrovčki (crimp caps).

3.3.3. Analiza vzorcev z GC-MS

Analizo vzorcev smo izvedli kot opisujejo Mari in sod. (2013). Uporabili smo plinski kromatograf TRACE™ Ultra Gas Chromatograph (Thermo Scientific, ZDA) sklopljen z masnim spektrometrom TSQ Quantum GC™ (Thermo Scientific, ZDA). S pomočjo avtomatskega injektorja smo injicirali 1 µL derivatiziranega vzorca v injektor pri konstantni temperaturi 230 °C v načinu "split" z razmerjem 10:1. Nekatere derivatizirane vzorce smo poleg injiciranja split 10 najprej redčili 1:10 in nato injicirali 1 µL pri konstantni temperaturi 230 °C v načinu "split" z razmerjem 50:1. Separacija je potekala na kapilarni koloni HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) pri konstantnem pretoku He 1 mL/min. Uporabili smo naslednji temperaturni program: začetno temperaturo pri 70 °C smo držali 1 min, sledilo je prvo segrevanje na

temperaturo 76 °C s hitrostjo 1 °C/min in nato drugo segrevanje na temperaturo 350 °C s hitrostjo 6 °C/min. Končno temperaturo smo držali 1 min. Temperatura povezovalne linije (transfer line) je bila 340 °C, temperatura po končani analizi je bila nastavljena na 325 °C za 10 minut. Masni analizator je deloval v načinu »full scan«, v območju m/z 40-800 in s hitrostjo zajemanja podatkov 4 posnetke na sekundo. Način ionizacije je bil EI pri 70 eV, temperatura izvora ionov pa je bila nastavljena na 250 °C.

3.3.4. Obdelava GC-MS podatkov

Rezultat GC-MS analize so kromatogram polnega ionskega toka (angl. "total ion current chromatogram", TIC) in masni spektri posneti za vsako točko na kromatogramu. Kromatogram TIC kaže vsoto intenzitete ionskega toka vseh ionov v odvisnosti od retencijskega časa. Komponente, ki jih predstavljajo ločeni kromatografski vrhovi, lahko identificiramo na podlagi masnih spektrov. Za identifikacijo kromatografskih vrhov se uporabljajo avtentični standardi ter knjižnice masnih spektrov.

Za analizo podatkov GC-MS smo uporabili tri programe: AMDIS (Stein, 1999), LCQuan (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, ZDA). S pomočjo programa AMDIS smo izvedli dekonvolucijo (ločevanje komponent, ki se istočasno eluirajo, imajo enak retencijski čas). Z uporabo programov AMDIS in Xcalibur smo nato posamezne vrhove identificirali s pomočjo knjižnic NIST (ZDA), Golm Metabolite Database (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) in interne knjižnice oddelka Mosys (fakulteta za življenjske vede na Dunaju). Posamezen derivat metabolita (komponenta) je bil opredeljen kot identificiran, če je imel faktor zadetka spektra v knjižnici večji od 800 in njegov retencijski indeks ni odstopal za več kot 20 na začetku kromatograma oz. 50 na koncu kromatograma. Retencijski indeks (RI), predstavlja standardizirano vrednost t_R določene spojine izračunane na podlagi t_R n-alkanov ločenih na isti koloni (kalibracija z retencijskim indeksom).

Kvantifikacija je potekala v programu LCQuan, kjer smo za vsak poskus (Preglednica 1) postavili metodo za vse komponente (kromatografske vrhove) detektirane v programu AMDIS. Za vsako komponento smo definirali naslednje parametre:

- kvantitativni ion (quant ion) oziroma vrednost m/z, ki je značilna za določeno komponento. Preferenčno smo izbrali takega, ki ni prisoten v sosednjih vrhovih in ga ni v prebitku)
- retencijski čas in časovno okno, znotraj katerega se mora komponenta nahajati
- minimalno razmerje med signalom in šumom (S/N 50 za vse komponente)
- ICIS algoritem za integracijo vrhov
- Kalibracija glede na interni standard ^{13}C -sorbitol

Avtomatično prepoznavo in integracijo vrhov za vsako komponento smo v vseh vzorcih znotraj poskusa tudi ročno pregledali in popravili neskladnosti.

Definirali smo metodo za kvantifikacijo vrha internega standarda (ISTD, ^{13}C -sorbitol) in površini pod krivuljo (AUC) za ISTD pripisali vrednost 1. Za posamezno komponento smo iz površine pod vrhom s pomočjo programa izračunali faktor odziva (response ratio) po formuli: Faktor odziva = AUC(komponente)/AUC(ISTD).

Za vsak vzorec smo faktor odziva posamezne komponente normalizirali tako, da smo ga delili s povprečnim faktorjem odziva te komponente v vseh vzorcih. Na koncu smo tako normalizirane vrednosti posameznih komponent primerjali med vzorci znotraj poskusa.

Pri enakih metabolitih, ki so se pojavili v več vrhovih, smo izbrali le enega, pri metabolitih z različno obsežno derivatizacijo (različno število TMS (tri-metil-silil) skupin vezanih na molekulo) pa smo le te med seboj sešteli.

3.3.5. Statistična analiza podatkov

S studentovim t-testom smo izračunali ali so bile razlike v vrednosti posameznega analita med zdravimi in okuženimi vzorci (za posamezno sorto vinske trte) statistično značilne ($p < 0.05$).

Podatke relativne kvantifikacije smo analizirali tudi z metodo glavnih komponent (PCA), kot opisano v poglavju 3.2.6.2. Ugotavljali smo ali lahko ločimo zdrave rastline od okuženih na podlagi rezultatov prisotnosti/količini metabolitov (spremenljivk). PCA analizo smo izvedli z uporabo programa XLSTAT (Addinsoft), ki je dodatek za program Excel.

3.4. DOLOČANJE VSEBNOSTI OGLJIKOVIIH HIDRATOV

3.4.1. Določanje topnih sladkorjev

Vzorci listov smo v terilnicah s tekočim dušikom strli v prah. Topne sladkorje smo ekstrahirali s pomočjo mešanice MCW. 100 mg vzorca prahu smo dodali 500 μL MCW mešanice, premešali in inkubirali 8 minut na ledu. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 4 minute pri 4 $^{\circ}\text{C}$ in 14000 g. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dodali 250 μL vode. Ponovno smo premešali in centrifugirali 2 minute pri 4 $^{\circ}\text{C}$ in 14000 g. Zgornjo polarno fazo vzorca smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in v njej določili vsebnost sladkorjev glukoze, fruktoze in saharoze s pomočjo komercialnega kompleta K-SUFRG (Megazyme International, Irska). Delovanje kita temelji na sklopljenih encimskih reakcijah, kjer pri pretvorbi sladkorjev s pomočjo encimov β -fruktozidaze, heksokinaze (HK), glukoza6fosfat-dehidrogenaze (G6P-DH), fosfoglukoizomeraze (PGI) in nastaja NADPH. Količino nastalega NADPH, ki je sorazmerna začetni količini sladkorja,

določamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 340 nm. Encimske reakcije smo izvedli pri sobni temperaturi v kivetah po protokolu kompleta, kjer smo za vsak vzorec pripravili dve reakcijski mešanici, eno za saharozo in eno za glukozo in fruktozo (Preglednica 7). Za vsako serijo meritev smo za vsak merjeni sladkor izvedli tudi slepo reakcijo, brez vzorca ter reakcijo s standardno količino sladkorja. Meritve absorbance so bile narejene na spektrofotometru Shimadzu UV-1800.

Preglednica 7: Reakcijske mešanice za določanje glukoze, fruktoze in saharoze s SUFRG kitom.

Table 7: Reaction mixes for glucose, fructose and sucrose determination with SUFRG kit.

	Glukoza/Fruktoza (G/F)	Saharoza (S)
β-fructozidaza	/	100 μL
vzorec	20 μL	20 μL
premešaj in inkubiraj 5 minut		
dH₂O	1080 μL	980 μL
Imidazolni puffer	50 μL	50 μL
NADP+ ATP	50 μL	50 μL
	odčitaj absorbanco A1 po 3 minutah	odčitaj absorbanco A4 po 3 minutah
HK/G6P-DH	10 μL	10 μL
	odčitaj absorbanco A2 po 5 minutah	odčitaj absorbanco A5 po 5 minutah
PGI	10 μL	
	odčitaj absorbanco A3 po 10 minutah	

Koncentracijo sladkorjev smo izračunali kot mg/g sveže teže po naslednjih enačbah:

$$Glukoza = \frac{V_k * M_w(glu) * ((A_2 - A_1)vzorca - (A_2 - A_1)slepa)}{\epsilon * d * V_v * F_w} \quad \dots(4)$$

$$Fruktoza = \frac{V_k * M_w(fru) * ((A_3 - A_2)vzorca - (A_3 - A_2)slepa)}{\epsilon * d * V_v * F_w} \quad \dots(5)$$

$$Saharoza = \frac{V_k * M_w(sah) * (((A_5 - A_4)vzorca - (A_5 - A_4)slepa) - ((A_2 - A_1)vzorca - (A_2 - A_1)slepa))}{\epsilon * d * V_v * F_w} \quad \dots(6)$$

kjer je V_k končni volumen reakcije v kiveti, V_v volumen dodanega vzorca, ϵ ekstinkcijski koeficient NADPH pri 340 nm, d dolžina svetlobne poti, $M_w(glu)$ molska masa glukoze, $M_w(fru)$ molska masa fruktoze, $M_w(sah)$ molska masa saharoze, F_w sveža teža in A_1 - A_5

meritve absorbance (Preglednica 7). Rezultat vzorca predstavlja povprečje treh ponovitev ekstrakcije vzorca.

S studentovim *t*-testom (dvostranski *t*-test ob predpostavki enake variance v obeh skupinah) smo izračunali ali so bile razlike v vsebnosti sladkorjev med zdravimi in okuženimi vzorci (za posamezno sorto vinske trte) statistično značilne ($p < 0.05$).

3.4.2. Določanje škroba

Vzorci listov smo v terilnicah s tekočim dušikom strli v prah. Škrob smo določali s pomočjo komercialno dostopnega kompleta K-TSTA (Megazyme International, Irska) po navodilih proizvajalca. Komplet temelji na uporabi encima termo stabilne α -amilaze, ki razgradi škrob v maltodekstrine in encima amiloglukozidaze, ki maltodekstrine pretvori v D-glukozo. D-glukozo z encimom glukoza oksidaza nato pretvorimo v D-glukonat in vodikov peroksid. Količino slednjega kvantitativno določamo v kolorimetrični reakciji s pomočjo encima peroksidaza in nastajanja kinoniminskega barvila.

Vzorci smo najprej sprali z etanolom, da smo odstranili topne sladkorje (glukozo, fruktozo, maltodekstrine). In sicer smo 100 mg vzorca prahu dodali 5 mL 80 % etanola, premešali in inkubirali 5 minut na 80-85 °C. Po končani inkubaciji smo premešali in dodali še 5 mL 80 % etanola. Vzorci smo centrifugirali 10 min pri 18000 g. Supernatant smo odlili, oborini dodali 10 mL 80 % etanola ter premešali in centrifugirali 10 minut pri 18000 g. Ponovno smo previdno odlili stran supernatant, oborini pa smo dodali 3 mL raztopine termo stabilne α -amilaze. Sledila je 10 minutna inkubacija v vreli vodi. Med inkubacijo smo občasno premešali vzorce. Po inkubaciji smo vzorce ohladili v vodni kopeli na 50 °C ter jim dodali 4 mL 200 mM natrij acetatnega pufra (pH 4,5) in 100 μ L encima amiloglukozidaze. Vzorci smo premešali in inkubirali 30 minut v vodni kopeli na 50 °C. Po inkubaciji smo s pomočjo merilnih bučk volumen vzorcev dopolnili z vodo na 10 mL. Vzorci smo prenesli v sveže centrifugirke in jih centrifugirali 10 minut na 1800 g. V dveh paralelkah smo 100 μ L raztopine vzorca prenesli v epruveto in dodali 3 mL reagenta GOPOD ter premešali. Pripravili smo tudi 100 μ L standardne raztopine glukoze in 100 μ L slepega vzorca vode ter jima dodali po 3 mL reagenta GOPOG. Reakcijske mešanice smo inkubirali 20 minut v vodni kopeli na 50 °C da se je razvila barva. Po končani inkubaciji smo v kivetah s pomočjo spektrofotometra Shimadzu UV-1800 pri valovni dolžini 510 nm izmerili absorbanco vzorcev proti slepemu vzorcu.

Koncentracijo škroba smo izračunali kot mg/g sveže teže po naslednji enačbi:

$$\text{Škrob} = \frac{A * F * (10\text{mL} / 0,1\text{mL}) * (162 / 180)}{F_w} \quad \dots(7)$$

kjer je A absorbanca vzorca, Fw sveža teža vzorca, F predstavlja 100 µg glukoze/absorbanca standarda, 162/180 predstavlja prilagoditev iz proste D-glukoze v anhidrid glukoze, kot se pojavlja v škrobu. Rezultat vzorcev predstavlja povprečje dveh ali treh ponovitev ekstrakcije vzorca.

S studentovim t-testom (dvostranski *t*-test ob predpostavki enake variance v obeh skupinah) smo izračunali ali so bile razlike v vsebnosti škroba med zdravimi in okuženimi vzorci (za posamezno sorto vinske trte) statistično značilne ($p < 0.05$).

3.5. AKTIVNOST ENCIMOV METABOLIZMA OGLJIKOVIH HIDRATOV

V vzorcih celih listov smo določali aktivnost encimov saharoza-sintaza (SuSy) in ADP-glukoza-pirofosforilaza (AGPaza). Uporabili smo kontinuirno metodo, kjer smo spremljali nastajanje produkta skozi čas. Pri obeh encimskih testih (SuSy in AGPaza) smo s pomočjo pomožnih encimov, dodanih v reakcijske mešanice, spremljali nastajanje produkta preko redukcije NAD⁺ v NADH, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 340 nm (Slika 5, Slika 6). Encimske teste za uporabo na vinski trti je razvila dr. Elizabeth Covington v laboratoriju NIB (delo v pripravi za objavo).

3.5.1. Ekstrakcija encimov

Vzorci listov smo v terilnicah s tekočim dušikom strli v prah. V centrifugirko smo natehtali 500 mg vzorca prahu, dodali 3 mL ekstrakcijskega pufra in premešali z obračanjem. Sledila je inkubacija 10 minut na ledu, med katero smo vzorec občasno premešali z obračanjem centrifugirke. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 10 minut pri 13000 rpm in 4 °C. Supernatant smo prenesli v ohlajene sveže mikrocentrifugirke in ponovno centrifugirali 3 minute pri enakih razmerah. Supernatant, ki predstavlja grobi ekstrakt (G-ekstrakt), smo prenesli v ohlajene sveže mikrocentrifugirke. 1 mL G-ekstrakta smo v nadaljevanju očistili nečistoč z razsoljevanjem na PD Mditrap G-25 kolonah (GE Healthcare). Čiščenje smo izvedli z gravitacijskim protokolom, kjer smo uporabili 20 mM K-PO₄ puffer za uravnoteženje kolone in za elucijo. Dobili smo očiščen R-ekstrakt.

Sestava ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (pH 7,5):

Osnova:

MOPS (Sigma, Nemčija)	0,5M
MgCl ₂ *6H ₂ O (Merck, nemčija)	5 mM
BSA (Sigma, Nemčija)	0,5 mg/mL
Triton X-100 (Merck, Nemčija)	0,05 %

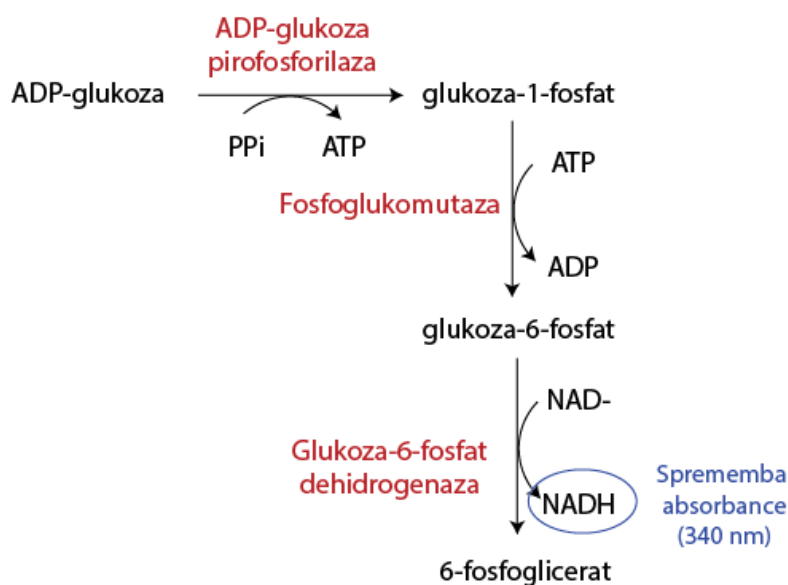
Na dan ekstrakcije smo na 3mL osnove dodali 90 mg PVP 40000. Premešali z obračanjem in inkubirali na ledu 30-60 min. PVP v ekstrakcijskem pufu lahko nadomestimo z PEG, čigar vloga v pufu in vpliv na ekstrakcijo sta enaka.

Tik pred ekstrakcijo dodamo na 3 mL osnove:

DTT (Sigma, Nemčija)	7,5 μ L 10 mM
PMSF (Sigma, Nemčija)	3 μ L 100 mM
benzamidine (Roth, Švica)	30 μ L 100 m

3.5.2. Test aktivnosti AGPaza

Encimsko aktivnost AGPaze smo določali v grobem ekstraktu (G-ekstrakt). Ker je encim AGPaza nestabilen, je potrebno encimsko aktivnost izmeriti takoj po ekstrakciji. Vzorcev ne smemo zamrzniti. Vsak ekstrakt vzorca smo testirali v triplicatih. Pri vsakem testiranju ekstrakta smo pripravili tudi slepo reakcijo brez substrata ter kontrolno reakcijo brez ekstrakta.



Slika 5: Shematski prikaz encimskih reakcij v testu AGPaza.

Figure 5: A schematic view of the enzymatic reactions in the AGPase assay.

V mikrotiterskih ploščicah (UV-compatible Corning 96 well plate) smo pripravili 160 μ L reakcije. Zaradi prisotne velike reakcije ozadja, ki lahko zamaskira rezultat aktivnosti encima, smo najprej pripravili pred-mešanico kateri manjka samo substrat (ADP-glukoza), in pustili, da reakcija ozadja poteče. Pred-mešanica je sestavljena iz 135 μ L mešanice 1 in 15 μ L G-ekstrakta (Preglednica 8). Inkubirali smo jo 15 minut pri 30 °C. Po inkubaciji smo

dodali substrat in takoj pričeli z meritvami kinetike. Absorbanco pri 340 nm smo merili s spektrofotometrom Synergy Mx (BioTek Instruments) pri 30 °C vsako minuto eno uro.

Preglednica 8: Reakcijske mešanice za test aktivnosti AGPaza.

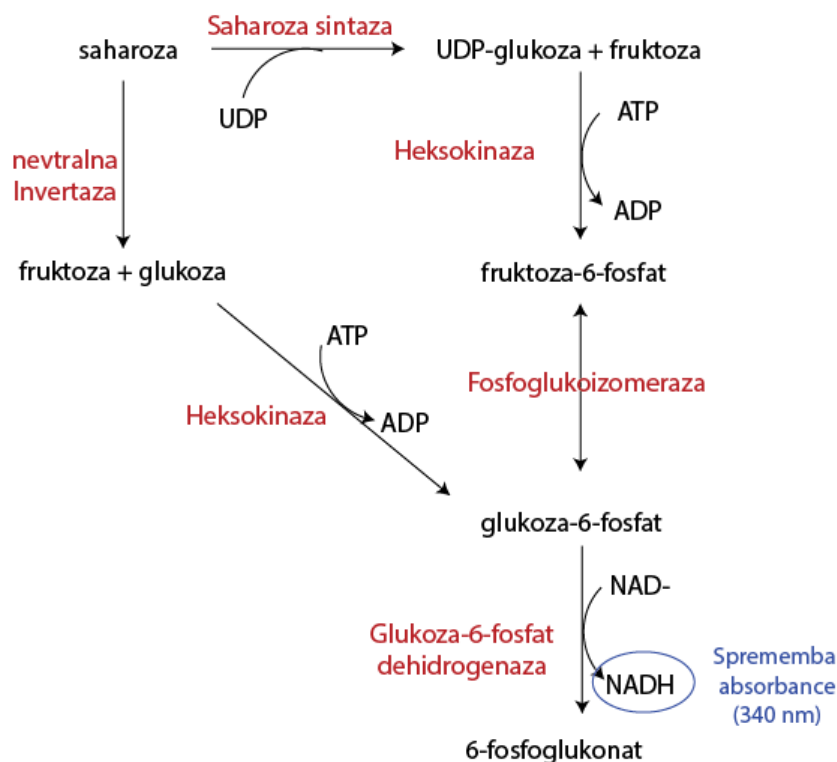
Table 8: Reaction mixes for AGPase assay.

	Kemikalije	delovna konc. (mM)	končna konc. (mM)	Volumen (μL) za 160 μL reakcijo
	H ₂ O			74.8
	Tris-HCl, pH 8.0	500	100	32
	EDTA	250	0.44	0.28
	MgCl ₂	1000	5	0.8
	BSA	10%	0.10%	1.6
Mešanica 1	PPi	100	1.5	2.4
	NADP	10	1	16
	3-PG	50	2	6.4
	G6PDH	5670 U/ml	1.28 U/reakc.	0.23
	PGM	884.8 U/ml	0.432 U/reakc.	0.49
Ekstrakt	G- ekstrakt			15
Substrat	ADP-glukoza	50	3.125	10

3.5.3. Test aktivnosti SuSy

Test aktivnosti SuSy je sestavljen iz dveh delov. V enem delu merimo encimsko aktivnost nevtralne invertaze (nINV) s saharozo kot edini substrat, v drugem delu pa merimo skupno encimsko aktivnost nINV in SuSy s substratoma saharoza in UDP (Slika 6). Aktivnost encima SuSy je razlika med obema aktivnostima.

Encimsko aktivnost SuSy smo določali v očiščenem ekstraktu (R-ekstrakt). Ker je encim SuSy nestabilen, je potrebno encimsko aktivnost izmeriti takoj po čiščenju ekstrakta in vzorcev ne smemo zamrzniti. Vsak ekstrakt vzorca smo testirali v triplikatih za test aktivnosti nINV (vsebuje samo substrat saharoza), v triplikatih za test aktivnosti nINV in SuSy (vsebuje substrata saharoza in UDP). Pri vsakem testiranju ekstrakta smo pripravili tudi slepo reakcijo brez obeh substratov ter kontrolno reakcijo brez ekstrakta.



Slika 6: Shematski prikaz encimskih reakcij v testu SuSy.

Figure 6: A schematic view of the enzymatic reactions in the SuSy assay.

V mikrotiterskih ploščicah (UV-compatible Corning 96 well plate) smo pripravili 160 μL reakcije (Preglednica 9). Zaradi prisotnih reakcij ozadja (reakcije med komponentami ekstrakta in mešanico 1 v odsotnosti substrata in reakcij zaradi glukozne kontaminacije v saharozi v odsotnosti ekstrakta), ki lahko zamaskirajo rezultat aktivnosti encima, pripravimo pred-mešanice v katerih pustimo, da reakcije ozadja potečejo preden sestavimo popolno reakcijsko mešanico.

Pripravimo kontrolne pred-mešanice:

- +UDP: 34 μL mešanice 1, 40 μL saharoze, 16 μL UDP
- -UDP: 34 μL mešanice 1, 40 μL saharoze, 16 μL H_2O
- Slepa: 34 μL mešanice 1, 56 μL H_2O

Pripravimo pred-mešanico ekstrakta: 20 μL R-ekstrakta in 50 μL mešanice 1.

Pred-mešanice inkubiramo 30 minut pri 30 $^\circ\text{C}$. Po inkubaciji zmešamo 90 μL ustrezne kontrolne pred-mešanice in 70 μL ustrezne pred-mešanice ekstrakta ter takoj pričnemo z meritvami kinetike. Absorbance pri 340 nm smo merili na spektrofotometru Synergy Mx (BioTek Instruments) pri 30 $^\circ\text{C}$ vsako minuto eno uro.

Preglednica 9: Reakcijske mešanice za test aktivnosti SuSy.

Table 9: Reaction mixes for SuSy assay.

	Kemikalije	delovna konc. (mM)	končna konc. (mM)	Volumen (μ L) za 160 μ L reakcijo
	H ₂ O			69.3
	Hepes/NaOH pH7.0	1000	50	8
	EDTA	250	1	0.64
	MgCl ₂	1000	2	0.32
	DTT	100000%	500.00%	0.8
Mešanica 1	ATP	100	1.3	2.08
	NAD	50	0.5	1.6
	G6PDH	5670 U/ml	0.32 U/rxn	0.056
	HXX	1500 U/ml	0.672 U/rxn	0.448
	PGI	700 U/ml	0.56 U/rxn	0.8
Ekstrakt	R-ekstrakt			20
Substrata	Saharozna	1000	250	40
	UDP	10	1	16

3.5.4. Izračun encimske aktivnosti

Rezultate meritev absorbance (A_{340}) skozi čas smo prenesli v programsko okolje Excel (Microsoft). Za vsako reakcijo smo izrisali graf A_{340} v odvisnosti od časa. A_{340} je direktno proporcionalna koncentraciji NADH ali NADPH. Iz naklona linearnega dela krivulje izračunamo hitrost encimske reakcije po Beer Lambertovem zakonu:

$$\Delta C / \Delta t = \text{naklon} / (\varepsilon * l) \quad \dots(8)$$

kjer je ε ekstinkcijski koeficient za NADH in l dolžina poti svetlobe. Pri določanju encimske aktivnosti SuSy moramo za vsak vzorec naklon premice reakcije brez substrata UDP (-UDP) odšteti od naklona premice reakcije z obema substratoma (+UDP).

Encimsko aktivnost določimo kot nanokatal na gram sveže teže (nkat/g Fw):

$$\text{Encimska aktivnost} = \frac{\Delta C / \Delta t * V_{\text{reakcije}}}{F_w} \quad \dots(9)$$

kjer je $F_w = 0,5 \text{ g/3 mL} * V_{\text{vzorca}}$ v reakciji.

Na koncu encimski aktivnosti vzorca ekstrakta odštejemo encimsko aktivnost slepega vzorca (isti ekstrakt, brez substrata).

S studentovim t-testom (dvostranski *t*-test ob predpostavki enake variance v obeh skupinah) smo izračunali ali so bile razlike v vsebnosti sladkorjev med zdravimi in okuženimi vzorci v (za posamezno sorto vinske trte) statistično značilne ($p < 0.05$).

3.6. DOLOČANJE TITRA IN RAZŠIRJENOSTI FDF PO RASTLINI MED RASTNO SEZONO

3.6.1. Izolacija DNA

S tekočim dušikom smo posamezna tkiva vinske trte v terilnicah strli v prah. DNA smo izolirali s komercialno dostopnim kompletom QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bionobile, Finska), katerega osnovno delovanje temelji na vezavi nukleinskih kislin na magnetna zrna. Izolacijo smo izvedli s pomočjo aparature King Fisher mL (Thermo Fisher scientific, ZDA) in je potekala po protokolu Pirc in sod. (2009) z nekaj modifikacijami. 100-200 mg tkiva smo dodali pufer za lizo v razmerju 1/3 (m/V) in 25 μ L proteinaze K ter premešali. Po 30 minutni inkubaciji na 65 °C in centrifugiranju pri 6000 g smo 220 μ L ekstrakta uporabili za izolacijo DNA. Ob koncu izolacije smo DNA eluirali v 200 μ L vode.

3.6.2. Detekcija in kvantifikacija FDF

Detekcijo in kvantifikacijo fitoplazme FDF smo izvedli z metodo qPCR (Mehle in sod., 2013). Poleg amplikona za FD gen smo za namen kvantifikacije v vsakem vzorcu pomnoževali tudi kontrolni rastlinski gen za 18S rRNA (18S, Eucaryotic 18S rRNA Applied Biosystems). V optični ploščici formata 384 (384 well white PCR plates, Roche Applied Systems, ZDA) smo pripravili 10 μ L reakcije, ki so vsebovale 2 μ L ustrezno razredčenega vzorca DNA ter za amplikon FDgen 1x Maxima Probe qPCR master mix (Fermentas), 900 nM oligonukleotidne začetnike in 250 nM sonde in za 18S rRNA amplikon 1x primer probe mix (AB-Applied Biosystems). Pomnoževanje je potekalo na aparaturi Roche LightCycler 480 (Roche Applied Systems, ZDA) pri univerzalnih razmerah: 2 minuti pri 50 °C in 10 minut pri 95 °C (aktivacija polimeraze) ter nato 45 ciklov pri pogojih: 10 sekund pri 95 °C in 1 minuta pri 60 °C.

Vsak vzorec DNA smo za vsak amplikon testirali v dveh razredčinah in dveh ponovitvah (štiri reakcije pomnoževanja). Za namen relativne kvantifikacije smo pripravili serijo desetkratnih in/ali petkratnih razredčin izbranega standardnega vzorca in jih nanесли na vsako ploščico za vsak amplikon. Za standardni vzorec smo izbrali vzorec, ki je vseboval DNA FDF in 18S rRNA.

Začetno analizo podatkov PCR v realnem času smo izvedli v programu LightCycler 480 SW 1.5.0 SP3 (Roche Applied Systems, ZDA). Vizualno smo pregledali krivulje pomnoževanja DNA. Za izračun vrednosti C_q smo pri obeh amplikonih uporabili metodo

maksimuma drugega odvoda, podatke izvozili v tekstovno obliko in analizirali v programu Microsoft Excel.

Uporabili smo metodo relativne kvantifikacije z uporabo standardne krivulje kot opisano v poglavju 3.2.6.1., le da smo namesto cDNA imeli DNA in le en kontrolni gen (18S rRNA) in en tarčni gen (FDgen). S pomočjo umeritvenih krivulj smo za posamezno razredčino vzorca določili relativno število kopij gena FD in gena 18S rRNA. Relativno število kopij FDgena za posamezno razredčino vzorca smo nato normalizirali, tako, da smo vrednost delili z relativnim številom kopij 18S rRNA gena ustreznega vzorca. Iz povprečja normaliziranih vrednosti dveh razredčin posameznega vzorca smo dobili tako imenovano normalizirano število kopij FDgena v vzorcu.

Pri kvantifikaciji smo uporabili enake kriterije kot so opisni v poglavju 3.2.6.1. Določili smo limito kvantifikacije (LOQ) in limito detekcije (LOD) (Hren in sod., 2007). Da smo lahko izvedli primerjalne analize, smo:

- Vzorcem, ki so imeli vrednosti Cq pod LOQ in nad LOD določili relativno število kopij gena FD glede na umeritveno krivuljo in jo delili s povprečnim relativnim številom kopij gena 18S rRNA v vseh negativnih vzorcih in vzorcih pod LOQ.
- Negativnim vzorcem (zdravi vzorci brez gena FD) pripisali umetno število kopij gena FD. In sicer smo relativno število kopij gena FD, ki je bilo 25-krat nižje od števila kopij pri LOQ delili s povprečnim relativnim številom kopij 18S rRNA gena v vseh negativnih vzorcih in vzorcih pod LOQ.

Normalizirana relativna števila kopij gena FD smo nato logaritmirali (\log_2) in primerjali med vzorci.

3.7. PREVERJANJE ZDRAVSTVENEGA STANJA RASTLIN

3.7.1. Določanje prisotnosti fitoplazem

V vseh rastlinah vzorčenih v raziskavi smo preverili prisotnost fitoplazem z uporabo metode qPCR na vzorcih izolirane DNA (postopek 3.2.2.). Z amplikonoma BNgen in FDgen (Hren in sod., 2007) smo preverjali prisotnost fitoplazem BNf in Fdf, z amplikonom UniRNA (Hren in sod., 2007) pa morebitno prisotnost kake druge fitoplazme. Nobena rastlina vzorčena v vinogradu v Izoli ali Straži ni bila okužena z BNf ter nobena rastlina vzorčena v Vipolžah ni bila okužena s Fdf. V vseh rastlinah vinske trte, okuženih s Fdf, je bil določen tip fitoplazme FD-D.

3.7.2. Določanje prisotnosti virusov

V vseh rastlinah smo s testom ELISA preverjali prisotnost najpogostejših virusov vinske trte: GFLV, GFkV, ArMV, GVA, GVB, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 in GLRaV-4-9. ELISA test smo izvedli kot opisujejo Čepin in sod. (2010), kjer smo za določanje vseh virusov uporabili protitelesa od proizvajalca Bioreba, le za določanje prisotnosti virusa GVB smo uporabili komplet Agritest. Merjenje optične gostote pri 405 nm smo izvedli na aparaturi Tecan Sunrise (Tecan Trading AG, Switzerland) 30 min, 1 h in 2 h po inkubaciji s substratom p-nitrofenilfosfat (Sigma Aldrich, ZDA). Podatke smo obdelali z računalniškim programom Excel (Microsoft, ZDA). Za pozitivne smo šteli vzorce, pri katerih je bila absorpcija po dveh urah inkubacije vsaj 2-krat večja kot absorpcija referenčne negativne kontrole. Rezultati testiranja trsov na prisotnost virusov vinske trte so v prilogi (Priloga A, Priloga B, Priloga C).

4 REZULTATI

4.1. TITER IN RAZŠIRJENOST FDF PO RASTLINI MED RASTNO SEZONO

Raziskavo smo izvedli v dveh rastnih sezonah v vinogradu v Straži in v eni sezoni v vinogradu v Izoli (Preglednica 1). Med rastno sezono smo v obeh vinogradih podrobno spremljali razvoj bolezenskih znamenj, v vinogradu v Izoli pa smo spremljali tudi obseg rastlin z bolezenskimi znamenji po vinogradu. Detekcijo in kvantifikacijo fitoplazme FDF smo izvedli z metodo qPCR kot objavljeno:

MEHLE, Nataša, **PREZELJ, Nina**, HREN, Matjaž, BOBEN, Jana, GRUDEN, Kristina, RAVNIKAR, Maja, DERMASTIA, Marina. A real-time PCR detection system for the bois noir and flavesence dorée phytoplasmas and quantification of the target DNA. V: DICKINSON, Matthew (ur.), HODGETTS, Jennifer (ur.). *Phytoplasma : methods and protocols*, (Methods in Molecular Biology, ISSN 1064-3745, vol. 938), (Springer Protocols). New York: Humana Press, 2013, str. 253-268. [COBISS.SI-ID [2614351](#)]

Rezultati raziskave so objavljeni v znanstvenem članku:

PREZELJ, Nina, NIKOLIĆ, Petra, GRUDEN, Kristina, RAVNIKAR, Maja, DERMASTIA, Marina. Spatiotemporal distribution of flavesence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, ISSN 0032-0862, 2013, vol. 62, no. 4, str. 760-766. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2012.02693.x/pdf>, doi: [10.1111/j.1365-3059.2012.02693.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02693.x). [COBISS.SI-ID [2656079](#)], [JCR, SNIP, WoS do 14. 5. 2014: št. citatov (TC): 1, čistih citatov (CI): 1, čistih citatov na avtorja (CIAu): 0.20, normirano št. čistih citatov (NC): 1, Scopus do 30. 4. 2014: št. citatov (TC): 2, čistih citatov (CI): 2, čistih citatov na avtorja (CIAu): 0.40, normirano št. čistih citatov (NC): 2] kategorija: 1A1 (Z1, A', A1/2)

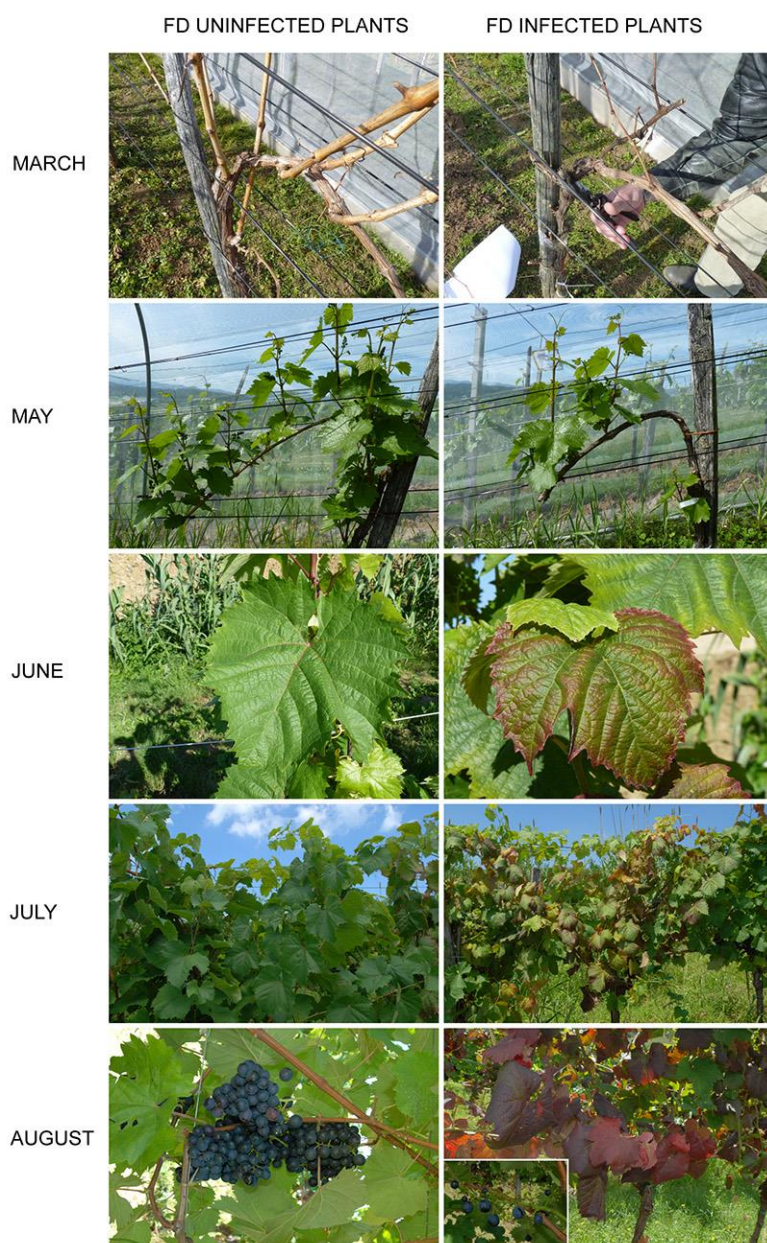
Uporabnost jagodnega tkiva za detekcijo FDF na terenu s pomočjo reakcije izotermalnega pomnoževanja (LAMP, ang. loop-mediated isothermal amplification) je objavljena v članku:

KOGOVŠEK, Polona, HODGETTS, Jennifer., HALL, Jayne, **PREZELJ, Nina**, NIKOLIĆ, Petra, MEHLE, Nataša, LENARČIČ, Rok, ROTTER, Ana, DICKINSON, Matt, BOONHAM, Neil, DERMASTIA, Marina, RAVNIKAR, Maja. LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavesence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*. doi: [10.1111/ppa.12266](https://doi.org/10.1111/ppa.12266).

4.1.1. Razvoj bolezenskih znamenj

V vinogradu v Straži smo v rastni sezoni 2010 potrdili prisotnost FDF v štirih rastlinah vinske trte. Rastline so v poletnih mesecih kazale bolezenska znamenja, tipična za okužbo s trsnimi rumenicami: vihanje listov navzdol, izrazito rdečenje in krhkost listov ter zmanjšano število jagod na trsih. V naslednji rastni sezoni (2011) smo rastline začeli opazovati že konca zime tako v vinogradu v Straži kot v vinogradu v Izoli (Slika 7). Marca, v času obrezovanja vinske trte, je les okuženih rastlin slabše dozorel v primerjavi z zdravimi rastlinami. Posledično so meseca maja okužene rastline kazale zmanjšano oz.

počasnejšo rast z manjšim številom cvetnih skupkov. Prva bolezenska znamenja v obliki rdečenja listov so se na okuženih rastlinah razvila junija, takoj po cvetenju. Sočasno so na okuženih rastlinah pričeli odpadati cvetni grozdi. Meseca julija so bila bolezenska znamenja na listih okuženih rastlin bolj izrazita. Poleg intenzivnejšega rdečenja listov so se ti pričeli vihati navzdol. Avgusta je izrazito rdečenje listov prešlo v rdeče-vijolično barvo. V primerjavi z zdravimi rastlinami je bilo število grozdov na okuženih rastlinah občutno manjše, jagode so se sušile in odpadale. Zanimivo pa v vinogradu v Straži avgusta 2011 dve od štirih okuženih rastlin nista kazali bolezenskih znamenj na novo razvitih listih.

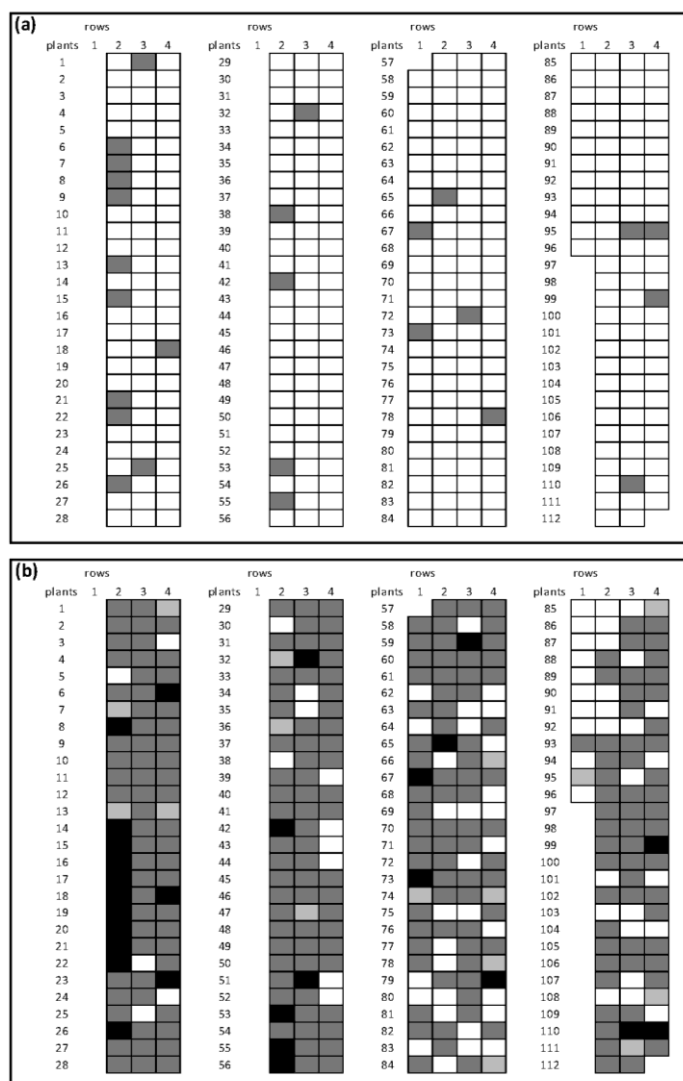


Slika 7: Razvoj bolezenskih znamenj rastlin tekom rastne sezone.

Figure 7: Symptom development during the growing season.

4.1.2. Obseg boleznj zlate trsne rumenice v vinogradu v Izoli

Vinograd v Izoli je obsegal približno 1800 rastlin vinske trte. V rastni sezoni 2010 je 26 rastlin v prvih štirih vrstah kazalo izrazita bolezenska znamenja okužbe s trsnimi rumenicami (1,4 %). V okviru uradnega inšpektorskega pregleda zdravstvenega varstva rastlin je bila potrjena okužba s FDF. V rastni sezoni 2011 je število rastlin z bolezenskimi znamenji naraslo na več kot 1000 (Slika 8), kar predstavlja skoraj 60 % vseh rastlin oziroma 40-kratni porast od leta 2010 do leta 2011. Zaradi velikega obsega okužbe, je bil vinograd konec sezone 2011 izkoreninjen.



Slika 8: Obseg okuženosti vinograda v Izoli v Avgustu 2010 (a) in Avgustu 2011 (b).

Figure 8: State of FDF infection in vineyard in Izola in August 2010 (a) and in August 2011 (b).

Predstavljene so prve štiri vrste v vinogradu, kjer se je zlata trsna rumenica najprej pojavila. Vsak kvadrat predstavlja posamezno rastlino. Bel kvadrat predstavlja zdravo rastlino, temno siv kvadrat predstavlja rastlino z značilnimi bolezenskimi znamenji trsnih rumenic, svetlo siv kvadrat predstavlja rastlino z netipičnimi bolezenskimi znamenji, črni kvadrat pa predstavlja mrtvi trs.

4.1.3. Detekcija FDF v vinogradu v Straži

Poleti, v sezoni 2010, smo v vinogradu v Straži potrdili prisotnost FDF v vseh tipih tkiv vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Preglednica 10). Najvišji relativni titer FDF smo določili avgusta v jagodni kožici (Preglednica 11) in v primerjavi z julijem, je bil relativni titer FDF, v večini tkiv višji v avgustu (Preglednica 11). Na poganjkih z bolezenskimi znamenji je bil relativni titer FDF avgusta 2010 višji v jagodah v primerjavi z listnimi žilami ($p = 0,034$) in viticami ($p = 0,00038$; Preglednica 11). Relativni titer FDF je bil v vseh jagodnih tkivih vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji zelo primerljiv, z izjemo grozdnega peclja, kjer je bila količina FDF značilno nižja ($p = 0,0023$; Preglednica 11). Fitoplazmo FD smo določili tudi v jagodnih tkivih vzorčenih na poganjku brez bolezenskih znamenj ene rastline, ki ni imela jagod na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Preglednica 10). Njihov relativni titer pa je bil 10^3 do 10^4 -krat nižji ($p = 0,000046$) v primerjavi s tistim na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Preglednica 11).

Detekcija FDF v floemu lesa je bila slaba. FDF smo komaj zaznali julija in avgusta 2010 v floemu 1 letnega lesa poganjka z bolezenskimi znamenji (Preglednica 10, Preglednica 11). Ob koncu rastle sezone 2010, oktobra, smo FDF zaznali v floemu 2 letnega lesa le v dveh od štirih rastlin (Preglednica 10). Marca 2011 pa je bil relativni titer FDF v floemu dve- in tri-letnega lesa pod limito detekcije (Preglednica 10).

Meseca maja 2011, v času cvetenja, rastline niso kazale bolezenskih znamenj na listih in FDF nismo zaznali v nobenem vzorčenem tkivu. Prvič smo v rastni sezoni 2011 zaznali FDF junija, ko so se pojavila bolezenska znamenja na eni od štirih predhodno okuženih rastlin. V tej rastlini smo v listnih žilah, listnem peclju in viticah vzorčenih na poganjku z bolezenskimi znamenji določili nizke količine FDF (Preglednica 10, Preglednica 11). FDF pa smo zaznali tudi v listnih žilah, listnem peclju, viticah in cvetovih rastlin brez bolezenskih znamenj (Preglednica 10, Preglednica 11). Julija 2011 so se na vseh štirih rastlinah pojavila bolezenska znamenja na listih. V vseh rastlinah smo določili prisotnost FDF v listnih žilah in listnem peclju vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Preglednica 10). Prav tako smo na vseh rastlinah z jagodami na poganjkih z bolezenskimi znamenji določili prisotnost FDF v celih jagodah in jagodnih pecljih. V skladu z milejšimi bolezenskimi znamenji v avgustu 2011 je bil tudi relativni titer FDF v jagodnih tkivih na poganjkih z bolezenskimi znamenji v povprečju nižji v primerjavi z avgustom 2010 ($p = 0,0016$; Preglednica 11, Slika 8). Do avgusta 2011 sta samo dve rastlini obdržali bolezenska znamenja na listih in FDF smo zaznali v listnih in jagodnih tkivih vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji teh dveh rastlin (Preglednica 10). Najvišji relativni titer FDF smo določili v jagodnih pecljih (Preglednica 11).

V splošnem smo v obeh rastnih sezonah opazili trend naraščanja relativnega titra FDF na poganjkih z bolezenskimi znamenji od junija do avgusta (Preglednica 11, Slika 8). Zaradi

visoke variabilnosti in/ali majhnega števila rastlin pa opaženi trend ni statistično značilen. Statistično značilno je naraščanje relativnega titra FDF od julija do avgusta v listnih žilah ($p = 0.0039$) in listni lamini ($p = 0.005$) vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji.

Preglednica 10: Zanesljivost detekcije FDF v posameznih tkivih tekom rastnih sezon.

Table 10: Reliability of FDF detection in individual tissues observed during the growing seasons.

Preglednica vključuje podatke obeh vinogradov. Predstavljeno je število rastlin v katerih smo določili prisotnost FDF deljeno s številom okuženih rastlin, ki smo jih testirali na prisotnost FDF. Barvno je predstavljen delež rastlin s potrjeno prisotnostjo FDF (rdeča 100 %, rumena 60-99 %, zelena 1-59 % bela 0 %). Prazni kvadrati pomenijo, da v tem časovnem obdobju nismo vzorčili določenega tkiva. Oznaka S pomeni tkiva z in AS tkiva brez bolezenskih znamenj. V prvem vzorčenju julija 2010 tkiv z in brez bolezenskih znamenj niso bila vzorčena ločeno.

		Vinograd v Straži							Vinograd v Izoli							
		Jul 2010	Avg 2010	Okt 2010	Mar 2011	Maj 2011	Jun 2011	Jul 2011	Avg 2011	Feb 2011	Maj 2011	Jun 2011	Jul 2011	Avg 2011		
LISTI	Listne žile	S	4/4	4/4				1/1	4/4	2/2			8/8	6/6	6/6	
		AS	0/2	0/4			0/4	2/4	1/4	0/4		5/9	6/6	2/6	3/6	
	Listna lamina	S	2/4	4/4												
		AS	0/2	0/4												
	Listni pecelj	S	4/4	4/4				1/1	4/4	2/2			8/8	5/6	6/6	
		AS	0/2	0/4			0/4	1/4	0/4	1/4		5/9	5/6	1/5	3/6	
JAGODE	Cele jagode	S		3/3					2/2	2/2			0/1	4/4	3/3	
		AS	2/3	1/4					0/3	0/3			3/3	0/4	1/4	
	Jagodna kožica	S		3/3					1/2	2/2			0/1	4/4	3/3	
		AS	2/3	1/4					0/2	0/3			2/2	2/5	1/4	
	Jagodno meso	S		3/3					1/2	2/2			0/1	4/4	3/3	
		AS	2/3	1/4					0/2	0/3			2/2	2/5	1/3	
	Grozdni pecelj	S		3/3						0/1			0/0	4/4	2/2	
		AS	2/3	1/4						1/3			1/1	1/3	1/4	
	Jagodni pecelj	S		3/3						2/2	2/2			1/1	3/3	3/3
		AS	2/3	1/4					0/2	0/3			3/3	3/5	1/4	
CVET	AS					0/4	3/4				5/7	5/6*				
LES-FLOEM	1-letni	S	4/4	1/4				0/1	0/4	1/2			3/4			
		AS	0/2	0/4				0/3	0/4	0/4			5/6			
	2-letni	AS			2/4	0/4					3/3					
3-letni	AS				0/4											
VITICE		S	3/4	3/3				1/1	1/2	1/1			7/7	6/6	3/4	
		AS	0/2	0/4			0/4	1/3	1/4	0/4		4/8	5/6	2/5	1/4	

* En vzorec je bil vzorčen na poganjku z bolezenskimi znamenji.

Preglednica 11: Relativna kvantifikacija FDF v različnih tkivih z (S) in brez (AS) bolezenskih znamenj v sezoni 2010 in 2011 v vinogradu v Straži.

Table 11: Relative quantification of FDF in different symptomatic (S) and asymptomatic (AS) tissues in 2010 and 2011 in vineyard in Straža.

Relativno število kopij FDF je normalizirano na relativno število kopij 18S rRNA gena. Za oceno povečanja/zmanjšanja relativne količine FDF, smo negativnim vzorcem glede na umeritveno krivuljo pripisali relativno število kopij FDF. Rezultati predstavljajo povprečje \log_2 števila kopij FDF \pm SE. Število vzorcev v testiranju je razvidno iz Preglednica 10.

		S/AS	Julij 2010	Avgust 2010	Junij 2011	Julij 2011	Avgust 2011
List	Žile	S	5.182 ^c	12.043 \pm 0.651	5.383 ^c	7.083 \pm 1.607	11.098 \pm 0.0127
		AS	0.538 ^d	0.770 ^d	1.900 ^c \pm 0.670	1.4127 ^c \pm 0.580	1.052 ^d
	Lamina	S	1.699 \pm 0.670	11.990 \pm 2.337	NA	NA	NA
		AS	0.538 ^d	0.770 ^d	NA ^a	NA	NA
	Pecelj	S	5.481 \pm 1.024	6.918 \pm 1.622	7.85	5.476 ^c	6.202 \pm 0.506
		AS	0.538 ^d	0.770 ^d	1.900 ^c \pm 0.670	0.832 ^d	1.633 ^c \pm 0.580
Jagode	Cele	S ^b	4.836 ^c \pm 0.774	15.943 \pm 1.047	NA	8.947 \pm 5.793	10.312 \pm 4.616
	jagode	AS ^b	4.836 ^c \pm 0.774	1.350 ^c \pm 0.580	NA	0.832 ^d	1.052 ^d
	Jagodna	S ^b	2.860 \pm 1.341	17.770 \pm 1.581	NA	6.067 \pm 5.235	8.658 \pm 2.961
	kožica	AS ^b	2.860 \pm 1.341	5.389 \pm 4.619	NA	0.832 ^d	1.052 ^d
	Jagodno	S ^b	3.634 ^c \pm 1.548	16.882 \pm 0.541	NA	7.849 \pm 7.016	10.192 \pm 4.495
	meso	AS ^b	3.634 ^c \pm 1.548	4.838 \pm 4.068	NA	0.832 ^d	1.052 ^d
	Jagodni	S ^b	4.920 \pm 2.458	15.932 \pm 0.890	NA	15.279 \pm 5.401	14.889 \pm 2.559
	pecelj	AS ^b	4.920 \pm 2.458	4.255 ^c \pm 3.485	NA	0.832 ^d	1.052 ^d
	Grozdni	S ^b	6.064 \pm 2.763	6.804 \pm 0.811	NA	NA	1.052 ^d
	pecelj	AS ^b	6.064 \pm 2.763	1.931 \pm 1.161	NA	NA	1.826 ^c \pm 0.774
Vitice	S	2.860 ^c \pm 0.948	1.544 ^c \pm 0.774	3.061 ^c	1.993 ^c \pm 1.161	3.374 ^c	
	AS	0.538 ^d	0.770 ^d	2.287 ^c \pm 1.548	1.413 ^c \pm 0.580	1.052 ^d	
Les	Sekundarni	S	3.441 ^c \pm 0.580	5.938 \pm 1.814	0.739 ^d	0.832 ^d	2.213 ^c \pm 1.161
	floem	AS	0.538 ^d	0.770 ^d	0.739 ^d	0.832 ^d	1.052 ^d

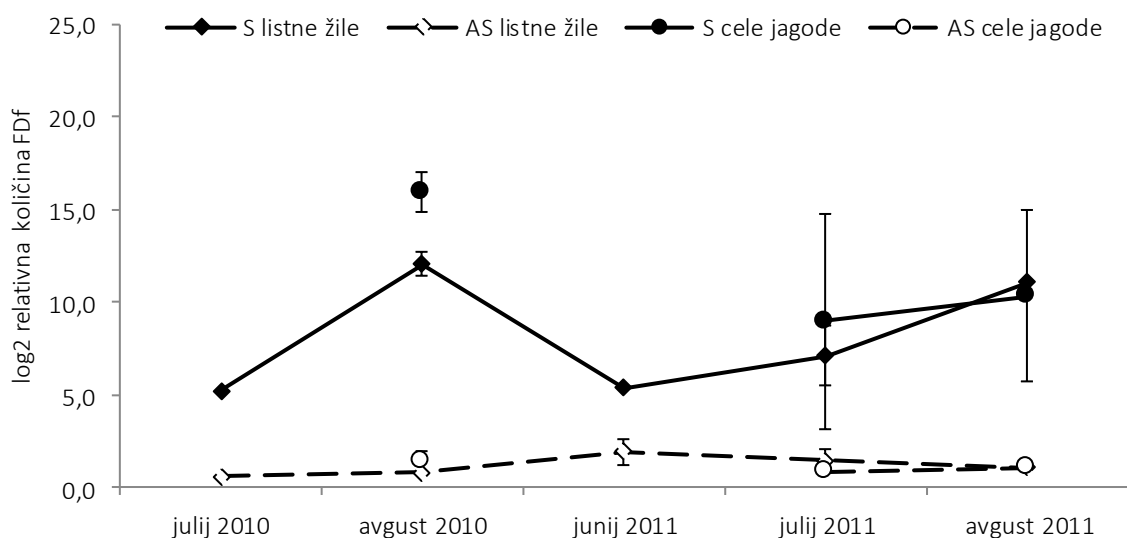
Oznaka S pomeni tkiva z in AS tkiva brez bolezenskih znamenj.

^aNA; tkivo ni bilo na voljo za vzorčenje oz. testiranje

^bJuija 2010 jagode na poganjkih z in brez bolezenskih znamenj niso bile vzorčene ločeno.

^cKoličina FDF pod limito kvantifikacije (<LOQ)

^dPripisana količina FDF, FDF nismo detektirali



Slika 9: Relativna kvantifikacija FDF v listnih žilah in celih jagodah tekom ravnih sezon 2010 in 2011 v vinogradu v Straži.

Figure 9: Relative quantification of FDF in leaf veins and whole berries during the growing seasons 2010 and 2011 in vineyard in Straža.

4.1.4. Detekcija FDF v vinogradu v Izoli

V času obrezovanja, februarja 2011, smo FDF zaznali v floemu dve-letnega lesa v vseh treh vzorčenih rastlinah (Preglednica 10). Fitoplazmo smo ponovno potrdili maja, pred pojavom bolezenskih znamenj, v listnih tkivih, cvetovih in viticah v večini vzorčenih rastlin (Preglednica 10). Ko so se junija 2011 razvila prva bolezenska znamenja, smo določili prisotnost FDF v listnih žilah vseh vzorčenih poganjkov, tako z kot brez bolezenskih znamenj. FDF smo določili v listnem peclju na poganjkih z bolezenskimi znamenji v vseh rastlinah, v 83 % v listnem peclju brez bolezenskih znamenj, v 80 % v cvetovih na poganjkih brez bolezenskih znamenj, v vseh viticah na poganjkih z bolezenskimi znamenji in v 83 % v viticah na poganjkih brez bolezenskih znamenj (Preglednica 10). V visokem deležu rastlin smo prisotnost FDF potrdili tudi floemu lesa (Preglednica 10). Kljub veliki variabilnosti med rastlinami je bila detekcija FDF v tkivih vzorčenih na poganjkih brez bolezenskih znamenj relativno zanesljiva (Preglednica 12). Junija, ko so se jagode pričele razvijati, je bil relativni titer FDF v poganjkih brez bolezenskih znamenj najvišji v jagodnih pecljih. Njihov relativni titer je bil primerljiv s tistim v listnih žilah, vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Preglednica 12). Zanimivo je, da je bil povprečni relativni titer FDF v jagodah vzorčenih na poganjkih brez bolezenskih znamenj 304-krat višji v primerjavi z relativnim titrom FDF v jagodah vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Preglednica 12, Slika 10). Zanimivo je

tudi znižanje (207-krat) relativnega titra FDF od junija do julija v jagodah na poganjkih brez bolezenskih znamenj ($p = 0.03$) z le rahlim porastom avgusta (Preglednica 12, Slika 10). Na drugi strani pa smo opazili povišanje (105-krat) relativnega titra FDF od junija do julija v jagodah vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Preglednica 12, Slika 10).

Tako kot pri jagodah, smo tudi pri ostalih tkivih vzorčenih na poganjkih brez bolezenskih znamenj opazili znižanje relativnega titra FDF od junija do julija (Preglednica 12). Relativni titer FDF v listnih tkivih, vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji, pa je ostal relativno stabilen tekom rastne sezone (Preglednica 12, Slika 10).

Preglednica 12: Relativna kvantifikacija FDF v različnih tkivih z (S) in brez (AS) bolezenskih znamenj v sezoni 2011 v vinogradu v Izoli

Table 12: Relative quantification of FDF in different symptomatic (S) and asymptomatic (AS) tissues in 2011 in vineyard in Izola.

Relativno število kopij FDF je normalizirano na relativno število kopij 18S rRNA gena. Za oceno povečanja/zmanjšanja relativne količine FDF, smo negativnim vzorcem glede na umeritveno krivuljo pripisali relativno število kopij FDF. Rezultati predstavljajo povprečje \log_2 števila kopij FDF \pm SE. Število vzorcev v testiranju je razvidno iz Preglednica 10.

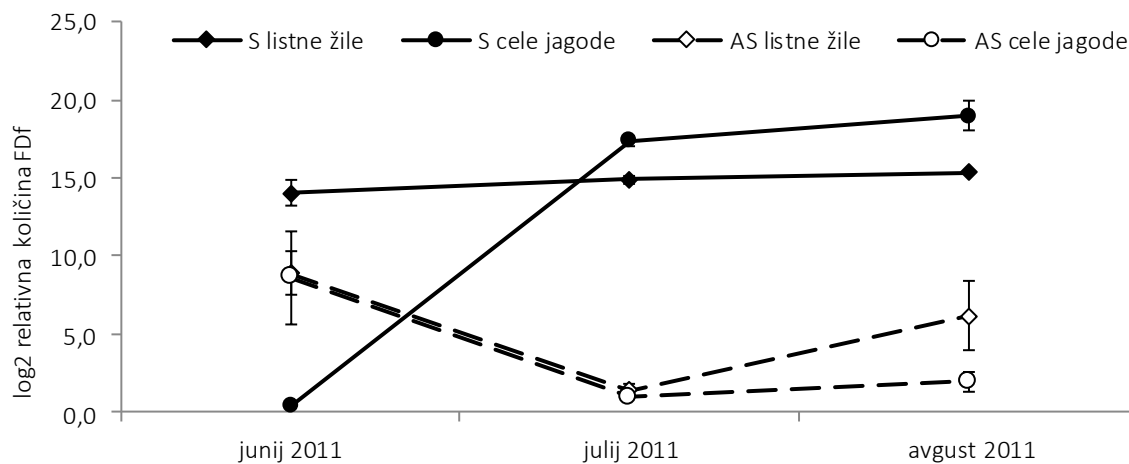
		AS/S	Junij	Julij	Avgust
List	Žile	S	14.032 \pm 0.865	14.900 \pm 0.238	15.360 \pm 0.137
		AS	8.880 \pm 1.401	1.387 ^c \pm 0.464	6.182 \pm 2.273
	Pecelj	S	14.680 \pm 0.729	13.300 \pm 2.429	15.617 \pm 0.351
		AS	10.152 \pm 2.471	3.086 \pm 2.164	6.669 \pm 2.556
Jagode	Cele	S	0.373 ^d	17.348 \pm 0.304	18.968 \pm 0.948
	jagode	AS	8.622 \pm 3.003	0.922 ^d	1.945 ^c \pm 0.580
	Jagodna	S	0.373 ^d	17.402 \pm 0.336	20.066 \pm 0.894
	kožica	AS	7.800 \pm 5.105	4.373 \pm 2.905	1.945 ^c \pm 0.580
	Jagodno	S	0.373 ^d	18.636 \pm 0.627	18511 \pm 1.144
	meso	AS	8.318 \pm 3.301	4.551 \pm 3.81	2.136 ^c \pm 0.774
	Jagodni	S	2.695 ^c	18.507 \pm 0.465	18.542 \pm 0.303
	pecelj	AS	12.799 \pm 1.831	5.259 \pm 3.218	3.068 \pm 1.703
	Grozdni	S	NA	15.539 \pm 0.384	13.054 \pm 4.257
	pecelj	AS	10.482	1.696 ^c \pm 0.774	1.945 ^c \pm 0.580
Vitice		S	12.476 \pm 0.582	11.110 \pm 1.674	12.472 \pm 3.793
		AS	8.714 \pm 1.839	1.503 ^c \pm 0.580	2.525 ^c \pm 1.161
Cvetovi		AS	9.240 \pm 2.893	NA	NA

Oznaka S pomeni tkiva z in AS tkiva brez bolezenskih znamenj.

^aNA; tkivo ni bilo na voljo za vzorčenje oz. testiranje

^cKoličina FDF pod limito kvantifikacije (<LOQ)

^dPripisana količina FDF, FDF nismo detektirali



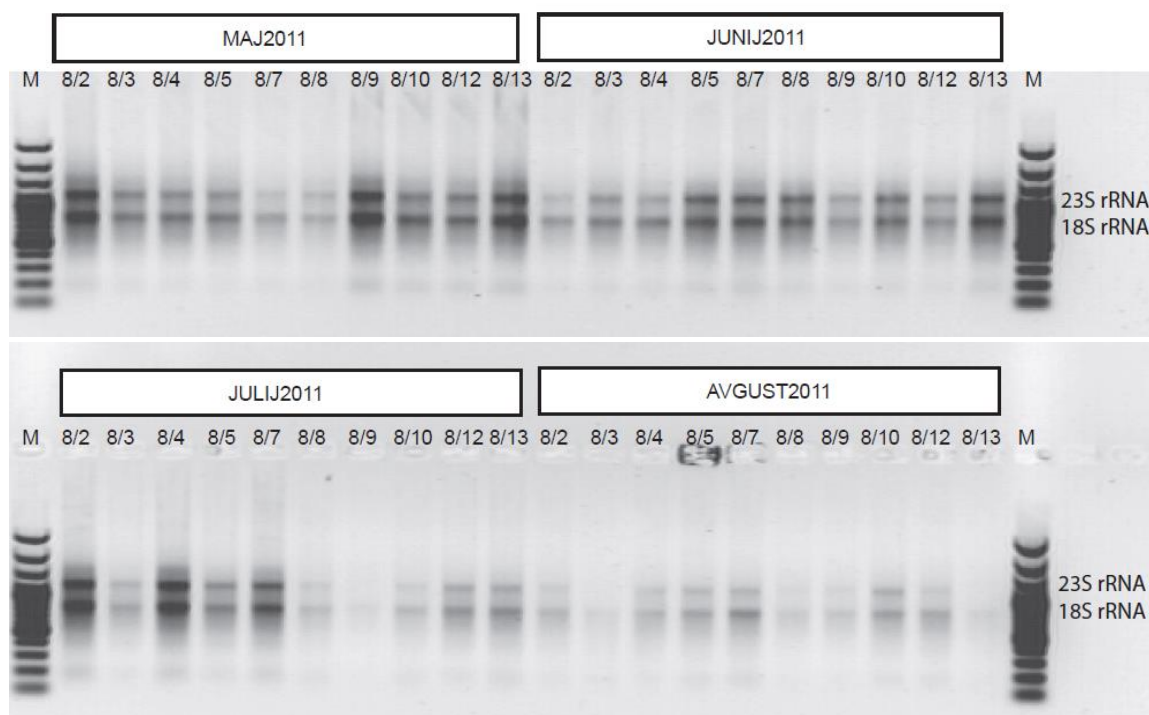
Slika 10: Relativna kvantifikacija FDP v listnih žilah in celih jagodah tekom rastne sezone 2011 v vinogradu v Izoli.

Figure 10: Relative quantification of FDP in leaf veins and whole berries during the growing season 2011 in vineyard in Izola.

4.2. IZRAŽANJE GENOV

4.2.1. Izolacija RNA

Uspešnost izolacije RNA smo preverjali z inštrumentom NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies) in z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 11). Izolacija RNA je z napredovanjem rastne sezone postajala težja zaradi vse večje prisotnosti sekundarnih metabolitov, ki motijo izolacijo.



Slika 11: Izolacija RNA iz vzorcev listnih žil vinske trte vzorčenih med rastno sezono v vinogradu v Straži, vizualizirane pod UV svetlobo po agarozni gelski elektroforezi.

Figure 11: RNA extraction from leaf veins of grapevine plants sampled in vineyard in Straža during the growing season. As visualised under UV-light after agarose gel electrophoresis.

M = označevalec velikosti DNA, ostalo so vzorci RNA tretirani z DNazo. Zgornja lisa pri vzorcih predstavlja 23S rRNA, spodnja lisa pa 18S rRNA. Vzorci so razdeljeni v štiri sklope, glede na mesec vzorčenja: zgoraj levo so vzorci vzorčeni maja, zgoraj desno so vzorci vzorčeni junija, spodaj levo so vzorci vzorčeni julija in spodaj desno so vzorci vzorčeni avgusta 2011.

4.2.2. Stabilnost izražanja referenčnih genov

Z uporabo programa NormFinder (Andersen in sod., 2004) smo najprej preverili stabilnost izražanja kontrolnih genov *18S*, *COX* in *UBICF*. Dobri kontrolni geni so tisti, katerih

izražanje se pri različnih pogojih in stanjih ne spreminja. Rezultat programa je preglednica z vrednostmi stabilnosti za posamezne gene. Manjša kot je vrednost, bolj stabilno je izražanje gena. Kot najbolj stabilen gen se je pokazal gen za *18S* (Preglednica 13) in na podlagi rezultatov smo se odločili, da za normalizacijo izražanja tarčnih genov v nadaljevanju uporabimo kontrolna gena *18S* in *COX*.

Preglednica 13: Ocena stabilnosti izražanja genov.

Table 13: Evaluation of reference genes stability.

Ime gena	Vrednost stabilnosti	Standardna napaka
<i>UBICF</i>	0.388	0.029
<i>COX</i>	0.247	0.026
<i>18S rRNA</i>	0.051	0.093

4.2.3. Statistične analiza izražanja genov

Analizo izražanja genov smo izvedli na vzorcih vinske trte, okuženih s fitoplazmo FDF. Spremljali smo izražanje genov med rastno sezono v listnih žilah zdravih in s FDF okuženih rastlin, vzorčenih v vinogradu v Izoli in v vinogradu v Straži (Preglednica 1).

Z metodo dvosmerna ANOVA smo ugotavljali ali je izražanje posameznih genov odvisno od dveh dejavnikov, okužbe s FDF in časa ter ali obstaja interakcija med obema dejavnikoma, ki vpliva na izražanje genov (Preglednica 14).

Preglednica 14: Rezultati analize dvosmerna ANOVA.

Table 14: Two-way ANOVA results.

Preglednica vključuje p-vrednosti za prikaz statistično značilnih razlik v izražanju posameznega gena tekom rastne sezone (dejavnik Čas), v izražanju gena med zdravimi in s FDF okuženimi rastlinami vinske trte (dejavnik FDF), ter statistično značilno izražanje posameznega gena zaradi interakcije obeh dejavnikov. Z zvezdicami so označene statistično značilne vrednosti: * ($p < 0,05$).

GEN	VINOGRAD V IZOLI			VINOGRAD V STRAŽI		
	Čas	FDF	interakcija Čas:FDF	Čas	FDF	interakcija Čas:FDF
<i>VvGLC2</i>	0.58084	0.01494*	0.26911	0.28043	0.10556	0.63822
<i>VvAGPL</i>	0.38095	0.01126*	0.00803*	0.01427*	0.00289*	0.00175*
<i>VvSUSY</i>	5.76407E-08*	0.01439*	0.03964*	1.83313E-10*	0.00609*	0.0014*
<i>VvINV2</i>	0.0166*	0.05149	0.28657	4.78518E-05*	0.00111*	0.02894*
<i>VvSWEET1</i>	0.07478	0.71668	0.25819	0.03441*	0.38999	0.39759
<i>VvSWEET10-15</i>	2.81927E-06*	0.00515*	0.00423*	9.45449E-08*	0.48187	0.9148
<i>VvSWEET16/17</i>	0.44041	0.99735	0.43688	5.29669E-06*	0.000102*	0.60556

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 14: Rezultati analize dvosmerna ANOVA

GEN	VINOGRAD V IZOLI			VINOGRAD V STRAŽI		
	Čas	Fdf	interakcija Čas:Fdf	Čas	Fdf	interakcija Čas:Fdf
<i>VvDMR6</i>	0.0337*	2.26099E-06*	0.00912*	0.00188*	0.00151*	0.30805
<i>VvF3H1</i>	5.60871E-06*	0.04975*	0.0273	1.67934E-08*	0.01402*	0.00103*
<i>VvF3H2</i>	1.96484E-05*	0.32246	0.49184	1.78029E-05*	0.04853*	0.05766
<i>VvAPX</i>	0.00015241*	0.00395*	0.73616	0.28986	0.26414	0.86988
<i>VvGPX</i>	1.36231E-06*	0.44692	0.50154	0.00393*	0.2128	0.7125
<i>VvOLP</i>	0.09667	2.58418E-05*	0.04235*	0.000220121*	0.00203*	0.23174
<i>VvHP</i>	0.49247	0.06866	0.13754	0.0012*	0.00133*	0.01204*

Naredili smo tudi ne-parametrični test Mann-Whitney, ki je pokazal kateri geni se v posamezni časovni točki v posameznem vinogradu statistično značilno različno izražajo v okuženih in zdravih rastlinah (Preglednica 15). V vinogradu v Izoli smo v mesecu maju imeli zelo majhno število zdravih rastlin, zaradi česar je bila statistična obdelava podatkov velikokrat nemogoča.

Preglednica 15: Mann-Whitney neparametrični test.

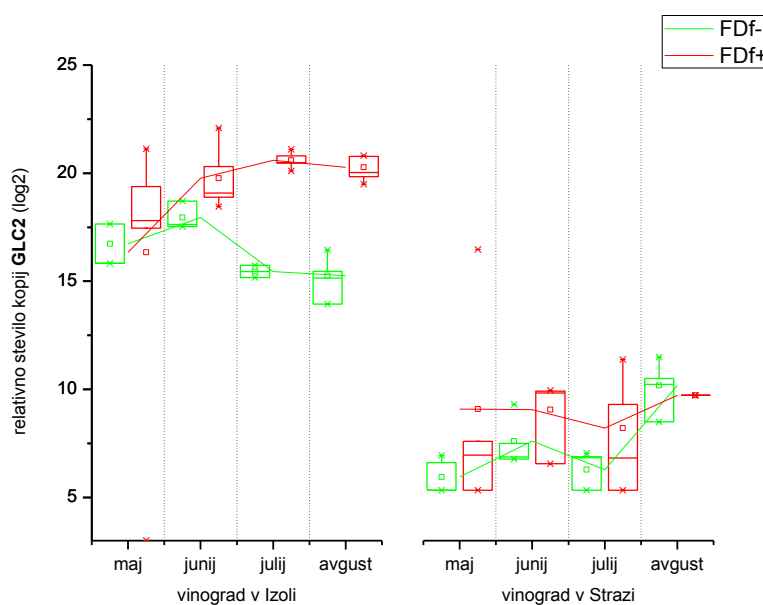
Table 15: Nonparametric Mann-Whitney test.

Preglednica vključuje p-vrednosti za prikaz statistično značilnih razlik v izražanju posameznega gena v posamezni časovni točki med zdravimi in s Fdf okuženimi rastlinami vinske trte. Z zvezdicami so označene statistično značilne vrednosti ($p < 0,05$).

GEN	VINOGRAD V IZOLI				VINOGRAD V STRAŽI			
	maj	junij	julij	avgust	maj	junij	julij	avgust
<i>VvGLC2</i>	0.40466	0.07364	0.03689*	0.01421*	0.12361	0.31232	0.53339	--
<i>VvAGPL</i>	--	--	0.33292	0.02819*	0.74912	0.91511	0.89728	0.03038*
<i>VvSUSY</i>	--	0.56128	--	0.02819*	0.74912	0.69854	0.45555	0.01421*
<i>VvINV2</i>	--	0.56128	0.16452	0.03689*	0.10982	0.74912	0.33736	0.01421*
<i>VvSWEET1</i>	--	0.84645	0.45555	0.02819*	0.06995	0.91511	0.51861	0.7133
<i>VvSWEET10-15</i>	0.08136	--	0.37109	0.02819*	0.85968	1	0.86763	0.7133
<i>VvSWEET16/17</i>	0.84645	0.13604	0.15558	0.02518*	0.06995	0.16581	0.16581	0.06995
<i>VvDMR6</i>	--	0.33292	0.01996*	0.08136	0.03734*	0.31232	0.47049	0.74912
<i>VvF3H1</i>	--	0.84645	--	0.09329	0.59403	0.59403	0.89728	0.02518*
<i>VvF3H2</i>	--	0.56128	0.24528	0.24528	0.59403	0.91511	0.69854	0.01996*
<i>VvAPX</i>	--	--	0.10519	--	0.91511	0.59403	0.90252	0.23304
<i>VvGPX</i>	--	0.81696	0.51861	0.24528	0.04283*	1	0.59403	0.74912
<i>VvOLP</i>	--	0.56128	0.06675	0.01421*	0.40466	0.10982	1	0.24095
<i>VvHP</i>	--	--	0.03038*	0.01421*	0.74912	0.59403	0.11135	0.03689*

Izražanje gena *VvGLC2* se v obeh vinogradih med rastno sezono ni statistično značilno spreminjalo (Preglednica 14, Slika 12). Glede na rezultate dvosmerne ANOVA ima dejavnik okužbe Fdf statistično značilen vpliv na izražanje gena *glc2* le v vinogradu v Izoli (Preglednica 14). Interakcije med obema dejavnikoma ni. Po pregledu posameznih časovnih točk je julija in avgusta le v vinogradu v Izoli statistično značilno večje izražanje gena v okuženih rastlinah (Preglednica 15, Slika 14).

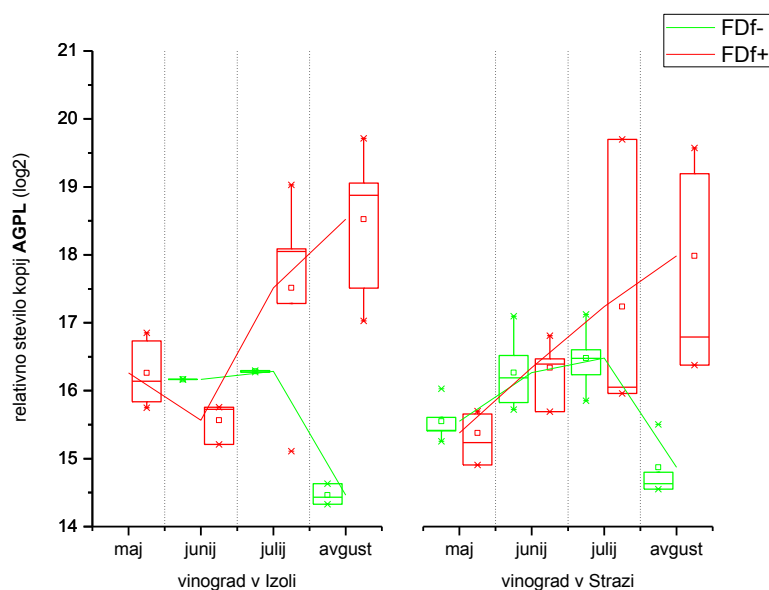
Rezultati dvosmerne ANOVA kažejo, da ima na izražanje gena *VvAGPL* v obeh vinogradih vpliv dejavnik okužbe Fdf, v vinogradu v Straži pa tudi časovni dejavnik. Prav tako je pri obeh vinogradih statistično značilna tudi interakcija med obema dejavnikoma, kjer je časovno izražanje gena statistično značilno drugačno pri zdravih kot pri okuženih rastlinah (Preglednica 14). Pri zdravih rastlinah se izražanje gena do konca rastne sezone avgusta zmanjša, medtem ko pri okuženih rastlinah izražanje gena med rastno sezono narašča (Slika 13). Po pregledu posameznih časovnih točk je avgusta v obeh vinogradih statistično značilno večje izražanje gena v okuženih rastlinah (Preglednica 15, Slika 13).



Slika 12: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvGLC2* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 12: Boxplots showing relative expression of *VvGLC2* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fdf-) in rdeča rastline okužene s Fdf (oznaka Fdf+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (\log_2) zdravih (zelena) in s Fdf okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

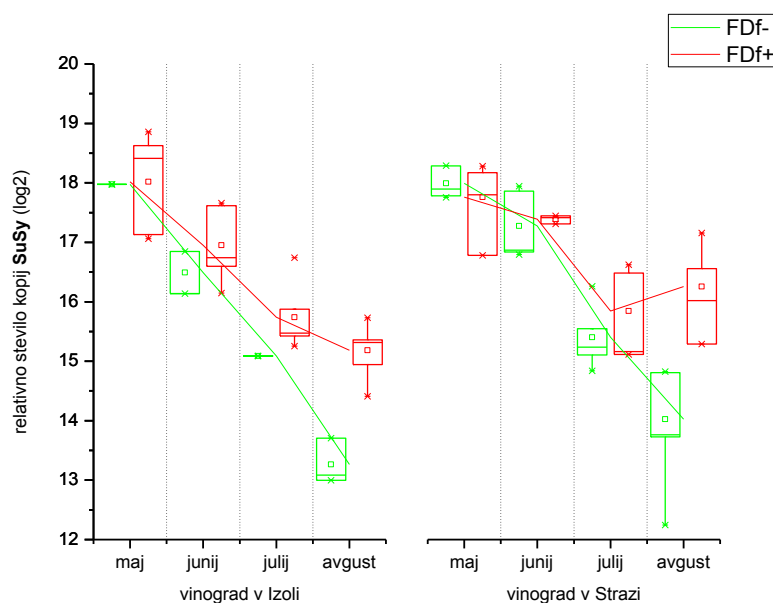


Slika 13: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvAGPL* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 13: Boxplots showing relative expression of *VvAGPL* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka FDF-) in rdeča rastline okužene s FDF (oznaka FDF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FDF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Izražanje gena *VvSUSY* je v obeh vinogradih odvisno tako od dejavnika okužbe FDF kot od dejavnika časa (Preglednica 14). Interakcija med obema dejavnikoma oziroma časovno izražanje gena med zdravimi in okuženimi rastlinami je statistično značilno različno v obeh vinogradih (Preglednica 14). V vinogradu v Izoli se izražanje gena med rastno sezono zmanjšuje tako v zdravih kot v okuženih rastlinah (Slika 14). V vinogradu v Straži izražanje gena med rastno sezono pada v zdravih rastlinah, v okuženih rastlinah pa se izražanje gena od julija do avgusta bistveno ne spremeni (Slika 14). Po pregledu posameznih časovnih točk je avgusta v obeh vinogradih statistično značilno večje izražanje gena v okuženih rastlinah (Preglednica 15, Slika 14).

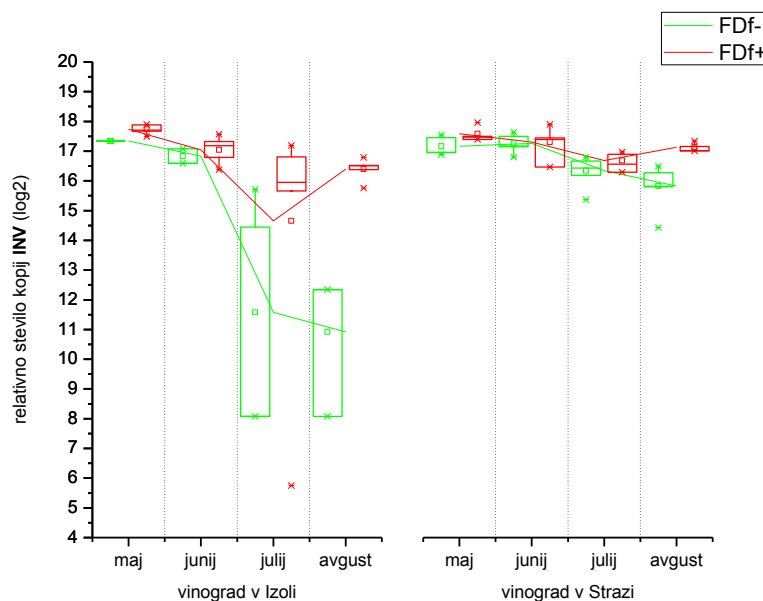


Slika 14: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvSUSY* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 14: Boxplots showing relative expression of *VvSUSY* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fd-) in rdeča rastline okužene s FdF (oznaka FdF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log2) zdravih (zelena) in s FdF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Izražanje gena *VvINV2* je v vinogradu v Straži odvisno tako od dejavnika okužbe FdF kot od dejavnika časa, v vinogradu v Izoli pa le od slednjega (Preglednica 14). Interakcija med obema dejavnikoma je statistično značilno različna le v vinogradu v Straži (Preglednica 14). Izražanje gena v zdravih rastlinah se postopno zmanjšuje med rastno sezono, v okuženih rastlinah pa se izražanje gena od julija do avgusta rahlo poveča (Slika 15). Po pregledu posameznih časovnih točk je avgusta v obeh vinogradih statistično značilno večje izražanje gena v okuženih rastlinah (Preglednica 15, Slika 15).



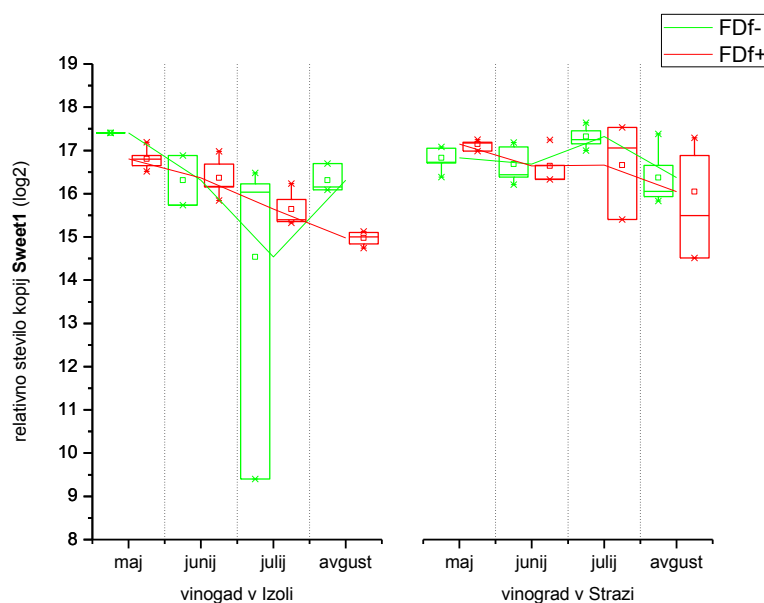
Slika 15: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvINV2* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 15: Boxplots showing relative expression of *VvINV2* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fdf-) in rdeča rastline okužene s Fdf (oznaka Fdf+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s Fdf okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Izražanje gena *VvSWEET1* je, glede na analizo dvosmerne ANOVA, odvisno le od dejavnika časa v vinogradu v Straži (Preglednica 14). Izražanje gena v okuženih rastlinah se postopno zmanjšuje med sezono, izražanje gena v zdravih rastlinah pa niha (Slika 16). Dejavnik okužbe Fdf ni statistično značilno različen, kar pomeni da se izražanje gena v vseh zdravih rastlinah ne razlikuje od izražanja gena v vseh okuženih rastlinah. Kljub temu pa je statistično značilna razlika v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami avgusta v vinogradu v Izoli (Preglednica 15, Slika 16).

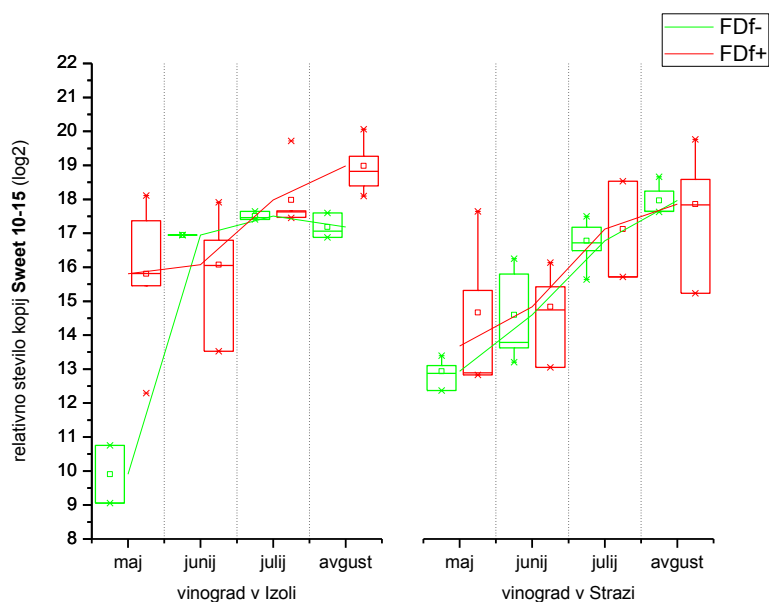
Izražanje gena *VvSWEET10-15* je v vinogradu v Izoli odvisno tako od dejavnika okužbe Fdf kot od dejavnika časa, v vinogradu v Straži pa le od slednjega (Preglednica 14). Časovno izražanje gena med zdravimi in okuženimi rastlinami je statistično značilno različno le v vinogradu v Izoli (Preglednica 14), kjer se izražanje gena od maja do julija zelo poveča pri zdravih rastlinah nato pa se ustali, pri okuženih rastlinah pa opazimo povečano izražanje gena od junija do avgusta (Slika 17). V vinogradu v Straži izražanje gena tako pri zdravih kot pri okuženih vzporedno narašča (Slika 17). Po pregledu posameznih časovnih točk je statistično značilna razlika v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami avgusta v vinogradu v Izoli (Preglednica 15).



Slika 16: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvSWEET1* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 16: Boxplots showing relative expression of *VvSWEET1* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fdf-) in rdeča rastline okužene s FDF (oznaka Fdf+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FDF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

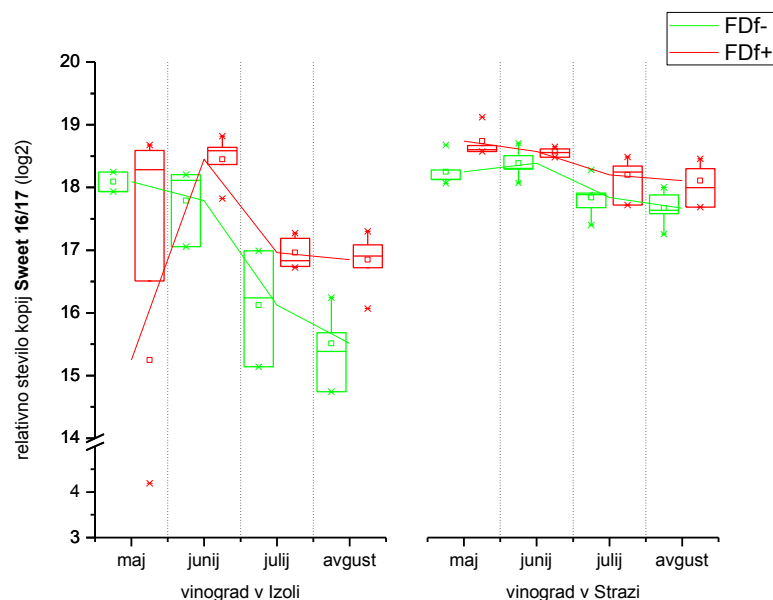


Slika 17: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvSWEET10-15* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 17: Boxplots showing relative expression of *VvSWEET10-15* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fd-) in rdeča rastline okužene s FdF (oznaka FdF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FdF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Izražanje gena *VvSWEET16/17* v vinogradu v Izoli ni odvisno ne od dejavnika časa ne od dejavnika okužbe FdF in med obema dejavnikoma ni statistično značilne interakcije (Preglednica 14). Ne-paralelnost opažena na sliki 18, je posledica velike variabilnosti v izražanju gena med rastlinami. Med rastno sezono se je izražanje gena zmanjševalo tako v zdravih kot v okuženih rastlinah (Slika 18). Avgusta smo opazili statistično značilno večje izražanje gena v okuženih v primerjavi z zdravimi rastlinami (Preglednica 15, Slika 18). Nasprotno pa imata v vinogradu v Straži na izražanje gena vpliv tako dejavnik časa kot dejavnik okužbe FdF (Preglednica 14). Interakcije med obema dejavnikoma ni, saj je časovno izražanje gena pri zdravih in okuženih rastlinah enako in se med rastno sezono zmanjšuje (Slika 18). Kljub temu pa v posameznih časovnih točkah ni nobenih razlik v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami (Preglednica 15).



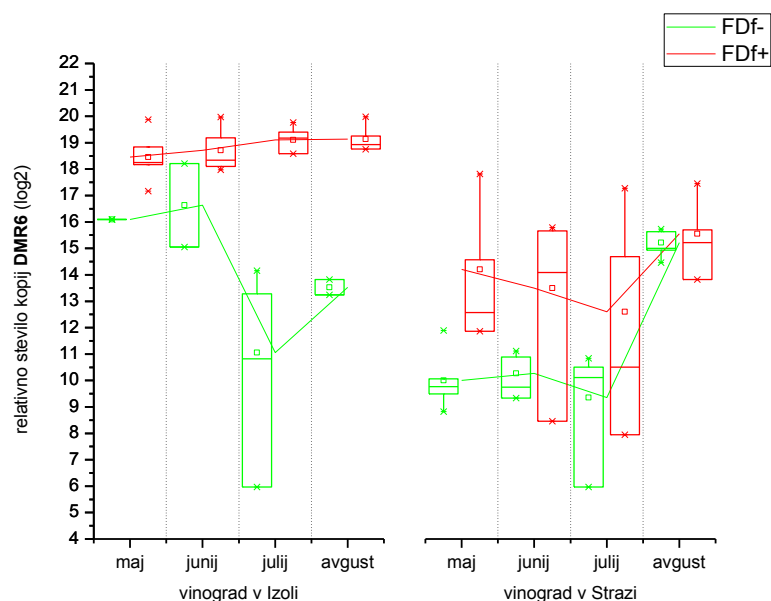
Slika 18: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvSWEET16/17* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 18: Boxplots showing relative expression of *VvSWEET16/17* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fd-) in rdeča rastline okužene s FdF (oznaka FdF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FdF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Rezultati dvosmerne ANOVA kažejo, da imata na izražanje gena *VvDMR6* v obeh vinogradih vpliv tako dejavnik okužbe FdF kot časovni dejavnik (Preglednica 14). Interakcija med obema dejavnikoma je statistično značilno različna le v vinogradu v Izoli, kjer je izražanje gena med rastno sezono v okuženih rastlinah približno konstantno in večje

kot pri zdravih rastlinah, v zdravih rastlinah pa izražanje niha (pade od junija do julija in nato naraste od julija do avgusta) (Slika 19). Enako časovno izražanje gena v zdravih rastlinah opazimo tudi v vinogradu v Straži, pri okuženih rastlinah pa imamo večjo variabilnost v izražanju gena (Slika 19). Po pregledu posameznih časovnih točk je statistično značilna razlika v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami v vinogradu v Izoli julija, v vinogradu v Straži pa meseca maja (Preglednica 15).



Slika 19: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvDMR6* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

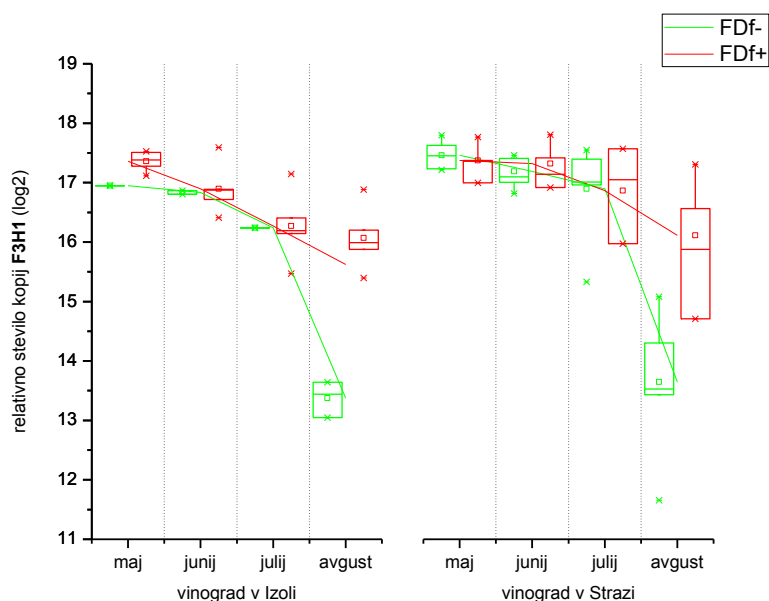
Figure 19: Boxplots showing relative expression of *VvDMR6* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka FDF-) in rdeča rastline okužene s FDF (oznaka FDF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FDF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Izražanje gena *VvF3H1* je v obeh vinogradih odvisno od dejavnika okužbe in od dejavnika časa, v vinogradu v Straži pa med obema dejavnikoma opazimo tudi statistično značilno interakcijo (Preglednica 14, Slika 20). V obeh vinogradih se izražanje gena med rastno sezono zmanjšuje tako v zdravih kot v okuženih rastlinah, padec v izražanju pa je od julija do avgusta večji v zdravih rastlinah v primerjavi z okuženimi (Slika 20). Po pregledu posameznih časovnih točk je statistično značilna razlika v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami avgusta le v vinogradu v Straži (Preglednica 15).

Izražanje gena *VvF3H2* je v obeh vinogradih odvisno od dejavnika časa, v vinogradu v Straži pa tudi od dejavnika okužbe FDF (Preglednica 14). Statistično značilne interakcije med obema dejavnikoma ni. Časovno izražanje gena pri zdravih in okuženih rastlinah je v

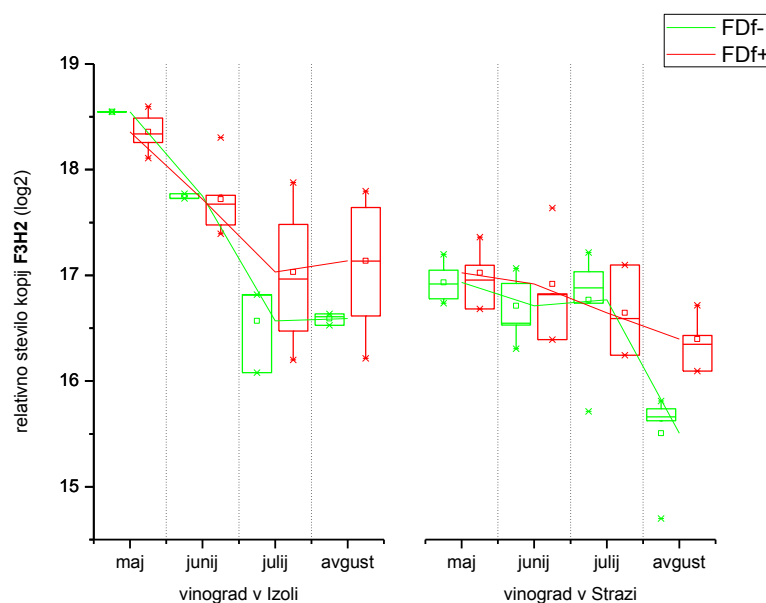
primerjavi s časovnim izražanjem gena *VvF3H1* v vinogradu v Straži podobno, v vinogradu v Izoli pa različno (Slika 20, Slika 21). V vinogradu v Izoli se izražanje gena *VvF3H2* zmanjšuje in se julija ustali. Različno časovno izražanje genov *VvF3H1* in *VvF3H2* v vinogradu v Izoli je lahko posledica večje variabilnosti med rastlinami v slednjem. Po pregledu posameznih časovnih točk je statistično značilna razlika v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami avgusta le v vinogradu v Straži (Preglednica 15).



Slika 20: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvF3H1* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 20: Boxplots showing relative expression of *VvF3H1* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka F3H1-) in rdeča rastline okužene s F3H1 (oznaka F3H1+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log2) zdravih (zelena) in s F3H1 okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

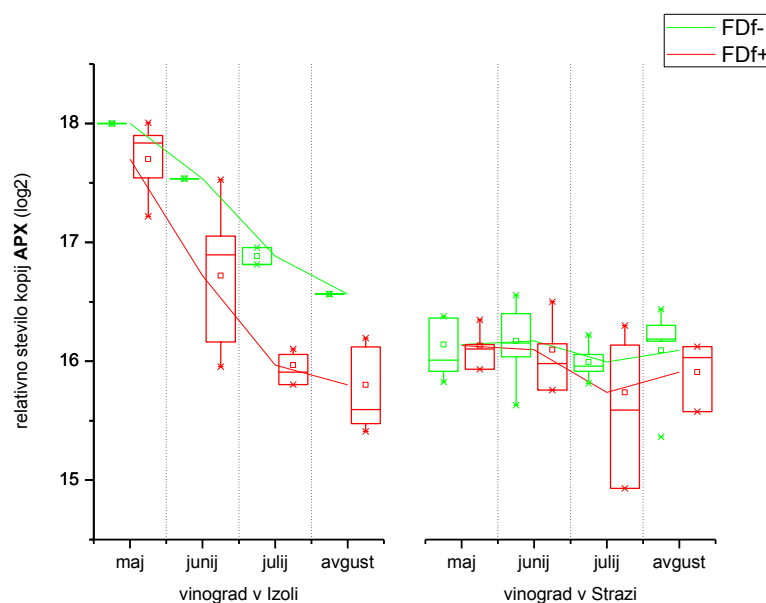


Slika 21: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvF3H2* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 21: Boxplots showing relative expression of *VvF3H2* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka FDF-) in rdeča rastline okužene s FDF (oznaka FDF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log2) zdravih (zelena) in s FDF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

V vinogradu v Straži izražanje gena *VvAPX* ni odvisno ne od dejavnika časa, ne od dejavnika okužbe FDF in med dejavnikoma tudi ni statistično značilne interakcije (Preglednica 14). Izražanje gena v zdravih in okuženih rastlinah je podobno v vseh časovnih točkah in se med sezono ne spreminja (Preglednica 15, Slika 22). V vinogradu v Izoli pa na izražanje gena vpliva tako dejavnik časa kot dejavnik okužbe FDF (Preglednica 14). Časovno izražanje gena je pri zdravih in okuženih rastlinah enako in pada tekom sezone (Preglednica 14, Slika 22). V primerjavi z zdravimi rastlinami je izražanje gena nižje v okuženih rastlinah, vendar zaradi majhnega števila rastlin v nobeni časovni točki razlika ni statistično značilna (Preglednica 15).

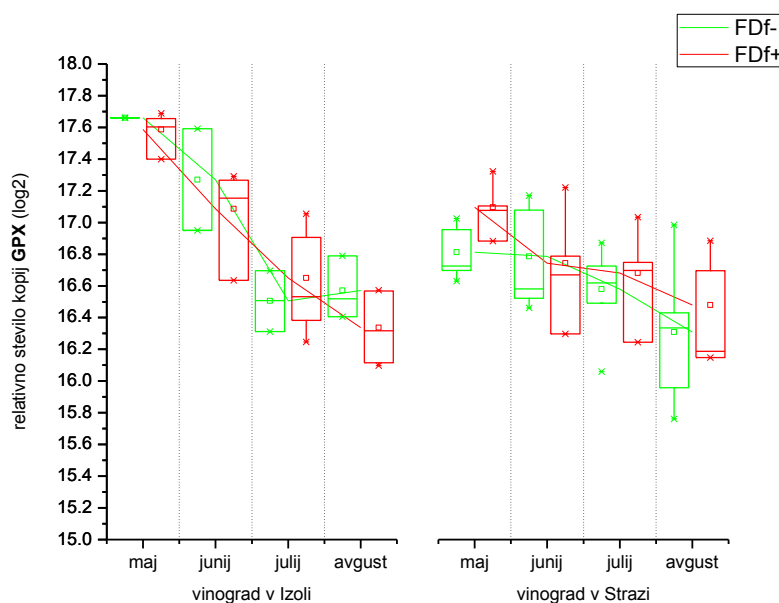


Slika 22: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvAPX* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 22: Boxplots showing relative expression of *VvAPX* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fd-) in rdeča rastline okužene s FdF (oznaka FdF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log2) zdravih (zelena) in s FdF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Izražanje gena *VvGPX* je v obeh vinogradih odvisno le od dejavnika časa (Preglednica 14). in se med sezono zmanjšuje tako v zdravih kot v okuženih rastlinah (Slika 23). Po pregledu posameznih časovnih točk je statistično značilna razlika v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami le maja v vinogradu v Straži (Preglednica 15).

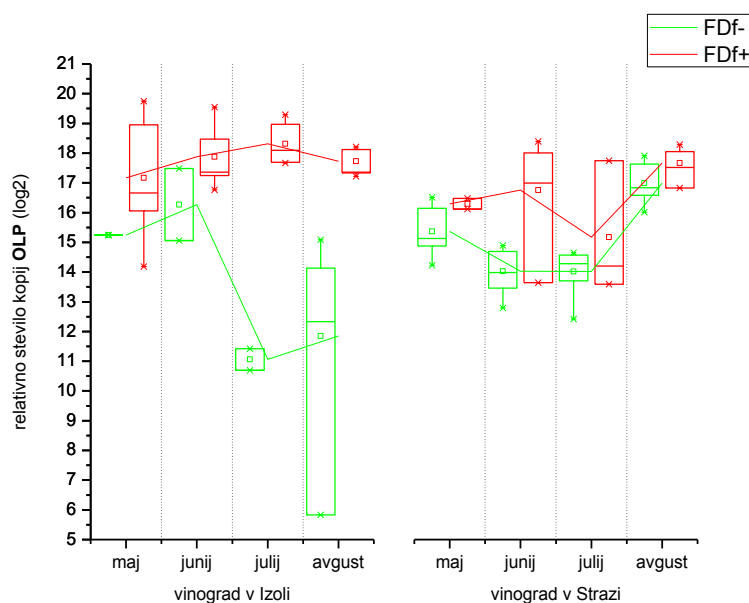


Slika 23: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvGPX* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 23: Boxplots showing relative expression of *VvGPX* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fd-) in rdeča rastline okužene s FdF (oznaka FdF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FdF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Rezultati dvosmerne ANOVA kažejo, da ima na izražanje gena *VvOLP* v obeh vinogradih vpliv dejavnik okužbe FdF, v vinogradu v Straži pa tudi dejavnik časa (Preglednica 14). Interakcija med obema dejavnikoma je statistično značilno različna le v vinogradu v Izoli (Preglednica 14), kjer izražanje gena v zdravih rastlinah pade do meseca julija, nato pa zopet naraste, v okuženih rastlinah pa je trend ravno nasproten (Slika 24). Trend časovnega izražanja gena pri zdravih rastlinah je v vinogradu v Straži podoben kot v vinogradu v Izoli, ni pa tudi statistično značilno različen od časovnega izražanja gena v okuženih rastlinah v vinogradu v Stražu (ni interakcije med obema dejavnikoma) (Preglednica 14, Slika 24). Izražanje gena je v obeh vinogradih v vseh časovnih točkah višje v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 24), vendar pa je razlika statistično značilno različna le avgusta v vinogradu v Izoli (Preglednica 15).

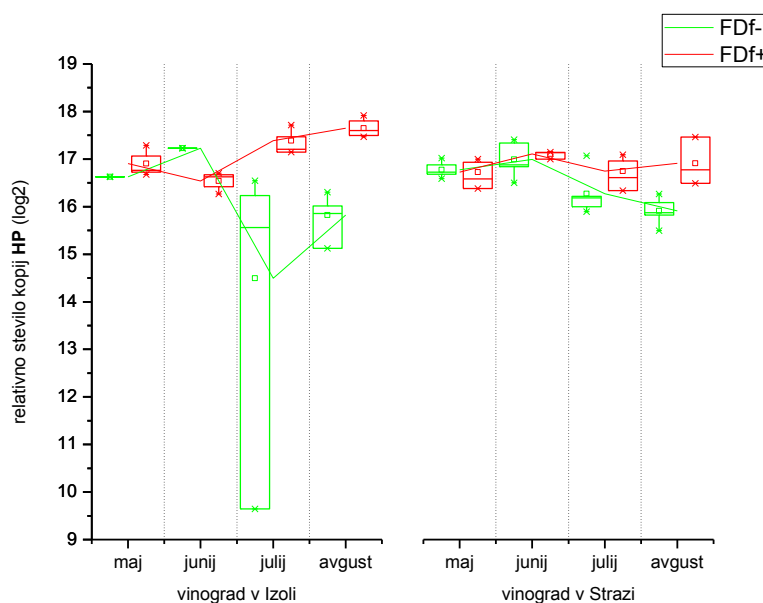


Slika 24: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvOLP* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 24: Boxplots showing relative expression of *VvOLP* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka FDF-) in rdeča rastline okužene s FDF (oznaka FDF+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FDF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

Izražanje gena *VvHP* v vinogradu v Izoli ni odvisno ne od faktorja časa, ne od dejavnika okužbe FDF in med obema dejavnikoma tudi ni značilne interakcije (Preglednica 14). Nasprotno pa je izražanje gena v vinogradu v Straži odvisno od obeh dejavnikov in tudi časovno izražanje gena je statistično značilno različno med zdravimi in okuženimi rastlinami (Preglednica 14, Slika 25). V zdravih rastlinah izražanje gena pada od meseca junija naprej, v okuženih rastlinah pa zaznamo od junija do julija rahel padec nato pa se avgusta izražanje gena približa nazaj junijskim vrednostim. V vinogradu v Izoli je trend časovnega izražanja gena različen kot v vinogradu v Straži, saj se izražanje gena v okuženih rastlinah zmanjšuje od maja do junija in nato narašča do avgusta, pri zdravih rastlinah pa opazimo nihanje skozi mesece (naraščanje od maja do junija, padec od junija do julija in ponovno naraščanje od julija do avgusta) (Slika 25). Po pregledu posameznih časovnih točk je statistično značilna razlika v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami avgusta v obeh vinogradih ter julija v vinogradu v Izoli (Preglednica 15).



Slika 25: Grafikoni kvantilov za izražanje gena *VvHP* v vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 25: Boxplots showing relative expression of *VvHP* gene in grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

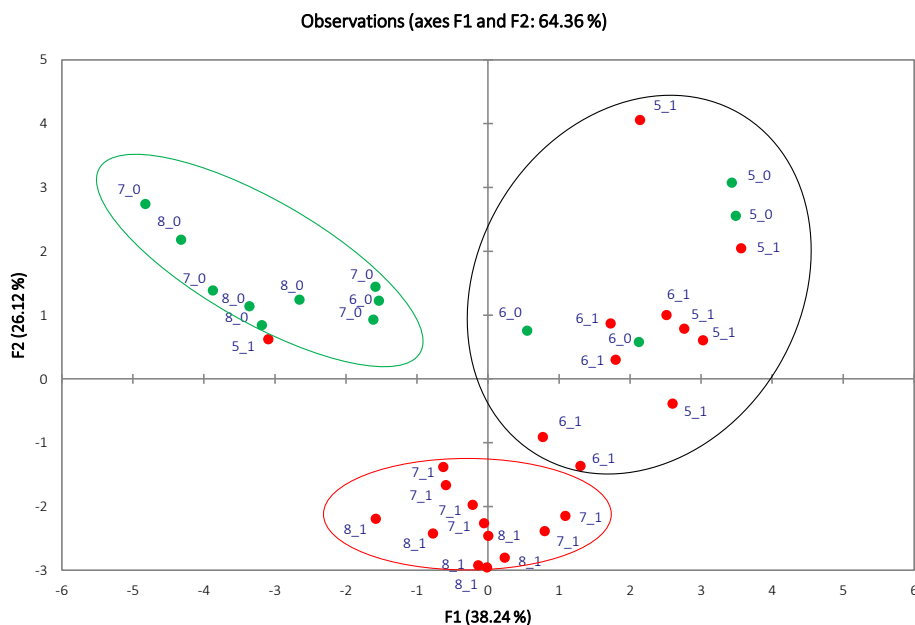
Zelena barva označuje zdrave rastline (oznaka Fdf-) in rdeča rastline okužene s FDF (oznaka Fdf+). Linearna črta povezuje povprečna relativna števila kopij (log₂) zdravih (zelena) in s FDF okuženih (rdeča) rastlin med rastno sezono. Zvezdice označujejo minimalne in maksimalne vrednosti.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, ali lahko na osnovi relativne kvantifikacije izbranih 14 genov ločimo rastline glede na njihov status okužbe s FDF (okužene in zdrave rastline) in glede na čas vzorčenja (maj-avgust), ter kateri geni najbolj vplivajo na razdelitev. Rezultate smo analizirali z metodo glavnih komponent (PCA).

Naredili smo analizo PCA za vzorce iz vinograda v Izoli (Slika 26). Odstotek variabilnosti, ki jo opisujeta prvi dve komponenti je 64,36 %, skupaj s tretjo komponento pa 75,99 %. Opazili smo ločevanje vzorcev v 3 skupine. V eni skupini so vzorci zdravih rastlin, vzorčenih poleti (julija in avgusta), v drugi skupini so vzorci okuženih rastlin prav tako vzorčeni poleti, v tretji skupini pa so vzorci tako zdravih kot okuženih rastlin vzorčenih spomladi (maja in junija), pred pojavom bolezenskih znamenj. Le en okužen vzorec vzorčen maja se je razvrstil k zdravim rastlinam vzorčenih poleti.

Iz grafa PCA za spremenljivke (Slika 27) lahko vidimo, kateri so tisti geni, ki na podlagi svojega izražanja v vseh vzorcih, največ vplivajo na ločevanje vzorcev. Največji prispevek na postavitev prve komponente imajo geni *VvSUSY*, *VvF3H1*, *VvF3H2*, *VvINV* in *VvGPX*, na drugo komponento pa najbolj vplivajo geni *VvAPX*, *VvGLC2*, *VvAGPL* in *VvSWEET10*-

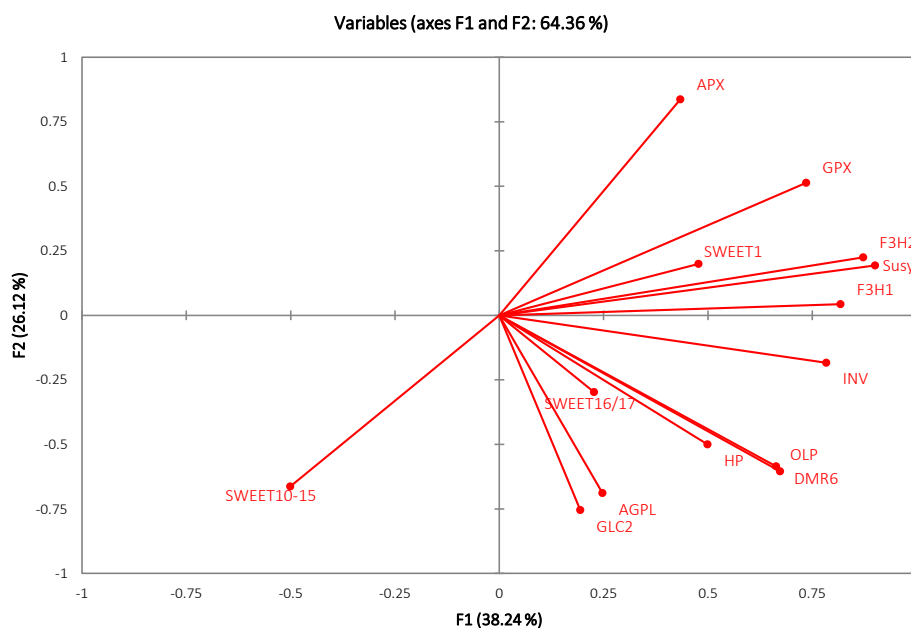
15. Gen *VvAPX* je statistično značilno ($p < 0,01$) pozitivno koreliran z genom *VvGPX* in negativno koreliran z geni *VvSWEET10-15*, *VvAGPL* in *VvGLC2*. Statistično značilno so med seboj pozitivno korelirani geni *VvDMR6*, *VvOLP* in *VvHP* ter v drugi skupini geni *VvSUSY*, *VvF3H2*, *VvF3H1*, *VvINV* in *VvGPX*.



Slika 26: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na transkriptomskih podatkih vzorcev iz vinograda v Izoli.

Figure 26: Sample principal component analysis (PCA) of transcriptomic data on grapevine samples from vineyard in Izola.

Na razsevnem diagramu je prikazana komponenta 1 (F1) v odvisnosti od komponente 2 (F2). Podatki o izražanju genov so transformirani z \log_2 . Vzorci so označeni z mesecem vzorčenja (leva številka) in z zdravstvenim statusom (desna številka), kjer so zdrave rastline označene z vrednostjo 0, okužene pa z 1. Krožnice ponazarjajo približno lego vsake izmed skupin vzorcev.



Slika 27: Analiza glavnih komponent 14 genov na vzorcih vinske trte iz vinograda v Izoli.

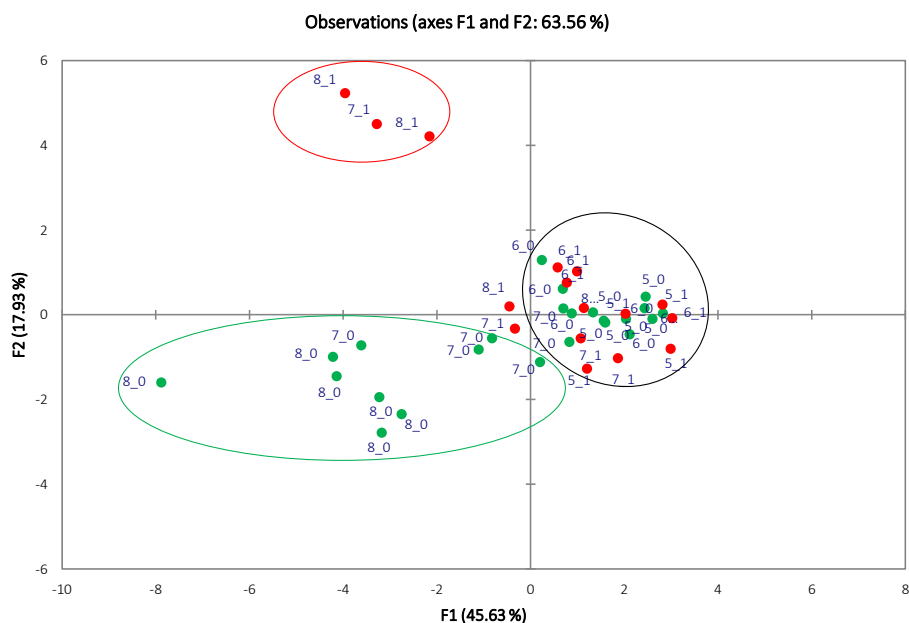
Figure 27: Principal component analysis on 14 genes on grapevine samples from the vineyard in Izola.

Na razsevnom diagramu je prikazana komponenta 1 (F1) v odvisnosti od komponente 2 (F2). Podatki o izražanju genov so transformirani z \log_2 . Dolžina vektorja izraža variabilnost oziroma prispevek gena k formaciji glavne komponente (faktorja).

Okuženi in zdravi vzorci vzorčeni poleti se najbolj ločijo po drugi komponenti, kjer je izražanje genov *VvGLC2*, *VvAGPL* in *VvSWEET10-15* avgusta statistično značilno višje v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Preglednica 15, Slika 12, Slika 13 in Slika 17). Izražanje gena *VvAPX* je nižje v okuženih v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 22) zato tudi negativna korelacija gena z ostalimi.

Spomladanski in poletni vzorci se najbolj ločijo po prvi komponenti, kjer izražanje genov *VvSUSY*, *VvINV*, *VvF3H1*, *F3H2* in *VvGPX* med rastno sezono pada (Slika 14, Slika 15, Slika 20, Slika 21 in Slika 23). Glede na rezultate dvosmerne ANOVA je izražanje teh genov statistično značilno odvisno od faktorja časa (Preglednica 14).

Rezultat analize PCA za vzorce iz vinograda v Straži je na Slika 28. Odstotek variabilnosti, ki jo opisujeta prvi dve komponenti je 63,56 %, skupaj s tretjo komponento pa 79,7 %. Tudi tukaj bi lahko rekli, da se vzorci ločijo v 3 skupine na enak način kot vzorci iz vinograda v Izoli (zdrave rastline vzorčene poleti, okužene rastline vzorčene poleti in rastline vzorčene spomladi). Vendar pa je ločevanje slabše saj imamo večje število rastlin, ki se razporedijo drugače. To je lahko posledica dejstva, da dve okuženi rastlini avgusta nista več kazali bolezenskih znamenj na listih, pridelka pa kljub vsemu ni bilo. Po podrobnejšem pregledu vzorcev, ti dve rastlini nista vključeni pri ostalih okuženih rastlinah vzorčenih poleti.



Slika 28: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na transkriptomskih podatkih vzorcev iz vinograda v Straži.

Figure 28: Sample principal component analysis (PCA) of transcriptomic data on grapevine samples from vineyard in Straža.

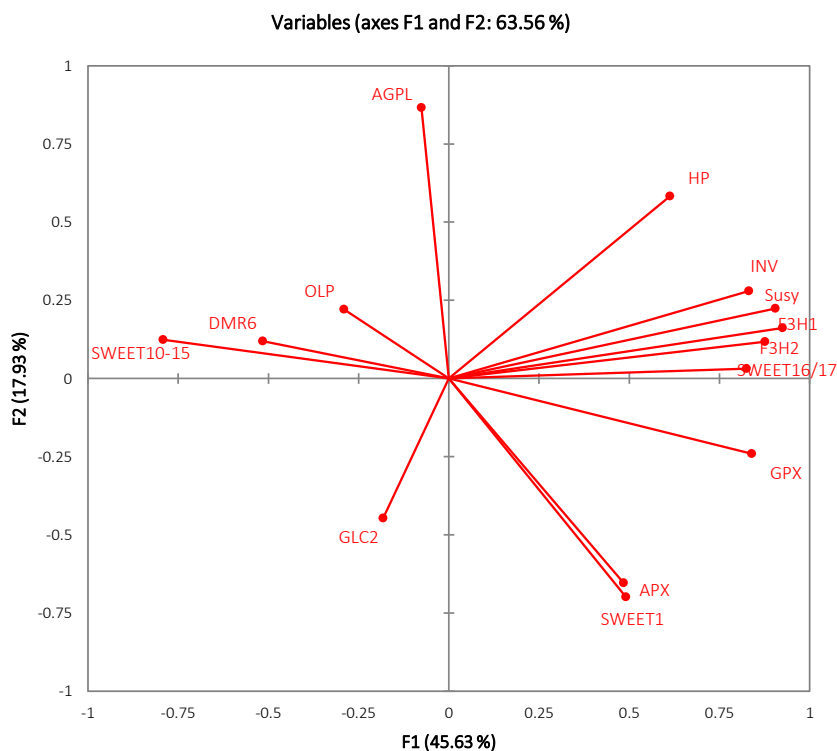
Na razsevnem diagramu je prikazana komponenta 1 (F1) v odvisnosti od komponente 2 (F2). Podatki o izražanju genov so transformirani z \log_2 . Vzorci so označeni z mesecem vzorčenja (leva številka) in z zdravstvenim statusom (desna številka), kjer so zdrave rastline označene z vrednostjo 0, okužene pa z 1. Krožnice ponazarjajo približno lego vsake izmed skupin vzorcev.

Glede na oddaljenost lege gena od središča koordinatnega sistema, nam je analiza PCA za gene (Slika 29) povedala, kateri so tisti geni, ki na podlagi svojega izražanja v vseh vzorcih iz vinograda v Straži vplivajo največ na njihovo razporejanje. Največji prispevek na postavitev prve komponente imajo geni *VvF3H1*, *VvSUSY*, *VvF3H2*, *VvGPX* in *VvINV*, na drugo komponento pa najbolj vplivajo geni *VvAGPL*, *VvSWEET1*, *VvAPX*, *VvHP* in *VvGLC2*. Gen *apx* je statistično značilno ($p < 0,01$) negativno koreliran z genom *VvAGPL* in pozitivno koreliran z genom *VvSWEET1* in *VvGPX*. Statistično značilno so med seboj pozitivno korelirani geni *VvDMR6*, *VvOLP*, *VvSWEET10-15* in *VvGLC2* ter v drugi skupini geni *VvSUSY*, *VvF3H2*, *VvF3H1*, *VvSWEET16/17* in *VvINV*.

Okuženi in zdravi vzorci vzorčeni poleti se najbolj ločijo po drugi komponenti, kjer je izražanje gena *VvAGPL* avgusta statistično značilno višje v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Preglednica 15, Slika 13).

Spomladanski in poletni vzorci se najbolj ločijo po prvi komponenti, kjer izražanje genov *VvSUSY*, *VvINV*, *VvF3H1*, *VvF3H2* in *VvGPX* v času rastne sezone pada (Slika 14, Slika

15, Slika 20, Slika 21 in Slika 23). Glede na rezultate dvosmerne ANOVA je izražanje teh genov statistično značilno odvisno od faktorja časa (Preglednica 14).



Slika 29: Analiza glavnih komponent 14 genov na vzorcih vinske trte iz vinograda v Straži.

Figure 29: Principal component analysis on 14 genes on grapevine samples from the vineyard in Straža.

Na razsevnem diagramu je prikazana komponenta 1 (F1) v odvisnosti od komponente 2 (F2). Podatki o izražanju genov so transformirani z \log_2 . Dolžina vektorja izraža variabilnost oziroma prispevek gena k formaciji glavne komponente (faktorja).

4.3. METABOLOMIKA

Metabolomsko analizo smo izvedli na vzorcih rastlin vinske trte sorte chardonnay okužene s fitoplazmo Bnf (vinograd v Vipolžah) in na vzorcih rastlin vinske trte sorte modra frankinja okužene s fitoplazmo Fdf (vinograd v Straži) (Preglednica 1). Pri obeh interakcijah smo iskali razlike v vsebnosti in količini metabolitov v listnih žilah med zdravimi in s posamezno fitoplazmo okuženimi rastlinami. Primerjali smo tudi vsebnost in količino metabolitov v zdravih rastlinah vinske trte obeh sort (Preglednica 16).

Preglednica 16: Seznam identificiranih metabolitov, katerih vrednosti se statistično značilno razlikujejo med zdravimi in okuženimi vzorci trte v posamezni interakciji oziroma med zdravimi rastlinami različnih sort vinske trte.

Table 16: List of components which are statistically different in healthy and infected grapevine leaves in individual interaction or between healthy plants of different grapevine cultivar.

Oznake t_r -retencijski čas, m/z-ion za kvantifikacijo, RI-retencijski indeks, vprašaj pred imenom pa označuje le morebitno identifikacijo. Zdrave/Fdf vrednosti predstavljajo razmerje med količino metabolita med zdravimi in s Fdf okuženimi rastlinami, zdrave/Bnf vrednosti pa razmerje med količino metabolita med zdravimi in z Bnf okuženimi rastlinami. Vrednosti frankinja/chardonnay predstavljajo razmerje med količino metabolita med sortama modra frankinja in chardonnay v zdravih rastlinah. Količina metabolita je predstavljena z normalizirano vrednostjo faktorja odziva. Samo obarvana razmerja so statistično značilno različna med zdravimi in okuženimi rastlinami. Zelena barva označuje večjo količino metabolita pri zdravih, oranžna pa pri okuženih rastlinah. Vijolična barva označuje višjo količino metabolita v rastlinah sorte modra frankinja, modra barva pa višjo količino metabolita v rastlinah sorte chardonnay.

Ime komponente	m/z	tr	RI	Interakcija frankinja: Zdrave/ Fdf	Interakcija chardonnay: Zdrave/ Bnf	Zdrave: frankinja/ chardonnay
2-oksoglutarat	288	22,41	1589	0,4149	0,9904	0,588882
citrat	273	27	1843,4	0,8362	0,6295	1,140501
malat	335	20,68	1506	0,7105	0,6838	0,950312
sukcinat	247	16,58	1323,9	0,6735	0,6881	0,961193
piruvat	174	9,34	1066,7	0,2463	1,1305	0,377678
citramalat	247	20,3	1487,9	0,6100	1,4542	0,656323
aspartat (2TMS)	160	19,09	1430,6	0,5676	0,3180	1,389839
beta-alanin	248	19,2	1435	0,4416	0,9426	0,628636
glutamin	156	26,05	1786,7	2,2468378	/	/
serin (2TMS)	219	15,21	1268,7	0,6655	1,1652	0,75063
treonin (2TMS)	130	16,18	1308	0,6396	0,4968	1,118789
valin (2TMS)	144	14,13	1225,9	0,6605	0,5362	1,090441
leucin (2TMS)	158	15,62	1285,6	0,5809	0,3448	1,333353
fenilalanin (2TMS)	192	23,27	1635,7	0,4575	/	/
katehin	355	41,74	2917	0,6061	0,3827	1,276537

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 16: Seznam identificiranih metabolitov, katerih vrednosti se statistično značilno razlikujejo med zdravimi in okuženimi vzorci trte v posamezni interakciji oziroma med zdravimi rastlinami različnih sort vinske trte.

Ime komponente	m/z	tr	RI	Interakcija frankinja: Zdrave/ FDF	Interakcija chardonnay: Zdrave/ BNF	Zdrave: frankinja/ chardonnay
epikatehin	355	41,46	2892,5	0,4778	0,3466	1,169006
neoklorgena kislina	345	45,26	3247,3	0,9196	/	/
flavonoid 1	559	43,78	3105,5	1,3579	0,4702	1,707857
fruktoza	189	28,1	1910	0,8159	0,5205	1,288654
glukoza	233	28,53	1935,2	0,8414	0,4077	1,437904
?rafinoza	437	47,62	3489,1	0,4702	0,5791	0,838977
galaktinol	217	43,29	3059,1	1,3519	0,6274	1,442211
galaktoza/manoza	318	28,38	1926,7	0,6884	0,3072	1,603467
glikolat	177	9,93	1085,5	1,0494	/	/
maltotrioza	361	48,45	3576	0,7430	0,3040	1,689109
?fukoza/ramnoza 1	160	25,17	1739,6	0,6764	0,5670	1,071057
?fukoza/ramnoza 2	160	25,3	1746	0,9863	0,5640	1,322144
?fukoza/ramnoza 3	160	25,4	1751,8	0,7100	0,4223	1,31717
disaharid 1	204	39,47	2720,8	1,4086	1,4735	1,008558
disaharid 2	204	39,59	2730,8	1,3232	1,8832	0,910171
disaharid 3	204	39,74	2743	2,5000	1,8739	1,143053
disaharid 7	361	40,49	2805,5	0,6132	0,5531	1,023522
disaharid 8	204	40,65	2819,3	0,7239	0,5601	1,122527
disaharid 10	297	41,06	2856,1	0,2773	0,5280	0,600506
fruktoza-6-P	315/387	34,86	2360	0,5732	0,3380	1,340314
heksoza-6-P	315/388	35,03	2372	0,5701	0,3616	1,275592
heksoza-6-P	315/389	35,27	2389	0,7113	0,3682	1,442558
hidroksilamin	133	11,12	1123,6	0,911645	/	/
aldopentoza 1	307	24,02	1676,5	0,8601	0,3464	1,672743
aldopentoza 2	307	24,2	1686,2	0,7465	0,3291	1,601867
aldopentoza 3	307	24,31	1692,5	0,6885	0,4611	1,223936
eritronska kislina	292	21,92	1566,5	0,9795	2,9926	0,707252
ribonska kislina	333	25,96	1782,8	0,5216	0,6768	0,825883
?vinska kislina	423	23,86	1669,5	1,6096	0,5699	1,632659
dehidroaskorbat	157	27,45	1870,2	0,9058	1,3677	0,841047
piroglutamat	258/156	21,22	1532,6	0,5241	0,3859	1,156825
etanolamin	174	15,42	1277,5	0,5077	1,2923	0,605633
glicerol	218	15,81	1292	0,5783	0,7273	0,850517
?glicerofosfoglicerol	445	33,1	2234	0,2747	/	/
glicerat	117	17,15	1347,2	1,1081	1,5636	0,888862
salicilna kislina	267	20,99	1519,6	0,0761512	/	/
salicilna kislina-glukopiranozid	267	38,25	2618,6	0,1328	0,0388	2,722869
butanojska kislina-4-amino	100	21,35	1538,8	/	0,8450	/
2,4-dihidroksi-butanojska kislina	103	19,03	1426,8	0,6205	1,3424	0,682124
eritronska kislina 1,4-lakton	103	19,32	1441,6	1,4465	2,0947	1,452565

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 16: Seznam identificiranih metabolitov, katerih vrednosti se statistično značilno razlikujejo med zdravimi in okuženimi vzorci trte v posamezni interakciji oziroma med zdravimi rastlinami različnih sort vinske trte.

Ime komponente	m/z	tr	RI	Interakcija frankinja: Zdrave/ FDF	Interakcija chardonnay: Zdrave/ BNF	Zdrave: frankinja/ chardonnay
malonska kislina	233	13,87	1214,5	0,5703	/	/
palmitinska kislina	313	30,28	2044,8	2,3538519	/	/
pentahidroksiheksanojska kislina 2	292	30,14	2035	1,2596	/	/
pentahidroksiheksanojska kislina 3	277	30,45	2056	1,6601	0,9069782	1,303015
pentahidroksiheksanojska kislina 4	333	30,86	2083	1,4670	0,2607	2,634743
pentahidroksiheksanojska kislina-1,4-lakton	361	28,2	1914,4	1,3103	1,0257	1,124838
pentoza alkohol 1	307	25,16	1738	0,825078	/	/
pentoza alkohol 2	189	25,46	1755,6	1,0674	1,6117	0,86466
pentoza alkohol 3	307	25,36	1749,7	/	0,9271	/
?2-metil-1,2-propandiol	292	18,6	1406	0,3850	1,0167	0,630999
2-metil1,3-butandiol	306	18,23	1390	0,5727	1,4212	0,635785
?lavrinska kislina	257	23,6	1653	1,0540314	/	/
?ketoheksoza	217	27,6	1879,3	0,2317347	/	/
?nonanojska kislina	215	17,56	1363,5	0,8491421	/	/
?2-ketooktanojska kislina	287	19,85	1467	0,5375021	/	/

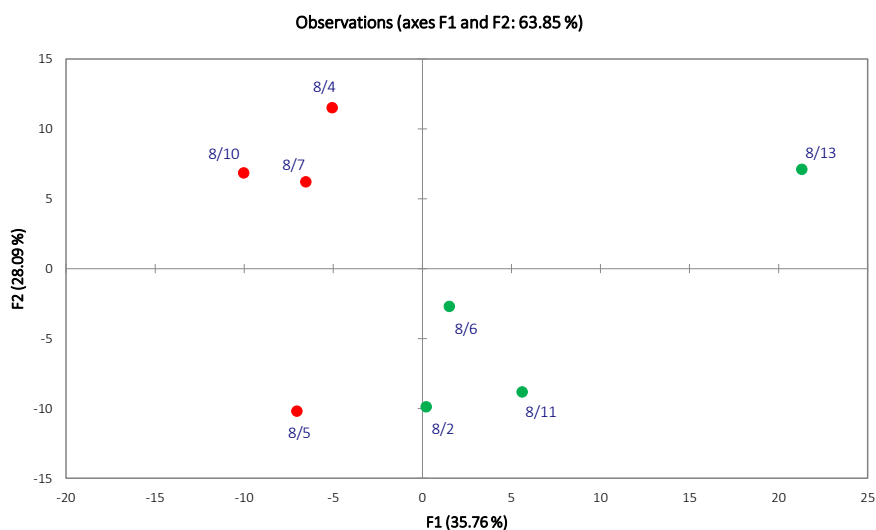
4.3.1. Interakcija trte sorte modra frankinja s FDF

Po obdelavi podatkov smo določili 247 komponent, identificirali pa smo jih 58. Velikokrat sicer nismo mogli nedvoumno identificirati posamezne komponente, lahko pa smo določili v katero skupino spada (na primer da je disaharid, heksoza-6-fosfat in podobno). S studentovim t-testom smo določili 41 komponent, katerih količina se statistično značilno ($p < 0.05$) razlikuje med zdravimi in okuženimi rastlinami (Preglednica 16). Med njimi je šest aminokislin, katerih količina je statistično značilno višja v okuženih v primerjavi z zdravimi rastlinami. Prav tako je v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi statistično značilno višja vsebnost fruktoze-6-fosfata in ostalih dveh heksoz-6-fosfat, nižja pa je vsebnost penta-hidroksi-heksanojskih kislin. Vsebnost dveh metabolitov, 2-oksoglutarat in sukcinat, vključenih v cikel citronske kisline je višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi. Vsebnost metabolitov etanolamina, glicerola in glicero-fosfoglicerola, ki so vključeni v metabolizem lipidov, je prav tako višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi.

Rezultate smo analizirali tudi z metodo PCA, kjer smo želeli ugotoviti ali se na podlagi metabolnega odtisa rastline lahko ločijo glede na njihov zdravstveni status (Slika 30). Odstotek variabilnosti, ki jo opisujeta prvi dve PCA komponenti je 63,85 %, skupaj s tretjo

komponento pa 77,49 %. Opazili smo, da se zdrave in okužene rastline med sabo lepo ločijo glede na prvo komponento.

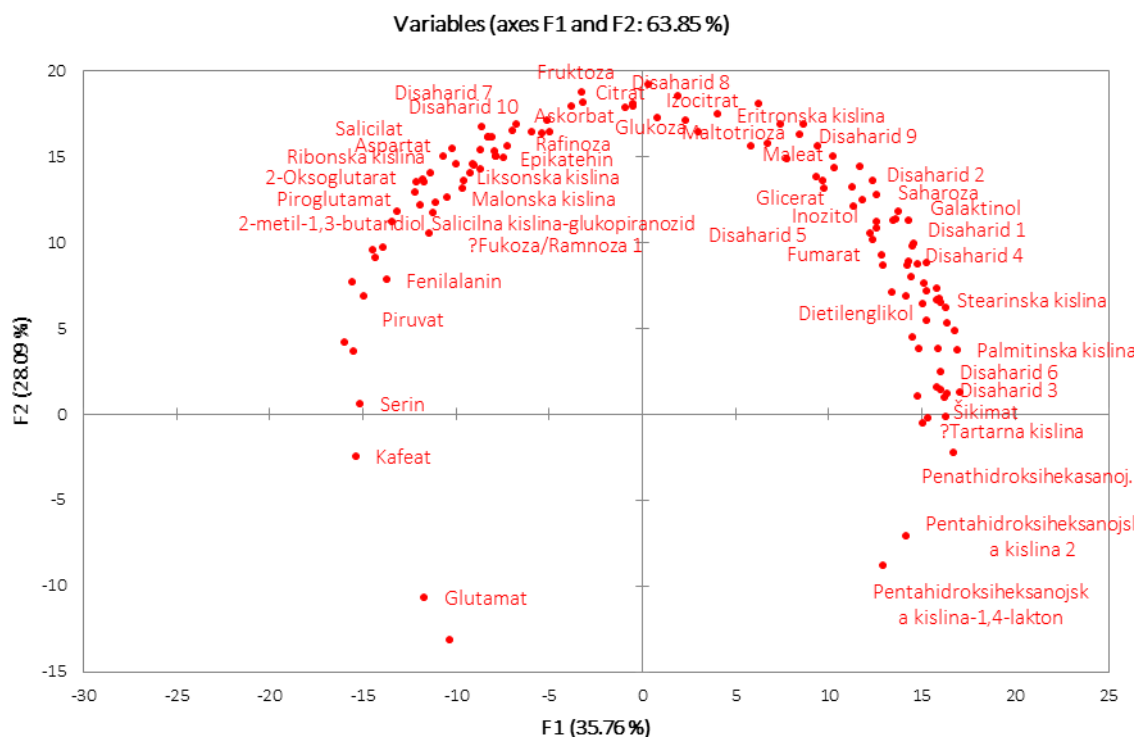
Iz grafa PCA za spremenljivke (Slika 31) lahko vidimo, kateri so tisti metaboliti/komponente, katerih vsebnost v vseh vzorcih, največ vpliva na ločevanje vzorcev. Med identificiranimi metaboliti imajo največji prispevek na postavitev prve PCA komponente palmitinska kislina, pentahidroksi heksanojska kislina, šikimat, stearinska kislina, disaharida 3 in 6, kafeat, serin in piruvat. Na postavitev druge PCA komponente pa najbolj vplivajo fruktoza, citrat, disaharid, glukoza, eritronska kislina, izocitrat, askorbat in maltotriosa.



Slika 30: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na metabolomskih podatkih interakcije vinske trte s FDF.

Figure 30: Sample principal component analysis (PCA) of metabolomic data on grapevine-FDF interaction.

Na razsevnem diagramu je prikazana komponenta 1 (F1) v odvisnosti od komponente 2 (F2). Metabolomski podatki so transformirani z \log_2 . Okuženi vzorci so označeni z rdečno, zdravi pa z zeleno barvo.



Slika 31: Analiza glavnih komponent 247 komponent na vzorcih interakcije vinske trte s FDF
Figure 31: Principal component analysis on 247 components on samples from grapevine-FDF interaction.

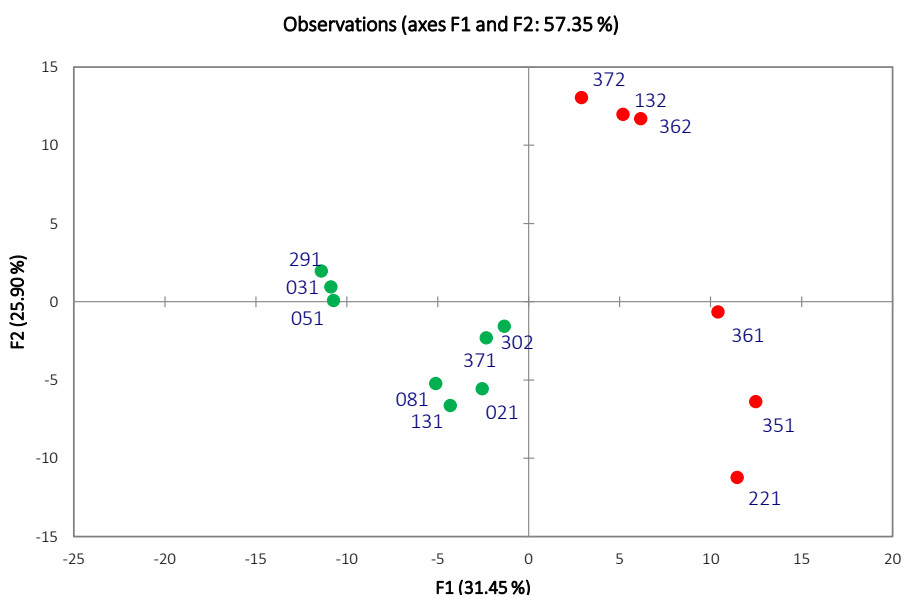
Na razsevnem diagramu je prikazana komponenta 1 (F1) v odvisnosti od komponente 2 (F2). Dolžina vektorja (oz. razdalja od središča do točke) izraža variabilnost oziroma prispevek metabolita k formaciji glavne komponente (faktorja). Prikazani so le identificirani metaboliti, ki največ prispevajo k formaciji glavne komponente.

4.3.2. Interakcija trte sorte chardonnay z BNF

Po obdelavi podatkov smo določili 202 komponenti, identificirali pa smo jih 55. S studentovim t-testom smo določili 80 komponent, katerih količina se statistično značilno ($p < 0.05$) razlikuje med zdravimi in okuženimi rastlinami (Preglednica 16). Z razliko od metabolomskih rezultatov interakcije vinske trte s FDF pri interakciji trte z BNF nismo določili nobene aminokislino, katere količina bi bila statistično značilno različna med zdravimi in okuženimi rastlinami. Določili smo dva metabolita, citrat in malat, vključena v cikel citronske kisline, katerih količina je statistično značilno višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi. Statistično značilno višjo količino metabolitov katehin, epikatehin in ne identificiranega flavonoida (metabolizem flavonoidov) smo določili v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi. Z izjemo treh disaharidov (1-3) je bila statistično značilna količina ostalih metabolitov sladkornega metabolizma višja v okuženih v primerjavi z zdravimi rastlinami. Tako kot pri interakciji trte s FDF, je bila tudi pri interakciji z BNF količina glicerola, metabolita vključenega v metabolizem lipidov, statistično značilno višja v okuženih v primerjavi z zdravimi rastlinami. Dehidroaskorbat in piroglutamat sta metabolita vključena v redoks regulacijo. Količina prvega je bila

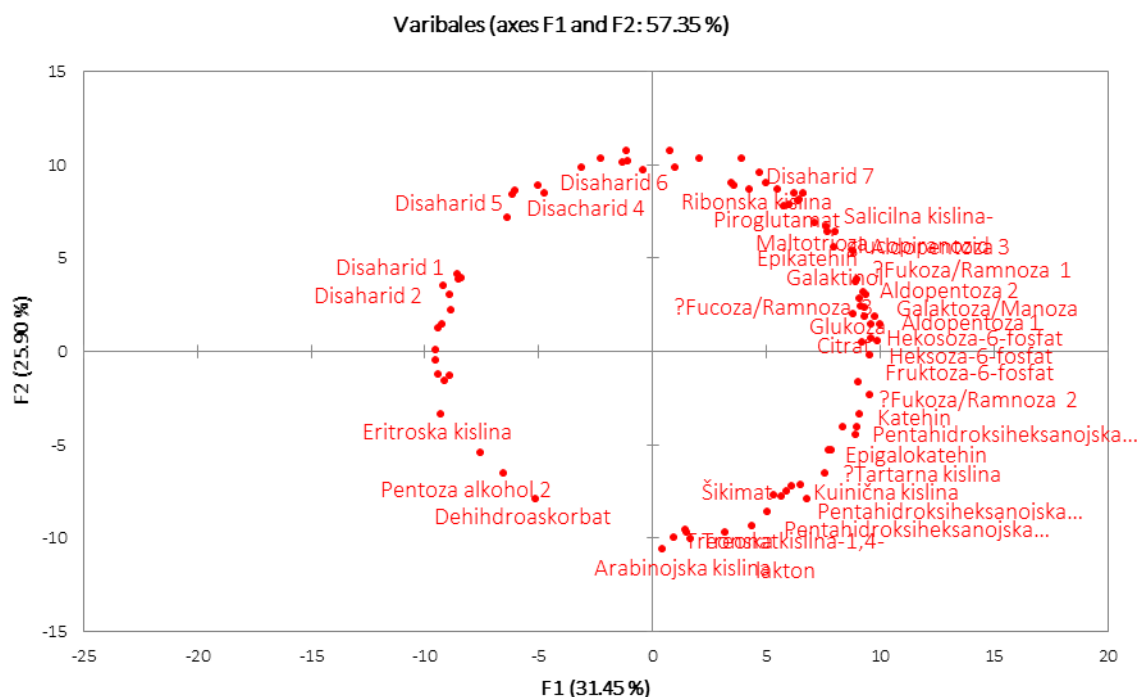
statistično značilno višja v zdravih rastlinah v primerjavi z okuženimi, količina zadnjega pa ravno obratno. Identificirali smo tudi glukopiranozid salicilne kisline, ki je vpleten v metabolizmu hormona salicilne kisline in čigar količina je bila statistično značilno višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi.

Rezultate smo analizirali z metodo PCA. Na Slika 32 vidimo, da se zdravi vzorci po prvi PCA komponenti lepo ločijo od vzorcev okuženih z BNf. Odstotek variabilnosti, ki jo opisujeta prvi dve PCA komponenti je 57,35 %, skupaj s tretjo komponento pa 66,79 %. Med identificiranimi metaboliti imajo največji prispevek na postavitev prve PCA komponente vse tri heksoze-6-fostat (fruktoza-6-fosfat, glukoza-6-fosfat in manoz-6-fosfat; za zadnji dve ne moremo nedvoumno določiti kateri od dveh kromatografski vrhov pripada kateri) (Slika 33). Poleg heksoz-6-fosfat prispevajo k prvi PCA komponenti še katehin in dve aldopentozi. Na postavitev druge PCA komponente pa najbolj vplivajo arabinonska kislina, treonat in treonska kislina-1,4-lakton.



Slika 32: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na metabolomskih podatkih interakcije vinske trte z BNf.

Figure 32: Sample principal component analysis (PCA) of metabolomic data on grapevine-BNp interaction.

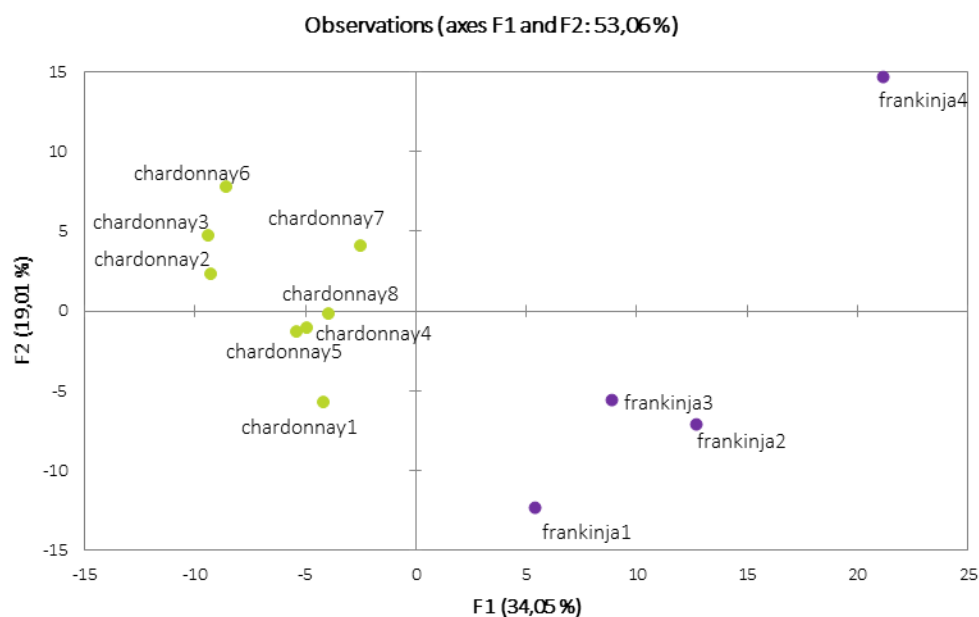


Slika 33: Analiza glavnih komponent (PCA) 202 komponent na vzorcih interakcije vinske trte z BNf.
Figure 33: Principal component analysis on 202 components on samples from grapevine-BNf interaction.

Na razsevnem diagramu je prikazana komponenta 1 (F1) v odvisnosti od komponente 2 (F2). Dolžina vektorja (oz. razdalja od središča do točke) izraža variabilnost oziroma prispevek metabolita k formaciji glavne komponente (faktorja). Prikazani so le identificirani metaboliti, ki največ prispevajo k formaciji glavne komponente.

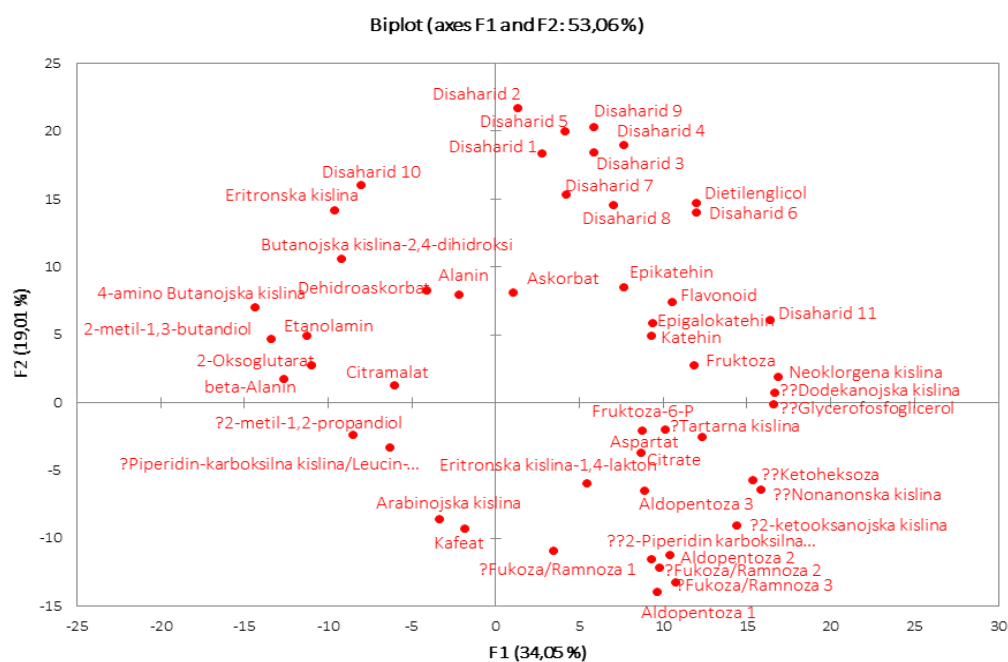
4.3.3. Primerjava sorte chardonnay in modra frankinja

V listnih žilah rdeče sorte modra frankinja smo določili 247 komponent, v beli sorti chardonnay pa 202 komponenti. 56 komponent smo določili le v sorti modra frankinja in 11 komponent le v sorti chardonnay. Z analizo PCA so se vzorci zdravih trt po prvi PCA komponenti lepo ločili glede na njihovo sorto (Slika 34). Odstotek variabilnosti, ki jo opisujeta prvi dve PCA komponenti je 53,1 %, skupaj s tretjo PCA komponento pa 65,13 %. Kot pričakovano imajo največji prispevek na postavitev prve PCA komponente metaboliti oziroma komponente, katerih prisotnost smo določili le v posamezni sorti vinske trte (Slika 35). Mednje sodijo neoklorgena kislina, malonska kislina, palmitinska kislina, pentahidroksiheksanojska kislina 2 in ?lavrinska kislina, katerih prisotnost smo določili samo v trti sorte modra frankinja. Poleg pa sodi tudi glukopiranozid salicilne kisline, ki smo ga določili tudi v trti sorte chardonnay a je bila njegova vsebnost statistično značilno nižja v beli sorti.



Slika 34: Analiza glavnih komponent (PCA) vzorcev na metabolomskih podatkih zdravih rastlin vinske trte sort chardonnay in modra frankinja.

Figure 34: Sample principal component analysis (PCA) of metabolomic data on healthy grapevine samples of chardonnay and modra frankinja cultivars.



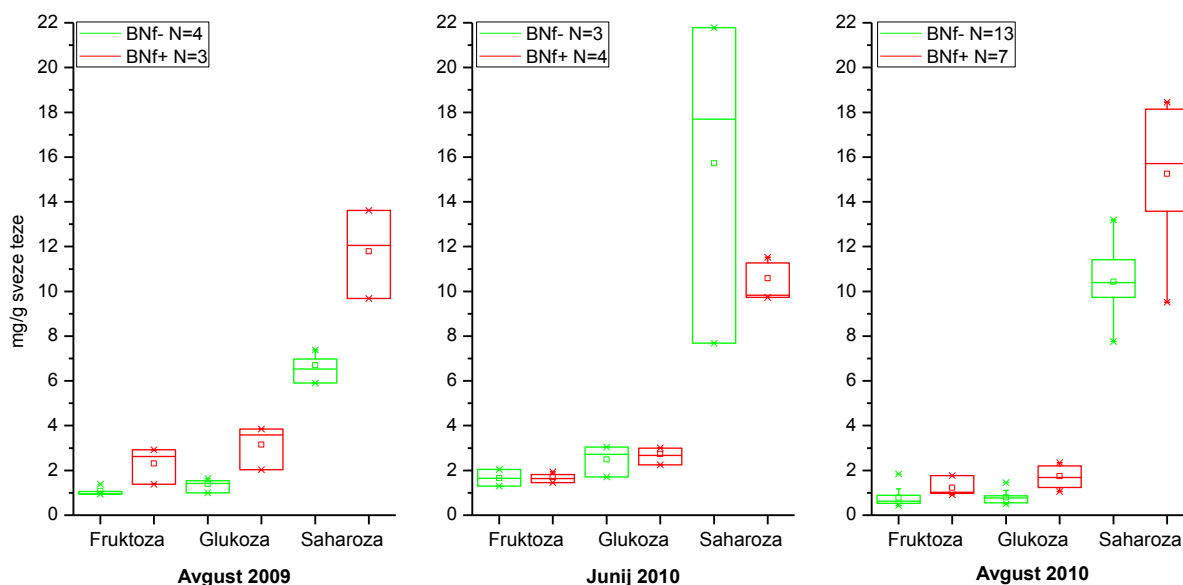
Slika 35: Analiza glavnih komponent (PCA) 258 komponent na zdravih vzorcih vinske trte sort chardonnay in modra frankinja.

Figure 35: Principal component analysis on 258 components on healthy grapevine samples of chardonnay and modra frankinja cultivars.

4.4. VSEBNOST OGLJIKOVIH HIDRATOV

Vsebnost sladkorjev smo določali v celih listih vinske trte, vzorčenih v treh delujočih vinogradih, z različno sorto vinske trte in prisotnostjo različne fitoplazme trsnih rumenic (Preglednica 1).

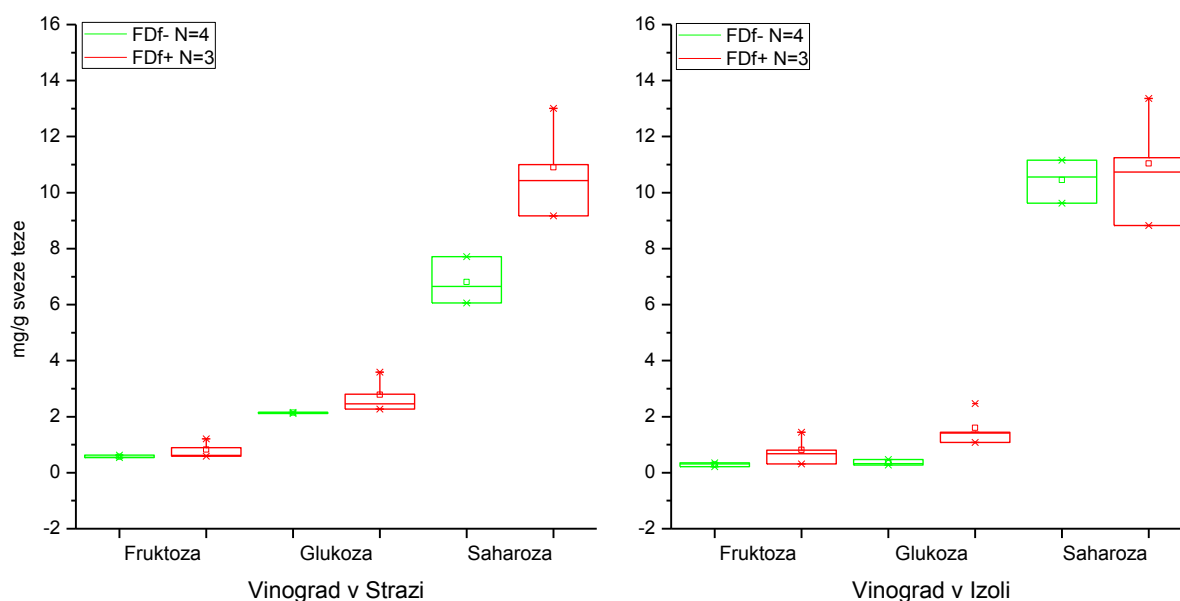
V vinogradu v Vipolžah smo na rastlinah vinske trte sorte Chardonay potrdili prisotnost fitoplazme BNf. Določali smo vsebnost sladkorjev glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in s fitoplazmo BNf okuženih rastlin. Avgusta 2009 je bila količina vseh treh merjenih sladkorjev v okuženih rastlinah višja v primerjavi z zdravimi, vendar je razlika statistično značilna le za saharozo (Slika 36). Junija 2010, v začetku pojavljanja blagih bolezenskih znamenj trsnih rumenic, je bila vsebnost glukoze in fruktoze v okuženih in zdravih rastlinah primerljiva. Prav tako med zdravimi in okuženimi rastlinami nismo opazili statistično značilnih razlik v vsebnosti saharoze (Slika 36). Avgusta 2010, ko so bila bolezenska znamenja na okuženih rastlinah izrazita pa so bile vsebnosti vseh treh sladkorjev v okuženih rastlinah statistično značilno višje v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 36).



Slika 36: Graf kvantilov vsebnosti sladkorjev v vzorcih vinske trte iz vinograda v Vipolžah, kjer je prisotna fitoplazma BNf.

Figure 36: Boxplot of sugar amount in grapevine samples from vineyard in Vipolže, where BN phytoplasma is present.

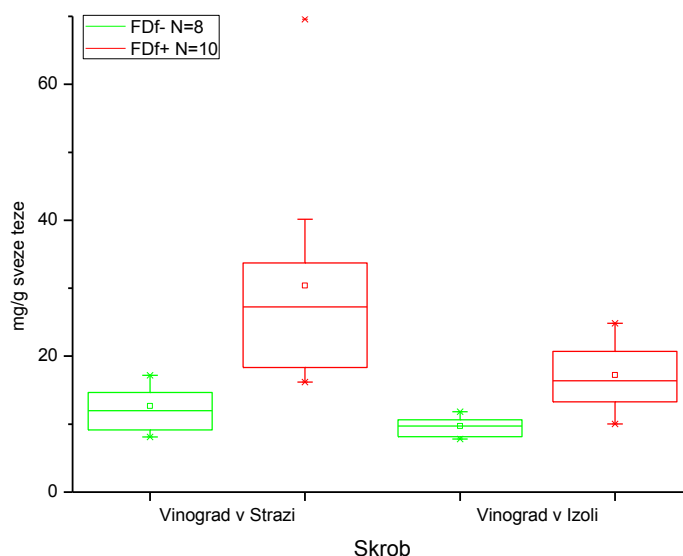
V vinogradu v Izoli je na rastlinah vinske trte sorte refošk prisotna fitoplazma FDF, v vinogradu v Straži pa imamo FDF na rastlinah vinske trte sorte modra frankinja. Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze smo določali v zdravih in s fitoplazmo FDF okuženih rastlinah, vzorčenih v vinogradu v Izoli avgusta 2011 in v vinogradu v Straži julija 2010. Količina vseh treh merjenih sladkorjev je bila v obeh vinogradih v okuženih rastlinah višja v primerjavi z zdravimi, vendar je v vinogradu v Izoli razlika statistično značilna le za glukozo, v vinogradu v Straži pa za saharozo (Slika 37).



Slika 37: Grafi kvantilov vsebnosti sladkorjev v vzorcih vinske trte iz vinogradov v Straži (levo) in Izoli (desno), kjer je prisotna fitoplazma FDF.

Figure 37: Boxplots of sugar amount in grapevine samples from vineyards in Straža (left) and Izola (right), where FD phytoplasma is present.

V obeh opazovanih vinogradih, kjer je prisotna fitoplazma FDF, smo v zdravih in okuženih rastlinah določali tudi vsebnost škroba. Le ta je bila v obeh statistično značilno višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Slika 38).

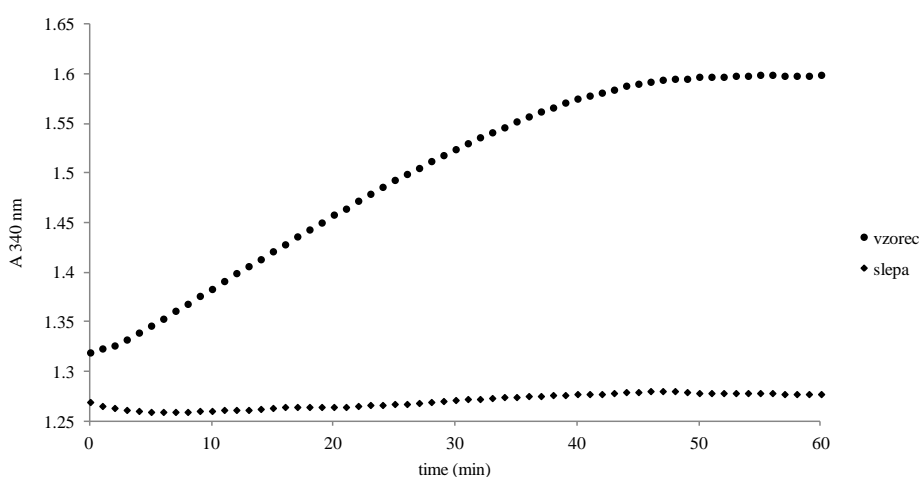


Slika 38: Grafi kvantilov za vsebnost škroba v vzorcih vinske trte iz vinogradov v Izoli in Straži, kjer je prisotna fitoplazma FD.

Figure 38: Boxplots of starch amount in grapevine samples from vineyards in Izola and Straža), where FD phytoplasma is present.

4.5. ENCIMSKA AKTIVNOST

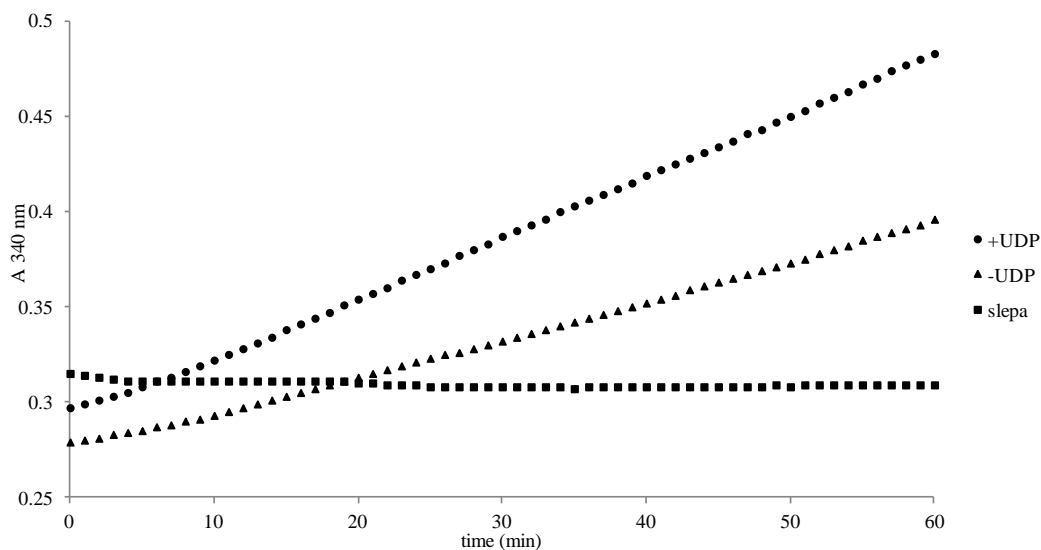
Encimsko aktivnost AGPase in SuSy smo določali v celih listih vinske trte, vzorčenih v vinogradu v Izoli in v vinogradu v Straži, kjer je prisotna zlata trсна rumenica (Preglednica 1). Pri obeh encimskih testih smo uporabili kontinuirno metodo, kjer smo spremljali nastajanje produkta (NADH) skozi čas (Slika 39, Slika 40).



Slika 39: Kinetika encima AGPaze.

Figure 39: AGPase enzyme kinetics.

Slika prikazuje hitrost encimske reakcije izbranega vzorca, ter v slepem vzorcu brez substrata.



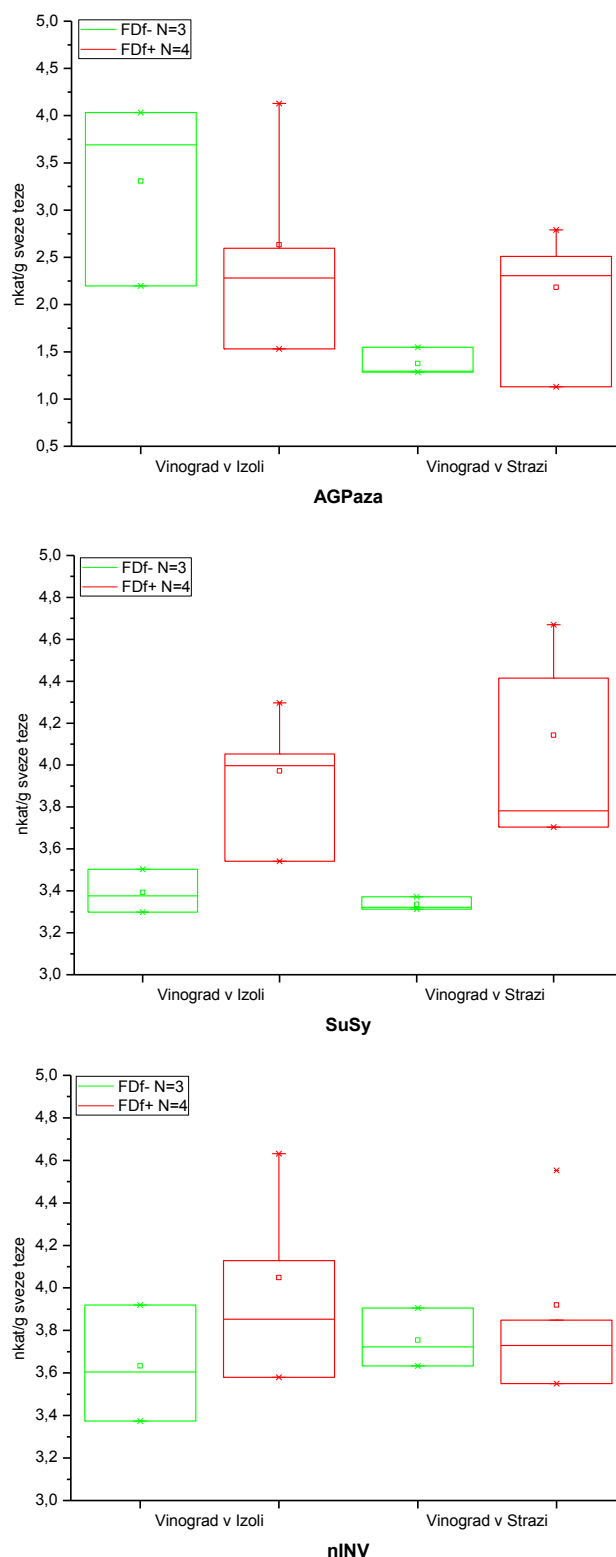
Slika 40: Kinetika encima SuSy.

Figure 40: SuSy enzyme kinetics.

Slika prikazuje hitrost encimskih reakcij izbranega vzorca, kjer sta dodana oba substrata (+UDP), kjer je od substratov prisotna le saharoza (-UDP), ter brez obeh substratov (slepa).

V vinogradu v Izoli je bila aktivnost encima AGPaza v zdravih rastlinah rahlo višja v primerjavi z okuženimi rastlinami, medtem ko je bilo v vinogradu v Straži ravno obratno (Slika 41). Razlike niso statistično značilne.

Aktivnost encima SuSy je bila v obeh vinogradih statistično značilno višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 41), aktivnost nINV pa je bila v obeh vinogradih primerljiva med zdravimi in okuženimi rastlinami (Slika 41).



Slika 41: Encimska aktivnost encimov AGPaza (zgoraj), SuSy (na sredini) in nINV (spodaj) v zdravih in z FdF okuženih vzorcih vinske trte vzorčenih v vinogradu v Izoli (levo) in v vinogradu v Straži (desno).

Figure 41: Enzyme activities of AGPase (upper), SuSy (middle) and nINV (bottom) in healthy and FdF infected grapevine samples from vineyard in Izola (left) and vineyard in Straža (right).

5 RAZPRAVA

Študije interakcije fitoplazem trsnih rumenic z vinsko trto potekajo večinoma na sistemih postavljenih v delujočih vinogradih, kjer pa je poleg naravne variabilnosti preučevane populacije rastlin prisotna še variabilnost, ki je posledica okoliških dejavnikov. Razloga za poljske poskuse interakcije pa sta predvsem dva. Eden je dejstvo, da fitoplazem še ne znamo gojiti na umetnih gojiščih, drugi razlog pa je njihov težaven prenos (inokulacija) na olesenele rastline kot je vinska trta. Študija prenosa FDF s cepljenjem okuženih rozg na zdrave podlage je bila jeseni neuspešna, spomladi pa je bil delež uspešnega prenosa le 1,4 % (rezultati projekta CRP V4-1103 trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja). Posledično je znanje o fiziologiji interakcij fitoplazem z gostitelji na splošno in za vinsko trto specifično zelo rudimentarno.

Študijo interakcije vinske trte z BNF smo izvedli v delujočem vinogradu v Vipolžah, kjer je posajena trta sorte chardonay. Študije interakcije vinske trte s FDF pa smo izvedli v dveh delujočih vinogradih v različnih vinorodnih deželah z različnim podnebjem in zasajenih z različnima sortama vinske trte. Tako v vinogradu v Straži (sorta modra frankinja) kot v vinogradu v Izoli (sorta refošk) pa je bil prisoten isti tip fitoplazme FDF, tip D. Vse rastline vinske trte smo testirali tudi na prisotnost virusov. V študijo izražanja genov in študijo sezonskega spremljanja titra FDF v različnih tkivih vinske trte smo vključili le trse brez virusne okužbe oziroma trse, ki so vsebovali le virus GfKV. V vinski trti je ta virus latenten in ne povzroča bolezenskih znamenj (Sabanadzovic in sod., 2000). Iz vinograda v Vipolžah pa smo zaradi pomanjkanja rastlin v študijo vključili tudi z virusi okužene trse. Predhodna večletna študija interakcije trte z BNF iz istega vinograda v Vipolžah je pokazala, da ni statistično značilne povezave med prisotnostjo virusov in okužbo z BNF (osebni razgovor z dr. Ano Rotter).

Zaradi karantenskega statusa FDF, ki zahteva odstranitev vseh okuženih rastlin, so študije njene interakcije z vinsko trto zelo težavne. V vinogradu v Straži smo z dovoljenjem Uprave Republike Slovenije za veterinarstvo, varno hrano in varstvo rastlin postavili karantenski mrežnik, ki nam je omogočal dolgoročno študijo interakcije. Nasprotno pa smo v vinogradu v Izoli že v začetku rastle sezone vzorčili nesistematično, s pričakovanjem pojava okužbe, zaradi prisotnosti FDF in njenega prenašalca ameriškega škržatka v pretekli sezoni. Proti koncu rastle sezone se je izkazalo, da je bilo zaradi velikega obsega boleznih (60 % rastlin z bolezenskimi znamenji) (Slika 8) težje v analizo vključiti zdrave vzorce vinske trte kot pa okužene s FDF. Tako v vinogradu v Straži, kot v vinogradu v Izoli smo imeli zaradi omenjenih dejavnikov na voljo manjše število bioloških ponovitev kot bi si želeli za statistično dobro podprto analizo.

5.1. TITER IN RAZŠIRJENOST FDF PO RASTLINI V ČASU RASTNE SEZONE

Sezonsko razporeditev FDF po rastlinah vinske trte v vinogradu v Izoli je spremljal zelo močan infekcijski pritisk. Ta je bil verjetno posledica odsotnosti nadzorovanja prenašalca FDF ameriškega škržatka v letu 2010. Ocenili smo, da se je bolezen FD v vinogradu od leta 2010 do leta 2011 širila s faktorjem 40 (Slika 8), kar je hitreje od napovedi oceni tveganja, ki so jo pripravili Steffek in sod. (2006).

V vinogradu v Straži smo v okuženih rastlinah znotraj mrežnika opazili rahlo znižanje povprečnega titra FDF med obema opazovanima rastnima sezonama in sicer 7,8 % znižanje v listih z bolezenskimi znamenji in 35,32 % znižanje v celih jagodah na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Slika 9). Konec sezone 2011 novo razviti listi dveh rastlin niso več kazali bolezenskih znamenj in v njih prisotnosti FDF nismo uspeli več potrditi. V letu 2012 smo prisotnost FDF dokazali le še v eni rastlini. Vzrok je lahko odsotnost prenašalca zaradi obdelave rastlin z ustreznimi insekticidi in/ali prisotnosti mrežnika, ki je fizično onemogočal dostop prenašalcem do rastlin. Domnevajo, da v odsotnosti ponovne inokulacije s prenašalcem lahko pride do okrevanja rastlin (Caudwell, 1961, 1964).

Prisotnost FDF smo dokazali v vseh testiranih tkivih, med njimi prvič tudi v cvetovih vinske trte (Table 10). Nekatero druge fitoplazme so že dokazali v cvetovih papaje, oljne repice, kokosove palme in madagaskarskega zimzelena (Siddique in sod., 1998; Azadvar in sod., 2011; Oropeza in sod., 2011; Su in sod., 2011). V tkivih brez bolezenskih znamenj smo zgodaj v sezoni uspešno detektirali FDF v vinogradu v Izoli. V mesecu maju je bila detekcija 50 -70 % (Preglednica 10). Junija je bila detekcija FDF v tkivih brez bolezenskih znamenj v pozitivni korelaciji s celokupnim titrom FDF v rastlini. Verjetnost detekcije FDF v tkivih brez bolezenskih znamenj je bila nižja v vinogradu v Straži v primerjavi z vinogradom v Izoli, kjer smo v poganjkih z bolezenskimi znamenji junija določili tudi višji povprečni titer FDF (približno 6,8-krat višji). Bulgari in sod. (2011) v svoji študiji na rastlinah vinske trte sorte Barbera niso uspeli detektirati FDF pred mesecem julijem. Opažene spremembe v titru FDF so lahko povezane s časom pojava primarne okužbe, podnebnimi razmerami, načinom gojenja ali pa so kombinacija večih dejavnikov.

V času rastne sezone smo opazili naraščanje titra FDF v listih vinske trte z bolezenskimi znamenji in v jagodah vzorčenih na poganjkih z bolezenskimi znamenji (Slika 9 in 10). Čeprav je to prva sistematična študija o prisotnosti FDF v različnih tkivih vinske trte, njena prisotnost v jagodah ni presenetljiva. Mikoplazmam podobne strukture so že opazili v celicah floema jagodnega in grozdnega peclja rastlin vinske trte z znaki motnje prezgodnje dehidracije jagod (Matus in sod., 2008). Naraščanje titra FDF med rastno sezono so pokazali tudi Bulgari *in sod.* (2011). Zanimivo je, da smo v vinogradu v Izoli v vseh tkivih brez bolezenskih znamenj opazili znižanje titra FDF od junija do julija. Enako smo opazili na manjšem številu rastlin v vinogradu v Straži. Nizek titer fitoplazme junija v poganjku

brez bolezenskih znamenj lahko naraste in vodi do razvoja bolezenskih znamenj v kasnejših mesecih.

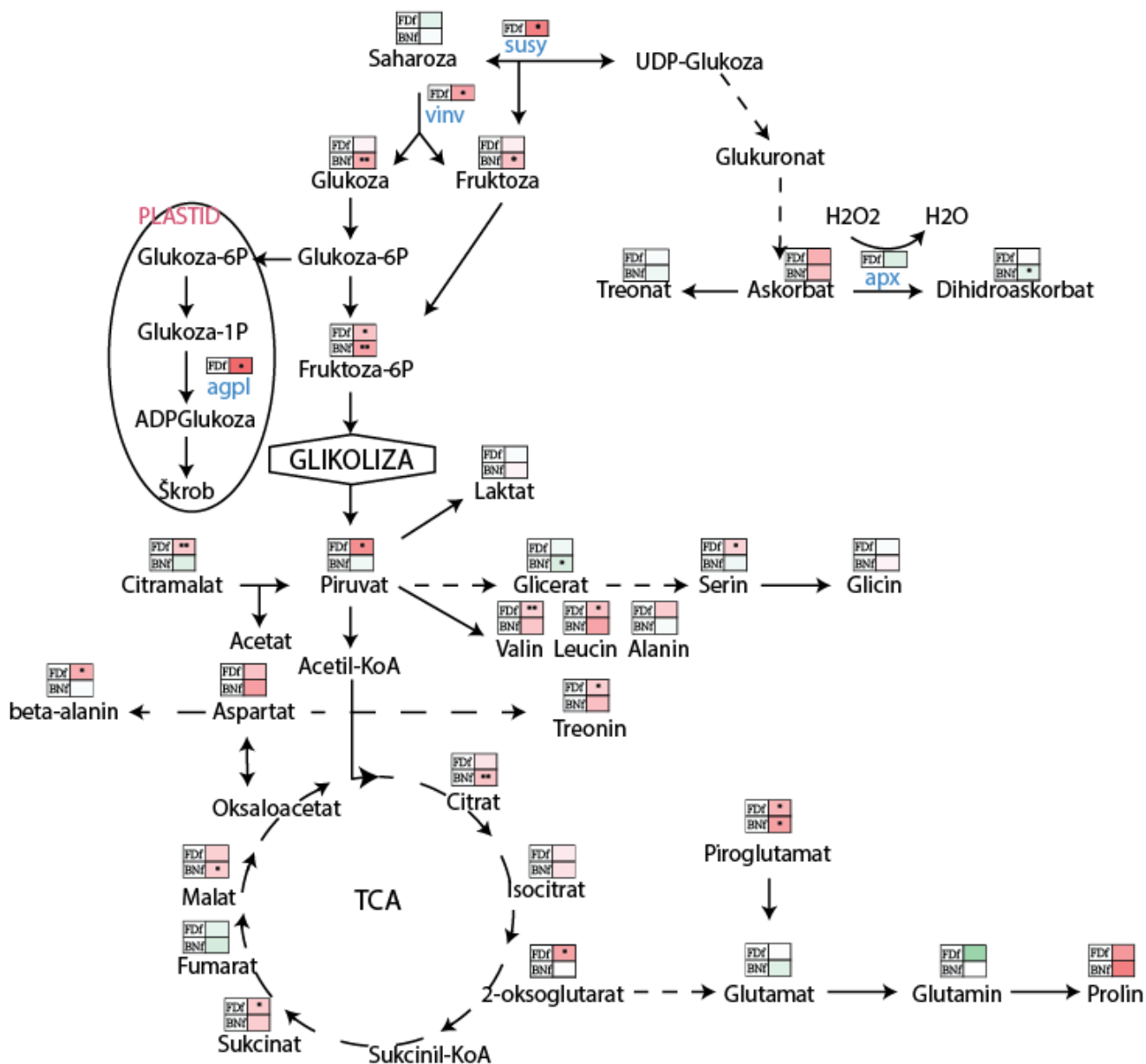
Jakost bolezenskih znamenj je bila večinoma v pozitivni korelaciji s količino fitoplazem. Tako je bila zanesljiva detekcija FDF v času, ko se na rastlinah pojavijo bolezenska znamenja, v skladu z dosedanjimi raziskavami na različnih trsnih rumenicah (Del Serrone in Marina, 1996; Gibb in sod., 1999; Constable in sod., 2003; Terlizzi in sod., 2007). Rezultati naše študije pa so pokazali tudi možnost detekcije FDF zgodaj v rastni sezoni, pred pojavom bolezenskih znamenj. Ker je to tudi čas pred pojavom odraslih osebkov ameriškega škržatka, bi ta ugotovitev lahko pripomogla k boljši zgodnji diagnostiki bolezni in odstranjevanju okuženih rastlin. V primeru visokega infekcijskega pritiska smo lahko FDF zaznali v floemu lesa že februarja, maja pa tudi v drugih tkivih brez bolezenskih znamenj kot so cvetovi in vitice. Naše ugotovitve o možni detekciji FDF že pred pojavom bolezenskih znamenj v času cvetenja so na vzorcih listov potrdili tudi Roggia in sod. (2014). V naši raziskavi smo dodatno ugotovili, da zanesljivo tkivo za detekcijo FDF niso samo listne žile poganjkov z bolezenskimi znamenji, ki se trenutno najpogosteje uporabljajo v diagnostiki, temveč tudi jagode vzorčene na poganjkih z bolezenskimi znamenji. Zaradi relativno visoke vsebnosti FDF in enostavne homogenizacije brez potrebne izolacije DNA so se jagode izkazale za tkivo izredno primerno za detekcijo FDF na terenu s pomočjo reakcije izotermalnega pomnoževanja (LAMP, ang. loop-mediated isothermal amplification) (Kogovšek in sod., 2014).

5.2. SPREMENJEN METABOLIZEM OKUŽENIH RASTLIN VINSKE TRTE

Fitoplazmi BNf in FDF povzročata na vinski trti enaka bolezenska znamenja, zato okužbe s posamezno fitoplazmo ne moremo določiti le na podlagi vizualnega pregleda rastlin. Ker so bolezenska znamenja posledica spremenjenega delovanja metabolizma rastlin, nas je zanimalo ali obe fitoplazmi povzročata enak odgovor rastline na okužbo na ravni izražanja genov in na ravni metaboloma. Ker fitoplazme naseljujejo celice sitastih cevi floema, smo vzorčili listne žile. Gene, katerih izražanje smo spremljali na rastlinah vinske trte, okuženih s FDF med rastno sezono od maja do avgusta, smo izbrali glede na rezultate predhodnih raziskav interakcije vinske trte s fitoplazmo BNf (Hren in sod., 2007, Nikolić, 2011). Izbrani geni so vključeni v metabolne poti primarnega in sekundarnega metabolizma.

Na interakcijah fitoplazem trsnih rumenic z vinsko trto je bilo opravljenih nekaj transkriptomskih študij rastlin okuženih z BNf (Hren in sod., 2009a,b; Albertazzi in sod., 2009) in dve študiji proteoma rastlin, okuženih s FDF (Margaria in Palmano, 2011; Margaria in sod., 2013). Interakcija fitoplazem trsnih rumenic z rastlinami vinske trte na ravni metaboloma pa je še neraziskana. Do sedaj sta bili objavljeni objavljeni dve študiji metabolomskih interakcij fitoplazem z madagaskarskim zimzelenom (Choi in sod., 2004) in murvo (Gai in sod., 2014). Metaboliti so končni produkt celičnih procesov zato

spremembe njihove količine lahko predstavljajo glavne lastnosti odziva rastline na okužbo in na okolje (Fiehn, 2002). V primerjavi z nukleinskimi kislinami, kjer je DNA sestavljena iz 4 nukleotidov in proteinov iz približno 20 aminokislin, so metaboliti precej bolj kompleksne molekule. Z eno analizo metodo danes ne moremo pokriti celotnega metaboloma preučevanega sistema (Ferne in Stitt, 2012).



Slika 42: Shema diferencialno akumuliranih metabolitov in diferencialno izraženih genov izbranih metabolnih poti primarnega metabolizma vinske trte, glede na analizo metaboloma (Preglednica 16) in analizo izražanja genov (Preglednica 15).

Figure 42: Presentation of differentially accumulated metabolites and differentially expressed genes from selected metabolic pathways of primary metabolism of grapevine according to metabolome (Table 16) and gene expression analysis (Table 15).

Na sliki so z barvanimi kvadrati prikazani identificirani metaboliti iz interakcije trte s posamezno fitoplazmo (FDf –zgornji kvadrat in BNf-spodnji kvadrat). Prav tako so prikazani diferencialno izraženi geni (*VvAGPL*, *VvAPX*, *VvSUSY* in *VvINV*) iz interakcije trte s fitoplazmo FDF avgusta iz vinograda v Straži. Vsak obarvan kvadrat predstavlja razmerje količine metabolita oziroma razmerje v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami, kjer rdeča barva pomeni višjo, zelena pa nižja vrednost v okuženih rastlinah glede na zdrave, bela pa nespremenjeno vrednost. Z zvezdicami so označeni statistično značilne razlike med zdravimi in okuženimi rastlinami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,0005$).

5.2.1. Oksidativni metabolizem

Ena najhitrejših obrambnih reakcij proti napadu mikroorganizma je oksidativni izbruh, v katerem se kopičijo reaktivne kisikove spojine (ROS), predvsem superoksid in vodikov peroksid (Mendoza, 2011). ROS lahko na patogena delujejo neposredno, lahko prispevajo k tvorbi fizične bariere v obliki papile (Voigt, 2014), predstavljajo pa tudi pomembne signalne molekule, ki usmerjajo aktivacijo obrambnih odgovorov (Mendoza, 2011). Kljub temu, da so ROS koristne molekule, pa so za celico tudi toksične, poškodujejo lahko biološke molekule, vključno z nukleinskimi kislinami, lipidi in proteini. Njihovo vsebnost morajo celice dobro nadzorovati. Za zaščito pred oksidativnimi poškodbami ROS, so rastline razvile različne neencimske in encimske sisteme. Glavni sestavni deli neencimskega sistema so karotenoidi, tokoferoli in glutation; encimskega pa superoksid dismutaza, katalaza, glutation reduktaza, številni encimi, ki reducirajo NADP^+ in peroksidaze (Dixon in sod., 2002; Mittler, 2002). Glutation peroksidaza (GPX) je splošno ime za družino encimov s peroksidazno aktivnostjo, katerih glavna biološka vloga je zaščita organizmov pred oksidativnimi poškodbami. GPX reducirajo lipidne perokside do odgovarjajočih alkoholov in reducirajo toksični vodikov peroksid do vode. Askorbatne peroksidaze pa pretvarjajo vodikov peroksid v vodo, pri čemer kot substrat uporabljajo askorbat. Reakcija, ki jo katalizirajo askorbatne peroksidaze, je prenos elektronov iz askorbata na peroksid. V njej nastajata dihidroaskorbat in voda.

V vinogradih v Straži in Izoli se je izražanje genov za askorbat peroksidazo (*VvAPX*) in glutation peroksidazo (*VvGPX*) med rastno sezono zniževalo tako v zdravih kot v s FDF okuženih rastlinah (Slika 22, Slika 23). Dejavnik časa je imel statistično značilen vpliv na izražanje obeh genov v vinogradu v Izoli, v vinogradu v Straži pa le na gen *VvGPX*. Izražanje *VvAPX* je bilo praviloma nižje v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi in v vinogradu v Izoli je bil dejavnik okužbe s FDF statistično značilno različen. Zanimivo je analiza glavnih komponent PCA pokazala, da izražanje gena *VvAPX* zelo prispeva k ločevanju okuženih in zdravih rastlin trte, vzorčenih poleti (Slika 27 in Slika 29). Količina substrata encima APX je bila tako v rastlinah okuženih s FDF kot v rastlinah okuženih z BNf višja v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 42). Skladno je bila količina produkta dehidroaskorbata statistično značilno nižja v rastlinah, okuženih z BNf, v primerjavi z zdravimi rastlinami. V vinogradu v Straži smo v rastnih sezonah ob odsotnosti prenašalca opazili okrevanje treh rastlin, okuženih s FDF.

V študiji interakcije trte sorte chardonnay, okužene z BNF, sta bila gena za obe peroksidazi avgusta bolj izraženi v zdravih kot v okuženih vzorcih (Nikolić, 2011). Povečano izražanje *VvAPX* v zdravih rastlinah trte sorte manzoni bianco v primerjavi z BNF okuženimi rastlinami so določili tudi Albertazzi in sod., 2009. Na ravni proteinov je študija interakcije vinske trte sorte nebbolo s FDF pokazala povečano količino proteina APX v okuženih rastlinah (Margaria in Palmano, 2011), pri interakciji trte sorte barbera s FDF pa je bila količina APX nižja v okrevanih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Margaria in sod., 2013). Študija interakcije vinske trte sorte proseco s FDF v listih je pokazala primerljivo aktivnost encima APX med zdravimi in okuženimi rastlinami. Izmerjena encimska aktivnost pa je bila statistično značilno višja v primerjavi z okrevanimi rastlinami, v katerih so pokazali statistično značilno višje količine vodikovega peroksida v primerjavi z zdravimi in okuženimi rastlinami (Musetti in sod., 2007). Količina vodikovega peroksida je bila višja tudi v rastlinah sorte barbera, ki so okrevale po predhodni okužbi s FDF (Gambino in sod., 2013). Povišano količino vodikovega peroksida povezujejo z znižanim izražanjem peroksidaz kar naj bi vodilo v stanje okrevanja rastline. Če ne pride do okrevanja, je možno odstranjevanje vodikovega peroksida po drugih metabolnih poteh oziroma njegova reakcija z drugimi komponentami. H kopičenju vodikovega peroksida bi lahko prispevala tudi višja aktivnost encima superoksid dismutaze, ki v celicah pretvarja bolj reaktiven superoksidni ion v vodikov peroksid. V rastlinah limete je bila aktivnost superoksid dismutaze višja v s fitoplazmo okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Zafari in sod., 2011). V naši raziskavi količine vodikovega peroksida nismo spremljali, čeprav bi se ta lahko kopičil na račun nižje aktivnosti APX. Posledica tega bi bilo lahko okrevanje treh rastlin po okužbi s FDF ob odsotnosti ameriškega škržatka v mrežniku vinograda v Straži.

5.2.2. Izražanje genov povezanih z obrambo in patogenezo

Proteini povezani s patogenezo (proteini PR) se v rastlinah inducirajo ob biotskem in abiotskem stresu. Glede na njihove lastnosti in funkcije jih trenutno razvrščajo v 17 razredov (PR-1 do PR-17). Nekateri od proteinov PR delujejo protimikrobno, nekateri so vključeni v signalizacijo, nekateri pa sodelujejo pri prečnem povezovanju molekul celične stene in kopičenju lignina, kar tvori fizično prepreko za patogene (Hegde in Keshgond, 2013).

V študiji smo spremljali izražanje gena za taumatinu in osmotinu podobnemu proteinu *VvOLP* iz skupine PR-5. Podobno kot v raziskavah interakcije trte sorte Chardonnay z BNF, kjer je bilo izražanje gena višje v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Hren in sod., 2009a; Albertazzi in sod., 2009; Nikolić, 2011), je bilo izražanje gena višje tudi v rastlinah, okuženih s FDF, v primerjavi z zdravimi. Pričakovano je analiza dvosmerne ANOVA pokazala, da ima dejavnik okužbe statistično značilen vpliv na izražanje gena v obeh vinogradih. V vinogradu v Izoli je bila razlika v izražanju statistično značilna tudi meseca avgusta. Proteomska študija na trti okuženi s FDF je pokazala kopičenje taumatinu in osmotinu podobnih proteinov (Margaria in Palmano, 2011; Margaria in sod., 2013).

Povečano izražanje genov za proteine iz skupine PR-5 so zasledili tudi pri *Chrysanthemum coronarium* okuženim s fitoplazmo *Ca. P. asteris*, sev OY-M (Zhong in Shen, 2004). Izražanje gena pa je bilo povečano tudi na vinski trti okuženi z glivnimi patogeni (Camps in sod., 2010; Spagnolo in sod., 2012). Sklepamo lahko, da se proteini PR-5 niso inducirali kot odgovor na specifičnega patogena, pač pa so del splošnega odgovora rastline na biotski stres.

Glukanaze uvrščamo med proteine, povezane s patogenozo razreda 2 (PR-2) zaradi njihove obrambne vloge. β -1,3 glukanaze hidrolizirajo β -1,3 glukan kot je kaloza, hidrolizirajo pa lahko tudi glivne celične stene (Hegde in Keshgond, 2013). Predhodne raziskave interakcije vinske trte sorte Chardonnay z Bnf so pokazale povečano izražanje gena za glukanaze v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi rastlinami (Hren in sod., 2009a; Albertazzi in sod., 2009; Nikolić, 2011). Predpostavljajo, da je povečano izražanje β -1,3 glukanaz povezano z okužbo trte s fitoplazmami, kjer naj bi le te uporabljale razgradne produkte kaloze in/ali si tako omogočale tudi pot za širjenje po rastlini (Hren in sod., 2009a). V naši študiji je bilo izražanje gena *VvGLC2* v rastlinah okuženih s Fdf višje v primerjavi z zdravimi rastlinami le v vinogradu v Izoli (Slika 12). V vinogradu v Straži ni bilo statistično značilnih razlik v izražanju gena med zdravimi in s Fdf okuženimi rastlinami. Vzrok bi lahko bilo okrevanje treh od štirih okuženih rastlin v sledeči rastni sezoni.

5.2.3. Okužba vinske trte s fitoplazmo spremeni metabolizem ogljikovih hidratov

Vedno več je dokazov, da fitoplazme vplivajo na metabolizem ogljikovih hidratov gostiteljskih rastlin. Študije različnih interakcij fitoplazem z rastlinami so pokazale povečano raven reducirajočih sladkorjev in saharoze v fotosinteznih listih (izvor asimilatov) okuženih rastlin, manjšo količino v ponornih listih okuženih rastlin, v koreninah pa naj bi sladkorjev začelo primanjkovati (Lepka in sod., 1999; Guthrie in sod., 2001; Maust in sod., 2003; Choi in sod., 2004; Junqueira in sod., 2004). Do podobnih rezultatov smo prišli z določanjem sladkorjev v celih, fotosintezno aktivnih listih vinske trte okužene z Bnf in Fdf. Avgusta, v času bolezenskih znamenj, je bila vsebnost glukoze, fruktoze, in saharoze višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi. Statistično značilna razlika je bila v vinogradu v Izoli samo na ravni glukoze, v vinogradu v Straži samo na ravni saharoze, v vinogradu v Vipolžah pa na ravni vseh treh sladkorjev (Slika 36, Slika 37). Analiza metaboloma interakcije trte s Fdf in Bnf ni potrdila višje vsebnosti saharoze v okuženih rastlinah (Slika 42). Ker je saharoza glavna komponenta floema, njena vsebnost v vzorcu listnih žil prevladuje nad drugimi analiziranimi komponentami in je prevelika, da bi z uporabo iste metode GC-MS omogočala zanesljivo kvantifikacijo. Za bolj zanesljivo kvantifikacijo saharoze bi lahko naredili dodatno metodo za tarčno detekcijo saharoze (npr. metodo SRM; selected reaction monitoring). Razlika v rezultatih pa je seveda lahko posledica dejstva, da smo uporabili drugačen izhodiščni material; listne žile za študijo metaboloma in cele liste za določanje sladkorjev. Študija metaboloma

robidnic okuženih s fitoplazmo, je pokazala drugačen metabolni odziv rastline v celih listih v primerjavi s sokom floema (Gai in sod., 2014). Naši metabolni rezultati za glukozo in fruktozo pa so skladni z določanjem sladkorjev v celih listih. Poleg reducirajočih sladkorjev smo v celih listih, vzorčenih avgusta, določali tudi vsebnost škroba, ki je bila statistično značilno višja v listih rastlin, okuženih s FDF (Slika 38). V času pred pojavom bolezenskih znamenj, junija, pa količina sladkorjev v trti okuženi z BNF ni bila višja v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 36). Študija spremljanja titra FDF med rastno sezono je pokazala trend naraščanja titra fitoplazme v listih z bolezenskimi znamenji (Slika 9, Slika 10). Sklepamo, da so fitoplazme usmerjene v tkiva bogata s sladkorji, saj smo jih v visoki koncentraciji določili tudi v jagodah. Tam se nato razmnožijo in vplivajo na metabolizem sladkorjev tako, da se v listih poruši sistem izvor/ponor fotosinteznih asimilatov. Maust in sod. (2003) so predlagali, da naj bi fizična prisotnost fitoplazem v rastlinah blokirala transport reducirajočih sladkorjev proti ponornim organom, ali pa bi bil ta oviran zaradi odlaganja kaloze s strani rastline kot odziva na okužbo ali zaradi zmanjšane odlaganja sahara v floem.

Fitoplazme naseljujejo skoraj izključno celice sitastih cevi floema in se skozi sitaste pore lahko translocirajo po rastlini po principu izvor/ponor toka floemskega soka. Floemski sok je bogat s hranili in pod visokim hidrostatskim tlakom, zaradi česa predstavlja ugodno okolje za številne patogene. Glavna komponenta, ki se prenaša po floemu trte so sladkorji, predvsem sahara, ki prispeva 50-70 % osmotskega tlaka floemskega soka. Sahara, katere izvor so fotosintezni listi, predstavlja vir energije. Genomske študije so pokazale, da imajo fitoplazme gene za številne ABC transportne sisteme (Kube in sod., 2012). Med drugim imajo MaleFGK ABC transportni sistem katerega vezavni protein naj bi imel afiniteto za vezavo maltoze, trehaloze, sahara in palatinoze (Silva in sod., 2005). Razen fitoplazme *Ca. P. mali*, vsebujejo genomi ostalih fitoplazem vse gene za glikolizo, ki je glavna pot pridobivanja energije, manjka jim samo gen za fosfotransferazo (heksokinazo), ki fosforilirajo sladkorje. Gen za encim sahara-fosforilaza, ki pretvarja sahara v fruktozo in glukoza-1-fosfat sicer imajo, vendar je le ta, razen pri *Ca. P. australiense* okrnjen, nefunkcionalen. Osutek genomskega zaporedja *Ca. P. solani* je pokazal okrnjenost tega gena tudi pri BNF, poleg tega pa niso našli gena, ki bi glukoza-1-fosfat pretvoril v glukoza-6-fosfat (Mitrović in sod., 2014). Prisotnost funkcionalnega gena pri FDF še ni znana. Ker fitoplazmam manjkajo tudi geni za encime fosfotransferaznega sistema (PTS), s pomočjo katerih se sladkorji ob vnosu v celico fosforilirajo, sklepajo, da fitoplazme potrebujejo že fosforilirane oblike sladkorjev, ki nato neposredno vstopajo v glikolizo. Kandidati za fosforilirane sladkorje bi bili trehaloza-6-fosfat, sahara-6-fosfat in fruktoza-6-fosfat (povzeto po Kube in sod., 2012). Energetsko najučinkovitejše bi bilo, če bi fitoplazme lahko sprejele kar fruktoza-6-fosfat. Rezultati metabolomske študije na vinski trti, okuženi s FDF ali z BNF so pokazali, da je vsebnost fruktoza-6-fosfat v listnih žilah statistično značilno višja v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Slika 42). Poleg fruktoza-6-fosfata pa sta bili tudi količini glukoza-6-fosfata in manozo-6-fosfata statistično značilno

višji v okuženih rastlinah (Preglednica 16). Analiza glavnih komponent PCA je pokazala, da vsi trije heksoza-6-fosfati vplivajo na ločevanje zdravih in z BNF okuženih rastlin trte oziroma določajo zdravstveni status rastlin (Slika 33).

V primeru, da so fitoplazme zmožne vnosa fosforiliranih oblik sladkorjev, pa jih morajo rastline predhodno fosforilirati. Študiji interakcije BNF z vinsko trto sta pokazali spremenjeno izražanje genov, ki so vključeni v pretvorbe med oblikami fosforiliranih sladkorjev (Hren in sod., 2009a; Albertazzi in sod., 2009), študija na rastlinah jablan, vzgojenih z mikropropagacijo in vitro pa je pokazala povečano izražanje heksokinaze v s fitoplazmo okuženih v primerjavi z zdravimi rastlinami (Giorno in sod., 2013). Študija proteoma limete okužene s fitoplazmo *Ca. P. aurantifolia* je pokazala povečano količino encima fruktokinaze v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Monavarfeshani in sod., 2013). Ker je saharoza glavna oblika transportnega sladkorja in jo je v floemu največ, predstavlja izhodišče za pripravo fosforiliranih sladkorjev. V rastlinah sta znana dva encima, ki cepita saharozo. Prvi je invertaza, ki cepi saharozo v glukozo in fruktozo, drugi pa je saharoza sintaza, ki reverzibilno cepi saharozo v UDP-glukozo in fruktozo. V vinski trti sta dva gena za kislno vakuolno invertazo (*VvINV1* in *VvINV2*) z 62 %-identičnostjo zaporedja, vendar popolnoma različnim vzorcem izražanja. *VvINV1* najdemo predvsem v jagodah, medtem ko je *VvINV2* najmočnejše izražena v mladih listih (Davies in Robinson, 1995). Ugotovili smo, da se izražanje gena *VvINV2* v zdravih rastlinah postopno zmanjšuje med rasto sezono, v okuženih rastlinah pa se od julija do avgusta rahlo poveča (Slika 15). Po pregledu posameznih časovnih točk je statistično značilna razlika v izražanju *VvINV2* med zdravimi in okuženimi rastlinami avgusta v obeh vinogradih (Preglednica 15, Slika 15). Povečano izražanje *VvINV2* poleti v listih vinske trte, okužene z BNF so pokazali tudi Hren in sod. (2009a), Albertazzi in sod. (2009) in Nikolić (2011). Spremembo izražanja *VvINV* za vakuolno invertazo so opazovali tudi v listih madagaskarskega zimzelena in paradižnika, okuženega s fitoplazmo stolbur. Zanimivo je, da spremembe v izražanju niso zaznali, a v okuženih listih se je povečala aktivnost nevtralne invertaze (Machenaud in sod., 2007). V naši analizi je bila aktivnost nevtralne invertaze med zdravimi rastlinami vinske trte in rastlinami, okuženimi s FDF, primerljiva tako v vzorcih vzorčenih v vinogradu v Izoli kot v tistih vzorčenih v vinogradu v Straži (Slika 41). V raziskavo smo vključili tudi encim za saharoza sintazo (*SUSY*), ki je v floemu prisoten tako v celicah spremljevalkah kot tudi v celicah sitastih cevi (Koch, 2004). Časovno izražanje *VvSUSY* med zdravimi in okuženimi rastlinami je bila statistično značilno različno v obeh vinogradih okuženih s FDF (Preglednica 14, Slika 14). Izražanje gena je bilo v vinogradu v Izoli višje v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi, vendar je bila razlika statistično značilna le avgusta. V vinogradu v Straži pa je bilo spomladi izražanje *VvSUSY* med zdravimi in okuženimi rastlinami primerljivo, avgusta pa je statistično značilno višje v okuženih rastlinah. Predhodne študije izražanja *VvSUSY* v trti, okuženi z BNF so prav tako pokazale povišano izražanje gena v okuženih rastlinah v času bolezenskih znamenj (Hren in sod., 2009a,b; Albertazzi in sod., 2009) in nespremenjeno izražanje pred pojavom

bolezenskih znamenj in kadar so bila le-ta šibka (Nikolić, 2011). Poleg tega naj bi na izražanje gena *VvSUSY* vplivala tudi okužba z virusoma GLRaV in GFLV (Nikolić, 2011), vendar pa smo v našo študijo izbrali le trse, ki s tema virusoma niso bili okuženi. Skladno s povečanim izražanjem gena *VvSUSY* je bila tudi encimska aktivnost SUSY v rastlinah vinske trte, okuženih s FDF, avgusta statistično značilno višja v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 41). Višjo aktivnost SUSY so pokazali tudi na vzorcih vinske trte, okužene z BNf (neobjavljeno delo dr. Elizabeth Covington).

Saharoza deluje tudi kot signalna molekula in med drugim vpliva na sintezo škroba. Ko hitrost fotosinteze preseže transport saharoze, oziroma se količina saharoze poveča, se v kloroplastih sintetizira škrob. Glavni regulatorni encim v sintezi škroba je ADP glukoza pirofosforilaza (AGPaza), ki je sestavljen iz dveh velikih in dveh majhnih podenot. Kljub temu da naj bi imela katalitično aktivnost manjša podenota pa naj bi bila za optimalno katalitično in regulatorno aktivnost encima potrebna sinergija obeh tipov podenot (Cross in sod., 2004; Hwang in sod., 2005; Ventriglia in sod., 2008). Poleg izražanja gena *VvAGPL*, ki kodira veliko podenoto encima AGPaza, smo avgusta spremljali tudi aktivnost encima. Kljub temu, da smo avgusta v celih listih določili statistično značilno višjo količino škroba v rastlinah vinske trte, okužene s FDF, v primerjavi z zdravimi rastlinami, pa je bila aktivnost encima primerljiva (Slika 41). Izražanje gena *VvAGPL* se je v zdravih rastlinah od julija do avgusta zniževalo, v rastlinah, okuženih s FDF, pa je naraščalo in je bilo avgusta statistično značilno višje v primerjavi z zdravimi rastlinami v obeh vinogradih (Slika 13). Interakcija vinske trte s fitoplazmo BNf je ravno tako pokazala povišano izražanje *VvAGPL* (Hren in sod., 2009a), ki pa ni bilo povezano z višjo encimsko aktivnostjo (raziskava dr. Elizabeth Covington, v pripravi za objavo). Ravno nasprotno pa so ugotovili Gamm in sod. (2011), kjer je bilo izražanje gena *VvAGPL* nižje v rastlinah trte okužene z oomiceto *Plasmopora viticola*, encimska aktivnost pa je bila višja. Razlike v izražanju gena in aktivnosti encima bi lahko bile posledica uravnavanja na različnih ravneh. Opisani so trije mehanizmi uravnavanja aktivnosti AGPaze: uravnavanje na ravni transkripcije, alosterično uravnavanje z glicerat 3-fosfatom (aktivator) in anorganskim fosfatom (inhibitor) ter post translacijska redoks modifikacija kot odgovor na sladkorje (Akihiro in sod., 2005). V naši raziskavi smo spremljali le izražanje velike podenote encima, za katalitično aktivnost pa naj bi bila pomembnejša majhna podenota (Hwang in sod., 2005). Povečana količina škroba v okuženih listih bi lahko bila tudi posledica nižjega izražanja genov in/ali nižje aktivnosti encimov za razgradnjo škroba, kot so ugotovili Gai in sod. (2014) pri študiji interakcije robidnice s fitoplazmo. Vsekakor pa se je izražanje gena *VvAGPL* pokazalo za izredno zanimivo, saj je zelo veliko prispevalo k ločevanju zdravstvenega statusa rastlin poleti (Slika 27, Slika 29).

Znano je, da patogeni lahko prestrežejo sistem iztekanja sladkorjev in tako pridobijo gostiteljeva hranila, ki jih potrebujejo za svojo rast. Študije na novo identificiranih eksporterjih sladkorjev, proteinih SWEET, so pokazale, da v navadnem repnjakovcu tako bakterija *Pseudomonas syringae* kot gliva *Golovinomyces cichoracearum* povzročita

povečano izražanje gena *AtSWEET11*, ki kodira transporter saharoze (Chen in sod., 2010). Poleg transporterja saharoze sta oba patogena sprožila izražanje različnega kompleta drugih genov za proteine SWEET. Pri rižu je dominantni gen *OsSWEET11*, ki je ortolog genov *AtSWEET11* in *12*, močnejše izražen med okužbo z bakterijo *Xanthomonas oryzae* (Chen in sod., 2012). Da bi preverili ali tudi fitoplazme vplivajo na transport sladkorjev smo v raziskavo vključili gene za proteine SWEET. Po prileganju 17 zaporedij mRNA iz navadnega repnjakovca za proteine SWEET, smo v genomu vinske trte našli 16 različnih proteinov SWEET (Marko Chersicola, NIB in Lecourieux in sod., 2013). Izbrali smo tri gene in sicer *VvSWEET1*, ki je najbolj podoben *AtSWEET1* in kodira transporter glukoze (Chen in sod., 2010), *VvSWEET10-15*, ki je podoben proteinom *AtSWEET10* do *15* in so transporterji saharoze (Chen in sod., 2012) ter *VvSWEET16/17*, ki je podoben proteinoma *AtSWEET16* in *17*, od katerih je slednji domnevni transporter fruktoze na tonoplastu (Guo in sod., 2014). V naši raziskavi se je izražanje gena *VvSWEET1* med sezono rahlo zmanjševalo. Avgusta je bilo izražanje gena statistično značilno nižje v trsih, okuženih s FDF, v primerjavi z zdravimi rastlinami samo v vinogradu v Izoli (Slika 16). Nedavna študija, kjer so pri navadnem repnjakovcu spremljali vpliv efektorske molekule SAP11 iz fitoplazme *Ca. P. asteris*, sev WB, pa je pokazala povečano izražanje gena *SWEET1* v transformiranih rastlinah v primerjavi z divjim tipom (Lu in sod., 2014). Nasprotno od izražanja gena *VvSWEET1* pa je izražanje gena *VvSWEET10-15* naraščalo med sezono in je bilo statistično značilno višje v rastlinah okuženih s FDF, v primerjavi z zdravimi zopet samo avgusta v vinogradu v Izoli (Slika 17). Povečano izražanje gena med sezono bi lahko bilo povezano s povečanim potrebam ponornih tkiv, jagod, za sladkorje. Povečano izražanje gena avgusta v okuženih rastlinah pa bi lahko vodilo do večje količine saharoze v apoplastu floema okuženih rastlin. Ker so fitoplazme v celicah sitastih cevi floema in ne v apoplastu, bi bilo potrebno raziskati tudi izražanje transportnih proteinov SUC, ki transportirajo saharozo iz apoplasta v celice spremljevalke, od koder gre naprej v sitaste celice floema. Študiji interakcije fitoplazme BNF z vinsko trto sorte chardonay sta pokazali nižje izražanje vseh treh transportnih proteinov SUC (*SUC11*, *SUC12* in *SUC27*), ki prenašajo saharozo, v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi (Santi in sod., 2013b,a). Santi in sod. (2013a) so s pomočjo laserske mikrodisekcije pokazali, da je izražanje transporterja *SUC27* specifično za floem (skupek celic sitastih cevi, celic spremljevalk in parenhimskih celic floema) in je razlika v izražanju med zdravimi in z BNF okuženimi rastlinami še večja. Rezultati kažejo na slabše nalaganje saharoze v floem in kopičenje le-te v apoplastu.

5.2.4. Spremembe metabolitov cikla TCA

Glavni organski kislini, ki sestavljata floem vinske trte sta malat in citrat. Obe molekuli sta komponenti cikla citronske kisline (TCA; tricarboxylic acid cycle). Poleg sladkorjev bi kot vir ogljika za sintezo ATP fitoplazme lahko uporabile malat. Genomi vseh štirih fitoplazem kot tudi osnutek genoma fitoplazme BNF (Mitrović in sod., 2014) vsebujejo pot za pretvorbo malata v acetat, pri čemer nastaja ATP (Kube in sod., 2012). Poleg tega so v

vseh omenjenih genomskih zaporedjih fitoplazem pokazali prisotnost simporterja malat ali citrat/Na⁺ (MleP) za vnos malata oziroma citrata (Kube in sod., 2012). Ta alternativna pot pridobivanja energije je še posebno prikladna za fitoplazmo *Ca. P. mali*, saj ji manjkajo nekateri geni glikolize (Kube in sod., 2008). Špekulirali so ali se vsebnost malata in citrata spremeni ob okužbi s fitoplazmami. Naša metabolomska študija je pokazala, da je v rastlinah trte okužene s fitoplazmo BNF vsebnost obeh komponent statistično značilno višja v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 42). Vsebnost obeh komponent je višja tudi v trtah, okuženih s fitoplazmo FDF, vendar pa razlika med okuženimi in zdravimi rastlinami ni statistično značilna. Zanimivo pa so trte okužene s FDF imele v primerjavi z zdravimi rastlinami statistično značilno višjo vsebnost sukcinata in 2-oksoglutarata, ki sta prav tako komponenti cikla TCA. Višjo vsebnost sukcinata v rastlinah madagaskarskega zimzelena, okuženega s fitoplazmo iz skupine stolbur so pokazali tudi Choi in sod. (2004). Študija proteoma limete je v rastlinah, okuženih s fitoplazmo *Ca. P. aurantifolia*, pokazala zmanjšano količino encima sukcinat dehidrogenaze, ki pretvarja sukcinat v fumarat (Monavarfeshani in sod., 2013). Poleg tega so v okuženih rastlinah pokazali tudi višjo vsebnost proteinov piruvat dehidrogenaze in citrat sintaze, ki piruvat pretvarjata v citrat. Skupni rezultati tako nakazujejo, da fitoplazme povečajo tok metabolne poti cikla TCA.

5.2.5. Vpliv fitoplazem na vsebnost aminokislin

V rastlinah vinske trte, okuženih s FDF, je bila statistično značilna višja vsebnost piruvata. Pretvorba piruvata v acetat bi lahko bila vir energije za fitoplazme, poleg tega pa je piruvat vključen tudi v mnoge druge metabolne poti, med drugim v sintezo aminokislin. Genomske študije so pokazale, da fitoplazmam manjkajo geni za sintezo številnih aminokislin, vsebujejo pa transporterje za njihov vnos (Kube in sod., 2012). Primerjalna analiza genoma treh fitoplazem (*Ca. P. australiense*, *Ca. P. asteris* seva OY-M in AY-WB) je pokazala, da vsem trem manjkajo geni za sintezo fenilalanina, glutamina, glutamata, arginina, ornitina, alanina in glutationa (Tran-Nguyen in sod., 2008). Višjo vsebnost celokupnih aminokislin v okuženih listih so pokazale študije interakcije madagaskarskega zimzelena s fitoplazmo *Ca. P. asteris* in interakcije tobaka in jablane s fitoplazmo *Ca. P. mali* (Lepka in sod., 1999; Bertamini in sod., 2002a). Nespremenjeno vsebnost aminokislin pa so pokazali na interakciji madagaskarskega zimzelena s fitoplazmami trsnih rumenic (Lepka in sod., 1999). Študija metaboloma robidnice, okužene s fitoplazmo mulberry yellow dwarf je pokazala višjo vsebnost celokupnih aminokislin tako v celih listih kot v soku floema okuženih rastlin v primerjavi z zdravimi rastlinami, vendar pa je bila razlika statistično značilna le v soku floema (Gai in sod., 2014). Raziskavo metaboloma trte, okužene s fitoplazmama BNF in FDF, smo izvedli v vzorcih listnih žil, ki vsebujejo s parenhimskimi celicami razredčen floem. Ugotovili smo, da so statistično značilne razlike v vsebnosti aminokislin prisotne le v rastlinah okuženih s FDF in so višje v primerjavi z zdravimi rastlinami (Slika 42, Slika 43, Preglednica 16). S FDF okužene rastline so imele višjo vsebnost beta-alanina, serina, treonina, valina, leucina in fenilalanina. Gai in sod. (2014) so v soku floema s fitoplazmo okuženih robidnic pokazali višjo vsebnost serina in

valina, vsebnost treonina pa je bila nižja v primerjavi z zdravimi rastlinami. Izgleda, da je vpliv fitoplazem na vsebnost aminokislin odvisen od tipa fitoplazme in gostitelja in je različen pri posameznih interakcijah.

5.2.6. Spremembe sekundarnega metabolizma

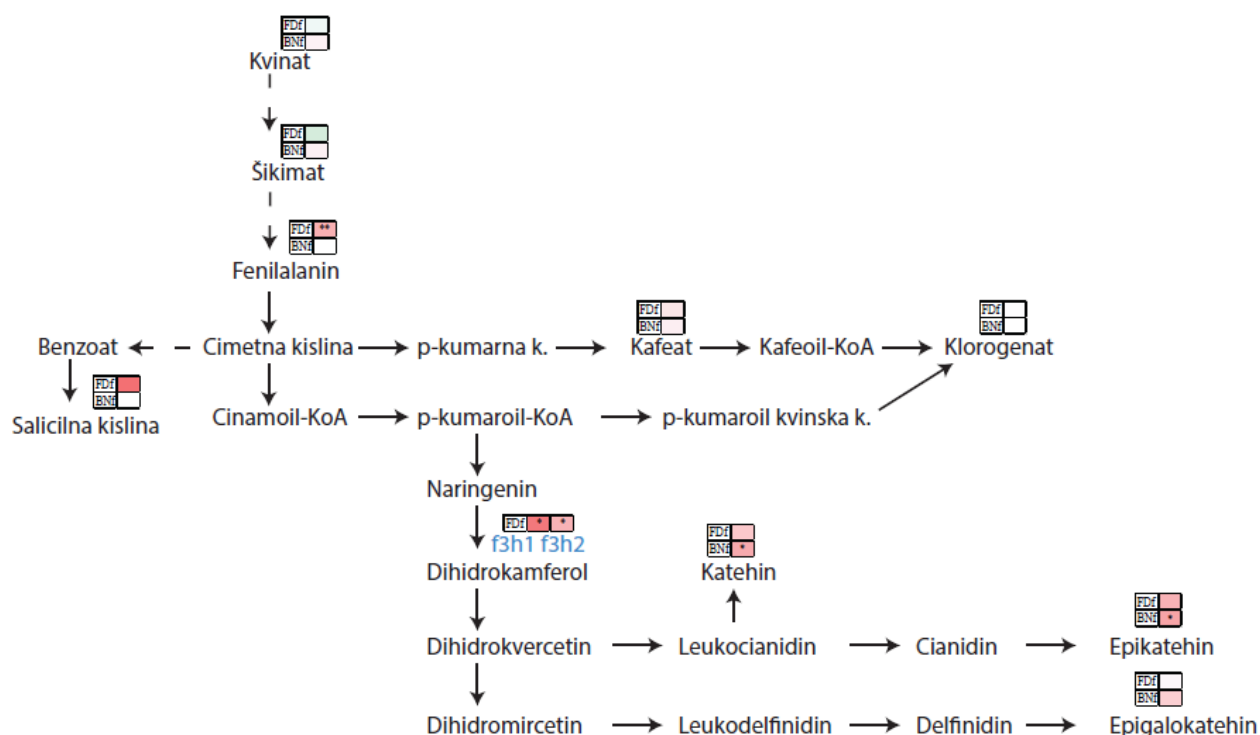
Flavonoidi so pomembna barvila v cvetovih, plodovih, semenih in listih. Vključeni so v številne fiziološke in biokemijske procese v rastlinah, od zaščite pred sevanjem UV, privabljanja opraševalcev, obrambe pred herbivori do simbiotičnih reakcij (Peters in Constabel, 2002; Koes in sod., 2005). Pogosto se sintetizirajo v stresnih razmerah, ki vključujejo tudi okužbe s patogeni (Dixon in Paiva, 1995; Chalker-scott, 1999; Hernández in sod., 2009; Gutha in sod., 2010). V raziskavo izražanja genov med rastno sezono smo vključili dva izogena *VvF3H1* in *VvF3H2*, ki kodirata encim flavanon 3-hidroksilazo in gen *VvDMR6* z neznano funkcijo iz genske super družine oksigenaz 2-oksoglutarat (2OG)-Fe(II). Zaporedje gena *VvDMR6* kaže 69 % podobnost zaporedju gena *DMR6* iz navadnega repnjakovca (*At5g24530*) in kodira protein podoben flavanon 3-hidroksilazi.

Rezultati dvosmerne ANOVA so pokazali, da imata na izražanje gena *VvDMR6* v obeh vinogradih vpliv tako dejavnik okužbe s FDF kot časovni dejavnik. Izražanje gena je bilo višje v rastlinah, okuženih s FDF, v primerjavi z zdravimi. Čeprav je zaradi pomanjkanja rastlin, vključenih v raziskavo, razlika v izražanju v začetku rastne sezone statistično značilna le v vinogradu v Straži, bi gen lahko predstavljal potencialni označevalec okužbe pred pojavom bolezenskih znamenj. Večletna študija interakcije vinske trte z BNF je pokazala povečano izražanje gena v okuženih rastlinah tako poleti kot junija pred pojavom bolezenskih znamenj in ne glede na spremenjene podnebne razmere v več zaporednih letih (Nikolić, 2011 (*DMR6* tam označen kot *F3H*)). Preveriti bi bilo potrebno še njegovo izražanje v trtah okuženih z drugimi patogeni. Pokazali so že, da mutacija gena *DMR6* povzroči odpornost navadnega repnjakovca na oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* (van Damme in sod., 2008).

Gen *F3H* uravnava sintezo cianidinskih antocianov in predstavlja enega od zgodnjih genov v sintezni poti. Raziskave izražanja gena *F3H* so večinoma povezane z grozdnimi jagodami, saj je tu največja sinteza antocianov. V naši raziskavi listnih žil se je izražanje obeh izogenov *VvF3H1* in *VvF3H2* med sezono zmanjševalo. Avgusta je bilo njuno izražanje višje v rastlinah, okuženih s FDF, v primerjavi z zdravimi, razlika pa je bila statistično značilna le pri sorti modra frankinja v vinogradu v Straži (Slika 20, Slika 21). Študija interakcije trte sorte barbera in nebbiolo s FDF pa je pokazala trend naraščanja izražanja gena *F3H2* v listih med sezono vse do avgusta in nato padec izražanja (Margaria in sod., 2014). Izražanje gena je bilo višje v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi rastlinami. Povečano izražanje gena *F3H* so pokazali tudi v rastlinah trte okužene z BNF (Albertazzi in sod., 2009; Landi in Romanazzi, 2011), povečana pa je bila tudi encimska aktivnost (Rusjan in sod., 2012). Poleg fitoplazem na povečano izražanje gena za *F3H* v

trti vplivajo tudi virus GLRaV-3 (Gutha in sod., 2010) in oomiceti *Plasmopora viticola* in *Pseudoperonospora cubensis* (Kortekamp, 2006).

Izražanje obeh izogenov *VvF3H1* in *VvF3H2* ter gena *VvDMR6* je bilo avgusta višje v rastlinah, okuženih s FDF. Prav tako je bila v njih višja tudi vsebnost 2-oksoglutarata, ki je eden od substratov za vse te proteine.



Slika 43: Shema diferencialno akumuliranih metabolitov in diferencialno izraženih genov izbranih metabolnih poti sekundarnega metabolizma, glede na analizo metaboloma (Preglednica 16) in analizo izražanja genov (Preglednica 15).

Figure 43: Presentation of differentially accumulated metabolites and differentially expressed genes from selected metabolic pathways of secondary metabolism according to metabolome (Table 16) and gene expression analysis (Table 15).

Na sliki so z barvanimi kvadrati prikazani identificirani metaboliti iz interakcije trte s posamezno fitoplazmo (FDf – zgornji kvadrat in BNF – spodnji kvadrat). Prav tako so prikazani diferencialno izraženi geni iz interakcije trte s fitoplazmo FDF avgusta iz vinograda v Straži. Vsak obarvan kvadrat predstavlja razmerje količine metabolita oziroma razmerje v izražanju gena med zdravimi in okuženimi rastlinami, kjer rdeča barva pomeni višjo, zelena pa nižjo vrednost v okuženih rastlinah glede na zdrave, bela pa nespremenjeno vrednost. Z zvezdicami so označeni statistično značilne razlike med zdravimi in okuženimi rastlinami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,0005$).

Fitoplazmi BNF in FDF v vinski trti inducirata povečano nastajanje dveh izomerov katehina in epikatehina, vendar pa je povečano nastajanje statistično značilno le v primeru okužbe z

BNf (Slika 43). Oba izomera spadata v skupino flavan-3-ol iz družine flavonoidov in imata antioksidantne lastnosti. Vsebnost flavanolov v listih vinske trte sorte chardonnay je bila poleti v času bolezenskih znamenj višja v rastlinah okuženih z BNf v primerjavi z zdravimi rastlinami (Rusjan in sod., 2012) Povečano količino flavanolov, akumulacijo proantocianidinov in antocianinov pa so pokazali tudi v rdečih sortah trt okuženih s fitoplazmo FDF (Margaria in sod., 2014) in virusom GLRaV3 (Gutha in sod., 2010).

5.2.7. Domnevna patogeneza fitoplazem povezana s spremenjenim sladkornim metabolizmom gostitelja (Slika 44)

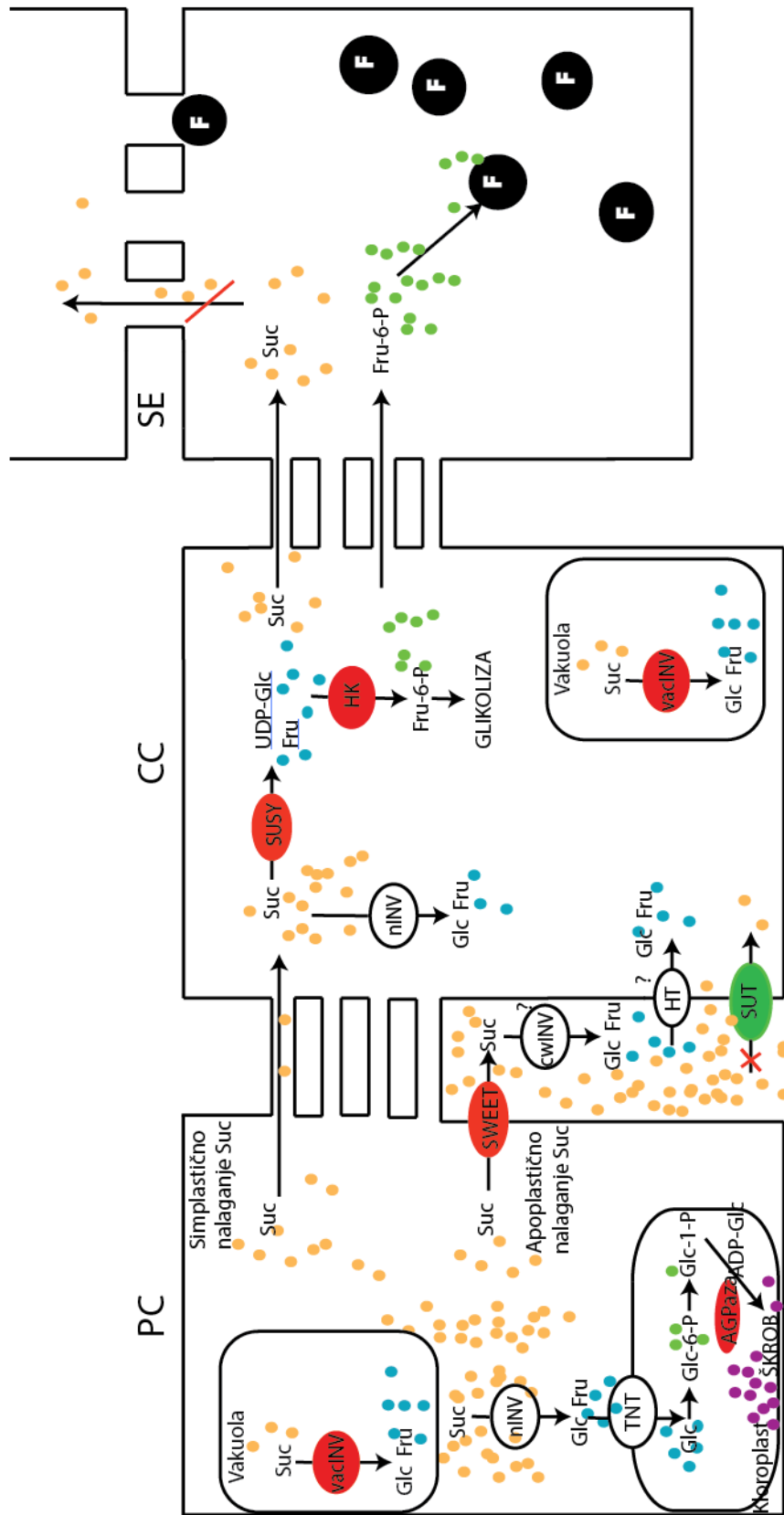
Fitoplazme so obligatni paraziti saj je njihovo preživetje in razmnoževanje odvisno od gostiteljev. Parazitizem je posledica dejstva, da nimajo genov za sintezo aminokislin, za sintezo maščobnih kislin, genov cikla TCA in oksidativne fosforilacije. Prav tako v njihovem genomu niso našli genov za podenote ATPaze, zato je glikoliza verjetno glavni način pridobivanja energije (Oshima in sod., 2004; Bai in sod., 2006; Kube in sod., 2008; Tran-Nguyen in sod., 2008, Mitrović in sod., 2014). Poleg glikolize pa lahko fitoplazme pridobijo energijo preko katabolizma karboksilnih kislin, predvsem iz malata in citrata (Kube in sod., 2012).

Fitoplazme so v sitastih celicah floema, kjer je njihova patogenost verjetno povezana z izrabljanjem sladkornega metabolizma rastlin, za pridobivanje energije za svoje potrebe. Preko povečanega izražanja transporterjev saharoze SWEET in zmanjšane izražanja transporterjev saharoze SUT (Santi in sod., 2013b, a) vplivajo fitoplazme na slabše nalaganje saharoze v floem zaradi česar se ta akumulira v apoplastu. Nalaganje saharoze v floem verjetno poteka tudi simplastično, vendar je celokupno nalaganje upočasnjeno. Delež saharoze, ki pride v sitaste celice floema bi lahko porabile fitoplazme. Ker pa nimajo encimov za razgradnjo saharoze, verjetno presnavljajo glukozo in fruktozo. Za pridobitev heksoz vplivajo na povečano izražanje gena in povečanje encimske aktivnosti SUSY, ki ima glavno vlogo pri presnovi saharoze v floemu in nastajanju fruktoze in UDP-glukoze. Poveča pa se tudi izražanje vakuolne invertaze, ki tvori fruktozo in glukozo. Ker fitoplazmam za glikolizo manjkajo samo geni za heksokinaze, ki fosforilirajo sladkorje, bi bil vnos fruktoza-6-fosfata, kot izhodišča za glikolizo, zanje energetsko najučinkovitejši. Povečano vsebnost fruktoza 6-fosfata, glukosa 6-fosfata in manosa 6-fosfata smo določili v rastlinah, okuženih s FDF in BNf (Slika 44). Ob predpostavki, da se saharoza nalaga v apoplastu, fitoplazme pa so v sitastih ceveh floema, bi bilo zanimivo preveriti tudi izražanje invertaze celične stene, ki v apoplastu razgradi saharozo v fruktozo in heksozo, ki se nato preko heksoza transporterjev preneseta v sitaste celice floema za potrebe fitoplazem. Ker se količina saharoze v nalagalnem floemu listov zmanjša, se spremeni njihov status iz izvora v ponor. Posledično se zmanjša transport sladkorjev do drugih ponornih tkiv. Jagode tako ne morejo kopiciti zadostne količine sladkorjev, ne dozorevajo in vinogradniki ostanejo brez pravega pridelka. Poleg slabšega prenosa sladkorjev po

floemu je okrnjen prenos tudi drugih asimilatov. Sladkorji se ne kopičijo samo v apoplastu pač pa tudi v mezofilnih celicah, kar inhibira fotosintezo in poveča sintezo škroba. Poleg tega vplivajo sladkorji tudi na izražanje genov sinteze antocianov. Razgradnja klorofila in sinteza antocianov pa vodi do pojava značilnih bolezenskih znamenj na listih.

5.2.8. Razlike med fitoplazmama BNf in FDF

Študija izražanja genov na interakciji trte s FDF je pokazala podoben trend izražanja izbranih genov kot pri interakciji trte z BNf. Za ugotavljanje razlik med obema fitoplazmama, bi bilo na interakciji trte s FDF potrebno narediti študijo celotnega transkriptoma ali z uporabo mikromrež ali pa z novimi metodami sekvenciranja. Na ravni metaboloma smo ugotovili, da imata interakciji trte s FDF in trte z BNf drugačen metabolni profil. Obe fitoplazmi povečata tok cikla TCA, vendar pa so med zdravimi in okuženimi rastlinami pri obeh fitoplazmah značilno različni drugi metaboliti. V primerjavi s FDF, spremeni fitoplazma BNf vsebnost večjega števila različnih sladkorjev. Na drugi strani pa fitoplazma FDF vpliva na povečano vsebnost aminokislin, kar nismo zaznali pri BNf (Preglednica 16). Kljub temu, da smo pri obeh fitoplazmah primerjali razlike v metabolnem profilu med zdravimi in okuženimi rastlinami, pa so razlike lahko tudi posledica dejstva, da smo imeli v poskusih različni sorti vinske trte – rdečo modro frankinjo v interakciji s FDF in beli chardonnay v interakciji z BNf. Posamezne sorte so različno občutljive na okužbo s fitoplazmami in sorta chardonnay velja za bolj občutljivo (Landi in Romanazzi, 2011). Z analizo PCA smo pokazali, da se na podlagi vsebnosti metabolitov zdrave rastline lepo ločijo glede na njihovo sorto (Slika 34). Ključni metaboliti za ločevanje pa so bili, razen palmitinske kisline, različni od tistih, ki so v posameznih intrakcijah ločevali zdrave rastline od rastlin okuženih s fitoplazmama (Preglednica 12). Sem sodijo predvsem različne kisline iz sekundarnega metabolizma rastlin. Vsekakor pa je zanimivo, da je pri obeh interakcijah prišlo do značilnega povišanja vsebnosti fosforiliranih sladkorjev, heksoza-6-fosfatov, kot potencialnim virom energije za fitoplazme. Vsebnost heksoza-6-fosfatov se med posameznima sortama ni značilno razlikovala.



Slika 44: Delovni model patogeneze fitoplazem.

Figure 44: Working model of Phytoplasma pathogenesis.

Na sliki je shema predpostavljene patogeneze fitoplazem preko spremenjenega sladkornega metabolizma, predvsem zaradi neučinkovitega nalaganja saharaže v floem. Predstavljen je nalagalni floem fotosintezno aktivnih listov (izvor). PC so parenhimske celice, CC so celice spremeljvalke, SE so sitaste celice cevi. Z oranžnimi krogi je označena saharaža (Suc), z modrimi krogi so označene heksoze (Glc-glukoza in Fru-fruktoza), z zelenimi krogi so označene heksoze 6-fosfati in z vijoličnimi krogi je označen škrob. Celice fitoplazem so označene s črnimi krogi in črko F. Proteini v ovalih so označeni glede na izražanje gena v s fitoplazmami okuženih rastlinah: rdeča v primeru povečanega izražanja, zelena v primeru manjšega izražanja in bela v primeru nespremenjenega ali neznanega izražanja.

6 SKLEPI

V študiji spremljanja titra FDF med rastno sezono smo pokazali, da je fitoplazma prisotna v vseh testiranih tkivih vinske trte. Prvič smo pokazali njeno prisotnost v viticah in cvetovih, visok titer pa smo določili v jagodnih tkivih in s tem potrdili našo hipotezo. Titer FDF je v tkivih z bolezenskimi znamenji med sezono naraščal. Fitoplazmo FDF pa smo uspešno zaznali tudi v začetku raste sezone, pred pojavom bolezenskih znamenj.

Ocenili smo, da se je bolezen FD v vinogradu v Izoli širila hitreje od teoretičnih napovedi in sicer s faktorjem 40.

Pri spremljanju s FDF okuženih rastlin v mrežniku, smo opazili pojav okrevanja rastlin v odsotnosti ponovne inokulacije s prenašalcem ameriškim škržatkom.

Trend izražanja večine izbranih genov pri interakciji trte s FDF je bil podoben v obeh vinogradih, Izoli in Straži. Za večino genov je bilo izražanje med zdravimi in s FDF okuženimi rastlinami statistično značilno različno avgusta v času bolezenskih znamenj in je bilo podobno kot v predhodnih raziskavah interakcije trte z BNf. Statistična analiza PCA je pokazala, da na podlagi izražanja izbranih genov lahko poleti ločimo rastline glede na njihov zdravstveni status. Ključni geni za ločitev so *VvAGPL*, *VvAPX* in *VvGLC2*.

V primerjavi z zdravimi rastlinami smo v listih rastlin, okuženih s fitoplazmama BNf ali FDF, pokazali povečano količino sladkorjev, predvsem saharoze in škroba.

Poleg vsebnosti sladkorjev smo v rastlinah, okuženih s FDF, pokazali tudi višjo aktivnost encima saharoza sintaza (SUSY).

Skupni rezultati transkriptomске in biokemične analize so potrdili naša predvidevanja, da fitoplazemska okužba vpliva na spremenjen sladkorni metabolizem.

Transkriptomška analiza je skupaj z analizo metaboloma pokazala povezanost fitoplazemske okužbe s fenolnim metabolizmom in odkrila gen *VvDMR6* s še neznano vlogo kot pomemben dejavnik okužbe.

Metabolomska študija interakcije trte s FDF in BNf je pokazala, da fitoplazmi povzročata različen metabolni profil. Delno je to posledica različne sorte trte pri obeh interakcijah, delno pa posledica različnega tipa fitoplazme. Na podlagi količine vseh metabolitov je analiza PCA pokazala, da se rastline lahko ločijo glede na njihov zdravstveni status, vendar pa so metaboliti, ključni za ločevanje, različni pri obeh interakcijah. Pri obeh interakcijah smo pokazali statistično značilno višjo vsebnost heksoza-6-fosfatov, ki so kot začetne komponente glikolize domnevni vir energije za fitoplazme. Obe fitoplazmi tudi povečata tok cikla TCA.

7 POVZETEK

7.1. POVZETEK

Fitoplazme so znotrajcelične bakterije brez celične stene iz raznolikega razreda *Mollicutes*. Med vsemi bakterijami imajo najmanjši genom, v katerem ni genov za številne ključne metabolne poti. To pomanjkanje uspešno nadomestijo z izrabljanjem metabolizma gostiteljev, ki so tako rastline kot žuželke. V rastlinah so v celicah sitastih cevi floema in se lahko skozi plazmodezme s floemskim tokom širijo po rastlini.

Trsne rumenice (angl. grapevine yellows – GY) so skupina bolezni, ki jih na vinski trti povzročajo različne fitoplazme. Pri nas sta najpogostejši fitoplazmi BNf, ki povzroča navadno trsno rumenico (Bois noir) in FDF, ki povzroča zlato trsno rumenico (Flavescence dorée). Na podlagi vizuelnega pregleda okuženih trt ne moremo ločiti posameznih fitoplazem trsnih rumenic, saj povzročajo enaka bolezenska znamenja. Zaradi svojega, na trto specializiranega monofagnega prenašalca, ameriškega škržatka, pa fitoplazma FDF lahko povzroči veliko gospodarsko škodo in ima karantenski status (seznam EPPO A2). Slednji dodatno otežuje študije interakcije vinske trte s fitoplazmo FDF, saj je potrebno zakonsko vse okužene rastline iz vinograda odstraniti. V ta namen smo v vinogradu v Straži postavili karantenski mrežnik, ki nam je omogočal večletno spremljanje okužbe s FDF.

Z metodo kvantitativnega PCR v realnem času smo v dveh različnih vinogradih, z različnima sortama vinske trte, med rastno sezono spremljali količino fitoplazme FDF v različnih tkivih vinske trte. Njeno prisotnost smo dokazali v vseh tipih tkiv, visok titer pa smo določili v jagodah. Med rastno sezono je titer FDF v tkivih z bolezenskimi znamenji naraščal. Ugotovili smo, da FDF lahko detektiramo že v začetku rastne sezone, pred pojavom bolezenskih znamenj, kadar je infekcijski pritisk velik. Zgodnja detekcija FDF bi lahko pripomogla k boljšemu obvladovanju širjenja bolezni.

Fitoplazem danes še ne znamo gojiti izven gostitelja, v čisti kulturi, kar otežuje njihovo proučevanje. Poleg tega je njihov prenos na gostiteljske rastline zelo slab in nekontroliran. Posledično je fiziologija patogeneze fitoplazem zelo slabo raziskana.

Ker so znamenja bolezni posledica spremenjenega delovanja metabolizma in so tista, ki jih povzročata BNf in FDF enaka, smo želeli preveriti na ravni metaboloma in na ravni izražanja izbranih genov ali FDF sproža podoben fiziološki odziv trte kot BNf.

Izbrali smo 14 genov, ki so vključeni v različne metabolne poti: sladkorni metabolizem, sekundarni metabolizem, metabolizem reaktivnih kisikovih zvrsti, poti vključene v obrambo rastline proti patogenom in druge. Njihovo izražanje smo opazovali med rastno sezono v rastlinah, okuženih s FDF, in v zdravih rastlinah iz dveh vinogradov z različnima

lokacijama in različnima rdečima sortama vinske trte. V obeh vinogradih, Izoli in Straži, je bil trend izražanja večine genov podoben. Statistično značilne razlike v izražanju genov med zdravimi rastlinami in rastlinami okuženimi s FDF so bile avgusta, v času bolezenskih znamenj in so bile podobne kot pri interakciji vinske trte z BNf. Ugotovili smo, da lahko iz podatkov profila izražanja izbranih genov poletnih vzorcev predvidimo bolezensko stanje rastlin. Po statistični analiza PCA so ključni geni za ločitev *VvAGPL*, *VvAPX* in *VvGLC2*.

Fitoplazme vplivajo na metabolizem ogljikovih hidratov gostiteljskih rastlin, zato smo preverili vsebnost posameznih sladkorjev in aktivnost nekaterih encimov metabolizma ogljikovih hidratov. V času bolezenskih znamenj smo v listih rastlin okuženih s fitoplazmama BNf ali FDF pokazali povečano količino sladkorjev, predvsem saharoze in škroba. Poleg vsebnosti sladkorjev smo v rastlinah, okuženih s FDF, pokazali tudi višjo aktivnost encima saharoza sintaza (*SUSY*), ne pa tudi spremenjene aktivnosti encimov ADP-glukoza-pirofosforilaza (*AGPaza*) in nevtralna invertaza (*nINV*).

S tehniko GC-MS smo ugotavljali razlike v metabolnem profilu zdravih rastlin in z BNf oziroma FDF okuženih rastlin vinske trte. Fitoplazmi povzročata različni metabolni profil, ki pa je lahko posledica različne sorte trte pri obeh interakcijah in/ali različnega tipa fitoplazme. Na podlagi količine vseh metabolitov je analiza PCA pokazala, da se rastline lahko ločijo glede na njihov zdravstveni status, vendar pa so metaboliti, ključni za ločevanje, različni pri obeh interakcijah. Pri obeh interakcijah smo pokazali statistično značilno višjo vsebnost heksoza 6-fosfatov, ki so kot začetne komponente glikolize domnevni vir energije za fitoplazme. Obe fitoplazmi tudi povečata tok cikla TCA.

Fitoplazme so v sitastih celicah floema, kjer je njihova patogenost verjetno povezana z izrabljanjem sladkornega metabolizma rastlin, za pridobivanje energije za svoje potrebe. Predpostavljamo, da fitoplazme vplivajo na slabše nalaganje saharoze v floem. Njena koncentracija v nalagalnem floemu listov se zmanjša kar spremeni njihov status iz izvora v ponor. Posledično se zmanjša transport sladkorjev do drugih ponornih tkiv, jagode ne morejo kopičiti zadostne količine sladkorjev, ne dozorevajo in vinogradniki ostanejo brez pravega pridelka.

7.2. SUMMARY

Phytoplasmas are intracellular pathogenic bacteria, lacking cell wall and belong to the class *Mollicutes*. They have the smallest genome among bacteria, lacking genes for key metabolic pathways. To compensate this scarcity they manipulate their host metabolism. Phytoplasmas live and reproduce in phloem sieve tubes in plants and in insects, which are the main vectors of transmission. In plants they move with the phloem sap through the plasmodesmata.

Grapevine yellows (GY) are a group of diseases, caused by different phytoplasmas. In Europe the most common phytoplasmas on grapevine are BNp phytoplasma causing Bois noir disease and FDp phytoplasma causing Flavescence dorée. As they cause similar symptoms one cannot distinguish with which phytoplasma plant is infected. However due to its specialized monophagous vector, *Scaphoideus titanus*, FDp can cause great economic damage and is listed as a quarantine pest (EPPO A2 list of pests). This quarantine status of FDp additionally hinders their studies as all infected plants have to be removed from the vineyard. For long term observation of the grapevine FDp interaction a quarantine net was set up.

Quantitative real-time PCR was used to follow the seasonal changes of FDp titre in two different grapevines with different cultivars. Besides its known presence in the leaf veins, FDp was also detected in all tissue types with high titre determined in berries. A trend of increasing FDp titre throughout the growing season in tissues with symptoms was recorded. Early detection of FDp in symptomless tissues was possible and positively correlated with high infection pressure. The results of this study may result in more reliable and accurate diagnostics of FDp, allowing better disease management.

Research of phytoplasma biology is very difficult. The main obstacle presents the inability of phytoplasma cultivation in artificial media without the presence of their hosts. Furthermore, phytoplasma transmission to host plants is very difficult and uncontrollable. This problems presents a great obstacle in research of the phytoplasma – plant interaction and the research work on physiology of the pathogenesis, which all therefore remains poorly understood.

As phytoplasmas BNp and FDp cause similar disease symptoms, which are the consequence of changing plant metabolism, we were trying to determine if they cause similar physiological response on the level of gene expression and metaboloma level.

A set of 14 genes from different metabolic pathways was selected, including sugar metabolism, secondary metabolism, metabolism of reactive oxygen species, pathogen assisted proteins and others. During the growing season, their expression was observed in healthy and FDp infected plants from two different vineyards with different red cultivars.

The trend of gene expression was similar in both vineyards for most of the genes. Statistically significant differences between healthy and FDp infected plants were observed in august in time of pronounced symptoms and were similar to differences observed in BNp-grapevine interaction from previous studies. From gene expression profiles we could distinguish the health status of plants sampled in summer. According to PCA analysis the main genes responsible for the separation are *VvAGPL*, *VvAPX* in *VvGLC2*.

Using GC-MS technique we assessed the differences in metabolic fingerprint of healthy and BNp or FDp infected grapevine samples. Both phytoplasmas cause different metabolic fingerprint, which can be the consequence of different grapevine cultivar used in the interaction study and/or different phytoplasma type. PCA analysis based on all metabolites showed separation of healthy and phytoplasma infected samples however the main metabolites responsible for the health status separation are different in both interactions. Both phytoplasmas induce higher levels of hexose 6-phosphates, which could be as the starting molecule of glycolysis the main energy source for phytoplasmas.

Phytoplasmas are present in phloem sieve tubes where their pathogenicity could be related with the manipulation of plant sugar metabolism to gain energy for their life. Phytoplasmas presumably decrease sucrose loading in phloem. Consequentially sucrose concentration in loading phloem of source leaves decreases turning leaves to sink. Sugar transport to other sink tissues is slowed down, leading to insufficient sugar accumulation in berries and loss of the harvest.

8 VIRI

- Agasse A., Vignault C., Kappel C., Conde C., Delrot S. 2009. Sugar transport and sugar sensing in grape. V: *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Roubelakis-Angelakis, Kalliopi A. (Eds). New York, Springer: 105-139
- Akihiro T., Mizuno K., Fujimura T. 2005. Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant & cell physiology*, 46: 937–946
- Albertazzi G., Milc J., Caffagni A., Francia E., Roncaglia E., Ferrari F., Tagliafico E., Stefani E., Pecchioni N. 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science*, 176: 792–804
- Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets Normalization of Real-Time Quantitative Reverse. *Cancer research*, 64: 5245-5250
- Aradhya M.K., Dangl G.S., Prins B.H., Boursiquot J.M., Walker M.A., Meredith C.P. Simon C.J. 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. *Genetical Research*, 81: 179–192
- Arocha Y., Antesana O., Montellano E., Franco P., Plata G., Jones P. 2007. “Candidatus *Phytoplasma lycopersici*”, a phytoplasma associated with “hoja de perejil” disease in Bolivia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57: 1704–1710
- Azadvar M., Baranwal V.K., Yadava D.K. 2011. Transmission and detection of toria [*Brassica rapa* L. subsp. *dichotoma* (Roxb.)] phyllody phytoplasma and identification of a potential vector. *Journal of General Plant Pathology*, 77: 194–200
- Bai X., Correa V.R., Toruño T.Y., Ammar E.D., Kamoun S., Hogenhout S. 2009. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular plant-microbe interactions*, 22: 18–30
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S.A., Radek A.J., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., Hogenhout S. 2006. Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. *Journal of bacteriology*, 188: 3682–3696
- Van Bel J.E. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment*, 26: 125–149

- Belhadj A., Telef N., Saigne C., Cluzet S., Barrieu F., Hamdi S., Mérillon J.M. 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant physiology and biochemistry*, 46: 493–499
- Bertaccini A., Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 355–378
- Bertamin M., Nedunchezian N. 2001. Effects of Phytoplasma [Stolbur-Subgroup (Bois Noir-BN)] on Photosynthetic Pigments, Saccharides, Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase, Nitrate and Nitrite Reductases, and Photosynthetic Activities in Field-Grown Grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonn). *Photosynthetica*, 39: 119–122
- Bertamini M., Muthuchelian K., Grando M.S., Nedunchezian N. 2002a. Effects of phytoplasma infection on growth and photosynthesis in leaves of field grown apple. *Photosynthetica*, 40: 157–160
- Bertamini M., Nedunchezian N., Tomasi F., Grando M. 2002b. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61: 357–366
- Boudon-Padieu E. 2005. Phytoplasmes associés aux jaunisses de la vigne et vecteurs potentiels. *Bulletin del'OIV*, 79: 299–309
- Braun E., Sinclair W. 1976. Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. *Cytology and Hystology*, 66: 598–607
- Braun D.M., Wang L., Ruan Y.L. 2014. Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of experimental botany*, 65, 7: 1713-1735
- Brzin J., Petrovič N., Ravnikar M., Kovač M. 2011. Induction of sucrose synthase in the phloem of phytoplasma infected maize. *Biologia planatarum*, 55: 711–715
- Bulgari D., Quaglino F., Bianco P.A., Casati P. 2011. Preliminary results on endophytic bacterial community fluctuation during phytoplasma infection. *Bulletin of insectology*, 64: 213–214
- Camps C., Kappel C., Lecomte P., Léon C., Gomes E., Coutos-Thévenot P., Delrot S. 2010. A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *Journal of experimental botany*, 61: 1719–1737
- Carraro L, Ermacora P, Loi N, Osler R, 2004. The recovery phenomenon in apple proliferation-infected apple trees. *Journal of Plant Pathology*, 86: 141–146

- Castellarin S.D., Pfeiffer A., Sivilotti P., Degan M., Peterlunger E., Gaspero G. 2007. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, cell & environment*, 30: 1381–1399
- Caudwell A. 1961. Les phénomènes de rétablissement chez la flavescence dorée de la vigne. *Annales des Epiphyties*, 12: 347–354
- Caudwell A. 1964. Identification d'une nouvelle maladie a virus de la vigne, "la Flavescence doree": etude des phenomenes de localisation des symptomes et de retablissement. *Annales des Epiphyties*, 15: 1–193
- Chalker-scott L. 1999. Invited Review Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70, 1: 1–9
- Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q., Guo W.J., Kim J.G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Somerville S.C., Mudgett M.B., Frommer W.B. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468: 527–532
- Chen L.Q., Qu X.Q., Hou B.H. Sosso D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 335: 207–211
- Choi Y.H., Tapias E.C., Kim H.K., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Verhoeven J., Brzin J., Žel J., Verpoorte R. 2004. Metabolic Discrimination of *Catharanthus roseus* Leaves Infected by *Phytoplasma* Using $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy and Multivariate Data Analysis 1. *Plant physiology*, 135: 2398–2410
- Constable F.E., Gibb K.S., Symons R.H. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267–276
- Coombe B.G. 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1: 104–110
- Cross J.M., Clancy M., Shaw J.R., Greene T.W., Schmidt R.R., Okita T.W., Hannah L.C. 2004. Both subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase are regulatory. *Plant physiology*, 135: 137–144
- Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Toševski I. 2014. Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology*, 63: 42–53
- Van Damme M., Huibers R.P., Elberse J., Van den Ackerveken G. 2008. Arabidopsis DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 54: 785–793

- Davies C., Robinson P. 1995. Sugar Accumulation in Grape Berries. *Plant physiology*, 111: 275–283
- Škorić D., Šarić A., Vibio M., Murari E., Krjačić M., Bertaccini. 1998. Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. *Vitis*, 37: 171–175
- Dixon D.P., Laphorn A., Edwards R. 2002. Protein family review Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3: 1–10
- Dixon R., Paiva N.L. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant cell*, 7: 1085–1097
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 33: 259–266
- Duduk B., Ivanovic M., Dukic N., Botti S., Bertaccini A. 2003. First report of an elm yellows subgroup 16SrV-C phytoplasma infecting grapevine in Serbia. *Plant Disease*, 87: 599
- Fernie A.R., Stitt M. 2012. On the discordance of metabolomics with proteomics and transcriptomics: coping with increasing complexity in logic, chemistry, and network interactions scientific correspondence. *Plant physiology*, 158: 1139–1145
- Fiehn O. 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology*, 48: 155–171
- Firrao G., Garcia-Chapa M., Marzachi C. 2007. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in bioscience*, 12: 1353–1375
- Gai Y.P., Han X.J., Li Y.Q., Yuan C.Z., Mo Y.Y., Guo F.Y., Liu Q.X., Ji X.L. 2014. Metabolomic analysis reveals the potential metabolites and pathogenesis involved in mulberry yellow dwarf disease. *Plant, cell & environment*, 37, 6: 1474-1490
- Gambino G., Boccacci P., Margaria P., Palmano S., Gribaudo I. 2013. Hydrogen peroxide accumulation and transcriptional changes in grapevines recovered from flavescence dorée disease. *Phytopathology*, 103: 776–784
- Gamm M., Héloir M.C., Bligny R., Vaillant-Gaveau N., Trouvelot S., Alcaraz G., Frettinger P., Clément C., Pugin A., Wendehenne D., Adrian M. 2011. Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Molecular plant-microbe interactions*, 24: 1061–1073
- Gibb K.S., Constable F.E., Moran J.R., Padovan A.C. 1999. Phytoplasmas in Australian grapevines – detection, differentiation and associated diseases. *Vitis*, 38: 107–114

- Giorno F., Guerriero G., Biagetti M., Ciccotti A.M., Baric S. 2013. Gene expression and biochemical changes of carbohydrate metabolism in in vitro micro-propagated apple plantlets infected by “Candidatus Phytoplasma mali”. *Plant physiology and biochemistry*, 70: 311–317
- Guo W.J., Nagy R., Chen H.Y., Pfrunder S., Yu Y.C., Santelia D., Frommer W.B., Martinoia E. 2014. SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of Arabidopsis roots and leaves. *Plant physiology*, 164: 777–789
- Gutha L.R., Casassa L.F., Harbertson J.F., Naidu R. 2010. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC plant biology*, 10: 187
- Guthrie J.N., Walsh K.B., Scott P.T., Rasmussen T.S. 2001. The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58: 23–30
- Hegde Y.R., Keshgond R.S. 2013. Role of pathogenesis-related proteins in plant disease management - a review. *Agricultural Reviews*, 34: 145–151
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S. 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in plant science*, 14: 125–132
- Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S. 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 6416–6421
- Hren M. 2007. Interakcije med fitoplazmami in vinsko trto (*Vitis vinifera* L.) na ravni izražanja genov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 150 str.
- Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology*, 56: 785–796
- Hren M., Nikolić P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden K. 2009a. “Bois noir” phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC genomics*, 10: 460
- Hren M., Ravnikar M., Brzin J., Ermacora P., Carraro L., Bianco P. A., Casati P., Borgo M., Angelini E., Rotter A., Gruden K. 2009b. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology*, 58:170-180

- Hwang S.K., Salamone P.R., Okita T.W. 2005. Allosteric regulation of the higher plant ADP-glucose pyrophosphorylase is a product of synergy between the two subunits. *FEBS letters*, 579: 983–990
- Irpem T, Spiroplasma P, Team W, 2004. “Candidatus Phytoplasma”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54: 1243–1255
- Junqueira A., Bedendo I., Pascholati S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65: 181–185
- Kakizawa S. 2008. Genome sequencing and analysis of cell surface membrane proteins of phytoplasmas. *Journal of General Plant Pathology*, 74: 457–458
- Kartte S., Seemüller E. 1991. Histopathology of Apple Proliferation in *Malus Taxa* and Hybrids of Different Susceptibility. *Journal of Phytopathology*, 131: 149–160
- Keller M. 2010. The science of grapevine. Amsterdam, Elsevier: 400 str.
- Koch K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 509–540
- Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current opinion in plant biology*, 7: 235–246.
- Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in plant science*, 10: 236–242
- Kogovšek P., Hodgetts J., Prezelj N., Nikolić P., Mehle N., Lenarčič R., Rotter A., Dickinson M., Boonham N., Dermastia M., Ravnikar M. 2014. LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site of Flavescence dorée phytoplasma in grapevine. Sprejet v objavo v reviji *Plant Pathology*
- Kortekamp A. 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant physiology and biochemistry*, 44: 58–67
- Kube M., Mitrovic J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E. 2012. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal*, 2012: 25
- Kube M., Schneider B., Kuhl H., Dandekar T., Heitmann K., Migdoll A.M., Reinhardt R., Seemüller E. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma “Candidatus Phytoplasma mali”. *BMC genomics*, 9: 306

- Landi L., Romanazzi G. 2011. Seasonal variation of defense-related gene expression in leaves from Bois noir affected and recovered grapevines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59: 6628–6637
- Lecourieux F., Kappel C., Lecourieux D., Serrano A., Torres E., Arce-Johnson P., Delrot S. 2013. An update on sugar transport and signalling in grapevine. *Journal of Experimental Botany*. Doi: 10.1093/jxb/ert394: 12 str.
- Lee I.M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. 2000. PHYTOPLASMA: Phytopathogenic Mollicutes1. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255
- Lee I., Gundersen-rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk M., Bldg A., Laboratoryz B. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16s rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169
- Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bottner K.D., Marcone C., Seemüller E. 2004a. “Candidatus Phytoplasma asteris”, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54: 1037–1048
- Lee I., Martini M., Marcone C., Zhu S.F. 2004b. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of “ Candidatus Phytoplasma ulmi ” for the phytoplasma associated with elm yellows. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54: 337–347
- Lepka P., Stitt M., Moll E., Seemüller E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 59–68
- Lessio F., Tedeschi R., Alma A. 2007. Population dynamics , host plants and infection rate with stolbur phytoplasma of *hyalesthes obsoletus* signoret in north-western italy. *Journal of Plant Pathology*, 89: 97–102
- Lherminier J., Courtois M., Caudwell A. 1994. Determination of the distribution and multiplication sites of Flavescence Dorée mycoplasma-like organisms in the host plant *Vicia faba* by ELISA and immunocytochemistry. *Physiological and molecular plant pathology*, 45: 125–138
- Lu Y.T., Li M.Y., Cheng K.T., Tan C.M., Su L.W., Lin W.Y., Shih H.S., Chiou T.J., Yang J.Y. 2014. Transgenic plants that express the phytoplasma effector SAP11 show altered phosphate starvation and defense responses. *Plant physiology*, 164: 1456–1469
- Ludewig F., Flüge U.I. 2013. Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Frontiers in plant science*, 4: 231

- Machenaud J., Henri R., Noubhani M.D., Pracros P., Renaudin J., Eveillard S. 2007. Gene expression and enzymatic activity of invertases and sucrose synthase in *Spiroplasma citri* or stolbur phytoplasma infected plants. *Bulletin of Insectology*, 60: 219–220
- Marcone C., Weintraub P.G., Jones P. 2009. Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. V: *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts and vectors*. Weintraub P., Jones P. (eds.). Velika Britanija, CABI: 114–131
- Margaria P., Abbà S., Palmano S. 2013. Novel aspects of grapevine response to phytoplasma infection investigated by a proteomic and phospho-proteomic approach with data integration into functional networks. *BMC genomics*, 14: 38
- Margaria P., Ferrandino A., Caciagli P., Kedrina O., Schubert A., Palmano S. 2014. Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant, cell & environment*, 37: 2183–2200
- Margaria P., Palmano S. 2011. Response of the *Vitis vinifera* L. cv. “Nebbiolo” proteome to Flavescence dorée phytoplasma infection. *Proteomics*, 11: 212–224
- Mari A., Lyon D., Fragner L., Montoro P., Piacente S., Wienkoop S., Egelhofer V., Weckwerth W. 2013. Phytochemical composition of *Potentilla anserina* L. analyzed by an integrative GC-MS and LC-MS metabolomics platform. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 9: 599–607
- Martini M., Botti S., Marcone C., Mazachi C., Casati P., Bianco P.A., Benedetti R., Bertaccini A. 2002. Genetic variability among flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 197–208
- Matus J.T., Vega A., Loyola R., Serrano C., Cabrera S., Arce-Johnson P. 2008. Phytoplasma and virus detection in commercial plantings of *Vitis vinifera* cv. Merlot exhibiting premature berry dehydration. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11: 1–10
- Maust B.E., Espadas F., Talavera C., Aguilar M., Santamaría J.M., Oropeza C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology*, 93: 976–981
- Mehle N., Prezelj N., Hren M., Boben J., Gruden K., Ravnikar M. 2013. A real time PCR Detection System for the Bois Noir and Flavescence Dorée Phytoplasmas and Quantification of the Target DNA. V: *Phytoplasma Methods in Molecular Biolog.* Matt Dickinson J.H. (ed). New York, Humana Press: 253–268
- Mendoza M. 2011. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. *Biotechnología Vegetal*, 11: 67–75

- Mitrović J., Siewert C., Duduk B., Hecht J., Mölling K., Broecker F., Bayerlein P., Büttner C., Bertaccini A., Kube M. 2014. Generation and analysis of draft sequences of “stolbur” phytoplasma from multiple displacement amplification templates. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 24: 1–11
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405–410
- Monavarfeshani A., Mirzaei M., Sarhadi E., Amirkhani A., Nekouei M.K., Haynes P.A., Mardi M., Salekdeh G.H. 2013. Shotgun Proteomic Analysis of the Mexican Lime Tree Infected with “*Candidatus Phytoplasma aurantifolia* .” *Journal of proteome research*, 12: 785–795
- Musetti R. 2010. Biochemical Changes in Plants Infected by Phytoplasmas. V: *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts and vectors*. Weintraub P., Jones P. (eds.). Velika Britanija, CABI: 132-146
- Musetti R., De Marco F., Farhan K., Polizzotto R., Santi S., Ermacora P., Margaria P. 2011. Phloem-specific protein expression patterns in apple and grapevine during phytoplasma infection and recovery. *Bulletin of Insectology*, 64: 211–212
- Musetti R., Buxa S.V., De Marco F., Loschi A., Polizzotto R., Kogel K.H., van Bel A.J.E. 2013. Phytoplasma-triggered Ca(2+) influx is involved in sieve-tube blockage. *Molecular plant-microbe interactions*, 26: 379–386
- Musetti R., Favali M.A., Pressacco L. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*, 102: 133–147
- Musetti R., Marabottini R., Badiani M., Martini M., Sanit L. 2007. On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence doree disease. *Functional Plant Biology*, 34: 750–758
- Musetti R., di Toppi L.S., Ermacora P., Favali M. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*, 94: 203–208
- Nejat N., Tan Y.H. 2014. Genome Plasticity in Obligate Parasitic Phytoplasmas. V: *Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria*. Katsy E.I. (ed.). New York, Springer: 155–169
- Nicolaisen M., Christensen N.M. 2007. Phytoplasma induced changes in gene expression in poinsettia. *Bulletin of Insectology*, 60: 215–216
- Nicolas P., Lecourieux D., Gomès E., Delrot S., Lecourieux F. 2013. The grape berry-specific basic helix-loop-helix transcription factor VvCEB1 affects cell size. *Journal of experimental botany*, 64: 991–1003

- Nikolić P, 2011. Vzorci izražanja genov v listih vinske trte okužene s fitoplazmo povezano s počrnlostjo lesa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študijbiotehnologije: 155 str.
- Oropeza C., Cordova I., Chumba A., Narváez M. Sáenz L., Ashburner R., Harrison N. 2011. Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Annals of Applied Biology*, 159: 109–117
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H.-Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36: 27-29
- Osler R, Carraro L, Refatti E. 1993. Symptom expression and disease occurrence of a yellows disease of Grapevine in Northeastern Italy. *Plant Disease*, 77: 496-498
- Peters D. J., Constabel C. P. 2002. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*) *Plant Journal*, 32: 701-712
- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P.A., Wei W., Davis R.E. 2013. “Candidatus *Phytoplasma solani*”, a novel taxon associated with stolbur-and bois noir-related diseases of plants. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 2879–2894
- Renaudin J, 2006. Sugar metabolism and pathogenicity of *spiroplasma citri*. *Journal of Plant Pathology*, 88: 129–139
- Riedle-Bauer M., Hanak K., Regner F., Tiefenbrunner W. 2010. Influence of Pruning Measures on Recovery of Bois Noir-infected Grapevines. *Journal of Phytopathology*, 632: 628–632
- Roggia C., Caciagli P., Galetto L., Pacifico D., Veratti F., Bosco D., Marzachi C. 2014. Flavescence dorée phytoplasma titre in field-infected Barbera and Nebbiolo grapevines. *Plant Pathology*, 63: 31–41
- Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current opinion in plant biology*, 2: 198–206
- Romanazzi G., Murolo S. 2008. Partial Uprooting and Pulling to Induce Recovery in Bois noir-Infected Grapevines *Journal of Phytopathology* 156: 747-750
- Ruan Y.L., Jin Y., Yang Y.J., Li G.J., Boyer J.S. 2010. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular plant*, 3: 942–955

- Rusjan D., Halbwirth H., Stich K., Mikulič-Petkovšek M., Veberič R. 2012. Biochemical response of grapevine variety “Chardonnay” (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). *European Journal of Plant Pathology*, 134: 231–237
- Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N., Castellano M.A., Digiario M., Martelli G.P. 2000. Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis*, *Archives in Virology*, 145: 553-565
- Salar P., Charenton C., Foissac X., Malembic-Maher S. 2012. Multiplication kinetics of *Flavescence dorée* phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. *European Journal of Plant Pathology*, 135: 371–381
- Santi S., Grisan S., Pierasco A., De Marco F., Musetti R. 2013a. Laser microdissection of grapevine leaf phloem infected by stolbur reveals site-specific gene responses associated to sucrose transport and metabolism. *Plant, cell & environment*, 36: 343–355
- Santi S., De Marco F., Polizzotto R., Grisan S., Musetti R., 2013b. Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. *Frontiers in plant science*, 4: 171
- Del Serrone P., Marina B. 1996. Importance of the vegetative stage for phytoplasma detection in yellow-diseased grapevines. *Vitis*, 35: 101–102
- Sforza R., Bourgoin T., Wilson S.W., Boudon-Padieu E., 1999. Field observations, laboratory rearing and description of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Entomology*, 96: 409-418
- Sheen J. 2002. Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science* 296, 5573: 1650-1652
- Siddique A. B. M., Guthrie J. N., Walsh K. B., White D. T., Scott P. T. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease*, 82: 1112-1120
- Silva Z., Sampaio M., Henne A., Gutzat R., Boos W., Costa M.S., Santos H., Bo A. 2005. The High-Affinity Maltose / Trehalose ABC Transporter in the Extremely Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus* HB27 Also Recognizes Sucrose and Palatinose. *Journal of bacteriology*, 187, 4: 1210-1218
- Sinclair W., Braun E. 1978. Translocation in Phloem Necrosis-Diseased American Elm Seedlings. *Physiology and Biochemistry*, 68: 1733–1737
- Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 49–81.

- Smeeckens S., Ma J., Hanson J., Rolland F. 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current opinion in plant biology*, 13: 274–279
- Spagnolo A., Magnin-Robert M., Alayi T.D., Cilindre C., Mercier L., Schaffer-Reiss C., Van Dorsselaer A., Clement C., Fontaine F. 2012. Physiological changes in green stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. *Journal of proteome research*, 11: 461–475
- Steffek R., Reisenzein H., Zeisner N. 2006. Analysis of pest risk from Grapevine Flavescence-dorée phytoplasma to Austrian viticulture 3. Results of the pest risk assessment. *EPPO-Bulletin*, 37: 191-203
- Stein SE, 1999. An Integrated Method for Spectrum Extraction. *Journal of The American Society of Mass Spectrometry*, 10: 770-781
- Su Y.T., Chen J.C., Lin C.P. 2011. Phytoplasma-induced floral abnormalities in *Catharanthus roseus* are associated with phytoplasma accumulation and transcript repression of floral organ identity genes. *Molecular plant-microbe interactions*, 24: 1502–1512
- Sugio A., MacLean A.M., Hogenhout S. 2014. The small phytoplasma virulence effector SAP11 contains distinct domains required for nuclear targeting and CIN-TCP binding and destabilization. *The New phytologist*, 202: 838–848
- Tan P.Y., Whitlow T. 2001. Physiological responses of *Catharanthus roseus* (periwinkle) to ash yellows phytoplasmal infection. *New Phytologist*, 150: 757-769
- Terlizzi F, Credi R. 2007. Uneven distribution of stolbur phytoplasma in Italian grapevines as revealed by nested-PCR. *Bulletin of Insectology*, 60: 365-366
- Tognetti J.A., Pontis H.G., Martínez-Noël G.M. 2013. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant signaling & behavior*, 8, 3: e23316. doi: 10.4161/psb.23316: 10 str.
- Tran-Nguyen L. T. T., Kube M., Schneider B., Reinhardt R., Gibb K. S. 2008. Comparative genome analysis of ‘Candidatus Phytoplasma australiense’ (subgroup tuf-Australia I: rp-A) and ‘Ca. Phytoplasma asteris’ strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190: 3979-3991
- Ventriglia T., Kuhn M.L., Ruiz M.T. Ribeiro-Pedro M., Valverde F., Ballicora M.A., Preiss J., Romero J.M. 2008. Two *Arabidopsis* ADP-glucose pyrophosphorylase large subunits (APL1 and APL2) are catalytic. *Plant physiology*, 148: 65–76
- Voigt C.A. 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in plant science*, 5, 168: 1-6

- Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.J., Thomas M.R., Robinson S.P. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 49: 772–785
- Wang L., Ruan Y.L. 2013. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in plant science*, 4: 163
- Weller S., 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: 2853–2858
- Wind J., Smekens S., Hanson J. 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71: 1610–1614
- Zafari S., Niknam V., Musetti R., Noorbakhsh S.N. 2011. Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 561–568
- Zhong B.X., Shen Y.W. 2004. Accumulation of pathogenesis-related type-5 like proteins in phytoplasma-infected garland chrysanthemum *Chrysanthemum coronarium*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 36: 773–779

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se rada zahvalila metorici prof. dr. Marini Dermastia saj brez nje tega dela ne bi bilo. Imela sem izredno srečo, da sta se najini poti srečali na fitoplazemskem križišču. Hvala za vedno odprta vrata, spodbujanja in usmerjanja ter vse zanimive diskusije, premlevanja rezultatov in novih idej.

Zahvalila bi se tudi prof. dr. Kristini Gruden, ki me je že kot dodiplomsko študentko s svojim neverjetnim znanjem in odprtostjo navdušila nad raziskovalnim delom in me spodbudila za podiplomski študij. Zahvala gre tudi prof. dr. Maji Ravnikar, ki mi je omogočila, da sem lahko tekom let na inštitutu spoznala in si pridobila znanja tudi iz drugih področij.

Zahvala gre tudi prof. dr. Wolframu Weckwerthu in Leni Fragner na Dunaj, na oddelek MOSYS fakultete za življenske vede. Izredno sem hvaležna Leni za vso pomoč pri metabolomski analizi.

Seveda pa ne gre pozabiti na vse FITOVce zaradi katerih gre človek rad v službo, obleče haljo in se muči z vzorci v laboratoriju. Veliko ste me naučili, mi dali strokovne in zraven še kakšne življenske nasvete. Hvala za prijetno družbo in sodelovanje, super kolektiv ste!

Hvala članom komisije in tudi vsem ostalim, ki so nalogo pregledali in podali konstruktivne komentarje in popravke.

Na koncu pa bi se zahvalila vsem mojim bližnjim, da so me spodbujali in potrpežljivo prenašali, da so moji.

PRILOGE

Priloga A: Rezultat testiranja trsov iz vinograda v Izoli na prisotnost virusov vinske trte.

Appendix A: Results of grapevine virus testing on plants from vineyard in Izola.

Virus/ Trs	GVA	GFLV	ArMV	GFkV	GLRa V1	GLRa V2	GLRa V3	GLRa V4-9	GVB
3/3	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2/30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2/58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/66	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3/92	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3/94	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3/109	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/64	-	-	-	+	-	-	-	-	-

