

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Marija STELE

**VPLIV VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE
TRTE NA METABOLIZEM IN TRANSPORT
SLADKORJEV V VINSKI TRTI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študijski program – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

Popravki (Corrigenda/Errata)

- str. 4, vrstica 19: namesto mesa beri osemenja
- str. 4, vrstica 26: namesto mesa beri osemenja
- str. 4, vrstici 26/27: namesto v mesu kot v kožici beri v mesu (mezokarpu) kot v kožici (eksokarpu)
- str. 11, vrstica 4: namesto ... v celice mezokarpa. Nekateri ... beri ... v celice mezokarpa pri vinski trti (Lecourieux in sod., 2013). Nekateri ...
- str. 15, vrstica 27: namesto ... *Cucurbitaceae*, *Leguminoseae*, *Solanaceae* ... beri ... *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* ...
- str. 15, vrstica 29: namesto *Comoviridae* (Mayo in Robinson, 1996) beri *Secoviridae* (Mayo in Robinson, 1996; ICTV Virology division, 2014)
- str. 19, vrstica 3: namesto pečke od mesa beri pečke (semena) od mesa (mezokarpa)
- str. 19, vrstica 19: namesto imidazolnega pufra beri raztopino imidazolnega pufra (25 ml, 2 M, pH 7,6), magnezijevega klorida (100 mM) in natrijevega azida (0,02 % w/v)
- str. 19, vrstica 19: namesto NADP + ATP beri NADP⁺ (150 mg) + ATP (440 mg)
- str. 19, vrstica 20: namesto 10 μ HK/G6P-DH beri 10 μl suspenzije heksokinaze (425 U/ml) + glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (212 U/ml)
- str. 19, vrstica 21: namesto PGI beri suspenzije fosfoglukoza izomeraze (2,25 ml, 1000 U/ml)
- str. 20, vrstica 3: namesto NADP + ATP beri NADP⁺ (150 mg) + ATP (440 mg)
- str. 20, vrstica 4: namesto 10 μ HK/G6P-DH beri 10 μl suspenzije heksokinaze (425 U/ml) + glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (212 U/ml)
- str. 20, vrstici 23/24: namesto kožico, meso in pečke beri kožico (eksokarp), meso (mezokarp) in pečke (semena)
- str. 24, vrstica 13: namesto (formalin-acetic-alcohol) beri (formalin-acetic acid-alcohol)
- str. 24, vrstica 16: namesto 5 ml ocente kisline beri 5 ml koncentrirane očetne kisline
- str. 25, vrstica 5: namesto Fiji-win32.exe beri Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>)

- str. 26, vrstici 1/2: namesto dva praga (Treshold) beri dva praga svetlosti (Threshold)
- str. 26, sl. 8: namesto Primerjava slik iz programa Fiji-win32.exe. A1: slika ki nastane, ko nastavimo »nizek« prag; A2: slika, ki nastane, ko nastavimo »visok« prag; B1: Maska slike A1 [Maska vsi], B2: Maska slike A2 [Maska samo prazni] beri Priprava maske za meritev lumna ksilemskih elementov. A1: slika ki nastane, ko nastavimo »nizek« prag svetlosti; A2: slika, ki nastane, ko nastavimo »visok« prag svetlosti; B1: Maska, pripravljena iz slike A1 [Maska vsi], B2: Maska, pripravljena iz slike A2 [Maska samo prazni]
- str. 26, vrstici 12/13: namesto ... z analizo partikolov (Partycle anaysis) [Maska polni brez kolobarjev] beri ... z analizo objektov (Analyse Particles) [Maska polni brez kolobarjev]: slika zamašenih ksilemskih elementov
- str. 26, vrstici 14/15: namesto ... [Maska prazni visok treshold] beri ... [Maska prazni nizek threshold]: slika praznih ksilemskih elementov
- str. 27, sl. 9: namesto visok treshold beri nizek threshold
- str. 27, vrstica 1: namesto visok treshold beri nizek threshold
- str. 27, vrstica 2: namesto partiklov beri objektov
- str. 27, vrstica 6: namesto partiklov beri objektov
- str. 50, med vrsticama 22 in 23 dodati vir:

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virology division – IUMS: ICTV Virus Taxonomy. 2014.
<http://www.ictvonline.org/index.asp> (30. sept. 2015)

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Marija STELE

**VPLIV VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE NA
METABOLIZEM IN TRANSPORT SLADKORJEV V VINSKI TRTI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študijski program – 2. stopnja

**THE IMPACT OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS ON THE METABOLISM AND
TRANSPORT OF SUGARS IN THE GRAPEVINE**

M. SC. THESIS
Master Study Programme

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo in na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oz. Senat oddelka je dne 21. 2. 2014 odobrila naslov magistrskega dela. Za mentorja magistrskega dela je bila imenovana doc. dr. Maruša Pompe Novak, za recenzenta pa prof. dr. Marina Dermastia.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: doc. dr. Aleš Kladnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Mentor: doc. dr. Maruša Pompe Novak
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
- Recenzent: prof. dr. Marina Dermastia
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 7. 10. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačano, 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.

Marija Stele

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK UDK 582.821:578(043.2)=163.6
KG virus pahljačavosti listov vinske trte/*Vitis vinifera*/glukoza/fruktoza/saharoza/
SWEET/saharoza sintaza/ksilem/vodni stres/zamašitev
AV STELE, Marija, dipl. biol. (UN)
SA POMPE NOVAK, Maruša (mentor)/DERMASTIA, Marina (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI 2015
IN VPLIV VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE NA METABOLIZEM IN TRANSPORT SLADKORJEV V VINSKI TRTI
TD Magistrsko delo (magistrski študij – 2. stopnja)
OP XII, 59 str., 5 pregl., 25 sl., 167 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) povzroča eno najresnejših bolezni vinske trte, ki lahko vodi do visokih izgub pridelka (več kot 80 %). Virus vpliva na izražanje genov, povezanih z metabolizmom antocianov in genov povezanih z odgovorom na vodni stres. Za nekatere druge viruse je bilo dokazano, da vplivajo tudi na izražanje genov povezanih z obrambo, staranjem ter metabolizmom in transportom snovi. Sladkorji so vir energije in ogljika ter nastajajo v mezofilnih celicah v procesu fotosinteze. Iz listov se saharoza transportira v porabniška tkiva, kjer se razgradi na glukozo in fruktozo. Pred zorenjem grozdja pride do spremembe transportne poti sladkorjev v jagode, ki se spremeni iz simplastne poti v apoplastno, ki poteka proti koncentracijskemu gradientu. Zato so za prehajanje saharoze iz floema potrebni transporterji, kot so SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) in SUT/SUC. Vsebnost sladkorjev določa kakovost pridelka, zato smo raziskali vpliv GFLV na transport, metabolizem in nalaganje sladkorjev, saj do sedaj vpliv GFLV na metabolizem in transport sladkorjev še ni bil jasen. S qPCR smo določili vpliv GFLV na izražanje izbranih genov iz družine *SWEET* in *SUSY* (saharoza sintaza). Izmerili smo tudi količino sladkorjev v listih in jagodah zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte. Z meritvami smo določili zamašenost ksilemskih elementov zalitih in nezalitih, zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte. Ugotovili smo, da okužba z GFLV vpliva na izražanje genov, ki kodirajo *VvSWEET* in *VvSUSY*, ter skupaj z vodnim stresom vpliva na povečan pojav zamašenosti v lesu vinske trte.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDK 582.821:578(043.2)=163.6
CX Grapevine fanleaf virus/*Vitis vinifera*/glucose/fructose/sucrose/SWEET/sucrose synthase/xylem/water stress/clogging
AU STELE, Marija
AA POMPE NOVAK, Maruša (supervisor)/DERMASTIA, Marina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study of Structural and Functional Biology
PY 2015
TI THE IMPACT OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS ON THE METABOLISM AND TRANSPORT OF SUGARS IN THE GRAPEVINE
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)
NO XII, 59 p., 5 tab., 25 fig., 167 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Grapevine fanleaf virus (GFLV) causes one of the most serious diseases of vine, which can lead to high losses of yield (over 80%). The virus affects the expression of genes associated with the metabolism of anthocyanins and genes associated with the response to water stress. For certain other viruses it has been shown that they influence the expression of genes related to defence, aging and metabolism, and transport of substances. Sugars are a source of energy and carbon and are formed in mesophyll cells in the process of photosynthesis. From the leaves the sucrose is transported into consumer tissues where it breaks into glucose and fructose. Before véraison the change occurs in the pathway of sugars into berries, which changes from symplast pathway to apoplast pathway, which takes place towards the concentration gradient. Therefore, for the passage of the sucrose from the phloem, transporters are necessary, such as SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) and SUT/SUC. Sugars content determine the quality of the crop, so we studied the impact of GFLV on the transportation, metabolism and loading of sugars, as so far the GFLV impact on the metabolism and transport of sugars was not yet clear. With the qPCR we determined GFLV impact on the expression of selected genes in the family *SWEET* and *SUSY* (sucrose synthase). We measured also the amount of sugars in the leaves and berries of healthy and GFLV infected grapevine plants. With the measurements we determined the congestion of xylem elements of flooded and unflooded, healthy and GFLV infected grapevine plants. We have found that the GFLV infection affects the expression of genes, that encode *VvSWEET* and *VvSUSY*, and along with water stress also causes the increase in the occurrence of congestion in wood of the grapevine.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VIII |
| KAZALO SLIK | IX |
| SLOVARČEK (POJMI IN OKRAJŠAVE) | XII |
| | |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. HIPOTEZE | 2 |
| 1.2. CILJI..... | 2 |
| | |
| 2. PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1. VINSKA TRTA..... | 3 |
| 2.2. SLADKORJI V VINSKI TRTI | 4 |
| 2.2.1. Listi | 5 |
| 2.2.2 Ksilem | 5 |
| 2.2.2.1. Sekundarni ksilem | 6 |
| 2.2.3. Floem | 7 |
| 2.2.3.1. Sestava floema..... | 8 |
| 2.2.3.2. Mehanizmi za transport po floemu | 8 |
| 2.2.3.2.1. Simplastna pot | 9 |
| 2.2.3.2.2. Apoplastna pot..... | 10 |
| 2.3. GENI, POVEZANI S TRANSPORTOM SLADKORJEV | 10 |
| 2.3.1. Saharozni/sladkorni transporterji | 10 |
| 2.3.2. Heksozni transporterji | 11 |
| 2.3.3. Transporterji SWEET | 12 |
| 2.3.4. Saharoza sintaza | 13 |
| 2.3.5. Invertaza..... | 13 |
| 2.4. ABIOTSKI IN BIOTSKI STRES VINSKE TRTE..... | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.1. Abiotski stres | 14 |
| 2.4.2. Biotski stres | 14 |
| 2.5. VIRUS PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE | 15 |
| | |
| 3. MATERIAL IN METODE | 17 |
| 3.1. IZBOR VINOGRADOV IN TRSOV | 17 |
| 3.2. DOLOČANJE VSEBNOSTI SLADKORJEV | 19 |
| 3.2.1. Priprava rastlinskega materiala | 19 |
| 3.2.2. Priprava vzorcev za merjenje sladkorjev | 19 |
| 3.2.3. Določanje sladkorjev | 19 |
| 3.2.4. Statistična obdelava podatkov | 20 |
| 3.3. ANALIZA IZRAŽANJA GENOV | 20 |
| 3.3.1. Priprava rastlinskega materiala | 20 |
| 3.3.2. Izolacija RNA | 21 |
| 3.3.3. Odstranitev genomske DNA | 21 |
| 3.3.4. Reverzna transkripcija | 22 |
| 3.3.5. Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR) | 22 |
| 3.3.6 Relativna kvantifikacija | 23 |
| 3.3.7. Statistična obdelava podatkov | 23 |
| 3.4. MERITVE POVRŠINE PRESEKA IN ZAMAŠENOSTI KSILEMSKIH ELEMENTOV..... | 24 |
| 3.4.1. Priprava materiala | 24 |
| 3.4.2. Rezanje rozg ter priprava in slikanje preparatov | 24 |
| 3.4.3. Določanje zamašenosti ksilemskih elementov | 25 |
| 3.4.4. Statistična obdelava podatkov | 27 |
| | |
| 4. REZULTATI | 28 |
| 4.1. VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST SLADKORJEV V JAGODAH IN LISTIH | 28 |
| 4.1.1. Vsebnosti sladkorjev v jagodah | 28 |
| 4.1.2. Vsebnosti sladkorjev v listih | 29 |
| 4.2. VPLIV GFLV NA IZRAŽANJE GENOV..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3. VPLIV OKUŽBE Z GFLV IN VODNEGA STRESA NA MAŠENJE KSILEMSKIH ELEMENTOV | 32 |
| 5. RAZPRAVA..... | 37 |
| 5.1. VPLIV OKUŽBE NA VSEBNOSTI SLADKORJEV V JAGODAH IN LISTIH | 37 |
| 5.2. IZRAŽANJE GENOV SWEET IN SUSY | 38 |
| 5.3. VPLIV OKUŽBE IN VODNEGA STRESA NA MAŠENJE KSILEMSKIH ELEMENTOV | 40 |
| 6. SKLEPI | 42 |
| 7. POVZETEK..... | 43 |
| 8. VIRI | 45 |

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Pregl. 1: Izbrani trsi sorte Refošk iz vinograda v Komnu za določanje vsebnosti sladkorjev in analizo izbranih genov..... | 17 |
| Pregl. 2: Izbrani trsi sorte Pokalca iz vinograda v Prepottu za določanje vsebnosti sladkorjev in analizo izražanja genov..... | 18 |
| Pregl. 3: Izbrani trsi sorte Pokalca iz vinograda v Prepottu za mikroskopske analize ksilema..... | 18 |
| Pregl. 4: Datumi vzorčenj listov in jagod (4 časovne točke)..... | 18 |
| Pregl. 5: Značilnosti začetnih oligonukleov in sond, uporabljenih za pomnoževanje PCR v realnem času. | 22 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Sl. 1: Tile v prerezu lesa robinije (<i>Robinia pseudacacia</i>) (Dermastia, 2007). | 6 |
| Sl. 2: Transport saharoze po floemu (BIOS 100 Lecture Material Online, 2004). | 8 |
| Sl. 3: Shematski prikaz poteka apoplastne in simplastne poti nalaganja sladkorjev v floem v zelenih listih (Taiz in Zeiger, 2002). | 9 |
| Sl. 4: Lega vinogradov. Levo: Lokacija vinograda v Komnu. Desno: Lokacija vinograda v Prepotu. (Sliki: Google maps, 2015). | 17 |
| Sl. 5: Spektrofotometer za meritve absorbanc, iz katerih smo izračunali vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze (Fotografija: Marija Stele, 2015). | 19 |
| Sl. 6: Mikrotom za rezanje rezin rozg (Fotografija: Marija Stele, 2015). | 25 |
| Sl. 7: Mikroskop in kamera za slikanje rezin rozg (Fotografija: Marija Stele, 2015). | 25 |
| Sl. 8: Primerjava slik iz programa Fiji-win32.exe. A1: slika ki nastane, ko nastavimo »nizek« prag; A2: slika, ki nastane, ko nastavimo »visok« prag; B1: Maska slike A1 [Maska vsi], B2: Maska slike A2 [Maska samo prazni] (Slika: Marija Stele, 2015). | 26 |
| Sl. 9: Primerjava mask odprtih in zamašenih ksilemskih elementov. A: [Maska prazni visok treshold] (črno obarvani samo odprti ksilemski elementi), B: [Maska polni brez kolobarjev] (črno obarvani samo zamašeni ksilemski elementi) (Slika: Marija Stele, 2015). | 27 |
| Sl. 10: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih jagodah sorte Refošk v treh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, p < 0,05. | 28 |
| Sl. 11: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih jagodah sorte Pokalca v treh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, p < 0,05. | 29 |
| Sl. 12: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih listih sorte Refošk v treh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja. | 29 |
| Sl. 13: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih listih sorte Pokalca v dveh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja. | 30 |

- Sl. 14: Izražanje gena *VvSWEET17a* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Pokalca ter v mesu, pečki in kožici zdravih in okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ 31
- Sl. 15: Izražanje gena *VvSWEET10* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk in Pokalca ter v mesu, pečki in kožici zdravih in okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$ 31
- Sl. 16: Izražanje gena *VvSWEET1* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk in Pokalca v mesu, pečki in kožici zdravih in okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$ 31
- Sl. 17: Izražanje gena *VvSUSY* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk in Pokalca. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$ 32
- Sl. 18: Primeri prerezov lesa zdravih zalitih, zdravih nezalatih, z GFLV okuženih zalitih in z GFLV okuženih nezalatih rozg (Slika: Marija Stele, 2015)..... 32
- Sl. 19: Primerjava povprečnega premera lumna posameznih zamašenih in praznih ksilemskih elementov med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (μm) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja. 33
- Sl. 20: Primerjava povprečne površine lumna posameznega ksilemskega elementa med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (μm^2) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja..... 34
- Sl. 21: Primerjava celokupne površine zamašenega lumna ksilema med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (mm^2) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$ 34

- Sl. 22: Primerjava deleža celokupne površine praznih ksilemskih elementov od celotne površine dela rozge v katerem je ksilem med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ 35
- Sl. 23: Primerjava deleža celokupne površine zamašenih ksilemskih elementov glede na celotno površino dela rozge v katerem je ksilem med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$ 35
- Sl. 24: Primerjava deleža površine zamašenih ksilemskih elementov glede na površino vseh ksilemskih elementov med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ 36
- Sl. 25: Primerjava deleža števila zamašenih ksilemskih elementov glede na število vseh ksilemskih elementov med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$ 36

SLOVARČEK (POJMI IN OKRAJŠAVE)

| | |
|-------------------------|--|
| ATP | adenozin trifosfat |
| CIN | invertaze v citoplazmi (cytoplasm invertase) |
| COX | citokrom oksidaza |
| CWIN | invertaze v celični steni (cell wall invertase) |
| ER | endoplazmatski retikulum |
| GFLV | virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus) |
| GLRaV-3 | virus zvijanja listov vinske trte (Leaf roll-associated closterovirus-3) |
| pozitivno usmerjena RNA | virusna RNA, ki je podobna mRNA, zato v gostiteljski celici lahko neposredno pride do translacije |
| qPCR | kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času |
| reverzna transkripcija | sinteza ene molekule DNA iz matrice iz ene molekule RNA |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| ROS | reaktivne kisikove spojine |
| SUSY (ali Sus) | saharoza sintaza |
| SUT/SUC | transportni protein za vnos sladkorjev v celice |
| SWEET | transportni protein za izvoz sladkorjev v apoplast (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) |
| UBICF | ubikitin konjugacijski faktor |
| VIN | invertaze v vakuolah (vacuolar invertase) |
| VvHT | heksozni transporterji |

1. UVOD

Do sedaj je znanih več kot 67 različnih virusov, ki lahko okužujejo vinsko trto (Martelli, 2012). Od teh je virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) eden najpogostejših. Povzročča kužno izrojenost vinske trte (Grapevine degradation disease) (Andret-Link in sod., 2004), eno najresnejših boleznih vinske trte, ki vodi do visokih izgub pridelka (Bovey in sod., 1980). Ugotovili so, da okužba z GFLV zmanjša število in maso jagod ter grozdov in v povprečju vpliva na znižanje vsebnosti kislin in zvišanje pH v jagodah (Cigoj, 2015). Okužba vinske trte z virusom zvijanja listov vinske trte (Grapevine leafroll-associated virus, GLRaV-3) spremeni izražanje genov v jagodah, povezanih z biosintezo antocianinov in metabolizmom sladkorjev, kar povzroča znižanje vsebnosti antocianinov in sladkorjev v jagodah (Vega in sod., 2011).

Poleg vsebnosti kislin in antocianinov je tudi vsebnost sladkorjev pomemben dejavnik za določanje kakovosti pridelka (Terrier in sod., 2005). Sladkorji nastajajo v zelenih listih v procesu fotosinteze ter predstavljajo vir energije in ogljika za biosintezo vseh organskih molekul v rastlini (Dey in Harborne, 1997; Chen in sod., 2012). Iz listov ali shranjevalnih mest se v vodi raztopljeni sladkorji po floemu, večinoma v obliki saharoze, transportirajo v druge nefotosintezne dele rastline ter se skladiščijo v jagodah in koreninah (Lalonde in sod., 2003).

Saharoza se nalaga nasproti koncentracijskemu gradientu (Braun in sod., 2014), zato so za prenos sladkorjev na dolge razdalje potrebni transporterji SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters), SUC/SUT (saharozni transporterji) in drugi, ki sodelujejo pri prehajanju saharoze, glukoze in fruktoze skozi plazemsko membrano (Chen in sod., 2010, Lalonde in sod., 2004).

V rastlinah sta prisotna dva transportna sistema. Medtem ko floem omogoča transport fotoasimilatov iz listov v porabniška tkiva, je ksilem odgovoren za transport vode in mineralov iz korenin v ostala tkiva. V primeru zmrzali, suše ali okužb z virusnimi, bakterijskimi ali glivnimi povzročitelji bolezni prihaja do zamašitev ksilemskih elementov in s tem motenega prenosa vode (Tyree in Spreey, 1989).

Narejenih je bilo že več raziskav vpliva GFLV na izražanje genov in fiziologijo vinske trte (Andret-Link in sod., 2004), vendar njegov vpliv na izražanje genov, povezanih s transportom in metabolizmom in sladkorjev še ni povsem jasn. Vsebnosti saharoze, glukoze in fruktoze v jagodah so pomembni parametri za določanje kakovosti pridelka, zato smo raziskali vpliv virusa na metabolizem, transport in nalaganje sladkorjev.

1.1. HIPOTEZE

1. Predvidevali smo, da virus pahljačavosti listov vinske trte vpliva na količino sladkorjev ali transport sladkorjev iz listov, po floemskih elementih, v jagode.
2. Predvidevali smo, da virus pahljačavosti listov vinske trte vpliva na izražanje genov, vključenih v metabolizem in transport sladkorjev.
3. Predvidevali smo, da virus pahljačavosti listov vinske trte vpliva na pojav zamašitev v žilnem sistemu v lesu vinske trte.

1.2. CILJI

Cilji magistrskega dela so bili analizirati, ali virus pahljačavosti listov vinske trte vpliva na količino sladkorjev v jagodah ali listih; raziskati, ali virus pahljačavosti listov vinske trte spremenjeni izražanje genov, vključenih v metabolizem in transport sladkorjev ter raziskati, ali okužba z virusom pahljačavosti listov vinske trte vpliva na pojav zamašitev v žilnem sistemu v lesu vinske trte.

2. PREGLED OBJAV

2.1. VINSKA TRTA

Vinska trta (*Vitis vinifera* L.) je vzpenjavka iz družine vinikovk (*Vitaceae*), ki so olesenele rastline ali grmičevje, pri katerih se nasproti listov pojavljajo vitice in socvetja (Mullins in sod., 2003). Vinikovke delimo v 17 rodov (Keller, 2010). V rod *Vitis* uvrščamo približno 60 vrst, od katerih edino *Vitis vinifera* izvira iz Evrazije (Mullins in sod., 2003).

Predvidevajo, da se je vinska trta pojavila pred približno 65 milijoni let (Saporta, 1879). V Evraziji in Severni Afriki v naravi najdemo dve podvrsti: *V. vinifera* subsp. *vinifera* (ali *sativa*) in *V. vinifera* subsp. *silvestris* (ali *sylvestris*), iz katerih izvira sodobna gojena vinska trta (Zohary, 1995). Najzgodnejši dokazi o udomačitvi vinske trte in pridelavi vina segajo v Iran, v čas 5400–5000 let pr. n. š (McGovern, 1996, 2004). V procesu udomačitve so se pojavile spremembe v velikosti jagod in grozdov, obliki semen. Prišlo je tudi do povečanja donosa, rednejše produkcije plodov (Marinval, 1997) in povečanja vsebnosti sladkorjev v jagodah (Pouget, 1988).

Koreninski sistem vinske trte črpa vodo in mineralna hranila, shranjuje ogljikove hidrate in ostale hranilne snovi ter sidra rastlino v tla. V tleh prihaja do simbioz z mikoriznimi glivami. Deblo podpira rastlino in dovaja hranila do višje rastočih vegetativnih in reproduktivnih organov (Hellman, 2003). Iz debela izraščajo veje. Rodne mladice poženejo iz zimskih brstov na rozgi, ki raste iz dvoletnega lesa. Mladica je razdeljena s členki na medčlenke. Na spodnjih členkih nasproti listov izraščajo grozdi, na zgornjih pa vitice (Colnarič in Vrabl, 1975).

Vinska trta je ena najbolj razširjenih in gospodarsko najpomembnejših rastlin. Gojijo jo na vseh kontinentih, razen na Antarktiki (Mullins in sod., 2003). Uspeva v predelih s subtropskim, sredozemskim in zmernim celinskim podnebjem (Terral in sod., 2010).

Več kot 80 % pridelka vinske trte se uporablja za pridelavo vina. Uporablja se tudi za pridelavo sokov in koncentratov, kot sveže sadje, posušeno sadje (rozine) in za proizvodnjo destilirnih tekočin, alkohola, antocianinskih pigmentov ter olja iz grozdnih pečk (Mullins in sod., 2003).

Transport sladkorjev in alokacija asimilatov med viri in ponori sta glavna parametra za nadzor produktivnosti pridelka (Gifford in sod., 1984). Saharoza se iz zelenih listov po floemu transportira v jagode, kjer razpade na glukozo in fruktozo. Glukoza in fruktoza sta v grozdnem soku v visokih koncentracijah in sta glavna vira energije pri alkoholnem vrenju kvasovk (Bavčar, 2006).

2.2. SLADKORJI V VINSKI TRTI

Sladkorji so vir energije in ogljika, omogočajo rast in razvoj rastlin ter so lahko vpleteni v nadzor različnih procesov, kot so fotosinteza, transport sladkorjev, privzem dušika, obrambne reakcije, sekundarni metabolizem in hormonsko ravnovesje (Smeekens in sod., 2010). Nadzor teh procesov temelji na regulaciji izražanja genov (Koch, 1996), lahko pa tudi na stabilnosti mRNA ter na translaciji in stabilnosti proteinov (Wiese in sod., 2004).

Najpogostejši ogljikovi hidrati, ki jih najdemo v grozdju, so pentoze (arabinoza in ksiloza), heksoze (glukoza, fruktoza, manoza, galaktinol in ramnoza), disaharidi (saharoza, trehaloza in analogi saharoze) in polisaharidi (pektin) (Margalit, 2004; Lecourieux in sod., 2013).

Saharoza predstavlja glavno translokacijsko obliko fotoasimilatov. Začetni korak transportne poti je prenos fotoasimilatov iz fotosinteznih celic mezofila do kompleksov sitastih cevi in celic spremljevalk floema (Chen, 2014). Odvisno od metabolnih potreb se sladkorji po floemu translocirajo na dolge razdalje v porabniška tkiva (meristemi, korenine, cvetovi, poganjki) (Chen in sod., 2012) ali se shranijo lokalno (Guo in sod., 2014). Rastline zaznavajo sladkorje in pretok sladkorjev z membranskimi ali citosolnimi senzorji (Gibson, 2004).

V jagodah se saharoza razcepi na glukozo in fruktozo (Davies in Robinson, 1996). Na nalaganje glukoze in fruktoze v vakuolah celic mesa vpliva aktivnost encimov za presnovo saharoze, saharozni transporterji in monosaharidni transporterji (Agasse in sod., 2009).

Sladkorji, ki se nalagajo v vakuole mezokarpnih celic, predstavljajo 65–91 % mase zrelih jagod. Nalaganje glukoze in fruktoze v jagodah se začne ob začetku zorenja in se nadaljuje med zorenjem (Davies in Robinson, 1996). Takrat jagode postajajo mehkejše in začnejo spreminjati barvo (Lecourieux in sod., 2013). Glukoza in fruktoza se nalagata v vakuolah v približno enakih koncentracijah (Kliewer, 1965). Saharoza se nalaga v visokih koncentracijah v osrednjih celicah mesa zrelih jagod. Koncentracije sladkorjev so višje v mesu kot v kožici (Coombe, 1987).

Vakuole zavzemajo približno 90 % celičnega volumna (Winter in sod., 1993) in imajo osrednjo vlogo pri začasnem ter dolgotrajnem skladiščenju topnih sladkorjev (Martinoia in sod., 2007). Zaradi visoke kapacitete vakuol za shranjevanje sladkorjev, lahko sladkorji v vakuolah služijo kot pomemben vir ogljikovih hidratov med pomanjkanjem drugih virov energije, npr. po tem ko se porabi škrob (Echeverria in Valich, 1988). Sladkorji se v rastlinski celici skladiščijo kot topni sladkorji v vakuoli ali kot škrob v plastidih (Guo in sod., 2014).

2.2.1. Listi

Sladkorji nastajajo s fotosintezno vezavo ogljikovega dioksida v kloroplastih, v mezofilnih celicah zelenih listov in so material za biosintezo vseh organskih molekul v rastlini (Dey in Harborne, 1997; Chen in sod., 2012).

Anatomske povezave znotraj lista vplivajo na možne poti, po katerih saharoza lahko potuje v žilo (Van Bel, 1993). Saharoza se premika med celicami skozi plazmodezme v celice ob žilah, imenovanih celice žilnega ovoja, in nato vstopi v žile floema za transport na dolge razdalje ven iz listov (Turgeon, 1989).

V listih dvokaličnic so žile med seboj povezane mrežasto, manjše žile pa se povezujejo v večje žile dokler ne dosežejo osrednje žile (Turgeon, 1989). Saharoza izhaja iz listov po osrednji žili listnega peclja in se pomika v ožilje stebela (Braun in sod., 2014).

Za transport snovi v rastlinah sta odgovorna dva tipa tkiv, ksilem in floem (Esau, 1977).

2.2.2 Ksilem

Glavne naloge ksilema so dovajanje vode in mineralov iz korenin do nadzemnih delov rastline, zagotavljanje mehanske opore ter shranjevanje vode in raztopljenih snovi (Dermastia, 2007).

Transport po ksilemu omogočata dva tipa celic oz. trahejnih elementov. Trahejni elementi z velikimi odprtini so člani trahej, elementi brez takih odprtini pa traheide. Zreli trahejni elementi so mrtvi, z razgrajenimi protoplasti, njihova stena je prepustna ter na določenih mestih okrepljena s sekundarno steno (Dermastia, 2007).

Transport vode po ksilemu razlaga kohezijsko-tenzijska hipoteza. Transpiracija vode skozi listne reže in kutikulo omogoča nastanek negativnega pritiska, ki je potreben za dvig vode po ksilemu (Taiz in Zeiger, 2002). Tako se ustvari gradient vodnega potenciala, ki omogoča izhajanje vode iz ksilema v medcelične prostore in povrh njico ter tako izhaja iz rastline. Lastnosti vode, ki omogočajo ta način transporta po ksilemu, so vodni potencial, adhezivnost in kohezivnost (Dermastia, 2007).

Tlak, ki se razvije v ksilemu, lahko povzroča določene težave. Če bi bile celične stene tanke in upogljive, bi se zaradi pritiska sesedle, vendar pa odebelitve iz sekundarne celične stene ter lignifikacije traheid to preprečujejo. Poleg tega je voda zaradi tolikšnega tlaka v fizikalnem metastabilnem stanju. Ko se tlak vode povečuje, se povečuje tudi verjetnost, da se v ksilem preko mikroskopskih por potegne še zrak, kar imenujemo sejanje zraka (air seeding) (Taiz in Zeiger, 2002). Drugi način nastanka mehurčkov je posledica zmanjšane topnosti plinov (Davis in sod., 1999). Zmrzovanje žil lahko vodi do nastanka zračnih mehurčkov. Ko se mehurček pojavi v vodnem stolpcu, se začne razširjati. Temu načinu nastanka mehurčkov rečemo kavitacija ali embolizem (Taiz in Zeiger, 2002; Tyree in

Sperry, 1989). Prekinitev vodnega stolpca v ksilemu prepreči transport vode ter povzroča dehidracijo in odmiranje listov (Taiz in Zeiger, 2002).

Trahejni elementi so medsebojno povezani, zato bi se mehurčki lahko hitro razširili. Vendar pa se mehurčki med žilami težje razširjajo zaradi majhnih por v membrani pikenj. Tudi ponoči lahko pride do popravila kavitacije. Raven transpiracija je ponoči nizka, zato se tlak v ksilemu dvigne, vodna para in plini pa lahko prehajajo nazaj v raztopino (Taiz in Zeiger, 2002).

2.2.2.1. Sekundarni ksilem

Sekundarni ksilem ali les je zgrajen iz dveh prostorsko različno orientiranih sistemov celic in tkiv. Osni sistem je orientiran navpično ter ga sestavljajo celice, ki izvirajo iz izvornih celic prevodnega kambija. Sestavljen je iz trahej, vlaken in žleznih vodov oz. medceličnih kanalov. Radialni sistem je organiziran vodoravno in izvira iz izvornih celic trakov. Parenhimske celice, ki so v sistemu trakov, so večinoma žive. Njihova naloga je prevajanje hranil med ksilemom in floemom, shranjevanje zalog ter prenos signalnih molekul. Za lažje prehajanje snovi in molekul med obema sistemoma so v trakovih ležeče in pokončne celice (Dermastia, 2007).

Prevodni kambij na notranji strani odlaga celice sekundarnega ksilema, ki rastejo in s tem potiskajo prevodni kambij navzven. Vsako sezono se doda nova plast, ki jo imenujemo branika. Najbolj zunanja plast celic branike se razlikuje od celice naslednje plasti, zato so med branikami vidne meje oz. letnice (Dermastia, 2007).

Vodo prevajajo le mlajše zunanje branike, ki sestavljajo beljavo lesa. Starejše notranje branike, ki vode ne prevajajo več, tvorijo jedrovino. Po prenehanju prevajanja ali v primeru poškodb so dvokaličnice razvile obrambni mehanizem za zaprtje trahejnih elementov z otiljem (Slika 1), ki prepreči razširjanje virusnih, bakterijskih in glivnih povzročiteljev bolezni. Tila nastane z vraščanjem parenhimskih celic v notranjost trahejnega elementa skozi piknje. Otilje se pojavi, ko imajo piknje premer vsaj 10 μm (Dermastia, 2007).



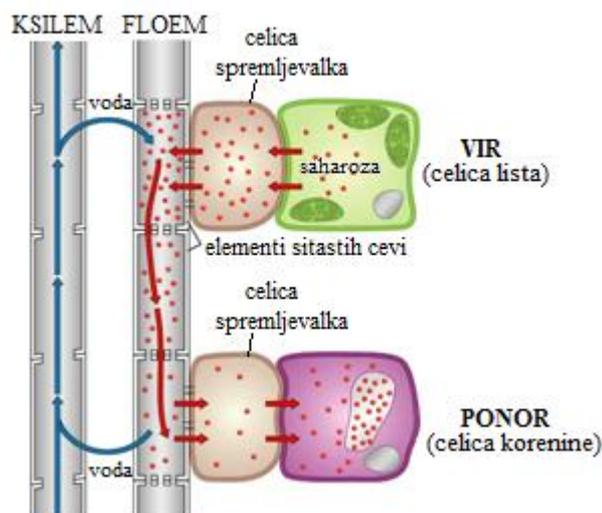
Slika 1: Tila v prerezu lesa robinije (*Robinia pseudacacia*) (Dermastia, 2007).

Zamašitve ksilemskih elementov v lesu vinske trte se lahko pojavljajo kot odgovor na hormonske signale in spremembe fizioloških procesov, povezanih s poškodbami in okužbami ali zaradi motenj koreninskega privzema (suša) (Sun in sod., 2007). Žilne bolezni z zmanjšanjem vodne prevodnosti ksilema povzročajo vodni stres v gostitelju (Dimond, 1970, Pouzoulet in sod., 2014). Poleg bolezni, poškodb in sušnega stresa pa lahko na izločanje in sestavo zamašitev vplivajo tudi drugi dejavniki. Poleti se v odgovor na poškodbe v večji meri tvorijo tile, medtem ko se pozimi v večji meri tvorijo geli (Sun in sod., 2008).

Zamašitve tvorijo tile in geli, ki izvirajo iz celic, povezanih z žilami (Sun in sod., 2008). Tile so heterogene strukture, sestavljene iz različnih plasti. Prisotnost in prostorska organizacija teh plasti se rahlo razlikuje glede na stopnjo zrelosti in vrsto rastline. Organizacija in kemična sestava stene zrelih til je podobna sestavi celične stene celic ksilemskega parenhima. Zunanja plast je večinoma sestavljena iz pektina. Pod njo je primarna celična stena, v kateri je prav tako prisoten pektin. Pri nekaterih vrstah je prisotna tudi sekundarna celična stena. Primarne in sekundarne stene til so lahko okrepljene z ligninom. Znotraj til so sloji suberina, v katerih se lahko nalagajo fenolne spojine (Rioux in sod., 1995). V žilah z zamašitvami ostajajo ozki prehodi med zreliimi tilami in med zreliimi tilami in steno žil (Rioux in sod., 1998). Ti ozki prehodi so zapolnjeni s spojinami, bogatimi s pektini (geli), ki se izločajo v lumen žil (Pouzoulet in sod., 2014).

2.2.3. Floem

Medtem ko tok vode z raztopljenimi mineralnimi snovmi po ksilemu omogoča zmanjšan vodni potencial, ki je posledica zmanjšane hidrostatičnega tlaka, ki nastane kot posledica transpiracije vode iz listov, pa tok po floemu omogočajo osmotske razlike med viri in ponori, ki omogočajo nastanek masnega toka. Vstop saharoze v zbiralni floem poveča koncentracijo raztopine. Kot odgovor na to voda iz ksilema z osmozo prehaja v sitaste cevi, s čimer se dvigne hidrostatični tlak. V tkivih ponorov transport saharoze iz odlagalnega floema zmanjša koncentracijo raztopine v sitastih ceveh, kar povzroči difuzijo vode iz sitastih cevi v sosednje celice in nižanje hidrostatičnega tlaka. Gradient hidrostatičnega tlaka med zbiralnim in odlagalnim floemom omogoča masni tok raztopin (saharoze in drugih fotoasimilatov) iz virov v ponore (Lalonde in sod., 2003) (Slika 2).



Slika 2: Transport saharoze po floemu (BIOS 100 Lecture Material Online, 2004).

2.2.3.1. Sestava floema

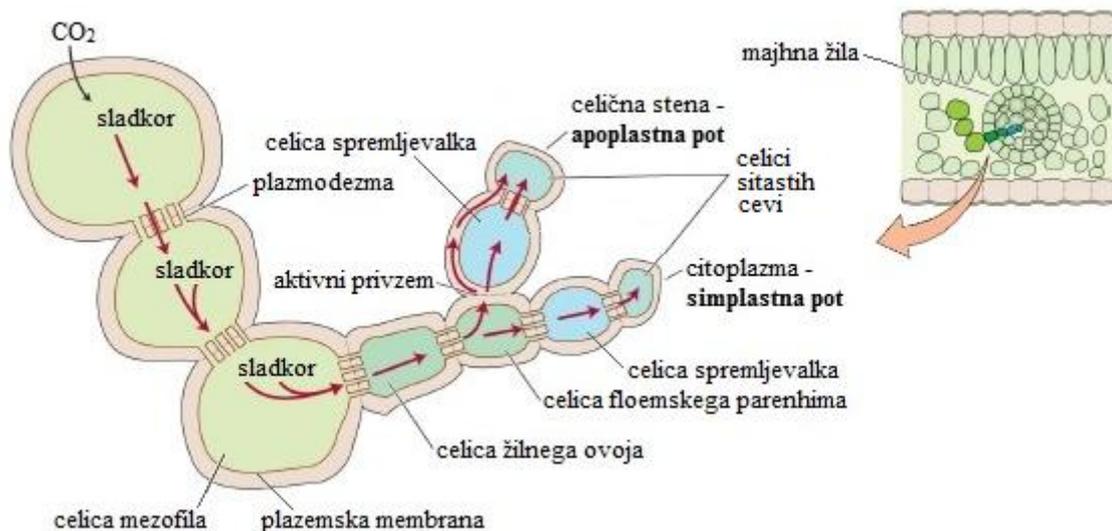
Floem je sestavljen iz treh tipov celic: celic sitastih cevi, celic spremljevalk in celic floemskega parenhima. Celice sitastih cevi dovajajo asimilate, celice spremljevalke pa genetsko in metabolno podpirajo sitaste elemente. Celice sitastih elementov se na koncih longitudinalno povezujejo v sitaste cevi, prek katerih poteka transport asimilatov iz virov v ponore (Evert, 1982).

Floemski sistem rastlin lahko razdelimo v tri med seboj prekrivajoče se regije (Van Bel, 1996). Zbiralni floem v majhnih žilah listov je odgovoren za vstop saharoze v žilo. Odlagalni floem se nahaja na mestih, kjer saharoza izstopa iz floema v sosednja tkiva za takojšnjo uporabo ali shranjevanje. Transportni floem povezuje zbirni in odlagalni floem in predstavlja največji delež floemskega omrežja v rastlini (Van Bel, 2003).

2.2.3.2. Mehanizmi za transport po floemu

Sladkorji se med celicami premikajo simplastno, v nekaterih tkivih pa je transport sladkorjev med celicami apoplasten. Zato sta potrebna vsaj 2 tipa transporterjev; prvi, ki izloča sladkorje iz celice in drugi, ki sodeluje pri privzemu v sosednje celice (Giaquinta, 1983).

Simplastni transport poteka prek plazmodezem, apoplastni pa po celični steni (Geiger in sod., 1974) (Slika 3). Za koordinacijo prehajanja saharoze v parenhim floema in komplekse sitastih cevi in celic spremljevalk je potrebna komunikacija med celicami (Chen in sod., 2012).



Slika 3: Shematski prikaz poteka apoplastne in simplastne poti nalaganja sladkorjev v floem v zelenih listih (Taiz in Zeiger, 2002).

Rastline pa lahko uporabljajo več kot en način floemskega privzema hkrati, celo v isti žili (Van Bel, 1993). Rastline so verjetno tudi sposobne preklapljati med mehanizmi v času razvoja, kot odgovor na biotski stres (Gil in sod., 2011) ali genetske mutacije (Srivastava in sod., 2008).

Pri vinski trti tik pred zorenjem v jagodah pride do spremembe transportne poti sladkorjev, ki se spremeni iz simplastne v apoplastno (Zhang et al. 2006). Po apoplastni poti rastline tudi izločajo sladkorje iz nektarijev za privabljanje opraševalcev in iz korenin za podpiranje rasti koristnih mikroorganizmov (Chen, 2014).

2.2.3.2.1. Simplastna pot

Prvi način za transport saharoze v floem se imenuje simplastna pot, ker je citoplazma vseh teh celic združena v enoten simplast. Pri vrstah s simplastno potjo so skozi celotno pot iz mezofilnih celic do sitaste cevi floema prisotne plazmodezme. Koncentracija saharoze je največja v citoplazmi mezofilnih celic in se pomika vzdolž koncentracijskega gradienta za vstop v sitaste cevi floema (Braun in sod., 2014).

Ta način privzema v floem je pasiven in poteka zaradi difuzije prek koncentracijskega gradienta (Rennie in Turgeon, 2009). Pri simplastnem floemskem privzemu ni potrebe po transportnih proteinih za transport saharoze in za premikanje saharoze skozi plazemske membrane za vstop v zbiralni floem (Braun in sod., 2014).

Nekatere vrste poleg saharoze prek sitastih cevi transportirajo tudi velike polimere saharoze, kot sta rafinoza in stahioza (Rennie in Turgeon, 2009). Ta način prehajanja saharoze v floem se imenuje ujetje polimerov (polymer trapping). Saharozna se pomika iz mezofilnih celic prek plazmodezem v citoplazmo specializiranih celic spremljevalk, kjer se sintetizira v rafinozo in stahiozo, ki sta preveliki za difuzijo nazaj v parenhimske celice in

se transportirata skozi plazmodezme v zbirni floem in naprej do ponornih tkiv (Braun in sod., 2013).

2.2.3.2.2. Apoplastna pot

Drugi način privzema v floem poteka po apoplastni poti. Apoplast je zunajcelični prostor zunaj simplasta, ki je omejen s kontinuumom plazemskih membran in vključuje celično steno, zunajcelični prostor in žile ksilema (Evert in sod., 1987).

V apoplastno pot se saharoza premakne skozi plazmodezme v celice žilnega ovoja, od tu naprej skozi plazmodezme v celice floemskega parenhima in potem v celicah floemskega parenhima skozi plazmalemo v celično steno. Od tod dalje gre iz celične stene celic floemskega parenhima po celični steni celic spremljevalk v celično steno sitastega elementa, od koder se naloži v sitasti element; ali pa iz celične stene floemskega parenhima v celično steno celice spremljevalke in dalje skozi plazmalemo v celico spremljevalko in od tu se po simplastu naloži v sitasti element (Russin in sod., 1996). Hkrati ob dvigu vsebnosti sladkorja v apoplastu pride tudi do dviga osmotskega tlaka ter povečanega izražanja in aktivnosti invertaz v celični steni (Zhang et al. 2006).

Za vstop saharoze v komplekse celic spremljevalk in sitastih elementov se mora saharoza pomikati v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta, iz nižjih koncentracij v apoplastu proti višjim koncentracijam v simplastu sitastih cevi. To poteka preko simporterjev saharoze in vodikovih protonov, pri tem pa se porablja energija v obliki ATP (Gianquinta, 1983).

Za prenos saharoze iz floemskega parenhima v komplekse sitastih cevi in celic spremljevalk za translokacijo na dolge razdalje so potrebni transporterji SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) in SUC/SUT (saharozni transporterji/ sladkorni transporterji) (Reismeyer in sod., 1992). Sladkorji se nato privzamejo v celice ponorov s SUC/SUT (Braun in Slewinski, 2009) ali z monosaharidnimi transporterji (Sauer in sod., 1990).

2.3. GENI, POVEZANI S TRANSPORTOM SLADKORJEV

2.3.1. Saharozni/sladkorni transporterji

Saharozni/sladkorni transporterji (SUC/SUT) so proteini, sestavljeni iz 12 transmembranskih domen, ki oblikujejo pore v membrani in omogočajo prehajanje saharoze (Lalonde in sod., 2004). Delujejo kot saharozni/protonski simporterji. Za prenos saharoze prek membrane se porablja ATP (Bush, 1990). Kodirajo jih geni iz več družin. SUT delimo na več kladov (Aoki in sod., 2003).

Saharozni transporterji, izraženi v jagodah, morajo izpolnjevati dve nasprotujoči si funkciji: vzdrževati saharozo v dovodnih snopih (conduction bundles), dokler ne doseže mesta nalaganja, na tem mestu pa morajo omogočiti izhajanje. Saharozni transporterji posredujejo pri privzemu saharoze v floem ali v celice mezokarpa. Nekateri saharozni transporterji pa delujejo v obratni smeri (Carpaneto in sod., 2005).

Iz jagod sort Shiraz and Cabernet Sauvignon so klonirali cDNA 3 saharoznih transporterjev, *VvSUC11*, *VvSUC12* in *VvSUC27* (Ageorges et al., 2000; Manning et al., 2001; Zhang et al., 2008). Ob začetku zorenja, ko se začne nalaganje sladkorja, se transkripcija *VvSUC11* in *VvSUC12* poveča, transkripcija *VvSUC27* pa se zmanjša (Davies et al., 1999).

AtSUC4 iz navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) in *HvSUT2* iz ječmena (*Hordeum vulgare* L.) se izražata v drugih porabniških organih in se nahajata v membrani vakuol (Sauer, 2007). *LjSUT4* iz nokote (*Lotus japonicus*) sodeluje pri privzemu saharoze iz citoplazme v vakuolo (Reinders in sod., 2008).

Genom riža ima 5 genov za SUT. Vseh 5 se izraža v listih. *OsSUT3* in *OsSUT5* se v listih bolj izražata kot *OsSUT1* (Aoki in sod., 2003). *OsSUT5* ima večjo afiniteto za saharozo in manjšo specifičnost kot *OsSUT1*. Potencialno lahko *OsSUT5* nadomesti funkcijo *OsSUT1* pri privzemu sladkorjev v floem (Sun in sod., 2010). *OsSUT1* se izraža v floemu, v celicah spremljevalkah in sitastih elementih (Matsukura in sod., 2000), ima pomembno vlogo za kalitev peloda (Eom in sod., 2012). *OsSUT2* se nahaja v tonoplastu (Endler in sod., 2006), izraža se v celicah mezofila, sodeluje pri prehajanju saharoze iz vakuol v citosol mezofilnih celic in je potreben za normalno rast riža (Braun in sod., 2014).

2.3.2. Heksozni transporterji

Heksozni transporterji so vključeni v proces hitre akumulacije heksoz med zorenjem in se izražajo v plazemski membrani ali tonoplastu (Fillion in sod., 1999). Izražanje monosaharidnih transporterjev se poveča med okužbo in lahko služi kot sekundarna linija obrambe (Sutton in sod., 2007).

V vinski trti so identificirali 59 homologov heksoznih transporterjev (Samson in sod., 2004; Jaillon in sod., 2007; Agasse in sod., 2009; Afoufa-Bastien in sod., 2010), vendar pa se je v jagodah izražalo le 6 genov za heksozne transporterje. *VvHT1-6*. *VvHT1*, *VvHT2* in *VvHT3* se visoko izražajo v vseh stopnjah razvoja jagod. Različna izraženost genov za heksozne transporterje med razvojem jagod sovпада s spremembo transportne poti sladkorjev iz simplastne v apoplastno pot, do katere pride ob začetku zorenja (Lecourieux in sod., 2013).

VvHT1, *VvHT3*, *VvHT4* in *VvHT5* so v plazemski membrani (Vignault in sod., 2005; Hayes in sod., 2007). *VvHT1* sodeluje pri transportu galaktoze, ksiloze in analogov glukoze (Conde in sod., 2006). *VvHT4* sodeluje le pri transportu glukoze, medtem ko *VvHT5*

sodeluje pri transportu glukoze in fruktoze (Hayes in sod., 2007). Transkripcija gena za *VvHT3* se zmanjša ob začetku zorenja (Hayes in sod., 2007).

VvHT2 in *VvHT6* sta v tonoplastu (Vignault in sod., neobjavljeno, vir: Lecourieux in sod., 2013). Ob začetku zorenja pride do povečanja transkripcije gena za *VvHT6* (Terrier in sod., 2005). *VvHT6* sodeluje pri nalaganju heksoz v vakuole ob začetku zorenja (Lecourieux in sod., 2013). Izražanje gena za *VvHT2* je povezano z začetkom zorenja (Terrier in sod., 2005; Lecourieux in sod., 2013).

2.3.3. Transporterji SWEET

Proteini SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) so družina transporterjev sladkorjev (Chen in sod., 2010), ki prevladujejo v rastlinah, ohranjeni pa so tudi v ostalih evkariontih. V evkariontih so sestavljeni iz 7 transmembranskih domen (TMD), z dvema zaporednima ponovitvama 3TMD, ki sta povezani s TDM4, homologi SWEET v prokariotih pa imajo samo eno ponovitev 3TMD (Chen in sod., 2010; Yuan in Wang, 2013). V navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) obstaja 17 genov za proteine SWEET, v rižu (*Oryza sativa*) pa 21. Večina transporterjev SWEET se nahaja v plazemski membrani (Guo in sod., 2014). Nekateri povzročitelji bolezni lahko prestrežejo sistem iztekanja sladkorjev, kar jim omogoči dostop do hranil gostitelja (Chen in sod., 2010).

Proteine SWEET delimo v 4 klade (Chen in sod., 2010). *AtSWEET1* (klad I) sodeluje pri prevzemu glukoze skozi plazemske membrane ter izhajanju glukoze v endoplazemski retikel (ER) (Takanaga in sod., 2008). *AtSWEET1* se močno izraža v cvetu navadnega repnjakovca, kjer zagotavlja nutriente gametofitom. Izražanje gena *AtSWEET1* v koreninah je nizko (Chen in sod., 2010). *AtSWEET5* se specifično izraža v vegetativnih celicah pelodnih zrn in sodeluje pri dostavi glukoze v generativne celice (Engel in sod., 2005). *AtSWEET8* in *AtSWEET9* (klad II) imata vlogo pri toku glukoze za izločanje nektarja (Ge in sod., 2000, Guan in sod., 2008). SWEET11 in SWEET12 (klad III) sta pomembna za tok saharoze iz celic floemskega parenhima za floemsko translokacijo. *AtSWEET11* in *AtSWEET12* se visoko izražata v listih, hkrati z geni, vključenimi v biosintezo in floemski privzem saharoze. *AtSWEET13* se nizko izraža v listih (Chen in sod., 2012). SWEET11 in SWEET12 sodelujeta pri izhajanju saharoze v apoplast floema in sta odgovorna za korak, ki se zgodi pred privzemom v apoplast, ki je posredovan s H⁺-saharoznimi simporterji, kot sta SUT1 in SUC2 (saharozni transporter 1 in saharozni prenašalec 2) (Chen in sod., 2012). *OsSWEET11* se izraža v plazemski membrani floemskih celic listov riža (Chu in sod., 2006b) in sodeluje pri transportu saharoze (Chen in sod., 2012). Povzročitelji bolezni najpogosteje vplivajo na izražanje genov SWEET iz klada III. *AtSWEET17* (klad IV) ima vlogo pri izhajanju fruktoze iz vakuol listov, njegovo izražanje v zrelih listih je nizko, kar kaže na to, da ima večjo vlogo v ponorih kot v listih (Chardon in sod., 2013, Guo in sod., 2014). Povečano izražanje gena *SWEET17* povzroča zmanjšano nalaganje fruktoze v listih. V primeru pomanjkanja energije (stradanja) se poveča izražanje *SWEET17*, zato sklepajo,

da SWEET17 sodeluje pri nalaganju saharoze v vakuole ter pri izločanju saharoze iz vakuol v citosol. SWEET16 in SWEET17 se visoko izražata v korteksu korenin in sta pomembna za transport sladkorjev iz vakuol korenin (Guo in sod., 2014).

2.3.4. Saharozna sintaza

Saharozna sintaza (SUSY) je globularni protein (Winter in sod., 1997), ki deluje kot encim, ki katalizira sintezo in razcep saharoze. SUSY katalizira razcep saharoze v UDP-glukozo in D-fruktozo. Reakcije SUSY so pomembne pri metabolizmu saharoze, saj predstavljajo reverzibilno povezavo med respiracijo, biosintezo ogljikovih hidratov ter uporabo ogljikovih hidratov. Odvisno od metabolnega okolja SUSY lahko sodeluje pri biosintezi celuloze, kaloze in škroba (Zheng in sod., 2011).

Pri višjih rastlinah je SUSY v citosolu, v topni ali membransko vezani obliki (Winter in sod., 1998). Fosforilacija SUSY zmanjša njeno hidrofobnost in ima le majhen učinek na njeno aktivnost (Winter in sod., 1997). SUSY nadzoruje vnos saharoze v plod (N'tchobo in sod., 1999). Do visokega izražanja SUSY pride med hitro rastjo (npr. podaljševanje listov) in med odlaganjem snovi v razvijajočih se plodovih (King in sod., 1997, Sung in sod., 1994). Kot odgovor na biotski ali abiotski stres lahko pride do motenj regulacije SUSY (Biemelt in Sonnewald, 2005).

2.3.5. Invertaza

Invertaza (β -fruktozidaza) je encim, ki katalizira razcep saharoze v D-glukozo in D-fruktozo (Davies in Robinson, 1996; Combes in Monsan, 1983). V rastlinah se pojavlja v dveh oblikah. Kisla invertaza ima optimum delovanja pri kislem pH, alkalna invertaza pa pri pH 7,5 (Cooper in Greenshields, 1964).

Invertaza je lahko v celični steni (cell wall invertase, CWIN), citoplazmi (cytoplasm invertase, CIN) ali vakuolah (vacuolar invertase, VIN). Kodirajo jih različni geni z različnimi molekularnimi in biokemijskimi značilnostmi (Ruan in sod., 2010).

VIN so pomembne za regulacijo ravni heksoz v jagodah (Lingle in Dunlop, 1987) in porabo saharoze, shranjene v vakuolah (Leigh in sod., 1979). Spodbujajo ekspanzijo celic in vplivajo na odlaganje višjih koncentracij heksoz v plodovih paradižnika in vinske trte (Wang in sod., 2010).

CWIN so povezane s hitro rastjo (Eschrich, 1980), inducirajo jih poškodbe in napadi povzročiteljev bolezni (Sturm in Chrispeels, 1990) ter so vpletene v floemski transport in regulacijo med viri in porabniki (Eschrich, 1980). Povečano izražanje CWIN v plodovih vpliva na zvišanje ravni heksoze in zvečane mase zrelih plodov (Jin in sod., 2009).

CIN so tradicionalno šteli za citosolni protein, kasnejše raziskave pa so pokazale, da se nahaja v kloroplastih, mitohondrijih in jedru (Wang in Ruan, 2013). Ima pomembno vlogo

v mitohondrijih pri vzdrževanju homeostaze reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (Xiang in sod., 2011).

Invertaze se inducirajo med okužbo in vplivajo na zmanjšanje ravni sladkorjev v apoplastu na mestu okužbe (Sutton in sod., 2007).

2.4. ABIOTSKI IN BIOTSKI STRES VINSKE TRTE

Vinska trta je trajnica, zato je skozi daljše časovno obdobje izpostavljena različnim oblikam abiotnega in biotnega stresa (Vršič in Lešnik, 2005). Stres povzroča tudi človek v želji po večjem pridelku z uporabo gnojil, herbicidov, insekticidov, fungicidov in hormonov ter z onesnaževanjem okolja (Vršič in Lešnik, 2005; Levitt, 1980).

2.4.1. Abiotni stres

Faktorji, ki povzročajo abiotni stres, so visoke ali nizke temperature, ionizacijsko sevanje, kemična toksičnost, neravnotežje hranil, prevelike ali premajhne količine vode v tleh ter prisotnost visokih koncentracij soli in toksičnih plinov (Pearson in Goheen, 1988; Levitt, 1980).

Vinska trta uspeva v semiaridnem okolju, zato se pogosto srečuje s problemoma, kot sta suša in slanost tal (Cramer in sod., 2007). Solni stres povzroča ionsko neravnovesje in zmanjša osmotski potencial ter tako kot suša, vodi do pojave osmotskega stresa, zaradi katerega rastlina ne more več normalno črpati vode (Levitt, 1980).

2.4.2. Biotni stres

Številne fitoplazeme, bakterije, glive in virusi povzročajo bolezni vinske trte (Pearson in Goheen, 1988). Fitoplazme so bakterije iz razreda Mollicutes. Nimajo celične stene, manjkajo pa jim tudi geni nekaterih ključnih metabolnih poti in so obligatni zajedalci, ki povzročajo pojav trsnih rumenic (Lee in sod., 2000). *Xylella fastidiosa* je ena od mnogih vrst bakterij, ki okužujejo vinsko trto. Povzroča Piercovo bolezen, ki onemogoča normalno rast vinske trte in povzroči odmiranje okužene rastline (Hopkins in Purcell, 2002). Na območju Slovenije je peronospora vinske trte (*Plasmopara viticola*) povzročitelj gospodarsko najpomembnejše glivične bolezni vinske trte, ki povzroča velike izgube pridelka (Colnarič in Vrabl, 1975). Od virusov, ki okužujejo vinsko trto, je virus zvijanja listov vinske trte (Leaf roll-associated closterovirus-3, GLRaV-3) eden najpogostejših, ki z zakasnitvijo zorenja in znižanjem vsebnosti antocianinov in sladkorjev pomembno vpliva na kakovost jagod (Borgo in Angelini, 2002). V kompatibilnih interakcijah med vinsko trto in povzročitelji bolezni se ti lahko razširjajo v vsa rastlinska tkiva, kar povzroča globalni celični stres in napake v razvoju (Whitham in sod., 2006). Čeprav rastlina ne more popolnoma ustaviti njihovega razširjanja in sistemske okužbe, pa ni popolnoma pasivna

proti povzročiteljem bolezni. Odgovor rastline vključuje spremembe v ekspresiji genov za obrambo in stres (Whitham in sod., 2003) ter mašenje žil s tilami in geli, ki preprečijo razširjanje povzročiteljev bolezni (Sun in sod., 2008).

Ugotovljeno je bilo, da okužba z GLRaV-3 v vinski trti povzroča spremembe v izražanju genov, povezanih z obrambo, celično smrtjo in staranjem. Vpliva tudi na gene, povezane s transportom in metabolizmom sladkorjev in antocianinov, kar pomembno vpliva na zorenje, saj sta metabolizem in akumulacije sladkorjev in antocianinov ključna procesa pri zorenju (Vega in sod., 2011).

Škodljivci, ki napadajo vinsko trto, so predvsem pršice, žuželke in ogorčice (Pearson in Goheen, 1988). Pomembnejši škodljivci vinske trte so pasasti in križasti grozdni sukač (*Clysia ambiguella* in *Lobesia botrana*), metulja, katerih gosenice obžirajo cvetne brste, cvetove in jagode; trsna uš ali filoksera (*Viteus vitifoliae*), ki je, preden so začeli cepiti evropsko trto na ameriške podlage, povzročala veliko škode na koreninah; rdeča sadna pršica (*Panonychus ulmi*), ki največ škode povzroča z obžiranjem prvih spomladanskih lističev (Colnarič in Vrabl, 1975) ter ektoparazitske ogorčice iz rodov *Longidorus* in *Xiphinema*, ki povzročajo škodo s prehranjevanjem s koreninami vinske trte in razširjanjem rastlinskih Nepovirusov (Urek in Širca, 2005).

2.5. VIRUS PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE

Virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) je virus, ki povzroča kužno izrojenost vinske trte (Grapevine degradation disease) (Andret-Link in sod., 2004). Bolezen se pojavlja v vinorodnih pokrajinah v vseh predelih sveta in lahko vodi do visokih izgub pridelka (prek 80 %) (Bovey in sod., 1980; Martelli in Savino, 1990). V vinogradih se razširja iz ene rastline na drugo s pomočjo ektoparazitske ogorčice *Xiphinema index* (Hewitt in sod., 1958).

Vinska trta je glavni naravni gostitelj GFLV, čeprav občasno prihaja do okužb plevelov, ki rastejo v vinogradih (Horvath in sod., 1994). Poleg vinske trte lahko GFLV okužuje vrste iz družin *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae*, *Solanaceae* in *Fabaceae* (Andret-Link in sod., 2004).

GFLV uvrščamo v rod *Nepovirus* iz družine *Comoviridae* (Mayo in Robinson, 1996). Zgrajen je iz izometričnih delcev poliedrične oblike, ki v premeru merijo 28 nm (Quacquarelli in sod., 1976).

Genom GFLV je sestavljen iz dveh enoverižnih pozitivno usmerjenih RNA (Quacquarelli in sod., 1976). RNA1 kodira poliprotein P1 (Ritzenthaler in sod., 2002), RNA2 pa poliprotein P2 (Serghini in sod., 1990). Oba poliproteina se procesirata v funkcionalna

proteina s pomočjo proteinaze, ki jo kodira RNA1 (Margis in sod., 1991). V nekaterih izolatih GFLV so našli tudi satelitno RNA3, ki kodira protein P3 (Pinck in sod., 1988).

V celicah, okuženih z GFLV, pride do proliferacije membran endoplazemskega retikla (ER), pri tem nastane virusni kompartment (Ritzenthaler in sod., 2002). Po vstopu virusa v celico in dekapsulaciji se RNA prevedeta in pride do replikacije v virusnem kompartmentu. Iz perinuklearnega mesta sinteze RNA se virusni partikli pomikajo na periferijo celice in se verjetno skozi plazmodezme razširjajo v sosednje celice (Andret-Link in sod., 2004). Premiki virusnih partiklov na dolge razdalje potekajo po floemu, skupaj s transportom sladkorjev (Maule in Palukaitis, 1991).

Bolezenska znamenja okužb z GFLV so raznolika (Martelli, 1993). Virus povzroča nepravilno zorenje jagod, nekatere okužene jagode so brez pečk (Raski in sod., 1983), vpliva na velike izgube pridelka zaradi zmanjšanja števila in mase grozdov ter jagod, povzroča pa tudi spremembe kakovosti pridelka zaradi zmanjšanja vsebnosti kislin in povečanja vsebnosti antocianov (Cigoj, 2015). Bolezenska znamenja, vidna na listih, so pahljačasta razrast, kloroze, rumenenje listov in rumene kloroze vzdolž žil. Bolezenska znamenja, ki se pojavljajo na rožgah, so deformacije, kratki medčlenki, zraslost členkov ter cikcak rast med členki (Raski in sod., 1983). Značilni notranji znaki okužbe z GFLV v olesenelih poganjkih in bazalnih medčlenkih so znotrajcelične cevaste strukture, ki prečkajo lumen žilnih elementov. Sestavljene so iz pektinskega jedra, ki ga obdaja celulozni plašč z vključki iz lignina, suberina ali kutina (Martelli in Savino, 1990). Okužba povzroča tudi slabšo sposobnost ukoreninjenja podlag in prijemanja cepičev. Produktivna doba v okuženih vinogradih se skrajša iz 30–40 let na 15–20 let (Andret-Link in sod., 2004).

3. MATERIAL IN METODE

3.1. IZBOR VINOGRADOV IN TRSOV

V okviru predhodnih raziskav (Cigoj, 2015; Jež Krebelj, 2015) so nabrali vzorce vinske trte iz dveh vinogradov (Slika 4). V vinogradu v Komnu na Krasu so izbrali 5 zdravih in 5 z GFLV okuženih trsov sorte Refošk (Preglednica 1). V vinogradu v Prepottu v Friuli Colli Orientali so izbrali 9 zdravih in 10 z GFLV okuženih trsov sorte Pokalca (Preglednica 2). Za izbrane trse so bile izvedene analize prisotnosti najpogostejših virusov, ki so potrdile odsotnost vseh najpogostejših virusov, razen GFLV.



Slika 4: Lega vinogradov. Levo: Lokacija vinograda v Komnu. Desno: Lokacija vinograda v Prepottu. (Sliki: Google maps, 2015).

Vzorci so izbrali iz večjega dela vinograda, da so dobili čim bolj reprezentativne rezultate. Trse so označili s kratico imena sorte (SCH za Pokalca (Schioppetino) in REF za Refošk) ter zaporedno številko vrste in sadilnega mesta (npr. 18/12 – osemnajsta vrsta/dvanajsti trs).

Preglednica 1: Izbrani trsi sorte Refošk iz vinograda v Komnu za določanje vsebnosti sladkorjev in analizo izbranih genov.

| Sorta Refošk | |
|--------------|----------------|
| Zdravi | Okuženi z GFLV |
| REF 18/12 | REF 19/22 |
| REF 18/15 | REF 21/14 |
| REF 20/11 | REF 21/17 |
| REF 38/33 | REF 22/18 |
| REF 38/35 | REF 38/31 |

Preglednica 2: Izbrani trsi sorte Pokalca iz vinograda v Prepottu za določanje vsebnosti sladkorjev in analizo izražanja genov.

| Sorta Pokalca | |
|----------------------|-----------------------|
| <i>Zdravi</i> | <i>Okuženi z GFLV</i> |
| SCH 7/24 | SCH 7/5 |
| SCH 7/35 | SCH 9/21 |
| SCH 7/45 | SCH 10/24 |
| SCH 8/27 | |

Preglednica 3: Izbrani trsi sorte Pokalca iz vinograda v Prepottu za mikroskopske analize ksilema.

| Sorta Pokalca | |
|----------------------|-----------------------|
| <i>Zdravi</i> | <i>Okuženi z GFLV</i> |
| SCH 7/45 | SCH 7/7 |
| SCH 7/47 | SCH 8/15 |
| SCH 8/23 | SCH 8/19 |
| SCH 8/26 | SCH 8/32 |
| SCH 8/41 | SCH 10/16 |
| SCH 9/39 | SCH 10/32 |

V okviru predhodnih raziskav (Jež Krebelj, 2015) so v vinogradu v Prepottu januarja 2012 nabrali enoletni les zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Pokalca (Preglednica 3) in vzorce do začetka poskusa shranili pri 4 °C.

V okviru predhodnih raziskav (Cigoj, 2015; Jež Krebelj, 2015) v letu 2012 so približno vsaka dva tedna od začetka zorenja do trgatve (Preglednica 4) iz izbranih trsov v vinogradih v Preppottu in v Komnu zbirali vzorce listov in jagod, ločeno iz zdravih in iz z GFLV okuženih trsov sort Pokalca in Refošk za analizo izražanja genov in določanje vsebnosti sladkorjev (Preglednica 1 in Preglednica 2). Liste v velikosti dlani so nabrali iz zgornjega dela trsa. Jagode so naključno izbrali iz zgornjega, srednjega in spodnjega dela grozda, iz senčne in sončne strani. Liste in jagode so shranili v centrifugirkah in jih hitro zamrzili s tekočim dušikom. Vzorce so shranili pri – 80 °C.

Preglednica 4: Datumi vzorčenj listov in jagod (4 časovne točke).

| | 1. točka | 2. točka | 3. točka | 4. točka |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Listi</i> | 5. 7. 2012 | 29. 7. 2012 | 8. 8. 2012 | 7. 9. 2012 |
| <i>Jagode</i> | 13. 8. 2012 | 27. 8. 2012 | 10. 9. 2012 | 25. 9. 2012 |

3.2. DOLOČANJE VSEBNOSTI SLADKORJEV

3.2.1. Priprava rastlinskega materiala

Jagode smo olupili in ločili pečke od mesa. V ohlajenih terilnicah smo s tekočim dušikom vzorce mesa in listov strli v prah. V ohlajene označene centrifugirke smo natehtali po 100 mg materiala in vzorce shranili v zamrzovalniku pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. Priprava vzorcev za merjenje sladkorjev

Pripravili smo pufer v razmerju metanol : kloroform : voda = 5 : 2 : 1 in ga ohladili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

100 mg rastlinskega materiala smo dodali 500 μl hladnega pufra in močno premešali. Homogenat smo v ledu inkubirali 8 minut in ga nato centrifugirali 4 minute pri 14.000 g. Supernatant smo prenesli v svežo epico, dodali 250 μl vode in močno premešali. Potem smo centrifugirali 2 minuti pri 14.000 g, supernatant prenesli v svežo označeno epico in vzorce shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Določanje sladkorjev

Vsebnosti D-glukoze, D-fruktoze ter saharoze v listih in mesu smo analizirali s kompletom K-SURFG (Megazyme International, Irska), pri čemer smo ves čas absorbance merili s spektrofotometrom Shimadzu UV-1800 (Slika 5) pri valovni dolžini 340 nm.



Slika 5: Spektrofotometer za meritve absorbanc, iz katerih smo izračunali vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze (Fotografija: Marija Stele, 2015).

Za določanje vsebnosti D-glukoze in D-fruktoze smo k 20 μl vzorca dodali 1080 μl vode, 50 μl imidazolnega pufra in 50 μl NADP + ATP ter premešali. Po 3 minutah smo izmerili absorbanco (A1). Nato smo dodali 10 μl HK/G6P-DH, premešali in po 5 minutah ponovno izmerili absorbanco (A2). Dodali smo še 10 μl PGI, premešali in po 10 minutah spet izmerili absorbanco (A3).

Za določanje vsebnosti saharoze smo v kivete odpipetirali po 20 µl vzorca in dodali 100 µl β-fruktozidaze ter premešali. Po 5 minutah smo dodali 980 µl destilirane vode, 50 µl imidazolnega pufra in 50 µl NADP + ATP ter ponovno premešali. Po 3 minutah smo izmerili absorbanco (A4). Nato smo dodali 10 µ HK/G6P-DH, premešali in po 5 minutah ponovno izmerili absorbanco (A5).

Za vsako serijo meritev smo izvedli tudi slepo reakcijo (brez vzorca) in reakcijo s standardno količino sladkorja.

Koncentracije sladkorjev smo izračunali po spodnjih enačbah (1, 2, 3):

$$\text{Glukoza} = \frac{V_k \cdot M_{w_{glu}} \cdot ((A_2 - A_1)_{\text{vzorca}} - (A_2 - A_1)_{\text{slepa}})}{\epsilon \cdot d \cdot V_v \cdot F_w} \quad \dots (1)$$

$$\text{Fruktoza} = \frac{V_k \cdot M_{w_{fru}} \cdot ((A_3 - A_2)_{\text{vzorca}} - (A_3 - A_2)_{\text{slepa}})}{\epsilon \cdot d \cdot V_v \cdot F_w} \quad \dots (2)$$

$$\text{Saharoza} = \frac{V_k \cdot M_{w_{sah}} \cdot (((A_5 - A_4)_{\text{vzorca}} - (A_5 - A_4)_{\text{slepa}}) - ((A_2 - A_1)_{\text{vzorca}} - (A_2 - A_1)_{\text{slepa}}))}{\epsilon \cdot d \cdot V_v \cdot F_w} \quad \dots (3)$$

pri čemer je bil V_k končni volumen, V_v volumen dodanega vzorca, ϵ ekstinkcijski koeficient NADPH pri valovni dolžini 340 nm, d dolžina svetlobne poti, M_w molska masa, F_w sveža teža ter $A_1 - A_5$ meritve absorbance. Izračunane vrednosti sladkorjev so podane v mg/g.

3.2.4. Statistična obdelava podatkov

Začetno analizo podatkov smo izvedli v programu UVProbe 2.32. Podatke smo izvozili v Microsoft Excel 2007, kjer smo izračunali koncentracije sladkorjev, povprečne vrednosti in intervale zaupanja. Za ugotavljanje statistične značilnosti razlik med zdravimi in okuženimi rastlinami smo uporabili studentov t-test (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

3.3. ANALIZA IZRAŽANJA GENOV

3.3.1. Priprava rastlinskega materiala

Jagode, shranjene pri -80°C , smo s skalpelom za enkratno uporabo olupili, ločili kožico, meso in pečke ter jih v predhodno ohlajenih terilnicah s tekočim dušikom strli v prah. Pri tem smo pazili, da se vzorci niso odtajali. V ohlajene in označene centrifugirke smo zatehtali po 300 mg materiala in jih do izolacije RNA shranili v zamrzovalniku pri -80°C .

Liste smo v ohlajenih terilnicah s tekočim dušikom strli v prah. V ohlajene in označene centrifugirke smo zatehtali po 100 mg materiala in vzorce shranili pri -80°C .

3.3.2. Izolacija RNA

Celokupno RNA smo izolirali s kompletom RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen).

Pufer RLC smo pred uporabo modificirali, tako da smo na 1 ml pufru RLC dodali 10 mg PVP MW 40.000 (Sigma). Modificiran pufer RLC smo v vodni kopeli segreli na 56 °C. Na 100 mg vzorca rastlinskega materiala smo dodali 1 ml modificiranega pufru RLC ter močno premešali. Homogenat smo inkubirali 3 minute v termobloku pri 56 °C in nato centrifugirali 30 sekund pri 10.000 g.

Supernatant smo prenesli na kolono QIAshredder (vijola) v več korakih po 500 µl ter centrifugirali 2 minuti pri 14.000 g, da smo odstranili preostale grobe delce. Filtrat vseh centrifugiranj smo prenesli v novo 2 ml centrifugirko z merilcem, dodali polovični volumen absolutnega etanola (Sigma, Nemčija) ter dobro premešali s pipetiranjem.

650 µl vzorca smo prenesli na kolono RNeasy Mini spin (roza) in centrifugirali 20 sekund pri 10.000 g. Filtrat smo zavrgli. Korak smo ponovili s preostalim vzorcem, na isti koloni.

Nato smo dodali 700 µl pufru RW1, centrifugirali 20 sekund pri 10.000 g in zavrgli filtrat. Za tem smo dodali 500 µl pufru RPE in centrifugirali 20 sekund pri 10.000 g in zavrgli filtrat. Korak s pufrom RPE smo še enkrat ponovili.

Kolono smo prenesli v svežo 1,5 ml centrifugirko in dvakrat dodali 30 µl na 65 °C segrete vode brez RNaz ter inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Vzorce smo shranili v zamrzovalniku pri – 80 °C.

3.3.3. Odstranitev genomske DNA

Genomsko DNA smo odstranili s kompletom DNase I, Amplification Grade Kit (Invitrogen, ZDA).

Pripravili smo reakcijsko mešanico, ki je za en vzorec vsebovala:

- ◆ 0,1 µl DNase I, Amp Grade,
- ◆ 2 µl reakcijskega pufru 10x DNase I,
- ◆ 8 µl vode brez RNaz,
- ◆ 10 µl vzorca RNA.

Vzorce z reakcijsko mešanico smo inkubirali pri sobni temperaturi ($T = 23^{\circ}\text{C} \pm 2$). Po 15 minutah inkubacije smo reakcijo inaktivirali z dodatkom 2 µl 25 nM EDTA raztopine in jih segreli na 65 °C za 10 minut. Vzorce (12,5 µl) smo nato za 5 minut postavili na 80 °C (denaturacija) in jih shranili v ledu.

3.3.4. Reverzna transkripcija

S kompletom High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems, ZDA) smo RNA prepisali v cDNA.

Reakcijska mešanica za en vzorec je vsebovala:

- ◆ 2,5 µl pufra 10x RT,
- ◆ 1 µl mešanice 25x dNTP Mix,
- ◆ 2,5 µl naključnih heksameroev RT,
- ◆ 4,25 µl vode brez RNaz,
- ◆ 1 µl inhibitorja RNaz,
- ◆ 1,25 µl reverzne transkriptaze Multiscribe™.

Vzorcem, ki smo jim odstranili genomsko DNA, smo dodali 12,5 µl reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo. Reakcijo smo izvedli v aparaturi GeneAmp® PCR System 9700 HT (Applied Biosystem) pri pogojih: 25 °C za 10 minut, 37 °C za 120 minut in 4 °C za ∞.

3.3.5. Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Preglednica 5: Značilnosti začetnih oligonukleov in sond, uporabljenih za pomnoževanje PCR v realnem času.

| Ime gena | Orientacija | Nukleotidno zaporedje (5' – 3') | Končna koncentracija (nM) | Referenca |
|-------------------|-------------|------------------------------------|------------------------------|--|
| <i>VvSWEET1</i> | Začetni | ATACTGTACGCCATCTACTGCAAAA | 900 | Prezelj in sod., 2015 (poslano v objavo) |
| | Končni | CATGTCCACCGGCTTGTCT | 900 | |
| | Sonda | CAGCGGCCAGATTC | 250 | |
| <i>VvSWEET10</i> | Začetni | TATCTGCGGATTCGGTTCCA | 300 | Prezelj in sod., 2015 (poslano v objavo) |
| | Končni | ACGCTTAGCGAGAACACGAGAC | 300 | |
| <i>VvSWEET17a</i> | Začetni | CCTCATATACGCACCGGCAAAA | 900 | Prezelj in sod., 2015 (poslano v objavo) |
| | Končni | GCTAGAAACCCACATCCAAGAG | 900 | |
| | Sonda | CAGAGCGACGGTTTTG | 250 | |
| <i>VvSUSY</i> | Začetni | TGTTAAGGCTCCTGGATTTC AATTA | 900 | Hren, 2007 |
| | Končni | AGCCAAATCTTGGCAAGCA | 900 | |
| <i>UBICF</i> | Začetni | CTATATGCTCGCTGCTGACG | 300 | Castellarian in sod., 2007 |
| | Končni | AAGCCAGGCAGAGACA AACTC | 300 | |
| <i>COX</i> | Začetni | CGTCGCATTCCAGATTATCCA | 300 | Weller in sod., 2000 |
| | Končni | CAACTACGGATATATAAGAGCCAAA ACTG | 300 | |
| | Sonda | TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT | 150 | |

Za spremljanje izražanja genov *VvSWEET1*, *VvSWEET10*, *VvSWEET17a* in *VvSUSY* v vzorcih vinske trte smo izbrali metodo kvantitativnega PCR v realnem času (quantitative polymerase chain reaction, qPCR). Uporabili smo dve različni kemiji (SYBR® Green in TaqMan). Ne glede na uporabljeno kemijo smo uporabljali 5 µl reakcije, ki so vsebovale 2 µl cDNA in 3 µl reakcijske mešanice. V primeru kemije SYBR Green smo uporabili komplet Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), v primeru kemije TaqMan pa TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Koncentracije začetnih oligonukleotidov so bile v primeru SYBER 300 nM, v primeru kemije TaqMan 300 nM, sonde pa 150 nM.

Za kontrolna gena za normalizacijo smo izbrali gen za citokrom oksidazo (*COX*) (Weller in sod., 2000) in ubikitin konjugirajoči dejavnik (*UBICF*) (Castellarian in sod., 2007) (Preglednica 5).

Vse reakcije smo izvedli v optičnih ploščicah formata 384 (384 Well Clear Optical Reaction Plates, Applied Biosystems), prekritih z optičnimi adhezivnimi folijami (Thermo Scientific). Ploščice smo centrifugirali 1 minuto pri 1000 g. qPCR smo izvedli na inštrumentu LightCycler® 480 (Roche, Applied Systems) pri razmerah: 2 minuti pri 50 °C, 10 minut pri 95 °C (aktivacija polimeraze) ter nato 40 ciklov pri pogojih: 10 sekund pri 95 °C in minuta pri 60 °C. V primeru SYBER 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.

Začetno analizo podatkov smo izvedli v programu Roche LightCycler Software. Vrednosti Cq smo izvozili v Microsoft Excel za nadaljnjo statistično obdelavo.

3.3.6 Relativna kvantifikacija

Uporabili smo metodo relativne kvantifikacije z uporabo standardne umeritvene krivulje. Za vsak amplikon smo izrisali umeritveno krivuljo.

Relativno raven izražanja smo izračunali po formuli: $E = 10^{(1/\text{naklon})}$

Cq vrednosti smo normalizirali na geometrično sredino referenčnih genov (*COX* in *UBICF*).

3.3.7. Statistična obdelava podatkov

Podatke smo obdelali v programu Microsoft Excel 2007. Izračunali smo kvantitativne in kvalitativne parametre, povprečne vrednosti in intervale zaupanja. Statistično značilnost razlik med zdravimi in okuženimi rastlinami smo izračunali s studentovim t-testom (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

3.4. MERITVE POVRŠINE PRESEKA IN ZAMAŠENOSTI KSILEMSKIH ELEMENTOV

3.4.1. Priprava materiala

V okviru predhodnih raziskav (Jež Krebelj, 2015) so vzorce enoletnega lesa (Preglednica 3), ki so bili shranjeni na 4 °C, v začetku februarja 2012 posadili v vermikulit in jih vzgojili v podtaknjence v komori za pripravo podtaknjencev.

Ko so dovolj zrasli, so jih v začetku aprila posadili v lonce s prostornino 3 l, v specialen substrat za lesnate rastline. V rastlinjaku so rasli do konca junija, ko so začeli s poskusom.

Vodni stres je bil narejen pri 3 zdravih in 3 z GFLV okuženih rastlinah tako, da jih niso zalivali. Vodni stres je bil določen z meritvami vodnega potenciala.

0. dan (izhodišče, vse rastline so bile zalite) ter 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja so rastlinam odrezali približno 1 cm dolge koščke debla in jih shranili v raztopini FAA (formalin-acetic-alcohol).

100 ml raztopine FAA je vsebovalo:

- ◆ 50 ml absolutnega etanola,
- ◆ 5 ml ocentne kisline,
- ◆ 10 ml formaldehida (37–40 %),
- ◆ 35 ml destilirane vode.

Po enem tednu so vzorce začeli dehidrirati v etanolni vrsti (30 %, 50 % in 70 %). V vsaki raztopini so bili vzorci od 5 do 7 dni. Vzorce v 70 % etanolu so shranili v hladilnik pri 4 °C.

3.4.2. Rezanje rozg ter priprava in slikanje preparatov

V okviru magistrskega dela smo približno 1 cm dolge koščke rozg, ki so bili shranjeni v 70 % etanolu, pred rezanjem 3–10 minut hidrirali v destilirani vodi.

Rozgam smo odstranili lubje, jih pritrdili na mikrotomom (Reichert-Jung) (Slika 6) in jih prečno narezali na 35 µm debele rezine. Občasno smo košček rozge, vpet v mikrotom, s kapalko navlažili s kapljico destilirane vode, da se ni preveč izsušil. Cele rezine smo sproti s pinceto ali tanjšim čopičem prenašali na objektno stekelce, na katero smo predhodno kapnili kapljico destilirane vode, ter jih nato pokrili s krovnim stekelcem.



Slika 6: Mikrotom za rezanje rezin rozg (Fotografija: Marija Stele, 2015).

Preparate smo pogledali pod mikroskopom Axioskop 2 MOT (Zeiss) in jih poslikali z na mikroskop pritrjeno kamero AxioCam MRc (Zeiss) (Slika 7). Oba sta bila povezana z računalnikom. S programom Axiovision Real 4.8. smo naredili delne posnetke prek celotnega preparata rezine rozge tako, da so se robovi sosednjih delnih posnetkov med seboj prekrivali. Delne posnetke rezine smo uvozili v program Fiji-win32.exe in jih sestavili v sliko celotnega prereza.

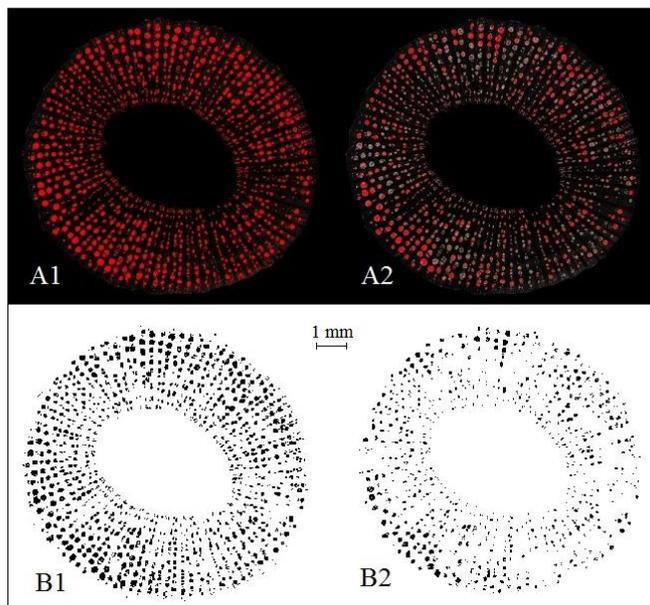


Slika 7: Mikroskop in kamera za slikanje rezin rozg (Fotografija: Marija Stele, 2015).

3.4.3. Določanje zamašenosti ksilemskih elementov

V programu Fiji-win32.exe smo na vsaki sliki celotnega prereza rozge črno obarvali ozadje, ostanke lubja in floema, centralni stržen in raztrganine v ksilemu, ki so nastale zaradi rezanja.

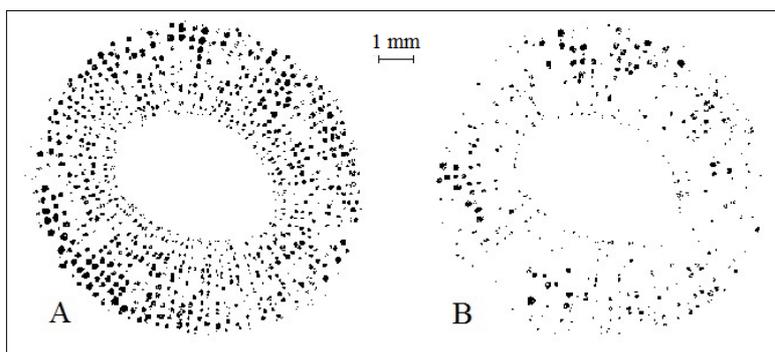
Z nastavitvami svetlobe (Brightness) smo za vsako sliko rozge določili dva praga (Threshold). Nižji prag je označeval vse (odprte in zamašene) ksilemske elemente (rdeče obarvan lumen vseh ksilemskih elementov), višji prag pa samo odprte ksilemske elemente (rdeče obarvan samo lumen odprtih ksilemskih elementov, zamašeni ksilemski elementi sivo obarvani). Za vsak svetlobni prag smo naredili masko (Slika 8).



Slika 8: Primerjava slik iz programa Fiji-win32.exe. A1: slika ki nastane, ko nastavimo »nizek« prag; A2: slika, ki nastane, ko nastavimo »visok« prag; B1: Maska slike A1 [Maska vsi], B2: Maska slike A2 [Maska samo prazni] (Slika: Marija Stele, 2015).

Za merjenje zamašenosti ksilemskih elementov smo maske med seboj seštevali (funkcija OR) ali odštevali (funkcija XOR):

1. [Maska vsi] + (OR) [Maska samo prazni] = [Maska vsi + samo prazni]
2. [Maska vsi + samo prazni] – (XOR) [Maska samo prazni] = [Maska polni s kolobarji] *zaradi razlike v svetlobnem pragu ostanejo kolobarji okrog praznih ksilemskih elementov
3. [Maska polni s kolobarji] – kolobarji (odstranili smo jih z analizo partikolov (Particle analysis) = [Maska polni brez kolobarjev]
4. [Maska vsi + samo prazni] – (XOR) [Maska polni brez kolobarjev] = [Maska prazni visok threshold]



Slika 9: Primerjava mask odprtih in zamašenih ksilemskih elementov. A: [Maska prazni visok treshold] (črno obarvani samo odprti ksilemski elementi), B: [Maska polni brez kolobarjev] (črno obarvani samo zamašeni ksilemski elementi) (Slika: Marija Stele, 2015).

Za sliki [Maska prazni visok treshold] in [Maska polni brez kolobarjev] (Slika 9) smo izvedli analizo partiklov (Analyse Particles) in s tem dobili podatke o površini (Area, Area Fraction), obsegu (Perimeter) in premeru (Ferets Diameter) lumna posameznih odprtih in zamašenih ksilemskih elementov.

3.4.4. Statistična obdelava podatkov

Podatke, ki smo jih pridobili z analizo partiklov, smo iz programa Fiji-win32.exe uvozili v Microsoft Excel 2007, kjer smo za zdrave zalite, zdrave nezalite, okužene zalite in okužene nezalite rozge izračunali povprečne premere in površine posameznih praznih in zamašenih ksilemskih elementov, celotno površino, ki ga zavzema prazen in zamašen lumen ksilema in deleže zamašenih in polnih ksilemskih elementov, ki jih zavzemajo glede na celotni lumen ksilema ali glede na celotno poršino rozge. Za vse meritve smo izračunali povprečne vrednosti in intervale zaupanja.

Statistično značilnost razlik med zdravimi/okuženimi in zalitimi/nezalitimi rozgami smo izračunali s testom Two way ANOVA v programu SigmaPlot (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

4. REZULTATI

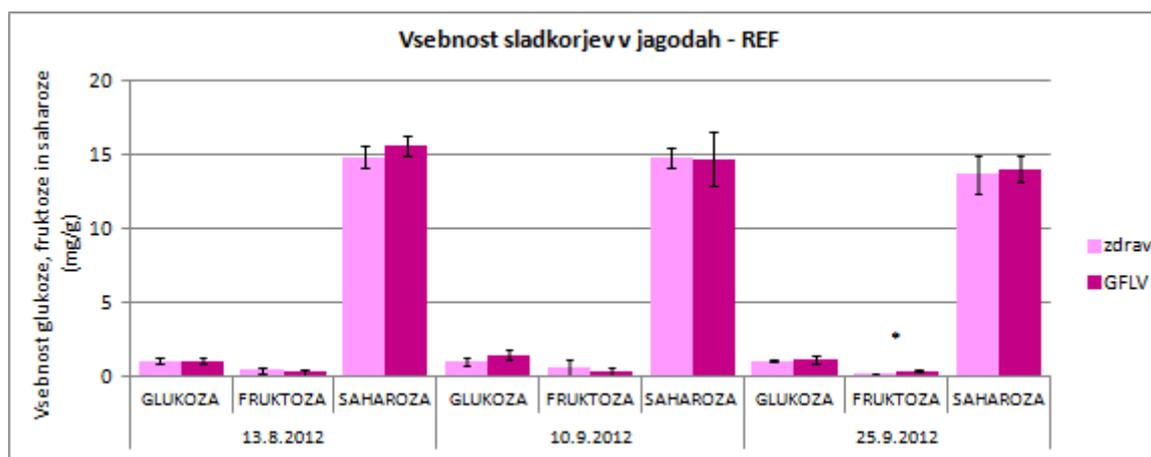
4.1. VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST SLADKORJEV V JAGODAH IN LISTIH

V listih in mesu jagod zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sort Refošk in Pokalca smo določali vsebnost saharoze, glukoze in fruktoze v 3 časovnih točkah.

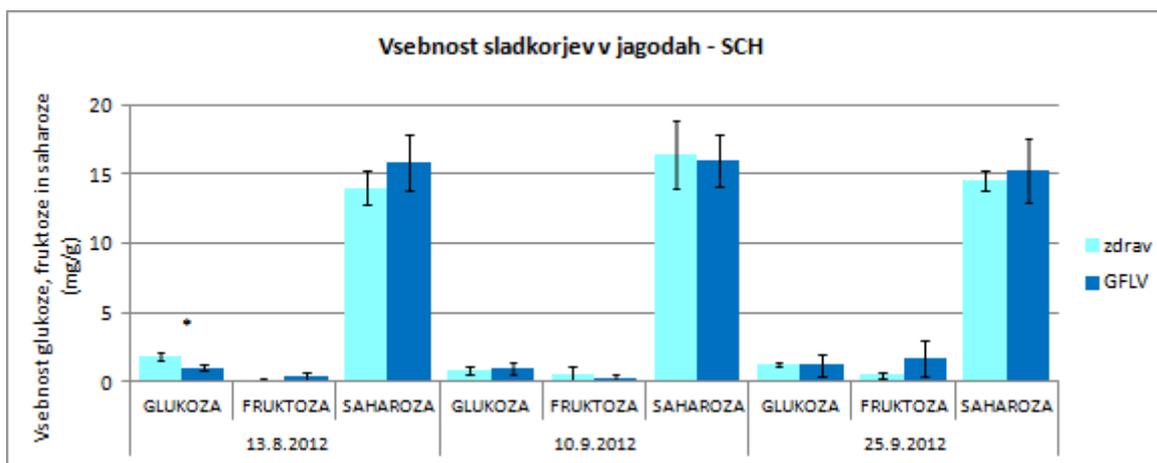
4.1.1. Vsebnost sladkorjev v jagodah

Čeprav je bila vsota povprečnih vrednosti skupnih vsebnosti sladkorjev v jagodah, okuženih z GFLV (REF: 13. 8. – 16,9 mg/g; 10. 9. – 16,4 mg/g; 25. 9. – 15,4 mg/g; SCH: 13. 8. – 17,3 mg/g, 10. 9. – 17,3 mg/g, 25. 9. – 18,2 mg/g), do 11 % višja kot v zdravih jagodah (REF: 13. 8. – 16,2 mg/g, 10. 9. – 16,4 mg/g, 25. 9. – 14,7 mg/g; SCH: 13. 8. – 15,8 mg/g, 10. 9. – 17,9 mg/g, 25. 9. 16,4 mg/g), zaradi majhnega števila vzorcev in biološke variabilnosti razlike niso bile statistično značilne.

Prav tako ni bila statistično značilna večina razlik v vsebnosti sladkorjev med z GFLV okuženimi in zdravimi jagodami, z izjemo vsebnosti fruktoze 25. 9. pri sorti Refošk, ki je bila v z GFLV okuženih jagodah statistično značilno višja kot v zdravih jagodah (Slika 10) ter vsebnosti glukoze 13. 8. pri sorti Pokalca, ki je bila v z GFLV okuženih jagodah statistično značilno nižja kot v zdravih jagodah (Slika 11). Kljub temu, da razlike večinoma niso bile statistično značilne, pa je v času trgatve (25. 9.) opazen trend višje vsebnosti saharoze v jagodah okuženih trsov kot v jagodah zdravih trsov.



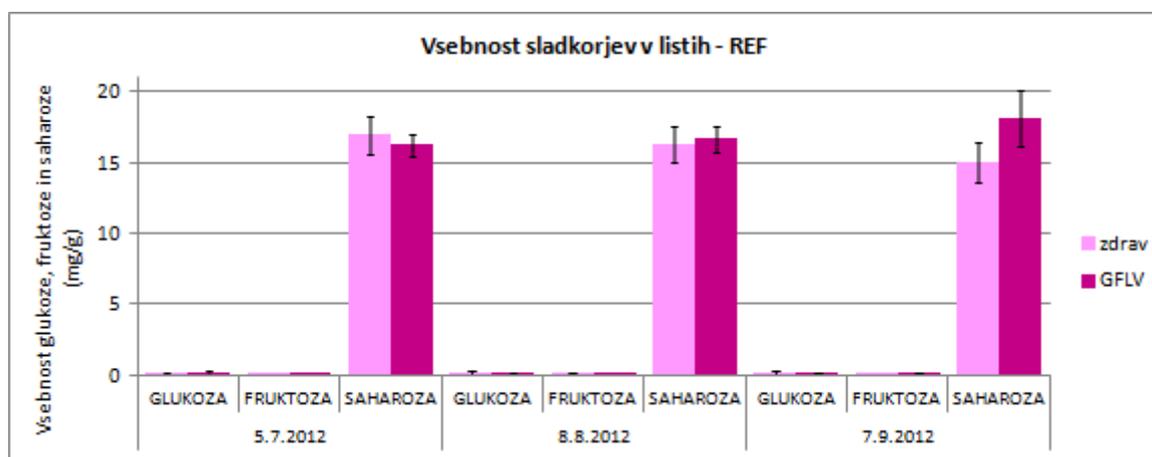
Slika 10: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih jagodah sorte Refošk v treh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.



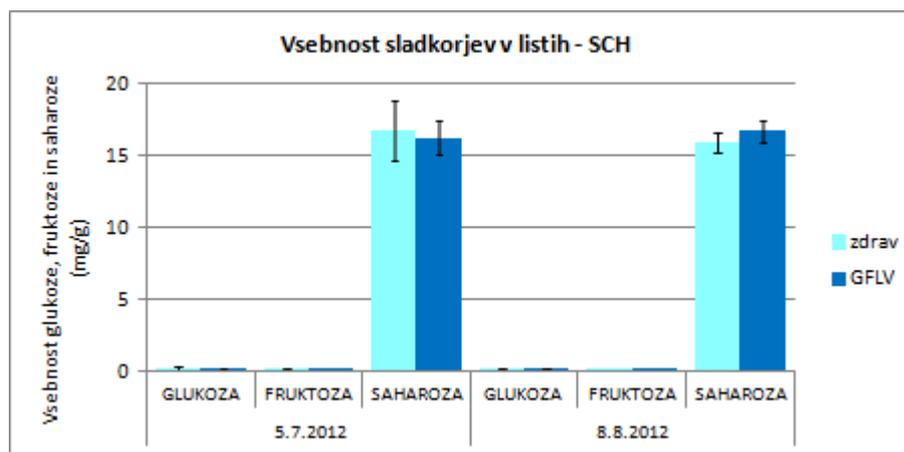
Slika 11: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih jagodah sorte Pokalca v treh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.

4.1.2. Vsebnost sladkorjev v listih

V zdravih in okuženih listih sort Refošk in Pokalca smo izmerili zelo nizke povprečne vrednosti vsebnosti glukoze in fruktoze (< od 0,23 mg/g). V okuženih listih smo pri obeh sortah v avgustu in septembru izmerili višje povprečne vrednosti vsebnosti saharoze kot v zdravih listih, vendar zaradi majhnega števila vzorcev razlike niso bile statistično značilne (Slika 12 in Slika 13).



Slika 12: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih listih sorte Refošk v treh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja.



Slika 13: Vsebnost glukoze, fruktoze in saharoze v zdravih in okuženih listih sorte Pokalca v dveh časovnih točkah (mg/g). Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja.

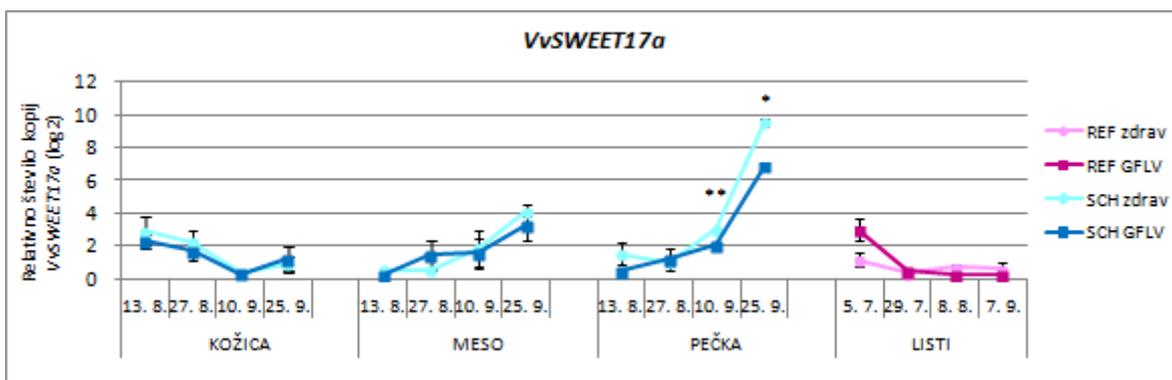
4.2. VPLIV GFLV NA IZRAŽANJE GENOV

V mesu, pečkih in kožici zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sort Pokalca in Refošk ter v listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk smo izmerili izražanje genov *VvSWEET1*, *VvSWEET10*, *VvSWEET17a* ter *VvSUSY*.

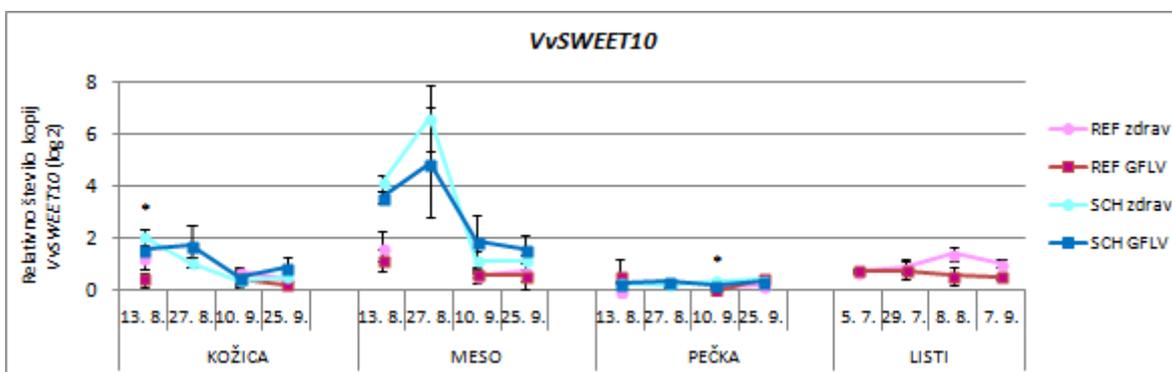
Gena *VvSWEET17a* in *VvSWEET1* sta bila pri sorti Pokalca najmočneje izražena v pečki (Slika 14 in Slika 16), gen *VvSWEET10* pa v mesu jagode (Slika 15). Izražanje gena *VvSWEET17a* se je v mesu in pečki pri sorti Pokalca skozi sezono povečevalo, v kožici pri sorti Pokalca in v listih pri sorti Refošk pa zniževalo (Slika 14). Pri sorti Pokalca se je skozi sezono zniževalo tudi izražanje gena *VvSWEET10* v kožici in mesu (Slika 15) ter izražanje gena *VvSWEET1* v pečki (Slika 16). Izražanje gena *VvSUSY* se je pri sorti Pokalca v kožici in pečki skozi sezono povečevalo, v mesu pa zniževalo (Slika 17).

Izražanje gena *VvSWEET17a* je bilo 10. 9. in 25. 9. v pečki pri sorti Pokalca statistično značilno nižje v z GFLV okuženih trsih kot v zdravih (Slika 14). Izražanje gena *VvSWEET10* je bilo 13. 8. v kožici pri sorti Pokalca in 10. 9. v pečki pri sorti Refošk statistično značilno nižje v z GFLV okuženih trsih kot v zdravih (Slika 15). Izražanje gena *VvSWEET1* je bilo 10. 9. v kožici pri sorti Refošk statistično značilno višje v z GFLV okuženih trsih kot v zdravih (Slika 16). Izražanje gena *VvSUSY* je bilo 13. 8. v kožici pri sorti Refošk statistično značilno višje v z GFLV okuženih trsih, 13. 8. v pečki pri sorti Pokalca pa statistično značilno nižje v z GFLV okuženih trsih (Slika 17).

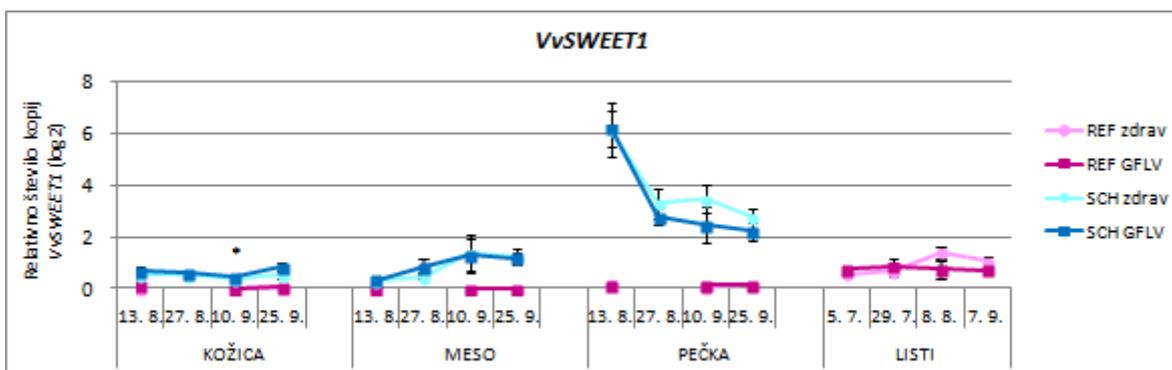
Pri sorti Pokalca je okužba z GFLV najmočneje vplivala na izražanje vseh štirih preiskovanih genov septembra v pečki. Pod vplivom okužbe z GFLV se je septembra v pečki namreč statistično značilno znižalo izražanje genov *VvSWEET17a* in *VvSWEET10* (Slika 14 in Slika 15), znižalo pa se je tudi izražanje genov *VvSWEET1* in *VvSUSY*, čeprav ne statistično značilno (Slika 16 in Slika 17).



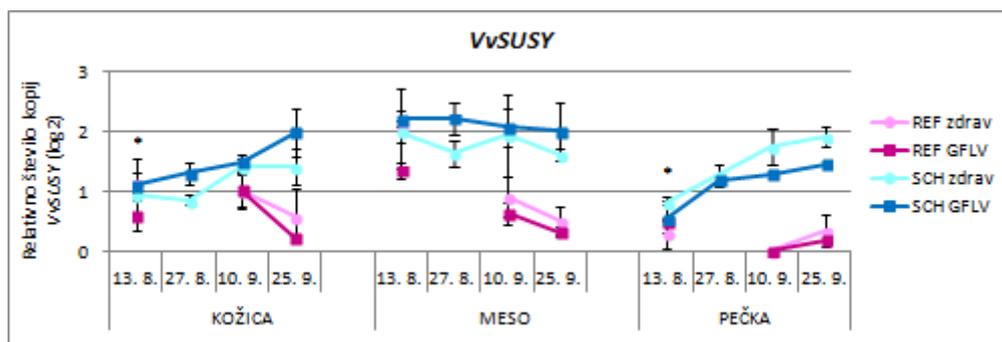
Slika 14: Izražanje gena *VvSWEET17a* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Pokalca ter v mesu, pečki in kožici zdravih in okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.



Slika 15: Izražanje gena *VvSWEET10* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk in Pokalca ter v mesu, pečki in kožici zdravih in okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.



Slika 16: Izražanje gena *VvSWEET1* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk in Pokalca v mesu, pečki in kožici zdravih in okuženih rastlin vinske trte sorte Refošk. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.



Slika 17: Izražanje gena *VvSUSY* v kožici, mesu, pečki in listih zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sorte Refoš in Pokalca. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.

4.3. VPLIV OKUŽBE Z GFLV IN VODNEGA STRESA NA MAŠENJE KSILEMSKIH ELEMENTOV

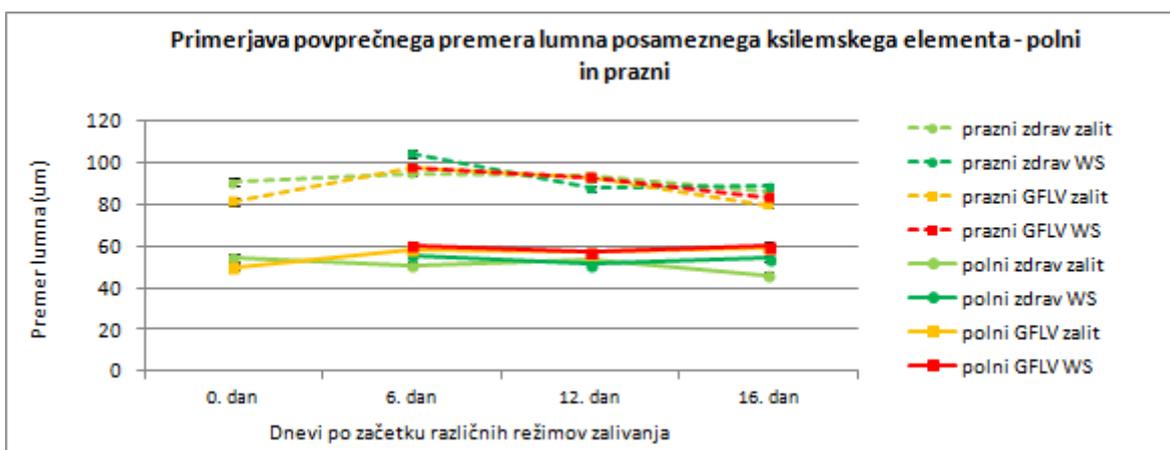
Na preparatih rezin rozg zdravih zalitih, zdravih nezalutih, z GFLV okuženih zalitih in z GFLV okuženih nezalutih rastlin sorte Pokalca (Slika 18) smo izmerili površino, premere in izračunali razmerja med zamašenimi in odprtimi ksilemskimi elementi.



Slika 18: Primeri prerezov lesa zdravih zalitih, zdravih nezalutih, z GFLV okuženih zalitih in z GFLV okuženih nezalutih rozg (Slika: Marija Stele, 2015).

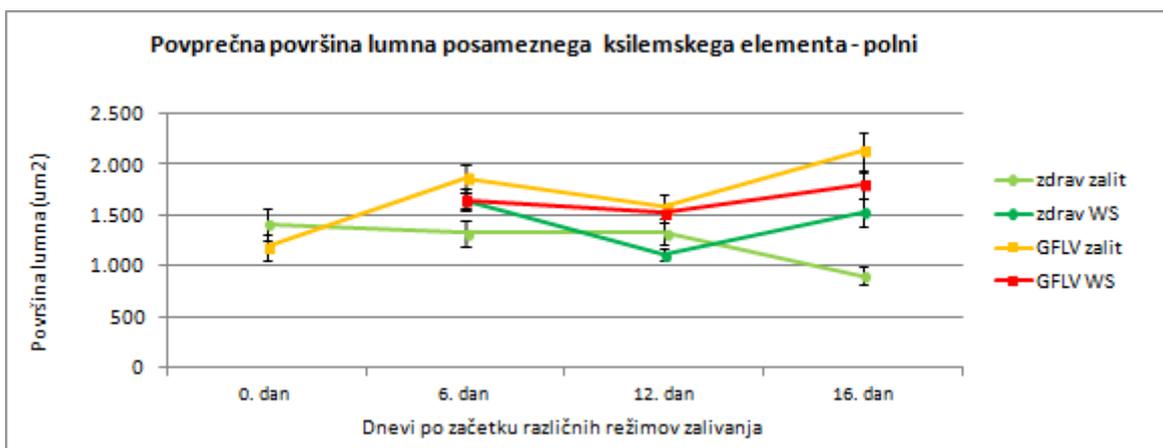
Meritve, narejene na zdravih in z GFLV okuženih rastlinah vinske trte sorte Pokalca, ki so bile podvržene različnim režimom zalivanja, so bile 0., 6., 12., in 16. dan opravljene na različnih rastlinah, saj je pri delu šlo za invazivno metodo (rezanje), zato npr. 6. in 12. dan nismo mogli uporabiti istih rastlin. Zaradi naključne izbire rastlin, majhnega števila vzorcev in biološke variabilnosti lahko npr. med 6. in 12. dnevom prihaja do razlik v zamašenosti tudi med rastlinami, ki so bile npr. v obeh primerih zalite in okužene z GFLV. Vse meritve ksilemskih elementov (Slika 19 – Slika 25) so bile za 0. dan opravljene na istih rastlinah, saj smo naredili mikroskopske preparate prerezov rozg, ki smo jih poslikali in na le-teh izvajali meritve, enako velja za 6. dan, 12. dan in 16. dan.

Povprečni premer posameznih praznih ksilemskih elementov je bil večji od povprečnega premera posameznih polnih ksilemskih elementov. Zaradi velikih razlik smo predvidevali, da se bolj mašijo manjši ksilemski elementi (Slika 19). Razlike v povprečnem premeru med praznimi in polnimi ksilemskimi elementi ne glede na okužbo in režim zalivanja so bile statistično značilne ($p < 0,001$).



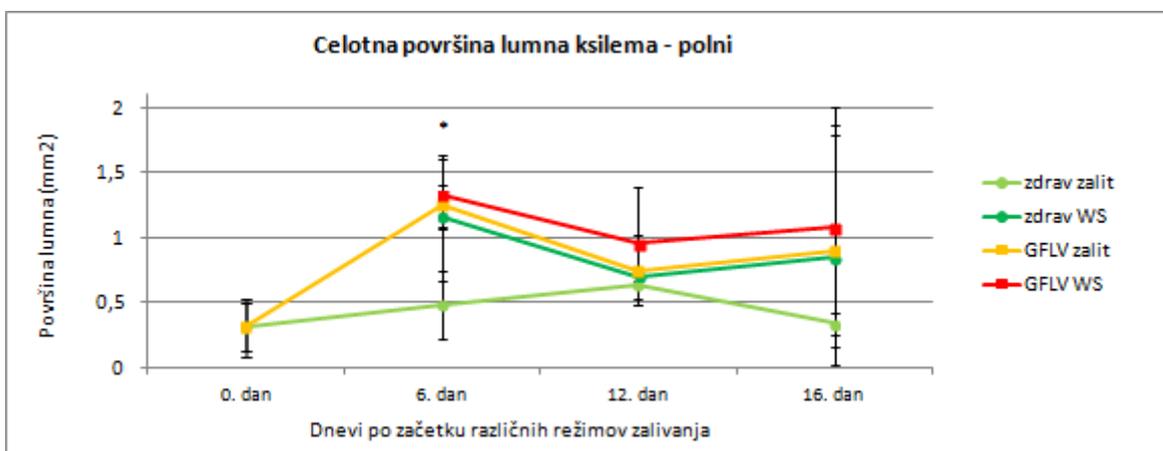
Slika 19: Primerjava povprečnega premera lumna posameznih zamašenih in praznih ksilemskih elementov med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitimi (WS) rozgami (μm) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja.

Največjo povprečno površino posameznih polnih ksilemskih elementov smo izmerili v okuženih zalitih rozgah, nekoliko manjšo povprečno površino posameznih ksilemskih elementov smo izmerili v okuženih nezalilih rozgah, sledi ji površina posameznih ksilemskih elementov zdravih nezalilih rozg. Najmanjšo povprečno površino lumna posameznega zamašenega ksilemskega elementa smo izmerili v zdravih zalitih rozgah. Sklepamo, da okužba in vodni stres povzročita, da se začnejo mašiti tudi večji ksilemski elementi (Slika 20). Vendar pa kljub opaznemu trendu zaradi majhnega števila trsov in velike variabilnosti razlike med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitimi, z GFLV okuženimi zalitimi in z GFLV okuženimi nezalitimi trsi niso bile statistično značilne.



Slika 20: Primerjava povprečne površine lumna posameznega ksilemskega elementa med zdravimi zalitimi, zdravimi nezaliti (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezaliti (WS) rozgami (μm^2) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja.

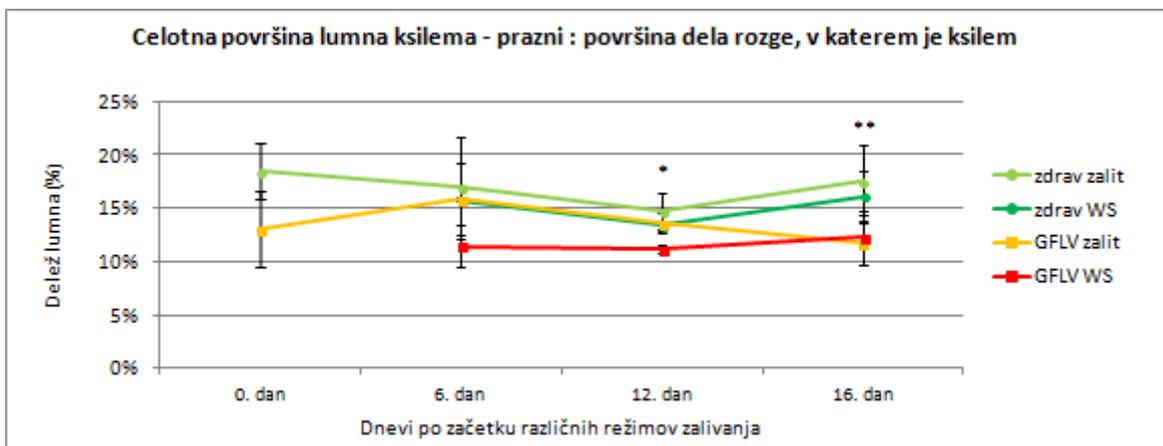
Pri meritvah celokupne površine zamašenega lumna ksilema smo opazili, da je bilo pri zdravih rastlinah zamašenega manj ksilema kot pri okuženih rastlinah. Pri zdravih nezalilih in okuženih zalitih rozgah smo izmerili podobni celokupni površini zamašenih elementov. V primeru okužbe in vodnega stresa pa je prišlo do skupnega učinka obeh dejavnikov in s tem do največ zamašitev (Slika 21). 6. dan so bile razlike med zdravimi in z GFLV okuženimi rastlinami statistično značilne ($p < 0,05$).



Slika 21: Primerjava celokupne površine zamašenega lumna ksilema med zdravimi zalitimi, zdravimi nezaliti (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezaliti (WS) rozgami (mm^2) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.

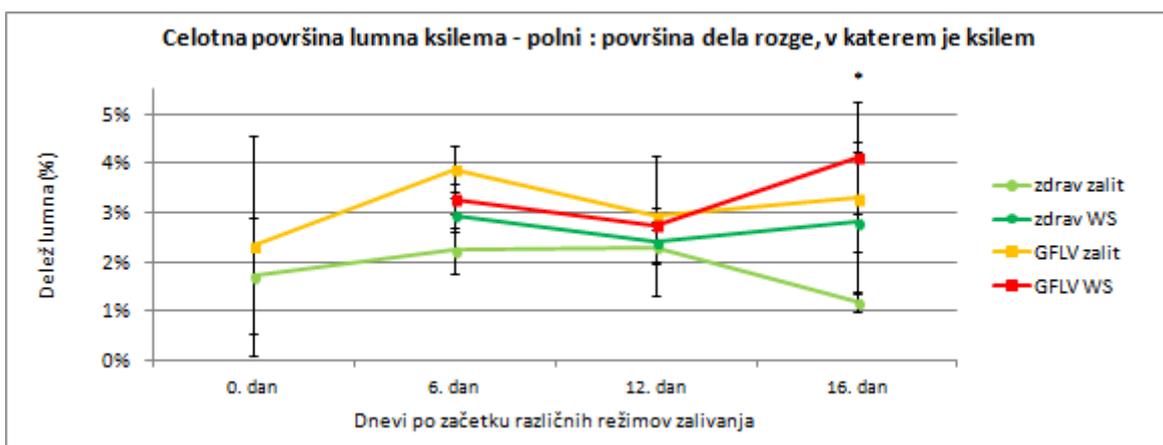
Delež celokupne površine praznega lumna ksilema od celotne površine dela rozge, v katerem je ksilem, je bil največji pri zdravih zalitih trsah, kar pomeni, da so se najmanj mašili ksilemski elementi zdravih zalitih rozg. Pri zdravih nezalilih in okuženih zalitih rozgah smo izmerili zelo podoben delež praznega lumna ksilema. V okuženih nezalilih rozgah pa je bil delež površine praznega lumna ksilema najmanjši in to kar za približno

tretjino manjši kot pri zdravih zalitih trsih (Slika 22). 12. dan so bile razlike statistično značilne tako med zdravimi in z GFLV okuženimi rastlinami ($p < 0,05$), kot tudi med zalitimi in nezalitim rastlinami ($p < 0,01$). 16. dan so bile razlike med zdravimi in z GFLV okuženimi rastlinami statistično značilne ($p < 0,01$).



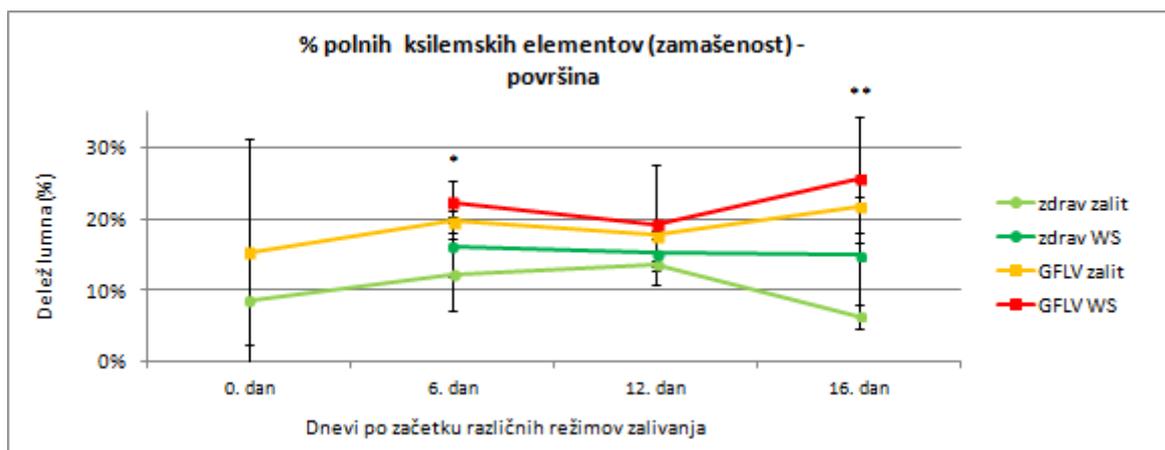
Slika 22: Primerjava deleža celokupne površine praznih ksilemskih elementov od celotne površine dela rozge v katerem je ksilem med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitim (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitim (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Delež celokupne površine zamašenega lumna ksilema glede na celotno površino dela rozge, v katerem je ksilem, je bil večji pri okuženih kot pri zdravih rozgah. Pri zdravih zalitih rozgah je bil delež zamašenega lumna ksilema najmanjši (Slika 23). 16. dan so bile razlike med zdravimi in z GFLV okuženimi rastlinami statistično značilne ($p < 0,05$).



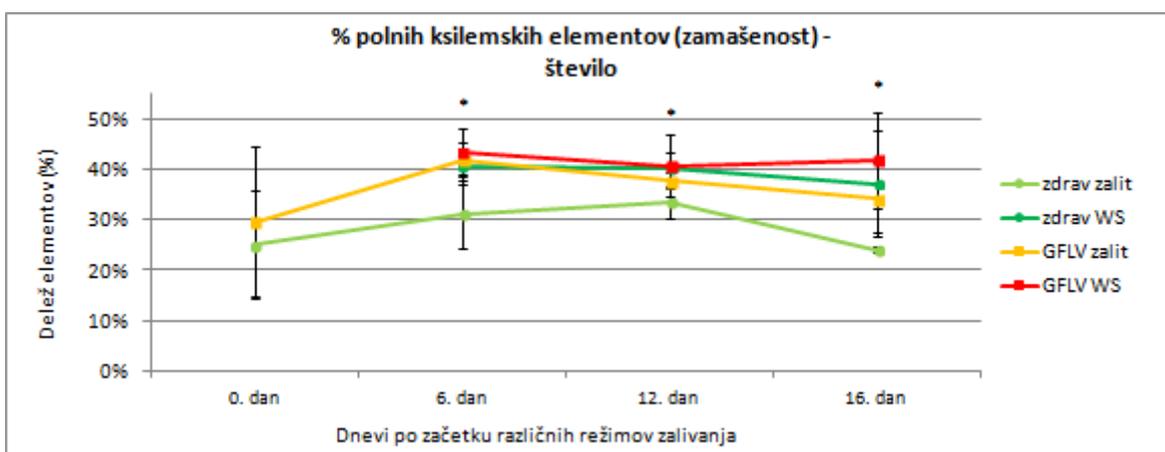
Slika 23: Primerjava deleža celokupne površine zamašenih ksilemskih elementov glede na celotno površino dela rozge v katerem je ksilem med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitim (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitim (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.

Delež površine zamašenih ksilemskih elementov od površine vseh ksilemskih elementov je bil večji v okuženih kot v zdravih rozgah. Največji delež površine zamašenih ksilemskih elementov smo izmerili pri okuženih nezalatih rastlinah, sledile so okužene zalite rastline, nato zdrave nezalite rastline, najmanjši delež pa je bil pri zdravih zalitih rastlinah (Slika 24). Razlike med zdravimi in z GFLV okuženimi rastlinami so bile statistično značilne 6. dan ($p < 0,05$) in 16. dan ($p < 0,001$).



Slika 24: Primerjava deleža površine zamašenih ksilemskih elementov glede na površino vseh ksilemskih elementov med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitim (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitim (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Tudi delež števila polnih ksilemskih elementov od števila vseh ksilemskih elementov je bil najnižji pri zdravih zalitih rozgah (Slika 25). 6. dan so bile razlike statistično značilne med zdravimi in z GFLV okuženimi rastlinami ($p < 0,05$), 12. in 16. dan pa so bile razlike statistično značilne med zalitimi in nezalitim rastlinami ($p < 0,05$).



Slika 25: Primerjava deleža števila zamašenih ksilemskih elementov glede na število vseh ksilemskih elementov med zdravimi zalitimi, zdravimi nezalitim (WS), okuženimi zalitimi in okuženimi nezalitim (WS) rozgami (%) 0., 6., 12. in 16. dan po začetku različnih režimov zalivanja. Prikazane so povprečne vrednosti in interval zaupanja; *, $p < 0,05$.

5. RAZPRAVA

5.1. VPLIV OKUŽBE NA VSEBNOSTI SLADKORJEV V JAGODAH IN LISTIH

Sladkorji, kot so glukoza, fruktoza in saharoza, so vir energije in ogljika (Koch, 2004) ter imajo pomembno vlogo kot signalne molekule v rastlinah (Rolland in sod., 2006). Signaliziranje s sladkorji ima pomembno vlogo pri obrambnem odgovoru rastline na biotski in abiotski stres (Bolouri Moghaddam in Van der Ende, 2012). Sladkorji mikrobnega (Moxon in Kroll, 1990) ali rastlinskega (Herbers in sod., 1996a) izvora lahko igrajo kritično vlogo pri interakcijah med gostiteljem in povzročiteljem bolezni (Morkunas in sod., 2005).

Okužbe z glivami vplivajo na povečanje izražanja genov za transport sladkorjev v listih navadnega repnjakovca, paradižnika in vinske trte in s tem spremenjene vsebnosti sladkorjev v listih (Fotopulos in sod., 2003, Garcia-Rodriguez in Azcon-Aguilar, 2005; Hayes in sod., 2010). Tudi v listih madagaskarskega zimzelena (*Catharanthus roseus*) in tobaka (*Nicotiana tabacum*) je okužba s fitoplazmami povzročila dvig ravni sladkorjev in škroba (Lepka in sod., 1999). Virusne okužbe vplivajo na metabolizem ogljikovih hidratov v listih (Tesci e tal., 1994a,b, 1996) in transport sladkorjev v gostiteljski rastlini. V okuženih listih pride do znižanja ravni fotosinteze, koncentracije topnih sladkorjev in akumulacije škroba (Goodman e tal., 1986). V listih melone (*Cucumis melo L.*), okuženih z virusom mozaika kumare (Cucumber mosaic virus, CMV), so zaznali zvišane ravni sladkorjev, povečanje respiracije, znižanje ravni škroba in znižanja fotosintezne aktivnosti (Shalitin in Wolf, 2000). GLRaV-3 povzroča povečano izražanje genov za transport sladkorjev v listih vinske trte in znižanje vsebnosti sladkorjev v jagodah (Espinoza in sod., 2007a, Vega in sod., 2011).

Okužbe vinske trte z GFLV vplivajo na kvaliteto grozdja (Hewitt in sod., 1958). V jagodah vinske trte sorte Refošk okuženih z GFLV so v treh zaporednih letih izmerili za 10% (oz. za več kot 1 °Brix) višje povprečne vsebnosti sladkorjev kot v zdravih jagodah (pri čemer pa razlike niso bile statistično značilno različne), pri sorti Pokalca pa niso zaznali bistvenih razlik v vsebnosti sladkorjev med okuženimi in zdravimi jagodami, ali pa so bile vsebnosti sladkorjev v okuženih jagodah celo rahlo nižje kot v zdravih (Ščurek, 2014, Cigoj, 2015). Tudi v okviru magistrske naloge smo pri merjenju vsebnosti sladkorjev v jagodah zaznali trend, da so bile izmerjene koncentracije sladkorjev v okuženih jagodah večinoma višje kot v zdravih, čeprav večinoma razlike niso bile statistično značilne. Statistično značilno višja je bila vsebnost fruktoze pri sorti Refošk 25. 9. v z GFLV okuženih jagodah kot v zdravih jagodah, vsebnosti glukoze pri sorti Pokalca pa je bila 13. 8. v z GFLV okuženih jagodah statistično značilno nižje kot v zdravih. Povprečne vrednosti vsebnosti saharoze so bile v z GFLV okuženih jagodah sort Refošk in Pokalca večinoma višje kot v zdravih, vendar razlike niso bile statistično značilne. Predvidevamo, da razlike niso bile statistično

značilne, ker smo izvajali meritve na 3 do 5 trsih posamezne skupine, kar je z vidika statistične obdelave malo. Poleg tega smo meritve izvajali na trsih, ki so rastle v vinogradu, to pomeni v nekontroliranih in zato do neke mere različnih pogojih, na primer različne lege v vinogradu, nekoliko različen nagib tal in posledično različne količine razpoložljive vode, osončenost ... Zato je variabilnost med trsi v vinogradih večja kot variabilnost v kontroliranih pogojih, na primer v rastlinjaku.

V zdravih in z GFLV okuženih listih vinske trte smo izmerili zelo nizke ravni glukoze in fruktoze (< od 0,23 mg/g). V z GFLV okuženih listih smo, predvsem proti koncu sezone (avgust, september), izmerili višje povprečne vrednosti vsebnosti saharoze kot v zdravih listih, vendar razlike zaradi majhnega števila vzorcev in biološke variabilnosti niso bile statistično značilne. Tudi Shalitin in Wolf (2000) sta izmerila višje povprečne vrednosti vsebnosti sladkorjev v z virusom CMV okuženih listih melone kot v zdravih listih. V procesu fotosinteze v kloroplastih nastajajo sladkorji, ki se v obliki saharoze po floemu transportirajo v ostala tkiva (Braun in sod., 2014). Sprememba koncentracije saharoze v okuženih listih bi lahko bila povezana s spremembami v celični kontroli, ki uravnava simplastno in apoplastno transportno pot sladkorjev (Van Bel, 1993). Sprememba koncentracij fruktoze in glukoze v okuženih listih je povezana s spremembo ravni škroba v listih. Zaradi povečane potrebe po topnih sladkorjih (predvsem glukozi), ki so potrebni za vzdrževanje visoke ravni respiracije, pride do razgradnje škroba (Shalitin in Wolf, 2000).

5.2. IZRAŽANJE GENOV SWEET IN SUSY

Okužba z GFLV je vplivala na proces razvoja in zorenja jagod (Cigoj, 2014, Jež Krebelj, 2015). Pri tem je prišlo tudi do sprememb izražanja genov, ki so vključeni v transport in metabolizem sladkorjev, biosintezo antocianinov in hormonski odgovor (Cigoj, 2014, Jež Krebelj, 2015). Okužbe z različnimi virusi pa različno vplivajo na metabolizem vinske trte. Tako je okužba z GLRaV-3 povzročila zmanjšanje izražanja genov za transport sladkorjev v jagodah, kar je vplivalo na transport in metabolizem sladkorjev ter vodilo do znižanja koncentracij sladkorjev v jagodah (Vega in sod., 2011).

Pri vrstah z apoplastno floemsko potjo mora saharoza prečkati plazemsko membrano dveh različnih tipov celic za vstop v simplast sitastih cevi. SWEET so razred transportnih proteinov, nekateri od njih sodelujejo pri transportu sladkorjev, olajšajo difuzijo in omogočajo prehajanje sladkorjev skozi membrane. V genomu vinske trte so do zdaj identificirali 16 genov *SWEET* (Lecourieux in sod., 2013). Od teh smo v magistrski nalogi izbrali tri gene: *VvSWEET1*, ki je podoben *AtSWEET1*, ki kodira transporter za prehajanje glukoze skozi plazemsko membrano in privzem glukoze v endoplazemski retikel (Lecourieux in sod., 2013); *VvSWEET10*, ki je podoben *AtSWEET10-15*, ki kodirajo transporterje saharoze (Chen in sod., 2012) ter *VvSWEET17a*, ki je podoben *AtSWEET16* in *17*, ki kodirata transporterja fruktoze na tonoplastu (Guo in sod., 2014).

Za gene *SWEET* iz klada III, ki so vključeni v izhajanje saharoze in so odgovorni za prvi korak privzema v floem, so ugotovili, da na njihovo izražanje lahko vplivajo povzročitelji bolezni. Povzročitelji bolezni povzročajo spremembe kritičnih fizioloških funkcij, kar jim omogoča dostop do zaloga energije in ogljika gostitelja na mestu okužbe (Chen in sod., 2012). Nekateri bakterije in glive lahko inducirajo izražanje različnih genov *AtSWEET*, kar kaže na to, da so nekateri povzročitelji bolezni do določene mere odvisni od aktivnosti proteinov *SWEET* (Chen in sod., 2010). Okužba navadnega repnjakovca z glivo *Golovinomyces cichoracearum* in okužba navadnega repnjakovca z bakterijo *Pseudomonas syringae* sta povzročili povečano izražanje gena *AtSWEET11* (Chen in sod., 2012). Bakterija *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* je vplivala na povečano izražanje *OsSWEET11* v rižu (Chu in sod., 2006a); izražanje gena *OsSWEET11* je bilo potrebno za rast bakterije (Yuan in sod., 2009), mutacija tega gena pa je preprečila pojav bolezni (Chu in sod., 2006).

Za razliko od prej omenjenih povzročiteljev bolezni, ki povzročajo povečano izražanje genov *SWEET*, pa smo v vinski trti sorte Pokalca okuženi z GFLV zaznali, da se je izražanje izbranih genov *SWEET* v primerjavi z zdravimi trsi v pečki večinoma zmanjšalo. Izražanje genov *VvSWEET17a* in *VvSWEET10* se je v pečki z GFLV okuženih jagod sorte Pokalca zmanjšalo statistično značilno. V istem obdobju se je zmanjšalo tudi izražanje gena *VvSWEET1* v pečki okuženih jagod sorte Pokalca, čeprav ne statistično značilno. V listih vinske trte sorte Refoš, okuženih z GFLV, je avgusta in septembra prišlo do znižanja izražanja genov *VvSWEET17a*, *VvSWEET10* in *VvSWEET1*, vendar pa razlike zaradi majhnega števila vzorcev in velike variabilnosti niso bile statistično značilne. V začetku avgusta se je pri sorti Refoš statistično značilno tudi znižalo izražanje gena *VvSWEET10* v kožici z GFLV okuženih jagod, medtem ko se je izražanje gena *VvSWEET1* pri sorti Pokalca v začetku septembra v kožici z GFLV okuženih jagod statistično značilno povečalo.

Saharoza sintaza (*SUSY*) je encim, ki ima pomembno vlogo pri razgradnji saharoze in jo pri višjih rastlinah najdemo v topni in membransko vezani obliki (Winter in sod., 1997). *SUSY* je v floemu prisotna v celicah spremljevalkah in celicah sitastih cevi (Koch, 2004). Kontrolira vnos saharoze v plod (N'tchobo in od., 1999) in raven sinteze škroba (Wang in sod., 1993). Povzročitelji bolezni, kot na primer fitoplazme, lahko povzročajo motnje porazdelitve sladkorjev s kopičenjem topnih sladkorjev, predvsem glukoze v izvorih, kar kaže na to, da povzročitelji bolezni lahko vplivajo na ključne encime metabolizma sladkorjev, kot so *SUSY* ter *CWIN*, *VIN* in *CIN*. V odgovor na biotski ali abiotski stres lahko pride do motnje regulacije genov, ki kontrolirajo delovanje teh encimov (Biemelt in Sonnewald, 2005). Pri okužbi paradižnika in madagaskarskega zimzelena s fitoplazmami *Stolbur* in pri okužbi paradižnika s spiroplazmo *Spiroplasma citri* niso zaznali sprememb izražanja gena *SUSY* v listih med zdravimi in okuženimi rastlinami (Machenaud in sod., 2007). Pri vinski trti, okuženi s fitoplazmami, je prišlo do povečanega izražanja gena *SUSY* v času pojava bolezenskih znamenj (Hren in sod., 2009). V kožici in mesu z GFLV okuženih jagod sorte Refoš je prišlo do povečanega izražanja gena *VvSUSY*, vendar

razlike zaradi biološke variabilnosti in majhnega števila vzorcev niso bile statistično značilne. V pečki z GFLV okuženih jagod sorte Refošk je prišlo do zmanjšane izražanja gena *VvSUSY*, ki je bilo v začetku avgusta statistično značilno. V kožici, mesu in pečki z GFLV okuženih jagod sorte Pokalca je prišlo do zmanjšanja izražanja gena *VvSUSY*, znižanje izražanja gena *VvSUSY* je bilo v kožici v začetku avgusta statistično značilno.

Okužba z GFLV je najizraziteje vplivala na izražanje vseh 4 izbranih genov *VvSWEET17a*, *VvSWEET10*, *VvSWEET1* in *VvSUSY* septembra v pečki, ko smo zaznali trend zmanjšanja izražanja; hkrati smo septembra (v času trgatve) zaznali tudi trend zvišanja koncentracij sladkorjev v jagodah z GFLV okuženih trsov. Iz tega bi lahko sklepali, da je koncentracija sladkorjev v jagodi povezana z izražanjem izbranih genov.

5.3. VPLIV OKUŽBE IN VODNEGA STRESA NA MAŠENJE KSILEMSKIH ELEMENTOV

Z meritvami vpliva okužbe z GFLV in suše na vodni potencial stebela vinske trte sorte Pokalca so ugotovili, da okužba z GFLV do določene ravni pomanjkanja vode povzroča zmanjšanje vodnega potenciala. Vodni potencial stebela je bil pri določeni ravni pomanjkanja vode manjši pri nezalatih rastlinah kot pri zalitih rastlinah (Jež Krebelj, 2015). Z meritvami vpliva okužbe z GFLV in suše na hidravlično prevodnost korenin so ugotovili, da je bila hidravlična prevodnost korenin pri rastlinah izpostavljenih sušnemu stresu manjša, kot pri kontrolnih rastlinah. Tudi hidravlična prevodnost z GFLV okuženih rastlinah je bila manjša kot pri zdravih rastlinah. Opazili so tudi interakcije med obema dejavnikoma, okužba z GFLV pa je imela večji vpliv na meritve kot suša (Jež Krebelj, 2015). V skladu s temi ugotovitvami smo pri meritvah površine in deleža zamašenih ksilemskih elementov v rezinah rozg zdravih zalitih, zdravih nezalatih, z GFLV okuženih zalitih in z GFLV okuženih nezalatih trsih vinske trte sorte Pokalca opazili, da je v z GFLV okuženih nezalatih trsih prišlo do največ zamašitev. Nekoliko manj zamašitev smo izmerili v z GFLV okuženih zalitih trsih, sledili so zdravi nezaliti trsi, do najmanj zamašitev pa je prišlo pri zdravih zalitih trsih. Opazili smo tudi trend, da so bili zamašeni ksilemski elementi v povprečju najmanjši pri zdravih zalitih rastlinah, sledile so zdrave zalite ter okužene nezalite rastline. Pri okuženih nezalatih rastlinah vinske trte so bili zamašeni ksilemski elementi v povprečju največji, vendar pa razlike zaradi majhnega števila vzorcev in velikih variabilnosti niso bile statistično značilne. Sklepamo lahko, da tako okužba z GFLV kot vodni stres (suša) vplivata na pojav zamašitev ksilemskih elementov v lesu vinske trte, v primeru ko je rastlina poleg okužbe podvržena še vodnemu stresu pa pride do sinergističnega učinka, pojava bolezní v še hujši obliki in s tem še več zamašitev. Zamašitve tvorijo tile in geli, ki izvirajo iz celic, povezanih z žilami (Sun in sod., 2008). Tudi okužba z bakterijo *Xylella fastidiosa*, ki povzroča Piercovo bolezen, vpliva na povečan pojav zamašitev žil s tilami in geli (Sun in sod., 2008). Prav tako okužba z glivo *Phaeomoniella chlamydospora* povzroči povečano izločanje til in gelov v ksilemu (Del

Rio in sod., 2001). Nekatere glive pa povzročajo pojav bolezni v primeru, ko je gostitelj poleg okužbe podvržen še abiotskemu stresu, kot je suša (Pearce, 1996).

6. SKLEPI

Okužba z GFLV je najmočneje vplivala na izražanje genov *VvSWEET17a*, *VvSWEET10*, *VvSWEET1* in *VvSUSY* septembra v pečki. Pod vplivom okužbe z GFLV se je septembra v pečki statistično značilno znižalo izražanje genov *VvSWEET17a* in *VvSWEET10*. Znižalo se je tudi izražanje genov *VvSWEET1* in *VvSUSY*, čeprav razlike niso bile statistično značilne.

Opazili smo trend povečanja koncentracije celokupnih sladkorjev v jagodah pod vplivom okužbe z GFLV. V okuženih jagodah so bile povprečne vrednosti vsebnosti sladkorjev večinoma višje od povprečnih vrednosti vsebnosti sladkorjev v zdravih jagodah, vendar zaradi majhnega števila vzorcev in biološke variabilnosti razlike niso bile statistično značilne.

V okuženih listih smo izmerili višje koncentracije saharoze kot v zdravih listih, razlike pa zaradi majhnega števila vzorcev niso bile statistično značilne. Koncentracije glukoze in fruktoze v okuženih in zdravih listih so bile zelo nizke, kar lahko razložimo s tem, da je saharoza glavna transportna oblika sladkorjev, ki se transportira tudi v ostala tkiva.

Vodni stres in okužba z GFLV vplivata na pojav zamašitev žilnega sistema v lesu vinske trte. Povprečni premer posameznega praznega ksilemskega elementa je bil večji od povprečnega premera posameznega zamašenega ksilemskega elementa.

Opazili smo trend, da so se pri z GFLV okuženih nezalatih rozgah mašili v povprečju največji ksilemski elementi, sledile so z GFLV okužene zalite ter zdrave nezalite rozge, pri zdravih zalitih rozgah pa so se v povprečju mašili najmanjši ksilemski elementi. Vendar pa zaradi majhnega števila vzorcev in velikih variabilnosti razlike niso bile statistično značilne.

Pri zdravih zalitih rozgah je prišlo do najmanj zamašitev, sledile so zdrave nezalite rozge in z GFLV okužene zalite rozge, ob prisotnosti okužbe z GFLV in vodnega stresa pa je prišlo do največ zamašitev.

7. POVZETEK

Virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) povzroča kužno izrojenost vinske trte (Grapevine degradation disease), ki skrajša življenjsko dobo trsov, zmanjša količino pridelka in vpliva na kvaliteto pridelka. Bolezenska znamenja so vidna na listih, rozgah in grozdih. Značilni notranji znaki okužbe z GFLV v olesenelih poganjkih in bazalnih medčlenkih so znotrajcelične cevaste strukture, ki prečkajo lumen žilnih elementov. GFLV vpliva na izražanje mnogih genov, med njimi tudi tistih, povezanih z metabolizmom antocianov in z odgovorom na vodni stres.

Sladkorji nastajajo v kloroplastih mezofilnih celic v procesu fotosinteze. Saharoza se iz fotosintetskih tkiv prek floema prenese v meristeme, cvetove, plodove, liste, poganjke in korenine, kjer razpade na glukozo in fruktozo.

Sladkorji so pomemben dejavnik za določanje kakovosti pridelka, vpliv GFLV na metabolizem sladkorjev pa še ni popolnoma jasen, zato smo raziskali njegov vpliv na izražanje genov povezanih s transportom in metabolizmom sladkorjev in nalaganje sladkorjev (saharoze, glukoze in fruktoze). Raziskali smo tudi vpliv okužbe z GFLV in vodnega stresa na pojav zamašitev žilnega sistema v lesu vinske trte.

Pri vinski trti pred zorenjem pride do spremembe transportne poti sladkorjev v jagode, ki se spremeni iz simplastne v apoplastno pot. Medtem ko simplastna pot poteka vzdolž koncentracijskega gradienta, transport po apoplastni poti poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta. Pri apoplastni poti so za prehajanje saharoze prek plazemske membrane in vstop v floem potrebni transporterji, ki jih kodirajo mnogi geni. Transporterji SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) so proteini, ki sodelujejo pri transportu sladkorjev prek plazemske membrane ali njihovem izhajanju iz vakuol. Saharoza sintaza (SUSY) je encim, ki katalizira sintezo in razcep saharoze.

V listih in jagodah istih rastlin smo s kompletom K-SURFG in spektrofotometrom izmerili vsebnosti sladkorjev v listih in jagodah zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sort Refošk in Pokalca iz dveh različnih vinogradov. Opazili smo trend povečanja koncentracije sladkorjev v listih in jagodah z GFLV okuženih trsov, vendar zaradi majhnega števila vzorcev in biološke variabilnosti razlike niso bile statistično značilne.

Z metodo qPCR smo v 4 časovnih točkah spremljali izražanje genov *VvSWEET17a*, *VvSWEET10*, *VvSWEET1* in *VvSuSy* v listih in jagodah zdravih in z GFLV okuženih rastlin vinske trte sort Refošk in Pokalca iz dveh različnih vinogradov. Okužba z GFLV je najmočnejše vplivala na izražanje 4 preiskovanih genov septembra v pečki. V pečki z GFLV okuženih jagod je septembra prišlo do statistično značilnega znižanja izražanja genov *VvSWEET17a* in *VvSWEET10*, znižalo se je tudi izražanje genov *VvSWEET1* in *VvSUSY*, čeprav ne statistično značilno.

Z mikrotomom smo narezali rezine rozg zdravih zalitih, zdravih nezalatih, okuženih zalitih in okuženih nezalatih rastlin vinske trte sorte Pokalca, pripravili preparate, jih slikali pod mikroskopom in s programom Fiji izmerili zamašenost ksilemskih elementov. Ugotovili smo, da je pri zdravih zalitih rastlinah prišlo do najmanj zamašitev, sledile so zdrave nezalite in z GFLV okužene zalite rozge, v primeru okužbe z GFLV in vodnega stresa pa je prišlo do največ zamašitev.

8. VIRI

- Afoufa-Bastien D., Medici A., Jeuffre J., Coutos-Thévenot P., Lemoine R., Atanassova R., Laloi M. 2010. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biology*, 10: 245
- Agasse A., Vignault C., Kappel C., Conde C., Gerós H., Delrot S. 2009. Sugar transport and sugar sensing in grape. V: *Grapevine molecular physiology and biotechnology*. Roubelakis-Angelakis K. A., (ed.). 2nd ed. Berlin, Springer: 105-140
- Ageorges A., Issaly N., Picaud S., Delrot S. 2000. Characterization of an active sucrose transporter gene expressed during the ripening of grape berry (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 177-185
- Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 3: 184-195
- Andret-Link P., Schmitt-Keichinger C., Demangeat G., Komar V., Fuchs M., 2004b. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320, 1: 12-22
- Aoki N., Hirose T., Scofield G. N., Whitfeld P. R., Furbank R. T. 2003. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology*, 44, 3: 223-232
- Biemelt S., Sonnewald U. 2005. Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 163, 3: 307-318
- BIOS 100 Lecture Material Online: AM Lecture, Fall 2004. Exam 3 Material. Lecture 19: Transport in plants: The Translocation of Phloem.
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect19.htm> (10. jun. 2015)
- Bolouri Moghaddam M. R., Van der Ende W. 2012. Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, 63, 11: 3989-3998
- Borgo M., Angelini E. 2002. Influence of grapevine leaf roll (GLRaV3) on Merlot cv. grape production. *Bulletin OIV*, 75, 859: 611-622
- Bovey R., Gärtel W., Hewitt W. B., Martelli G. P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like diseases of grapevines. Colour atlas of symptoms. Lausanne, Editions Payot: 183 str.
- 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

- Braun D. M., Slewinski T. L. 2009. Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology*, 149, 1: 71-81
- 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
- Bush D. R. 1990. Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant Physiology*, 93, 4: 1590-1596
- Carpaneto A., Geiger D., Bamberg E., Sauer N., Fromm J., Hedrich R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 21437-21443
- Castellarin, S. D., Matthews, M. A., Di Gaspero, G., Gambetta, G. A. 2007. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227, 1: 101-112
- Chardon F., Bedu M., Calenge F., Klemens P. A., Spinner L., Clement G., Chietera G., Lérans S., Ferrand M., Lacombe B., Loudet O., Dinant S., Bellini C., Neuhaus H. E., Daniel-Vedele F., Krapp A. 2013. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 23, 8: 697-702
- Chen L. Q. 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist*, 201, 4: 1150-1155
- 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
- Chourey P. S., Taliencio E. W., Carlson S. J., Ruan Y. L. 1998. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Molecular and General Genetics*, 259, 1: 88-96
- Chu Z., Fu B., Yang H., Xu C., Li Z., Sanchez A., Park Y. J., Bennetzen J. L., Zhang Q., Wang S. 2006a. Targeting *xa13*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 3: 455-461

- Chu Z., Yuan M., Yao J., Ge X., Yuan B., Xu C., Li X., Fu B., Li Z., Bennetzen J. L., Zhang Q., Wang S. 2006b. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes and Development* 20, 10: 1250-1255
- Cigoj M. 2015. The impact of grapevine fanleaf virus (GFLV) on quantity and quality parameters of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Dissertation. Nova Gorica, University of Nova Gorica, Graduate school: 126 str.
- Cramer G. R., Ergul A., Grimplet J., Tillett R. L., Tattersall E. A. R., Bohlman M. C., Vincent D., Sonderegger J., Evans J., Osborne C., Quilici D., Schlauch K. A., Schooley D. A., Cushman J. C. 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional and Integrative Genomics*, 7, 2: 111-134
- Colnarič J., Vrabl S. 1975. Vinogradništvo: Moj vrt, moje veselje. Zgradba in življenje vinske trte.
http://www.savel-hobi.net/leksikon/htm/trta/vinska_trta.htm (1. jun. 2015)
- Combes D., Monsan P. 1983. Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. *ScienceDirect*, 117: 215-228
- Conde C., Agasse A., Glissant D., Tavares R., Gerós H., Delrot S. 2006. Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiology*, 141, 4: 1563-1577
- Coombe B. G. 1987. Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 2: 120-127
- Coombe B. G. 1989. The grape berry as a sink. V: *Acta Horticulturae* 239. Luckwill L. C., Powell L. E. (eds.). Penticton, ISHS: 149-158
- Cooper R. A., Greenshields R. N. 1964. The partial purification and some properties of two sucrases of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemistry Journal*, 92, 2: 357-364
- Davies C., Robinson S. P. 1996. Sugar Accumulation in Grape Berries. Cloning of Two Putative Vacuolar Invertase cDNAs and Their Expression in Grapevine Tissues. *Plant Physiology*, 111: 275-283
- Davis S. D., Ewers F. W., Wood J., Reeves J. J., Kolb K. J. 1999. Differential susceptibility to xylem cavitation among three pairs of *Ceanothus* species in the Transverse Mountain Ranges of southern California. *Écoscience*, 6, 2: 180-186

- Del Rio J. A., Gonzalez A., Fuster M. D., Botia J. M., Gomez P., Frias V., Ortuno M. 2001. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 394-399
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 237 str.
- Dey P. M., Harborne J. B. 1997. *Plant Biochemistry*. San Diego. Academic Press: 529 str.
- Dimond A. E. 1970. Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 8: 301-322
- Echeverria E., Valich J. 1988. Carbohydrate and enzyme distribution in protoplasts from valencia orange juice sacs. *Phytochemistry*, 27, 1: 73-76
- Endler A., Meyer S., Schelbert S., Schneider T., Weschke W., Peters S.W., Keller F., Baginsky S., Martinoia E., Schmidt U.G. 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology*, 14, 1: 196-207
- Engel M. L., Holmes-Davis R., McCormick S. 2005. Green sperm. Identification of male gamete promoters in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138, 4: 2124-2133
- Eom J. S., Choi S. B., Ward J. M., Jeon J. S. 2012. The mechanism of phloem loading in rice (*Oryza sativa*). *Molecules and Cells*, 33, 5: 431-438
- Esau K. 1977. *Anatomy of seed plants*. New York, John Wiley and Sons: 576 str.
- Eschrich W. 1980. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 93, 1: 363-378
- Espinoza C., Medina C., Somerville S., Arce-Johnson P. 2007. Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 58, 12: 3197-3212
- Evert R. F. 1982. Sieve-tube structure in relation to function. *BioScience*, 32, 10: 789-795
- Evert R. F., Eschrich W., Heyser W. 1978. Leaf structure in relation to solute transport and phloem loading in *Zea mays* L. *Planta*, 138, 3: 279-294
- Fillion L., Ageorges A., Picaud S., Coutos-Thevenot P., Lemoine R., Romieu C., Delrot S. 1999. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology*, 120, 4: 1083-1094

- Fotopoulos V., Gilbert M. J., Pittman J. K., Marvier A. C., Buchanan A. J., Sauer N., Hall J. L., Williams L. E. 2003. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atbetafruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology*, 132, 2: 821-829
- Garcia-Rodriguez P., Azcon-Aguilar F. 2005. Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza*, 15, 7: 489-496
- Ge Y. X., Angenent G. C., Wittich P. E., Peters J., Franken J., Busscher M., Zhang L., Dahlhaus E., Kater M. M., Wullems G. J. et al. 2000. *NECI*, a novel gene, highly expressed in nectary tissue of *Petunia hybrida*. *Plant Journal*, 24, 6: 725-734
- Geiger D. R., Sovonick S. A., Shock T. L., Fellows R. J. 1974. Role of Free Space in Translocation in Sugar Beet. *Plant Physiology*, 54, 6: 892-898
- Giaquinta R. T. 1983. Phloem loading of sucrose. *Annual Review of Plant Physiology*, 34: 347-387
- Gibson S. I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany*, 55: 253-264
- Gifford R. M., Thorne J. H., Hitz W. D., Giaquinta R. T. 1984. Crop productivity and assimilate partitioning. *Science*, 225, 4664: 801-808
- Gil L., Yaron I., Shalitin D., Sauer N., Turgeon R., Wolf S. 2011. Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. *The Plant Journal*, 66, 2: 366-374
- Goodman R. N., Kiraly Z., Wood K. R. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Missouri, University of Missouri Press: 433 str.
- Google maps
<https://maps.google.com/> (10. jun. 2015)
- Guan Y. F., Huang X. Y., Zhu J., Gao J. F., Zhang H. X., Yang Z. N. 2008. RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147, 2: 852-863
- 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, 2: 777-789

- Hayes M. A., Davies C., Dry I. B. 2007. Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany*, 58, 8: 1985-1997
- Hayes M. A., Feechan A., Dry I. B. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (*VvHT5*) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology*, 153, 1: 211-221
- Hellman E. 2003. Oregon Viticulture. 1st ed. Corvallis, Oregon State University Press: 296 str.
- Herbers K., Meuwly P., Frommer W., Métraux J. P., Sonnewald U. 1996. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell*, 8, 5: 793-803
- Hewitt W. B., Raski D. J., Goheen A. C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, 48: 586-595
- Horváth J., Tóbiás I., Hunyadi K. 1994. New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus. *Horticultural Science*, 26, 1: 31-32
- Hren M. 2007. Interakcije med fitoplazmami in vinsko trto (*Vitis vinifera* L.) na ravni izražanja genov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 296 str.
- Hren M., Ravnikar M., Brzin J., Ermacora P., Carraro L., Bianco P. A., Casati P., Borgo M., Angelini E., Rotter A., Gruden K. 2009. Induced expression of *sucrose synthase* and *alcohol dehydrogenase I* genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology*, 58: 170-180
- Jaillon O., Aury J. M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguency P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère, Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gasparo G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M. E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A. F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449: 463-467
- Jež Krebelj A. 2015. Biological role of Grapevine fanleaf virus (GFLV) in winegrowing region of northern Primorska. Dissertation. Nova Gorica, University of Nova Gorica, Graduate school: 151 str.

- Jin Y., Ni D. A., Ruan Y. L. 2009. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *The Plant Cell*, 21, 7: 2072-2089
- Keller M. 2010. *The science of grapevine*. Amsterdam, Elsevier: 400 str.
- King, S. P., Lunn, J. E. and Furbank, R. T. 1997. Carbohydrate Content and Enzyme Metabolism in Developing *Canola Siliques*. *Plant Physiology*, 114, 1: 153-160
- Kliwer W. M. 1965. Changes in Concentration of Glucose, Fructose and Total Soluble Solids in Flowers and Berries of *Vitis Vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 2: 101-110
- Koch K. 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, 3: 235-246
- Lalonde S., Tegeder M., Throne-Holst M., Frommer W. B., Patrick J. W. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment*, 26, 1: 37-56
- Lalonde S., Wipf D., Frommer W. B. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 341-372.
- 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*, 65, 3: 821-832
- Lee I. M., Davis R. E., Gundersen-Rindal D. E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic *Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255
- Leigh R. A., Rees T., Fuller W. A., Banfield J. 1979. The location of acid invertase activity and sucrose in the vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*). *Biochemical Journal*, 178, 3: 539-547
- 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, 1: 59-68
- Levitt J. 1980. *Physiological ecology series: Responses of plants to environmental stress. Volume II. Water, Radiation, Salt and other stresses*. 2nd ed. London, Academic press: 574 str.

- Ling K. S., Zhu H. Y., Gonsalves D. 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus *Ampelovirus*. *Journal of General Virology*, 85: 2099-2102
- Lingle S. E., Dunlop J. R. 1987. Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development. *Plant Physiology*, 84, 2: 386-389
- Machenaud J., Henti R., Dieuaide-Noubhani M., 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, 2: 219-220
- Manning K., Davies C., Bowen H. C., White P. J. 2001. Functional characterization of two ripening-related sucrose transporters from grape berries. *Annals of Botany*, 87, 1: 125-129
- Margalit Y. 2004. Concepts in wine chemistry. 2nd ed. San Francisco, The Wine Appreciation Guild: 486 str.
- Margis R., Viry M., Pinck M., Pinck L., 1991. Cloning and in vitro characterization of the Grapevine fanleaf virus proteinase cistron. *Virology*, 185, 2: 779-787
- Marinval P. 1997. Vigne sauvage et Vigne cultivée dans le Bassin méditerranéen. Émergence de la viticulture. Contribution archéo-botanique. V: L'Histoire du Vin, une Histoire de Rites. Frissant P. (ed.), Paris, Office International de la Vigne et du Vin: 137-172
- Martelli G. P. 1993. Grapevine degeneration - fanleaf. V: Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Martelli G. P. (ed.). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 9-18
- Martelli G. P., Savino V. 1990. Fanleaf degeneration. V: Compendium of grape diseases. Pearson R. C., Goheen A. (eds.). Saint Paul, American Phytopathological Society Press: 48-49
- Martelli, G. P. 2012. Grapevine virology highlights 2010-2012. V: Proceedings of the 17th congress of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). 17th Congress of ICVG, Davis, 7. - 14. oktober 2012. Ferguson B. (ed.). Davis, University of California, Foundation Plant Services: 13-31
- Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1: 83-102

- Matsukura C. A., Saitoh T., Hirose T., Ohsugi R., Perata P., Yamaguchi J. 2000. Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (*OsSUT1*) induced by sugar and light. *Plant Physiology*, 124, 1: 85-94
- Maule A. J., Palukaitis P. 1991. Virus movement in infected plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9, 6: 457-473
- Mayo M. A., Robinson D. J. 1996. *Nepoviruses: molecular biology and replication*. V: *The Plant Viruses. Polyhedral virions and bipartite RNA Genomes*. Harrison B. D., Murrant A. F. (eds.). New York, Plenum: 139-185
- McGovern P. E. 2004. *Ancient wine: the search for the origins of viniculture*. Princeton, Princeton University Press: 392 str.
- McGovern P. E., Glusker D. L., Exner L. J., Voigt M. M. 1996. Neolithic resinated wine. *Nature*, 381: 480-481
- Morkunas I., Marczak Q., Stachowiak J., Stobiecki M. 2005. Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*: Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 4: 363-373
- Moxon E. R., Kroll J. S. 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 150: 65-85
- Mullins M. G., Bouquet A., Milliams L. E. 2003. *Biology of Horticultural Crops: Biology of the Grapevine*. Cambridge, Cambridge University Press: 241 str.
- N'tchobo H., Dali N., Nguyen-Quoc B., Foyer C. H., Yelle S. 1999. Starch synthesis in tomato remains constant throughout fruit development and is dependent on sucrose supply and sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany*, 50, 338: 1457-1463
- Pearce R. B. 1996. Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytologist*, 132, 2: 203-233
- Pearson R. C., Goheen A. C. 1988. *Compendium of grape diseases*. 4th ed. Saint Paul, The American Phytopathological Society: 93 str.
- Pinck L., Fuchs M., Pinck M., Ravelonandro M., Walter B. 1988. A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. *Journal of General Virology*, 69: 233-239
- Pouget R. 1988. *Vitis vinifera, histoire et évolution*. V: *La Vigne et le Vin*. Terral S. (ed.). Paris, Graficas: 15-25

- Pouzoulet J., Pivovarov A. L., Santiago L. S., Rolshausen P. E. 2014. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 5, 253: 1-11
- Quacquarelli A., Gallitelli D., Savino V., Martelli G. P. 1976. Properties of Grapevine Fanleaf Virus. *Journal of General Virology*, 32: 349-360
- Raski D. J., Goheen A. C., Lider L. A., Meredith C. P. 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease*, 67: 335-339
- Reinders A., Sivitz A. B., Starker C. G., Gantt J. S., Ward J. M. 2008. Functional analysis of *LjSUT4*, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*, 68, 3: 289-299
- Rennie E. A., Turgeon R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Current Issue*, 106, 33: 14162-14167
- Riesmeier J.W., Willmitzer L., Frommer W.B. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal*, 11, 13: 4705-4713
- Rioux D., Chamberland H., Simard M., Ouellette G. B. 1995. Suberized tyloses in trees: An ultrastructural and cytochemical study. *Planta*, 196, 1: 125-140
- Rioux D., Nicole M., Simard M., Ouellette G. B. 1998. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees. *Phytopathology*, 88, 6: 494-505
- Ritzenthaler C., Laporte C., Gaire F., Dunoyer P., Schmitt C., Duval S., Piéquet A., Loudes A. M., Rohfritsch O., Stussi-Garaud C., Pfeiffer P., 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of Virology*, 76, 17: 8808-8819
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 675-709
- Ruan Y., Jin Y., Yang Y., Li G., 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, 6: 942-955
- Russin W. A., Evert R. F., Vanderveer P. J., Sharkey T. D., Briggs S. P. 1996. Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the sucrose export defective1 maize mutant. *The Plant Cell*, 8, 4: 645-658

- Samson F., Brunaud V., Duchêne S., De Oliveira Y., Caboche M., Lecharny A., Aubourg S. 2004. FLAGdb++: a database for the functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Nucleic Acids Research*, 32, 1: 347-350
- Saporta G. 1879. *Le monde des plantes avant l'apparition de l'homme*. Paris, Masson édit VIII: 416 str.
- Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* 581, 12: 2309-2317
- Sauer N., Friedländer K., Gräml-Wicke U. 1990. Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*, 9, 10: 3045-3050
- Serghini M. A., Fuchs M., Pinck M., Reinbolt J., Walter B., Pinck L., 1990. RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology*, 71: 1433-1441
- Shalitin D., Wolf S. 2000. Cucumber Mosaic Virus Infection Affects Transport in Melon Plants. *Plant Physiology*, 123, 2: 597-604
- Smeekens S., Ma J., Hanson J., Rolland F. 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 3: 273-278
- Srivastava A. C., Ganesan S., Ismail I. O., Ayre B. G. 2008. Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 Suc/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiology*, 148, 1: 200-211
- Sturm A., Chrispeels M. J. 1990. cDNA cloning of carrot extracellular P-fructofuranosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell*, 2, 11: 1107-1119
- Sun Q., Rost T. L., Matthews M. A. 2008. Wound-induced vascular occlusions in *Vitis vinifera* (*Vitaceae*): Tyloses in summer and gels in winter. *American Journal of Botany*, 95, 12: 1498-1505
- Sun Q., Rost T. L., Reid M. S., Matthews M. A. 2007. Ethylene and not embolism is required for wound-induced tylose development in stems of grapevines. *Plant Physiology*, 145, 4: 1629-1636
- Sun Y., Reinders A., LaFleur K. R., Mori T., Ward J. M. 2010. Transport activity of rice sucrose transporters OsSUT1 and OsSUT5. *Plant and Cell Physiology*, 51, 1: 114-122

- Sung S. S., Sheih W. J., Geiger D. R., Black C. C. 1994. Growth, sucrose synthase, and invertase activities of developing *Phaseolus vulgaris* L. fruits. *Plant, Cell and Environment*, 17, 4: 419-426
- Sutton P. N., Gilbert M. J., Williams L. E., Hall J. L. 2007. Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiologia Plantarum*, 129, 4: 787-795
- Ščurek M. 2014. Vpliv okužbe z virusom pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) na kakovost grozdja sorte Refošk in Pokalca (*Vitis vinifera* L.). Diplomsko delo. Univerza v Novi Gorici, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo: 36 str.
- Takanaga H., Chaudhuri B., Frommer W. B. 2008. *GLUT1* and *GLUT9* as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1778, 4: 1091-1099
- Tecsi L. I., Maule A. J., Smith A. M., Leegood R. C. 1994a. Complex, localized changes in CO₂ assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *The Plant Journal*, 5, 6: 837-847
- Tecsi L. I., Maule A. J., Smith A. M., Leegood R. C. 1994b. Metabolic alterations in cotyledons of *Cucurbita pepo* infected by cucumber mosaic virus. *Journal of Experimental Botany*, 45, 11: 1541-1551
- Tecsi L. I., Maule A. J., Smith A. M., Leegood R. C. 1996. A spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with cucumber mosaic virus. *Plant Physiology*, 111, 4: 975-985
- Terral J. F., Tabard E., Bouby L., Ivorra S., Pastor T., Figueiral I., Picq S., Chevance J. B., Jung C., Fabre L., Tardy C., Compan M., Bacilieri R., Lacombe T., This P. 2010. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105, 3: 443-455
- Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barrieu F., Abbal P., Couture C., Ageorges A., Atanassova R., Léon C., Renaudin J. P., Dédaldéchamp F., Romieu C. 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, 222, 5: 832-847
- Turgeon R. 1989. The sink–source transition in leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 119-138
- Tyree M. T., Zimmerman M. H. 2002. Xylem structure and the ascent of sap. 2nd ed. Berlin, Springer Verlag: 284 str.

- Tyree M. T., Sperry J. S. 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 40: 19-36
- Urek G., Širca S. 2005. Longidoridne ogorčice v vinogradnih tleh Slovenije. V: Zbornik predavanj in referatov 7. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. 7. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin, Zreče, 8. – 10. marec 2005. Vajs S., Lešnik M. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 356-359
- Van Bel A. J. 1993. Strategies of phloem loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44: 253-281
- Van Bel A. J. 1996. Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *Journal of Experimental Botany*, 47: 1129-1140
- Van Bel A. J. 2003. Transport phloem: Low profile, high impact. *Plant Physiology*, 131, 4: 1509-1510
- Vega A., Gutiérrez R. A., Peña-Neira A., Cramer G. R., Arce-Johnson P. 2011. Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Molecular Biology*, 77, 3: 261-274
- Vignault C., Vachaud M., Cakir B., Glissant D., Dédaldechamp F., Büttner M., Atanassova R., Fleurat-Lessard P., Lemoine R., Delrot S. 2005. *VvHT1* encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *Journal of Experimental Botany*, 56, 415: 1409-1418
- Vršič S., Lešnik M. 2005. *Vinogradništvo*. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 360 str.
- Wang F., Sanz A., Brenner M. L., Smith A. 1993. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology*, 101, 1: 321-327
- Wang L., Li X. R., Lian H., Ni D., He Y. K., Chen X. Y., Ruan Y. L. 2010. Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and *Arabidopsis* root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively. *Plant Physiology*, 154, 2: 744-756
- 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. A., Elphinstone J. G., Smith N. C., Boonham N., Stead D. E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 2853-2858

- Whitham S. A., Quan S., Chang H. S., Cooper B., Estes B., Zhu T., Wang X., Hou Y. M. 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 33, 2: 271-283
- Whitham S. A., Yang C., Goodin M. M. 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 11:1207-1215
- Wiese A., Elzinga N., Wobbes B., Smeeckens S. 2004. A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *The Plant Cell*, 16, 7: 1717-1729
- Winter H., Huber J. L., Huber S. C. 1997. Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Letters*, 420: 151-155
- Winter H., Huber J. L., Huber S. C. 1998. Identification of sucrose synthase as an actin-binding protein. *FEBS Letters*, 430, 3: 205-208
- Winter H., Robinson D. G., Heldt H. W. 1993. Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta*, 191, 2: 180-190
- Xiang L., Li Y., Rolland F., Van den Ende W. 2011. Neutral invertase, hexokinase and mitochondrial ROS homeostasis: emerging links between sugar metabolism, sugar signaling and ascorbate synthesis. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 10: 1567-1573
- Yuan M., Chu Z., Li X., Xu C., Wang S. 2009. Pathogen-induced expressional loss of function is the key factor in race-specific bacterial resistance conferred by a recessive R gene *xa13* in rice. *Plant and Cell Physiology*, 50, 5: 947-955
- Yuan M., Wang S. 2013. Rice MtN3/Saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular Plant*, 6, 3: 665-674
- Zhang X. Y., Wang X. L., Wang X. F., Xia G. H., Pan Q. H., Fan R. C., Wu F. Q., Yu X. C., Zhang D. P. 2006. A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology*, 142, 1: 220-232
- Zhang Y. L., Meng Q. Y., Zhu H. L., Guo Y., Gao H. Y., Luo Y. B., Lu J. 2008. Functional characterization of a LAHC sucrose transporter isolated from grape berries in yeast. *Plant Growth Regulation*, 54 1: 71-79
- Zheng Y., Anderson S., Zhang Y., Garavito R. M. 2011. The structure of sucrose synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and its functional implications. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 41: 36108-36118

Zohary D. 1995. Domestication of the Grapevine *Vitis vinifera* L. in the Near East. V: The origins and Ancient History of Wine. McGovern I., Patrick E. (eds.). Amsterdam, Gordon and Breach Publishers imprint: 23-30

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorici doc. dr. Maruši Pompe Novak za odlično mentorstvo, usmerjanje, strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Hvala tudi dr. Maji Rupnik Cigoj za prijaznost, veliko pomoč, nasvete in spremstvo pri izvedbi eksperimentalnega dela magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi Marku Chersicoli za pomoč pri mikroskopiranju in meritvah ksilemskih elementov.

Hvala tudi dr. Anastaziji Jež Krebelj za pomoč in odgovore na moja vprašanja.

Recenzentki prof. dr. Marini Dermastia in predsedniku doc. dr. Alešu Kladniku se zahvaljujem za pregled naloge ter popravke in komentarje.

Hvala tudi Špeli Krivec za lektoriranje naloge.

In nenazadnje hvala moji družini, mami Olgi, očetu Francu ter bratoma Mateju in Dominiku za vso podporo v času študija.