

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Urška ČEPIN

**GENETSKA RAZNOLIKOST IN DOLOČANJE VIRUSA
PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENETIC VARIABILITY AND DETECTION OF GRAPEVINE
FANLEAF VIRUS (GFLV)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2011

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete septembra 2008 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) v Ljubljani.

Mentorica: prof. dr. Maja RAVNIKAR

Somentorica: doc. dr. Maruša POMPE NOVAK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR

Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica: doc. dr. Maruša POMPE NOVAK

Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 8.6. 2011

Izjavljam, da je predložena doktorska disertacija rezultat samostojnega raziskovalnega dela.

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

Urška Čepin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	578.76:575.2:582.783(043.3)=163.6
KG	genetska raznolikost / satelitska RNA / vinska trta / <i>Vitis vinifera</i> / virusi / GFLV / diagnostika / medvrstne rekombinacije / PCR v realnem času
AV	ČEPIN, Urška, univ. dipl. biol.
SA	RAVNIKAR, Maja (mentorica) / POMPE-NOVAK Maruša (somentorica)
KZ	1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI	2011
IN	GENETSKA RAZNOLIKOST IN DOLOČANJE VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)
TD	Doktorska disertacija
OP	XVIII, 172 str., 16 pregl., 48 sl., 200 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Virus pahljačavosti listov vinske trte (<i>Grapevine fanleaf virus</i> , GFLV) povzroča bolezen imenovano kompleks kužne izrojenosti vinske trte, katere posledice so zmanjšanje pridelka in njegove kakovosti, ter propad trsov. Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja serološka imuno-encimska metoda ELISA. Prvi od ciljev doktorskega dela je bil najti najprimernejše tkivo vinske trte ter čas vzorčenja za najzanesljivejšo določitev virusa GFLV s testom ELISA. Ugotovili smo, da so za to najprimernejša zelena hitrorastoča tkiva v začetku rastne sezone, medtem ko se je floem izkazal kot primeren za določanje virusa le izven rastne sezone. Naš drugi cilj je bil razvoj molekularne metode RT-PCR v realnem času, uporaben v primerih latentnih okužb in za presejalne analize z veliko vzorci. Potrdili smo specifičnost in visoko občutljivost metode, ki je 1000x večja od testa ELISA in omogoča določitev do 10 kopij virusa na reakcijo. Virus nismo mogli določiti le v dveh od 86 GFLV izolatov zbranih iz različnih sort in vinogradov v Sloveniji in drugod po svetu. Za enega od njiju smo naknadno dokazali, da je medvrstna rekombinanta med virusi GDefV, ArMV in GFLV. Torej nova molekularna metoda služi tudi za odkrivanje medvrstnih rekombinant na 2A ^{HP} genu. Dokazali smo tudi, da je primerna za relativno kvantifikacijo virusa v floemskem tkivu vinske trte skozi sezono pri uporabi referenčnih genov COX in 18S, ki sta kazala stabilno izražanje skozi rastno sezono. Do sedaj še ni na voljo podatkov o genetski raznolikosti satRNA virusa GFLV, prav tako ne o prisotnosti satRNA v slovenskem prostoru. Za določanje satRNA virusa GFLV in ArMV smo razvili splošno RT-PCR metodo, s katero smo uspeli določiti satRNA v 58 od skupno 79 vzorcev trsov (73%) iz Slovenije, Španije, Francije, Italije in Kalifornije (ZDA), kar je 4x pogostejše, kot so dokazali do sedaj. Velike satRNA redko spreminjajo bolezenska znamenja virusa, kar potrjujejo tudi naši rezultati. Nukleotidna zaporedja satRNA so razkrila njihovo kvazivrstno naravo. V splošnem so se satRNA virusov ArMV in GFLV grupirale v dve skupini, ki sta si bili na nukleotidnem nivoju podobni v 70 – 77% in na aminokislinskem nivoju v 52 – 67%. SatRNA iz skupine ArMV smo lahko izolirali iz trsa okuženega z GFLV in obratno. To nakazuje na možnost zamenjave satRNA med sorodnimi virusi tako kot se lahko tudi njihove genomske RNA rekombinirajo. Kljub temu pa se je večkrat pokazalo, tako kot tudi v našem primeru, da imajo sorodnejši virusi tudi podobnejše satRNA.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd

DC 578.76:575.2:582.783(043.3)=163.6

CX genetic variability / satellite RNA / grapevine / *Vitis vinifera* / virusi / GFLV / diagnostics / interspecies recombinations / real-time PCR

AU ČEPIN, Urška

AA RAVNIKAR, Maja (supervisor) / POMPE-NOVAK Maruša (co-supervisor)

PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology

PY 2011

TI GENETIC VARIABILITY AND DETECTION OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV)

DT Doctoral Dissertation

NO XVIII, 172 p., 16 tab., 48 fig., 200 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is the causal agent of Grapevine degeneration complex, which is responsible for low fruit quality, yield loss and grapevine decline. For GFLV detection serological immuno enzyme test ELISA is mainly used. First of our objectives was to find the most appropriate part of the grapevine and time within a year for reliable detection of GFLV with ELISA test. This was shown to be the green actively growing tissues in the beginning of growing season, while the phloem was shown to be appropriate for virus detection out of the growing season. Our other objective was development of molecular method based on RT real-time PCR technology, which would be useful when dealing with latent infections or when screening test of pools of samples is needed. Its specificity and sensitivity was confirmed, the sensitivity was 1000-fold higher than the one of ELISA test, being able to detect down to 10 genome copies per reaction. The virus could not be confirmed in only two out of 86 GFLV isolates. One of those was further proven to be the interspecies recombinant between GFLV, GDefV and ArMV viruses. Hence new method can also serve as a tool for interspecies recombination determination on 2A^{HP} gene. It was also shown to be appropriate for relative virus quantification in phloem tissue during the season, by using COX and 18S as a reference genes, which had stable expression during the season. Up to now no genetic variability of satRNA GFLV has been investigated as well as no survey for satRNA presence in Slovenian GFLV infected grapevines has been done. For general detection of satRNA of GFLV and ArMV viruses, RT-PCR method was developed, with which satRNA was detected in 58 out of 79 GFLV infected samples (73%) from Slovenia, Spain, France, Italy and California (USA). This is 4-fold more frequent than proven up to now. Large satRNAs rarely change the symptoms caused by helper virus, which was also conclusion of our results. The sequences of satRNAs revealed their quasispecies nature. In general all satRNAs separated into two groups, sharing 70 – 77% of nucleotide and 52 – 67% of aminoacid sequences. SatRNA from ArMV group can be isolated from GFLV infected plants and vice versa. This suggests that satRNAs can exchange between related viruses just like their genomic RNAs can recombine. On the other hand it was more frequently observed that more related viruses contained also more related satRNAs.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG.....	XIII
SEZNAM OKRAJŠAV	XIV
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI	3
1.2 HIPOTEZE.....	4
2 PREGLED OBJAV.....	5
2.1 VIRUSI, POVZROČITELJI BOLEZNI NA VINSKI TRTI	5
2.1.1 Rodova <i>Closterovirus</i> in <i>Ampelovirus</i>	6
2.1.2 Rod <i>Maculavirus</i>	7
2.1.3 Rodova <i>Vitivirus</i> in <i>Foveavirus</i>	8
2.1.4 Rod <i>Nepovirus</i>	9
2.2 VIRUS PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV).....	11
2.2.1 Zgradba virusa GFLV.....	11
2.2.2 Replikacija in širjenje virusa med celicami.....	14
2.2.3 Razporeditev virusa GFLV po rastlini	15
2.2.4 Prenos virusa v vinogradu in širjenje okužbe	17
2.3 KOMPLEKS KUŽNE IZROJENOSTI VINSKE TRTE	20
2.4 SATELITI	23
2.4.1 Satelitske RNA (satRNA).....	24
2.4.2 Prisotnost satelitske RNA pri virusih GFLV in ArMV	30
2.4.3 Napredki v raziskavah satelitov	30
2.5 GENETSKA RAZNOLIKOST RNA VIRUSOV	32
2.5.1 Genetska raznolikost virusa GFLV.....	34
2.6 GENETSKA RAZNOLIKOST SATELITSKIH RNA.....	38
2.7 METODE ZA DOLOČANJE VIRUSA GFLV V TKIVU VINSKE TRTE IN METODE PROUČEVANJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI	40
2.7.1 Indeksiranje	40
2.7.2 DAS-ELISA.....	40
2.7.3 RT-PCR in LDA	40
2.7.4 PCR v realnem času (PCR-RČ).....	41
2.7.5 Metode proučevanja genetske raznolikosti virusov.....	55
3 MATERIAL IN METODE	56
3.1 VINOGRADI.....	56
3.2 POPISOVANJE BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN ISKANJE NOVIH TRSOV OKUŽENIH Z GFLV.....	58
3.2.1 Popisovanje bolezenskih znamenj.....	58
3.2.2 Nabiranje in homogenizacija rastlinskega materiala novih trsov	58
3.2.3 Test ELISA.....	59
3.3 DOLOČANJE IN RAZPOREDITEV VIRUSA GFLV V VINSKI TRTI SKOZI SEZONO S TESTOM ELISA	62
3.3.1 Nabiranje rastlinskega materiala	62
3.3.2 Homogenizacija rastlinskega materiala.....	62
3.3.3 DAS-ELISA.....	63

3.4	RAZVOJ METODE RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE IN RELATIVNO KVANTIFIKACIJO VIRUSA GFLV	63
3.4.1	Rastlinski material.....	63
3.4.2	Homogenizacija rastlinskega materiala za test ELISA	64
3.4.3	Homogenizacija rastlinskega materiala za izolacijo RNA	64
3.4.4	Izolacija celokupne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit	65
3.4.5	Konstruiranje začetnih oligonukleotidov	65
3.4.6	RT-PCR-RČ za določanje in relativno kvantifikacijo virusa GFLV	67
3.4.7	Raznolikost molekule RNA2 virusa GFLV	74
3.5	RAZVOJ METODE RT-PCR ZA DOLOČANJE SATELITSKE RNA GFLV	76
3.5.1	Rastlinski material in izolacija RNA.....	76
3.5.2	Reverzna transkripcija (RT)	77
3.5.3	Konstruiranje začetnih oligonukleotidov	78
3.5.4	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	80
3.6	PROUČEVANJE GENETSKE RAZNOLIKOSTI SATELITSKE RNA VIRUSA GFLV	82
3.6.1	Izolacija in čiščenje fragmentov iz gela.....	82
3.6.2	Ligacija v vektorja pGEM-T Easy in pJET 1.2/blunt	83
3.6.3	Transformacija celic.....	84
3.6.4	Izolacija plazmidov.....	86
3.6.5	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	86
3.6.6	Določanje nukleotidnega zaporedja	87
3.6.7	Relativna kvantifikacija GFLV z RT-PCR-RČ v primeru prisotnosti / odsotnosti satRNA.....	89
4	REZULTATI.....	90
4.1	ISKANJE NOVIH TRSOV OKUŽENIH Z VIRUSOM GFLV	90
4.2	DOLOČANJE VIRUSA GFLV SKOZI SEZONO S TESTOM ELISA.....	92
4.3	DOLOČANJE VIRUSA GFLV S TESTOM ELISA V RAZLIČNIH SORTAH VINSKE TRTE SKOZI SEZONO	98
4.4	RAZVOJ METODE RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE IN RELATIVNO KVANTIFIKACIJO VIRUSA GFLV	101
4.4.1	Preverjanje delovanja dvostopenjske RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1.....	101
4.4.2	Primerjava delovanja različnih kompletov za enostopenjsko RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1	103
4.4.3	Validacija metod enostopenjske RT-PCR-RČ s sondama GFLV-sonda1 in GFLV-sonda2.....	105
4.4.4	Primerjava občutljivosti RT-PCR-RČ in ELISA za določanje virusa GFLV v različnih tkivih vinske trte	109
4.4.5	Preverjanje specifičnosti in univerzalnosti metode.....	109
4.4.6	Relativna kvantifikacija virusa GFLV skozi sezono.....	116
4.5	RAZNOLIKOST MOLEKULE RNA 2	118
4.6	DOLOČANJE PRISOTNOSTI SATELITSKE RNA	121
4.7	DOLOČANJE RAZNOLIKOSTI SATELITSKE RNA.....	127
4.8	POVEZAVA MED PRISOTNOSTJO IN ODSOTNOSTJO SATELITSKE RNA IN BOLEZENSKIMI ZNAMENJI.....	133
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	134
5.1	RAZPRAVA	134
5.1.1	Razporeditev virusa GFLV po rastlini skozi sezono.....	134
5.1.2	Določanje virusa GFLV skozi rastno sezono v trsih različnih sort iz različnih vinogradov na Krasu in v Vipavski dolini.....	137
5.1.3	Razvoj metode RT-PCR v realnem času za določanje in relativno kvantifikacijo virusa GFLV.....	138
5.1.4	Raznolikost molekule RNA2.....	140
5.1.5	Določanje satRNA virusa GFLV	143
5.1.6	Vpliv satRNA na bolezenska znamenja	144

5.1.7 Raznolikost satRNA	145
5.2 SKLEPI	150
6 POVZETEK (SUMMARY)	152
6.1 POVZETEK	152
6.2 SUMMARY	155
7 VIRI	158
ZAHVALA	173
PRILOGE	174

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev virusa GFLV z metodo RT-PCR-RČ. ^a Položaj glede na referenčno nukleotidno zaporedje RNA2 GFLV-F13	66
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev ekspresije referenčnega gena citokrom oksidaze (COX) z metodo RT-PCR-RČ.	67
Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov uporabljenih za pomnoževanje in/ali sekvenciranje odsekov RNA2.	75
Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje satRNA.	79
Preglednica 5: Kombinacije vseh delujočih začetnih oligonukleotidov.....	80
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na plazmidna vektorja pGEM-T Easy in pJET 1.2/blunt.	86
Preglednica 7: Rezultati testiranja trsov s testom ELISA na prisotnost 9 najpogostejših virusov.	90
Preglednica 8: Delovanje metode dvostopenjske RT-PCR-RČ v kombinaciji s sondo GFLV-sonda1, testirani na redčitvah plazmidne DNA.	101
Preglednica 9: Primerjava delovanja enostopenjske RT-PCR v realnem času s kompletom proizvajalcev Invitrogen in Ambion na materialu okužene vinske trte redčene v zdravem rastlinskem materialu. ND – virus ni bil določen.	104
Preglednica 10: Lastnosti delovanja enostopenjske RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1 (metoda 1) in sondo GFLV-sonda2 (metoda 2).....	107
Preglednica 11: Primerjava metod RT-PCR-RČ in ELISA za določanje virusa GFLV v različnem materialu.	109
Preglednica 12: Različni izolati GFLV uporabljeni v tej študiji, njihov izvor in rezultati testov ELISA ter enostopenjskega RT-PCR-RČ.....	111
Preglednica 13: Prisotnost satRNA v 79 testiranih vzorcih okuženih z GFLV ter število dobljenih nukleotidnih zaporedij iz posameznega vzorca.	122
Preglednica 14: Seznam 65-ih nukleotidnih zaporedij satRNA razporejenih v preglednico glede na odstotek podobnosti, ki jo ima posamezna satRNA z ostalimi satRNA.	131
Preglednica 15: Seznam 65-ih aminokislinskih zaporedij satRNA razporejenih v preglednico glede na odstotek podobnosti, ki jo ima posamezna satRNA z ostalimi satRNA.	132
Preglednica 16: Odvisnost bolezenskih znamenj od prisotnosti/odsotnosti satRNA izračunana po testu χ^2 in G-testu, pri upoštevanju 21 bolezenskih znamenj izračunanih na dva načina: kot delež pojavljanja skozi več sezon (%) ali le kot prisotnost/odsotnost bolezenskega znamenja (1/0) ne glede na delež pojavljanja skozi več sezon; ter upoštevanju treh (+, -, +/-) oz. dveh postavk za prisotnost satRNA (+ (+/-), -) ali (+, -(+/-)).	133

KAZALO SLIK

Slika 1: Virus zvijanja listov vinske trte - 2 (GLRaV-2) (Brunt in sod., 1996)	6
Slika 2: Rdečenje in zvijanje listov vinske trte okužene z virusom zvijanja listov vinske trte (GLRaV) (http://www.ersa.fvg.it)	7
Slika 3: Tipično zvijanje listov vinske trte bele sorte okužene virusom zvijanja listov vinske trte (GLRaV) (www.wynboer.co.za , Foto: Roleen Carstens)	7
Slika 4: Negativno kontrastirani virusi marmoriranosti vinske trte (GFkV). Merilo = 50 nm (Martelli in sod., 2002)	8
Slika 5: <i>Levo</i> : Negativno kontrastiran virus razbrazdanja lesa rupestrisa (GRSPaV) (Foto: Urška Čepin). <i>Desno</i> : Kompleks bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (RW) prepoznan po številnih brazdah in jamicah pod lubjem nad ali pod mestom cepljenja (Foto: Irma Tomažič)	9
Slika 6: Pahljačast list vinske trte okužene z virusom GFLV (Foto: NIB)	11
Slika 7: Shematski prikaz genetske organizacije genomskih (RNA1 in RNA2) ter satelitske RNA virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Odprti bralni okvirji so predstavljeni s pravokotniki, 5' in 3' nekodirajoča nukleotidna zaporedja so predstavljena s tanko črto. Hel – helikaza, VPg – virusni protein, Pro – proteinaza, Pol – polimeraza, CP – plašni protein, MP – gibalni protein, HP – homing protein, poliA – poliA rep (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989)	12
Slika 8: Virusni delci virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). (Foto: Magda Tušek Žnidarič)	13
Slika 9: Shematski prikaz replikacije ter znotrajceličnega in medceličnega gibanja virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Golgi – Golgijev aparat, V – vezikel iz golgijevega aparata, MT – mikrotubuli, MP – gibalni protein, Pd – plazmodezma (Andret-Link in sod., 2004a)	15
Slika 10: Ogorčica <i>Xiphinema index</i>	17
Slika 11: Bolezenska znamenja na vinski trti okuženi z GFLV. <i>Levo</i> – rumenenje celotnih listov. <i>Sredina</i> – zraslost poganjkov. <i>Desno</i> – osip jagod.	22
Slika 12: Mehanizem delovanja nespecifičnih barvil (SYBRGreen/BOXT0)	44
Slika 13: Disociacijska krivulja prikaže temperaturo taljenja (T_m) amplikona, ki je definirana kot temperatura pri kateri se pojavi najbolj strmo zmanjšanje fluorescenčnega signala, zaradi disociacije obeh verig DNA. Pri SYBRGreen kemiji nam disociacijska krivulja pove ali smo pomnoževali pravičen amplikon, saj imajo nespecifični produkti (npr. dimeri začetnih oligonukleotidov) drugačno dolžino in sestavo nukleotidnega zaporedja in zato drugačno T_m	44
Slika 14: Hidrolizna ali TaqMan sonda	46
Slika 15: Molekularne svetilke	46
Slika 16: Dupleks začetni oligonukleotid - sonda pri škorpijonu	47
Slika 17: Hibridizacijske sonde	48
Slika 18: Sonda LightUp	48
Slika 19: začetni oligonukleotid LUX	49
Slika 20: Geografski prikaz lokacij vinogradov na Krasu in v Vipavski dolini v katerih smo vzorčili material vinske trte. Lokacije so označene z rdečimi pikami (Vir: GoogleMaps).	56

Slika 21: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na RNA2 virusa GFLV. Začetni oligonukleotidi so označeni s puščicami, nad/pod katerimi je ime posameznega začetnega oligonukleotida. Začetna oligonukleotida, s katerima smo pomnožili celoten ORF RNA2 sta označena z rdečo. Širši del predstavlja odprt bralni okvir (ORF), ožji pa nekodirajoče regije (UTR) molekule RNA2. Številke znotraj okvirjev predstavljajo velikosti posameznih genov.	76
Slika 22: Shematski prikaz naleganja delujočih začetnih oligonukleotidov na satRNA molekulo izolata GFLV-F13.	79
Slika 23: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri mlajših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.	92
Slika 24: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri starejših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. * Vzorec ni bil testiran.	93
Slika 25: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri viticah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. * Vzorec ni bil testiran.	93
Slika 26: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri floemu poganjka šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008 in zunaj rastne sezone januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. * Vzorec ni bil testiran.	94
Slika 27: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri koreninah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008 in znaj rastne sezone januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.	95
Slika 28: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri socvetju/grozdu šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.	96
Slika 29: Grafični prikaz povprečnih vrednosti fotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi napakami za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, v različnih delih šestih trsov iz treh lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (korenine in floem poganjka). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.	97
Slika 30: Grafični prikaz povprečnih vrednosti fotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi napakami za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri 5 različnih sortah vinske trte iz 7 lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi listi in vitice) in zunaj rastne sezone januarja 2009 (floem). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. V Dutovljah 1 in Vrhpolju 1 ter Vrhpolju 2, zimskih dormantnih poganjkov nismo testirali. V oklepajih so navedene lokacije in zraven število testiranih trsov.	99
Slika 31: Grafični prikaz povprečnih vrednosti fotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi napakami za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri 5 različnih sortah	

vinske trte iz 7 lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi listi in vitice) in januarja 2009 (floem). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. V Dutovljah 1 in Vrhpolju 1 ter Vrhpolju 2, zimskih dormantnih poganjkov nismo testirali. V oklepajih so navedene lokacije in zraven število testiranih trsov.	100
Slika 32: Linearna regresijska krivulja redčin plazmidne DNA (z insertom GFLV RNA2 izolata Ref 26 6/2 prikazanih v logaritemski skali glede na dobljene vrednosti C_q	102
Slika 33: Linearne regresijske krivulje serije redčin celokupne RNA izolirane iz trsa okuženega z različico GFLV-F13 ter pomnožene s tremi različnimi kompleti za enostopenjsko (oranžno) ter z enim kompletom za dvostopenjsko RT-PCR v realnem času (modro).	103
Slika 34: Krivulje pomnoževanja v linearni skali za vzorce testirane s kompletom proizvajalcev Invitrogen in Ambion.	104
Slika 35: Linearna regresijska krivulja logaritmiranih teoretičnih koncentracij RNA (serija redčenj po 10x) izolata GFLV-F13 (A) in izolata A17d (B) prikazanih glede na dobljene vrednosti C_q . Prikazane so vse tri vrednosti triplikata posamezne metode (intra-assay).	106
Slika 36: Poravnava dela NT zaporedja izolatov na katere GFLV-sonda1 ne prijema ($R = A/G$).	111
Slika 37: Linearna korelacija izražanja obeh referenčnih genov COX in 18S v vseh vzorcih pri vseh redčitvah dokazuje, da sta primerna kot normalizatorja v tej študiji.	116
Slika 38: Relativna kvantifikacija RNA virusa GFLV v floemu vinske trte skozi rastno sezono 2009 z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Razmerje relativne količine (r) je izračunano iz povprečja 10x in 100 redčitve RNA (Enačba 3) in prikazano kot $\log_2(r)$	117
Slika 39: Določanje virusa GFLV s testom ELISA skozi sezoni 2008 in 2009 v floemu vinske trte. Prisotnosti GFLV smo testirali januarja pri obeh vzorcih iz Dutovelj 1.	118
Slika 40: Graf podobnosti med molekulami RNA2 virusov GFLV-A17d, ArMV-NW, GDefV in LR 4/29 izrisan z uporabo programa za iskanje rekombinacij (RDPv3beta). ...	119
Slika 41: Tri filogenetska drevesa narisana iz nukleotidnih zaporedij molekule RNA2 virusov GFLV (črno), ArMV (modro), GDefV (zeleno) ter izolata LR 4/29 (rdeče) za vsak gen posebej. Merila predstavljajo genetsko razdaljo. Prikazane so le bootstrap vrednosti, ki so $\geq 60\%$	120
Slika 42: Primer elektroforetskega gela. Določanje prisotnosti satRNA z RT-PCR in kombinacijo začetnih oligonukleotidov FP3/RP. Za vzorce s šibkimi signali smo gelsko elektroforezo naredili še enkrat in potrdili prisotnost satRNA virusa GFLV.	125
Slika 43: Grafični prikaz prisotnosti satRNA virusa GFLV v 79-ih vzorcih različnih sort iz različnih geografskih lokacij v Sloveniji, Evropi in ZDA. (+) močan specifični PCR signal za prisotnost satRNA, (o) šibek specifični PCR signal za prisotnost satRNA, (-) ni specifičnega PCR signala za prisotnost satRNA. Glej sliko 42. (/) ločnica med rezultati dveh vzorčenj in testiranj (prvo junija 2009, drugo septembra 2010), če tega znaka ni je bil vzorec testiran le junija 2009, ker material jeseni 2010 ni bil več na voljo.	125
Slika 44: Relativna količina virusa GFLV v odvisnosti od prisotnosti satRNA v trsih sorte Refoš (junjski vzorci). * razlika v učinkovitosti pomnoževanja (E) med referenčnim genom in GFLV genom je večja od 0.5, zato izračunana vrednost ni čisto natančna.	126
Slika 45: Filogenetsko drevo nukleotidnega zaporedja satRNA. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Ena črtica pred številko klona predstavlja satRNA pridobljene iz junjskega materiala (2007 ali 2008), dve črtici pa satRNA pridobljene iz septembrskega materiala (2010).	129

Slika 46: Filogenetsko drevo aminokislinskega zaporedja satRNA. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Ena črtica pred številko klona predstavlja satRNA pridobljene iz junijskega materiala (2007 ali 2008), dve črtici pa satRNA pridobljene iz septembrskega materiala (2010).....	130
Slika 47: Nukleotidna podobnost med satRNA.....	131
Slika 48: Aminokislinska podobnost med satRNA.....	132

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam trsov analiziranih na prisotnost virusa GFLV v različnih obdobjih sezone s testom ELISA. Fotometrične vrednosti odčitane po 2h inkubacije s substratom.

SEZNAM OKRAJŠAV

ΔRn	razlika v signalu fluorescence med pasivno referenco in tarčno molekulo
18S	18 S rRNA
1A	gen za proteazni kofaktor
1B ^{Hel}	gen za NTP vezavni protein
1C ^{VPg}	gen za vezavni protein
1D ^{Pro}	gen za cisteinsko proteazo
1E ^{Pol}	gen za od RNA-odvisno RNA polimerazo (replikazo)
2A ^{HP}	gen za homing protein
2B ^{MP}	gen za gibalni protein
2C ^{CP}	gen za plaščni protein
ArMV	virus mozaika repnjaka (<i>Arabis mosaic virus</i>)
BaMV	virus mozaika bambusa (<i>Bamboo mosaic virus</i>)
bp	bazni par
BRSV	virus obročkaste pegavosti pese (<i>Beet ringspot virus</i>)
BRV	virus atavizma črnega ribeza (<i>Blackcurrant reversion virus</i>)
CB	bolezen razbrazdanja tipa plutavosti lesa (Corky bark)
CCMV	virus razbarvanja in lisavosti kitajskega fižola (<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>)
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
ChYMV	virus rumene lisavosti cikorije (<i>Chicory yellow mottle virus</i>)
CMV	virus mozaika kumar (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
COX	citokrom oksidaza
CP	plaščni protein (coat protein)
C _q	cikel kvantifikacije, pri katerem ΔRn preseže določen prag detekcije (cycle of quantification)
CV	koeficient variacije (coefficient of variation)
CymRSV	virus obročkaste pegavosti orhidej (<i>Cymbidium ringspot virus</i>)
Da	Dalton, enota za molekulsko maso
DAS-ELISA	imuno-encimska metoda dvojnega sendviča ELISA (double antibody sandwich ELISA)
ddH ₂ O	dvakrat deionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
E	učinkovitost pomnoževanja pri PCR v realnem času (efficiency)
ELISA	encimsko imunosorpcijski test (enzyme linked immunosorbent assay)

ER	endoplazmatski retikulum
FAM	6-karboksi-fluorescein
FP	začetni oligonukleotid (forward primer)
GA	Golgijev aparat
GBLV	prikriti virus vinske trte iz Bolgarije (<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i>)
GCMV	virus rumenega mozaika vinske trte (<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>)
GDefV	virus deformacije listov vinske trte (<i>Grapevine deformation virus</i>)
GFkV	virus marmoriranosti vinske trte (<i>Grapevine fleck virus</i>)
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte (<i>Grapevine fanleaf virus</i>)
GLRaV	virus povezan z zvijanjem listov vinske trte (<i>Grapevine leafroll associated virus</i>)
GRSPaV	virus povezan z razbrazdanjem lesa rupestrisa (<i>Grapevine rupestris stem-pitting associated virus</i>)
GRV	virus rozetavosti arašidov (<i>Groundnut rosette virus</i>)
GSO	gensko spremenjeni organizmi
GSR	gensko spremenjene rastline
GVA	virus A vinske trte (<i>Grapevine virus A</i>)
GVB	virus B vinske trte (<i>Grapevine virus B</i>)
GVD	virus D vinske trte (<i>Grapevine virus D</i>)
HP	homing protein
HSP70h	70-kDa homolog proteina toplotnega šoka (70-kDa homolog heat-shock protein)
IC	lovljenje virusov na protitelesa (immuno-capture)
izo-dCTP	sintetična baza izo-citozin
izo-dGTP	sintetična baza izo-gvanin
KSG	razbrazdanje lesa tipa kober (Kober stem grooving)
LDA	low density array
LNA	modificirani nukleotidi (locked nucleic acid)
LOD	meja določljivosti (limit of detection)
LOQ	meja kvantifikacije (limit of quantification)
MGB	molekula, ki se veže na mali žleb DNA (minor groove binder)
MLRSV	virusu prikrite obročkaste pegavosti rdečelistne slive (<i>Myrobalan latent ringspot virus</i>)
MP	gibalni protein (movement protein)
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
MT	mikrotubul
NTC	kontrola navzkrižne okužbe reakcijske mešanice (no template control)
OD	optična gostota (optical density)

oligo-(dT)21V začetni oligonukleotid

ORF odprt bralni okvir (open reading frame)

PCR verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

PCR-RČ PCR v realnem času (real-time PCR)

Pd plazmodezma

PEMV virus izrastkov in mozaika graha (*Pea enation mosaic virus*)

pH negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov v raztopini

PMV virus mozaika prosa (*Panicum small mosaic virus*)

PNA peptidne nukleinske kisline (peptide nucleic acid)

PREM delno kartiranje z restrikcijskimi encimi (partial restriction enzymatic mapping)

PSV virus zakrnelosti arašidov (*Peanut stunt virus*)

PVP polyvinylpyrrolidone

qPCR kvantitativni PCR (quantitative PCR)

r relativna količina tarčne molekule

R² korelacijski koeficient

RFLP polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism)

RISC RNA-induciran utiševalni kompleks (RNA-induced silencing complex)

RNA ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)

ROX 6-karboksi-X-rodamin

RP začetni oligonukleotid (reverse primer)

rpm obrati na minuto (rotation per minute)

rRNA ribosomska ribonukleinska kislina

RSP tip razbrazdanja na stebli rupestrisa (*Rupestris stem pitting*)

RT reverzna transkripcija ali obratno prepisovanje (reverse transcription)

RT-PCR reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

RW bolezen razbrazdanja lesa vinske trte (*rugose wood*)

s naklon umeritvene krivulje (slope)

satRNA satelitska RNA (satellite RNA)

SCBPV satelitski virus kronične čebelje paralize (*Satellite chronic bee-paralysis virus*)

SCMoV virus lisavosti podzemne detelje (*Subterranean clover mottle virus*)

SD bolezen Shiraz (*Shiraz disease*)

siRNA male interferenčne RNA (small interfering RNA)

SLRSV virus prikrite obročkaste pegavosti rdečih jagod (*Strawberry latent ringspot virus*)

SMWLMV	satelitski virus belo črtastega mozaika koruze (<i>Satellite maize white line mosaic virus</i>)
SNMoV	virus lisavosti pasjega zelišča (<i>Solanum nodiflorum mottle virus</i>)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (single nucleotide polymorphism)
SPMV	satelitski virus mozaika prosa (<i>Satellite panicum mosaic virus</i>)
SSCP	analiza konformacijskega polimorfizma enoverižnih DNA (Single Stranded Polymorphism)
STMV	satelitski virus mozaika tobaka (<i>Satellite tobacco mosaic virus</i>)
STNV	satelitski virus odmiranja tobaka (<i>Satellite tobacco necrosis virus</i>)
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin
<i>Taq</i>	polimeraza iz bakterije <i>Thermus aquaticus</i>
TBRV	virus črne obročkavosti paradižnika (<i>Tomato black ring virus</i>)
TBSV-B1	izolat B1 virusa zakrnelosti in grmičavosti paradižnika (<i>Tomato bushy stunt virus-B1</i>)
TBSV-B10	izolat B10 virusa zakrnelosti in grmičavosti paradižnika (<i>Tomato bushy stunt virus-B10</i>)
TCV	virus kodravosti repe (<i>Turnip crinkle virus</i>)
T_m	temperatura taljenja dvoverižne DNA (melting temperature)
TMV	virus mozaika tobaka (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
TNV	virus odmiranja tobaka (<i>Tobacco necrosis virus</i>)
TRIS	2,3-dibromo-1-propanol fosfat
TRSV	virus obročkaste pegavosti tobaka (<i>Tobacco ringspot virus</i>)
UTR	nekodirajoče nukleotidno zaporedje (untranslated region)
V	vezikel
VN	bolezen nekroz listnih žil vinske trte (vein necrosis)
VPg	virusni protein, vezan na genomom virusa
VTMoV	virus žametne lisavosti Velvet tobacco (<i>Velvet tobacco mottle virus</i>)

Standardne kratice za nukleotide

A	adenin
C	citozin
G	gvanin
T	timin
U	uracil

R	G ali A
Y	C ali T
M	A ali C
K	G ali T
S	G ali C
W	A ali T

H	A ali C ali T
B	G ali T ali C
V	G ali C ali A
D	G ali A ali T
N	A, C, G ali T

1 UVOD

Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) je zaradi svoje izjemne gospodarske pomembnosti že zelo dolgo tema raziskovanja velikega števila raziskovalnih skupin po vsem svetu. Poglavitni cilj raziskav predstavljajo analiza in pojav novih genotipskih različic, pojav virusov v novih okoljih in na prej ne opisanih gostiteljih, raziskovanje odgovora rastline na okužbo ter iskanje genskih determinant virusa za razvoj bolezni na gostiteljih.

GFLV povzroča bolezen, imenovano kompleks kužne izrojenosti vinske trte (Grapevine degeneration complex), ki je najstarejša znana in hkrati ena najresnejših virusnih bolezni vinske trte. Razširjena je v vseh večjih vinorodnih področjih po svetu. Bolezen povzroča zmanjšan pridelek (tudi do 80%), nizko kvaliteto grozdja, skrajšano življenjsko dobo trsov in zmanjšano odpornost na okoljske spremembe. Kompleks kužne izrojenosti vinske trte prepoznamo po različnih tipih rumenenja in deformacij listov ter nepravilni rasti poganjkov.

Genom virusa GFLV je sestavljen iz dveh linearnih pozitivno usmerjenih enoverižnih molekul RNA, RNA1 in RNA2. Pri francoski genotipski različici virusa GFLV z oznako F13, so odkrili še dodatno, satelitsko molekulo RNA (satRNA). Vse tri molekule RNA imajo na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), na 3' koncu pa se zaključijo s poliA repom. SatRNA je do sedaj najmanj proučena molekula virusa GFLV. Znano je le eno nukleotidno zaporedje satRNA genotipske različice GFLV F13, ki jo gradi 1114 nukleotidov in je kar v 83% identična veliki satRNA virusa mozaika repnjaka (*Arabis mosaic virus*, ArMV), ki ga prav tako kot GFLV uvrščamo v rod *Nepovirus* (Fuchs in sod., 1989; Hans in sod., 1992). SatRNA vsebuje zapis za nestrukturni protein P3, ki naj bi bil odgovoren za replikacijo satRNA, le-ta pa za lastno replikacijo in prenos potrebuje še obe genomski molekuli virusa pomagalca.

GFLV se v vinogradih na kratke razdalje prenaša s talno ogorčico (*Xiphinema index*), ki se hrani na koreninah vinske trte, na daljše razdalje pa ga prenašamo ljudje s pomočjo okuženega sadilnega materiala (Andret-Link in sod., 2004a; Hewitt in sod., 1958). Okužbo lahko preprečimo s testiranjem trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov ter posledično z uporabo neokuženega sadilnega materiala. Novejša možnost omejevanja njegovega širjenja je vzgoja gensko spremenjene vinske trte, odporne na GFLV, čemur je bilo v zadnjem času posvečenih veliko raziskav. Do sedaj je raziskovalcem uspelo pripraviti nekaj podlag odpornih na GFLV (Krastanova in sod., 1995; Mauro in sod., 1995; Xue in sod., 1999),

katerih odpornost temelji na v rastlinski genom vstavljenem genu za plašni protein GFLV. S tem pa so se odprla nova okoljevarstvena vprašanja o potencialnem tveganju povezanem z izpustom gensko spremenjenih trsov v okolje. Največja skrb je možnost rekombinacije med vnesenim virusnim genom in genotipsko različico virusa, ki naravno okuži gensko spremenjeno rastlino, pri čemer lahko nastane nova genotipska različica virusa, ki ima lahko nove biološke lastnosti, kot so sprememba specifičnosti virusnega prenašalca, širši izbor virusnih gostiteljev ali povečana patogenost virusa (Martelli in sod., 2001).

Na podlagi raziskav variabilnosti molekule RNA2 GFLV v Franciji (Vigne in sod., 2004b), Tuniziji (Fattouch in sod., 2005b), ZDA (Naraghi-Arani in sod., 2001) in Sloveniji (Pompe-Novak in sod., 2007) je bilo pokazano, da GFLV v naravi obstaja v obliki velikega števila genotipskih različic, ki so lahko hkrati prisotne v isti rastlini. Povezave med genotipskimi različicami RNA2 GFLV in bolezenskimi znamenji niso našli. Obstajajo pa poročila o izolatih, ki se med seboj razlikujejo po tipu in jakosti izražanja bolezenskih znamenj na zelnatih testnih rastlinah (Huss in sod., 1989), pri čemer genske determinante za razvoj bolezenskih znamenj niso znane.

Do sedaj še ni bila narejena nobena raziskava o genetski raznolikosti satRNA. Vprašanje pomena genske raznovrstnosti virusnega genoma GFLV za razvoj bolezenskih znamenj na gostitelju je odprto in pereče vprašanje, katerega odgovor bo doprinesel tudi k raziskavam na drugih interakcijah rastlina – virus. Prav tako ni dokazov ali obstaja povezava med prisotnostjo satRNA in bolezenskimi znamenji, ki jih povzroča GFLV, in ali je satRNA stalno ali le občasno prisotna v rastlinah okuženih z GFLV.

Vinska trta se na okužbo z virusom GFLV odzove z različno močnimi bolezenskimi znamenji, kar je posledica razlik v fiziološkem stanju trsa, pri katerem pride do okužbe z GFLV, možnih interakcijah z drugimi virusi (Šutić in sod., 1999) ter vplivov okolja (Blažina, 1992; Bovey in sod., 1980), možno pa je, da sta jakost in tip bolezenskih znamenj odvisna tudi od genotipske različice virusa, ki okužuje trs in od sorte vinske trte (neobjavljeno, Maruša Pompe Novak).

Za določanje virusa GFLV je bilo do sedaj uporabljenih več različnih metod, ki temeljijo na različnih lastnostih virusa. Standardna metoda za določanje virusa GFLV je serološka imuno-encimska metoda dvojnega sendviča ELISA (DAS-ELISA), katere dobre lastnosti so, da je poceni in omogoča določanje virusa direktno v rastlinskem ekstraktu. Njen problem pa je prenizka občutljivost v primeru nizkih koncentracij virusa v trsih, do katerih pride velikokrat v vročih delih sezone (Rowhani in sod., 1992); ko je virus v prikriti fazi ali, ko določamo virus v ogorčicah. Za določanje virusa GFLV s testom ELISA je tako

pomembno najti najprimernejše tkivo vinske trte, kot tudi najprimernejši čas sezone za vzorčenje. Okuženo tkivo, ki vsebuje največje količine virusa in v katerem lahko virus v določenem delu sezone vsako leto izmerimo, je najprimernejše za določanje virusa GFLV s testom ELISA, v tem delu sezone.

V primerih prikritih okužb trsi, ki jih uporabljamo za sadilni material, ne kažejo bolezenskih znamenj, a kljub temu predstavljajo vir nadaljnje okužbe. Za določanje virusa GFLV zato potrebujemo občutljivejšo metodo, ki je hkrati hitra, zanesljiva in cenovno ugodna ter omogoča pregled velikega števila vzorcev na enkrat, kar je pomembno pri laboratorijski diagnostiki virusov. Takšne so molekularne metode kot sta: metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času (PCR-RČ). Opisanih je več metod PCR za določanje virusa GFLV, vendar so vse specifične le za ožji izbor GFLV izolatov. PCR v realnem času je zelo občutljiva (zazna nizke koncentracije tarčne DNA v vzorcu), kvantitativna (določi natančno koncentracijo virusa v vzorcu) in specifična metoda. Prav tako je primerna za določanje virusa v velikem številu vzorcev na enkrat in omogoča avtomatizacijo.

1.1 CILJI

Cilji doktorske naloge so:

- najti najprimernejše tkivo vinske trte ter čas vzorčenja za najzanesljivejšo določitev virusa GFLV s testom ELISA,
- razviti ter validirati molekularno metodo PCR-RČ za splošno določitev virusa GFLV,
- uporabiti metodo PCR v realnem času za potrebe določanja relativne koncentracije virusa GFLV v vinski trti skozi rastno sezono,
- razviti metodo PCR za določanje satRNA virusa GFLV,
- ugotoviti delež prisotnosti satRNA v rastlinah okuženih z GFLV,
- ugotoviti ali obstaja povezava med prisotnostjo satRNA in bolezenskimi znamenji, ki jih povzroča virus GFLV na vinski trti,
- ugotoviti raznolikost satRNA na podlagi nukleotidnih zaporedij.

1.2 HIPOTEZE

Predvidevali smo, da:

- bomo z uporabo metode DAS-ELISA dobili vpogled v razporeditev virusa po rastlini vinske trte in ugotovili kateri čas v sezoni in katero tkivo vinske trte je najprimernejše za vzorčenje in določanje virusa GFLV s testom ELISA,
- bomo z obdelavo objavljenih nukleotidnih zaporedij molekule RNA2 virusa GFLV, uspeli oblikovati začetne oligonukleotide in sonde za določanje do sedaj znanih genotipskih različic virusa GFLV z metodo RT-PCR-RČ,
- bo nova metoda RT-PCR-RČ občutljivejša od testa DAS-ELISA,
- bo nova metoda RT-PCR-RČ primerna za relativno kvantifikacijo virusa v rastlinah vinske trte,
- bomo dobili odgovor o prisotnosti/odsotnosti satelitske RNA v trtah okuženih z GFLV ter povezavo med prisotnostjo satRNA in pojavom različnih bolezenskih znamenj,
- bomo uspeli pridobiti vpogled v raznolikost satelitske RNA GFLV na podlagi večjega števila nukleotidnih zaporedij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VIRUSI, POVZROČITELJI BOLEZNI NA VINSKI TRTI

Tako kot vse druge kulturne rastline je tudi vinska trta (*Vitis vinifera* L.) izpostavljena vplivom okolja ter boleznim in škodljivcem, ki nenehno ogrožajo količino in kakovost pridelka. Vinska trta sodi med zelo občutljive rastline, njena naravna odpornost na bolezni in škodljivce pa se je z željo po velikih pridelkih in hitrem mladostnem razvoju vinograda, z uporabo hormonov in drugih pospeševalcev razvoja, pretiranim gnojenjem in slabšo kakovostjo okolja, še zmanjšala. Posledično si sodobnega vinogradništva brez ustreznega varstva vinske trte pred boleznimi in škodljivci skoraj ne moremo predstavljati (Colnarič, 1980; Vršič in Lešnik, 2005).

Med žive povzročitelje bolezni ali biotske faktorje, ki napadajo vinsko trto, štejemo glive, bakterije, fitoplazme, viruse, viroide in škodljivce (žuželke, pršice, ogorčice itd.). V teh primerih je bolezen rezultat interakcij med občutljivim gostiteljem in patogenim organizmom. Na vinski trti se lahko pojavijo tudi bolezenska znamenja, ki jih povzročajo abiotiski dejavniki, kot so neravnotežje hranil, okoljski stres ali kemična toksičnost (Pearson in Goheen, 1998).

Virusne bolezni vinske trte brez dvoma obstajajo že od časov, ko smo trto udomačili. Takrat so bile bolezni, ki so danes prisotne po celem svetu, omejene na manjša vinorodna področja po Evropi. Virusi so se lahko širili le z naravnim načinom prenosa - s prenašalci, saj je bila trgovina s sadilnim rastlinskim materialom zelo omejena in nerazvita, zato do prenašanja povzročiteljev bolezni na daljše razdalje ni prihajalo. Po letu 1860 pa smo iz Amerike prinesli trtno uš (Phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch.), ki je do leta 1980 uničila večino evropskih vinogradov. Začelo se je aktivno iskanje odpornih hibridov vinske trte in s tem mešanje rastlinskega materiala. Kot odporni so se izkazali hibridi med ameriškimi divjimi in francoskimi trtami, zato so jih uporabili kot podlage na katere so cepili različne dragocene kulturne sorte vinske trte ter obnovili evropske vinograde. Žal pa so se hkrati z mešanjem rastlinskega materiala prenesli in razširili tudi virusi, saj kljub vizualni selekciji trsov, latentno okuženi trsi niso bili izločeni (Uyemoto in sod., 2009).

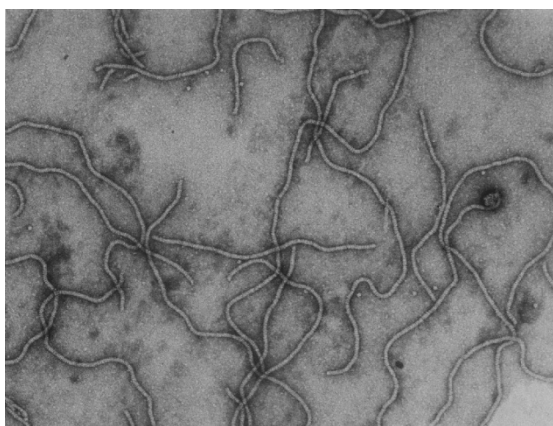
V nasprotju z večino glivnih boleznih, rastline po okužbi z virusi ostanejo sistemske okužene vse življenje (Šutić in sod., 1999). Virusne okužbe povzročajo hiranje, slabšo rodnost in izrojevanje vinske trte. Vinsko trto okužuje vsaj 60 do zdaj znanih virusov (Martelli, 2009). Najpomembnejši, ki jih povezujejo z boleznimi, so iz rodov

Closterovirus, *Ampelovirus*, *Maculavirus*, *Vitivirus*, *Foveavirus* in *Nepovirus* (Fauquet in sod., 2005).

2.1.1 Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus*

Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus* uvrščamo v družino *Closteroviridae* (ICTVdB Management, 2006), katere predstavniki so virusi zvijanja listov vinske trte (*Grapevine leafroll associated virus*, GLRaV). Virusi obeh rodov so dolge nitaste oblike in vsebujejo enojno linearno pozitivno polarno enoverižno RNA (Slika 1). Virusi se v največji meri nahajajo v floemu okuženih rastlin. Nekatere od njih prenašajo kaparji različnih vrst, pogosto pa jih prenašamo s cepljenjem trsov (Fauquet in sod., 2005). Virusi iz družine *Closteroviridae* so edini virusi, ki kodirajo gen za 70-kDa homolog proteina toplotnega šoka (70-kDa homolog heat-shock protein, HSP70h), ki je podoben celičnim šaperonom in ima visoko ohranjeni N-terminalno ter ATP-azno domeno. HSP70h in plaščni protein (coat protein, CP) sta del petdelnega modula za premikanje (movement module), ki je prisoten pri omenjeni družini virusov (Maliogka in sod., 2008).

Glede na aminokislinsko zaporedje ohranjene HSP70h regije uvrščamo GLRaV-2 v rod *Closterovirus*; GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-9, GLRaV-Pr in GLRaV-De v podskupino I rodu *Ampelovirus*; GLRaV-1 in GLRaV-3 pa v podskupino II istega rodu. GLRaV-7 je trenutno neuvrščeni član družine (Maliogka in sod., 2008). Ekonomsko najpomembnejša in tudi najbolj razširjena sta GLRaV-1 in GLRaV-3 (Sefc, 2000).



Slika 1: Virus zvijanja listov vinske trte - 2 (GLRaV-2) (Brunt in sod., 1996)

Figure 1: Grapevine leafroll associated virus - 2 (GLRaV-2) (Brunt et al., 1996)

Vse do sedaj odkrite viruse GLRaV povezujejo z boleznijo imenovano kompleks predčasnega rdečenja in zvijanja listov vinske trte (grapevine leafroll complex), ki je razširjena v vseh vinorodnih deželah po svetu (Alkowni in Rowhani, 2003; Martelli in sod., 2002). Poleti in jeseni se listi okuženih trsov zvijajo navzdol, glavne žile ostanejo

zelene, medžilni prostori pri temnih sortah pordečijo, pri svetlih pa porumenijo (Sliki 2 in 3). Posledica bolezni je tudi zakasnjeno in neenakomerno dozorevanje jagod. Grozdi so običajno manjši, oblika grozdov in jagod pa ostane primerljiva z zdravimi trsi (Uyemoto, 2009).



Slika 2: Rdečenje in zvijanje listov vinske trte okužene z virusom zvijanja listov vinske trte (GLRaV) (<http://www.ersa.fvg.it>).

Figure 2: Reddening and leafroll symptoms on leaves of red grapevine variety infected with *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) (<http://www.ersa.fvg.it>).



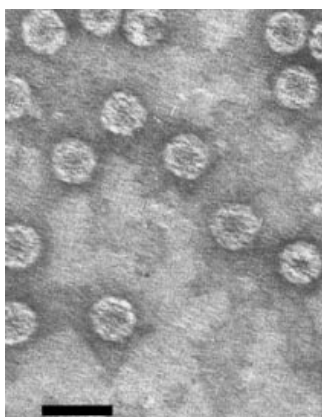
Slika 3: Tipično zvijanje listov vinske trte bele sorte okužene virusom zvijanja listov vinske trte (GLRaV) (www.wynboer.co.za, Foto: Roleen Carstens).

Figure 3: Typical leafroll symptoms on leaves of a white vine cultivar infected with *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) (www.wynboer.co.za, Photo: Roleen Carstens).

2.1.2 Rod *Maculavirus*

Virus marmoriranosti vinske trte (*Grapevine fleck virus*, GFkV) pripada rodu *Maculavirus* v družini *Tymoviridae* (Slika 4). Je oblike poliedra ter vsebuje enojno linearno pozitivno polarno enoverižno RNA (Slika 4). Okužuje le vinsko trto v vseh vinorodnih okoliših po

svetu, nahaja pa se izključno v floemu okuženih gostiteljev (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Povzročča bolezen imenovano kužna marmoriranost vinske trte (Grapevine fleck disease). Njegov vektor za enkrat še ni znan. Večinoma ga prenašamo s cepljenjem okuženega sadilnega materiala, ne da se ga prenašati z mehansko okužbo. GFkV je na vinski trti običajno latenten, z izjemo na *V. Rupestris*, pri katerem na mladih listih povzročča rahlo prosojne pike ali lise. Listi z večjim številom madežev, premera od 1 do 3 mm, se lahko nagubajo in zvijajo navzgor. Pri indeksiranju na *V. Rupestris* se bolezenska znamenja, ki jih povzročča GFkV, pogosto zamenjujejo s tistimi, ki jih povzročča virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), sploh če je indikator okužen z obema virusoma (Fauquet in sod., 2005; Martelli in sod., 2002).



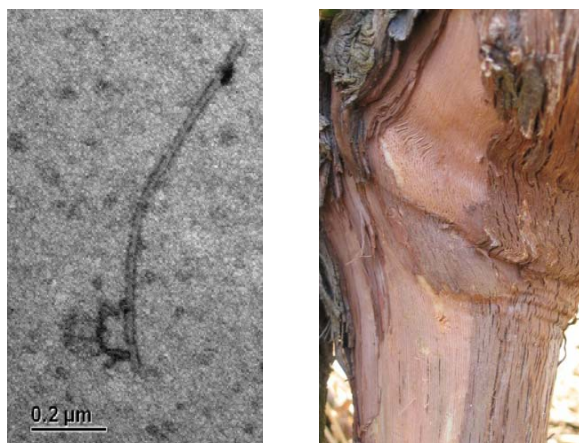
Slika 4: Negativno kontrastirani virusi marmoriranosti vinske trte (GFkV). Merilo = 50 nm (Martelli in sod., 2002).

Figure 4: Negative contrast electron micrograph of *Grapevine fleck virus* (GFkV) particles. Bar = 50 nm (Martelli et al., 2002).

2.1.3 Rodova *Vitivirus* in *Foveavirus*

Rodova *Vitivirus* in *Foveavirus* spadata v družino *Betaflexiviridae* (ICTV, 2009). Virusi obeh rodov so nitaste oblike in so razširjeni v vseh vinorodnih deželah (Slika 5 levo). Njihov genom predstavlja enojna linearna pozitivno polarna enoverižna RNA. V rod *Vitivirus* uvrščamo virus vinske trte A (*Grapevine virus A*, GVA) in virus vinske trte B (*Grapevine virus B*, GVB), virus vinske trte D (*Grapevine virus D*, GVD) ter virus vinske trte E (*Grapevine virus E*, GVE). V rod *Foveavirus* uvrščamo virus razbrazdanja lesa rupestrisa (*Grapevine rupestris stem-pitting associated virus*, GRSPaV). Vsi se prenašajo z okuženim sadilnim materialom, GVA in GVB se prenašata še s kaparji iz rodov *Pseudococcus* in *Planococcus* (Fauquet in sod., 2005). Pri virusih GVA in GRSPaV, so znotraj posamezne vrste nedavno odkrili številne genotipske različice (Goszczynski in sod., 2008; Rowhani in sod., 2000).

Vse štiri viruse povezujejo s kompleksom bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (Grapevine rugose wood complex, RW), razširjenim v vseh vinorodnih deželah po svetu (Martelli in sod., 1997; Nakaune in sod., 2008). Bolezen se lahko kaže kot zakasnelo brstenje popkov, odebeljeno deblo cepiča z debelim grobim lubjem ter vdolbinicami in vzdolžnimi brazdami pod lubjem cepiča ali podlage, odvisno od sorte trte (Slika 5 desno). GRSPaV povezujejo s tipom razbrazdanja na rupestrisu (Rupestris stem pitting, RSP) (Meng in sod., 1998), pa tudi z boleznijo nekroz listnih žil vinske trte (vein necrosis, VN) (Bouyahia, 2006) in s propadom sorte Syrah v Kaliforniji (Lima in sod., 2006). GVA povezujejo z razbrazdanjem lesa tipa kober (Kober stem grooving, KSG) (Garau in sod., 1994) ter z boleznijo Shiraz (Shiraz disease, SD) v Južni Afriki (Goszczynski in Jooste, 2003). GVB skušajo povezati z boleznijo razbrazdanja tipa plutavosti lesa (Corky bark, CB), vendar domnevajo, da ni edini povzročitelj te bolezni (Boschia, 1995).



Slika 5: *Levo*: Negativno kontrastiran virus razbrazdanja lesa rupestrisa (GRSPaV) (Foto: Urška Čepin). *Desno*: Kompleks bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (RW) prepoznan po številnih brazdah in jamicah pod lubjem nad ali pod mestom cepljenja (Foto: Irma Tomažič).

Figure 5: *Left*: Negative contrast electron micrograph of *Grapevine rupestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV) particles (Photo: Urška Čepin). *Right*: Grapevine rugose wood disease complex (RW) can be recognised by deep grooves and pits, exposed when the bark is removed from the trunk (Photo: Irma Tomažič).

2.1.4 Rod *Nepovirus*

Kljub temu, da so rod *Nepovirus* poimenovali po lastnostih kot sta širjenje s talnimi ogorčicami (Nematodi) in poliedrična oblika virusov (Poliedrični), danes v to skupino uvrščamo tudi viruse, ki se prenašajo s pršicami npr. virus atavizma črnega ribeza (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) ali pa celo viruse, ki za razširjanje ne potrebujejo prenašalcev. Po nedavni klasifikaciji rod *Nepovirus* uvrščamo v red *Picornavirales* in družino *Secoviridae* ter poddružino *Comovirinae* (Sanfançon in sod., 2009). Prisotnost treh domen na RNA1 poliproteinu v zaporedju: helikaza, proteinaza ter od RNA-odvisna RNA polimeraza (replikaza) (Hel-Pro-Pol) so predlagali kot skupno lastnost virusov iz rodu

Nepovirus, kar jih loči od rodov *Fabavirus* in *Comovirus*, drugih dveh članov poddružine *Comovirinae*. Ker dendrogram na podlagi Pro-Pol aminokislinskih zaporedij nepovirusov ne podpira trenutne sestave te skupine, obstaja možnost, da bodo v prihodnjih letih razbili rod *Nepovirus* v več različnih rodov (Sanfançon in sod., 2009).

Nepovirusi so razširjeni predvsem v zmerno toplih območjih po vsem svetu. Lahko okužujejo le eno ali širok krog rastlinskih vrst, odvisno od virusa (Fauquet in sod., 2005). Med nepovirusi jih je veliko takih, ki povzročajo gospodarsko pomembne bolezni na različnih kulturnih rastlinah. Običajno so omejeni na določeno geografsko področje ali celino. Najbolj značilna znamenja okužbe z nepovirusi so obročkaste kloroze na listih, ki jih lahko opazimo spomladi, pa tudi druge oblike kloroz ter razbarvanja listov. Mnoge divje rastline ob okužbi z nepovirusi ne razvijejo bolezenskih znamenj, kar kaže na možnost prilagoditve rastline na virus. Pojav in vrsta bolezenskih znamenj sta odvisna od vrste rastline, virusa, letnega časa ter od mnogih drugih dejavnikov (Kurstak, 1981). Tipični predstavnik rodu je virus obročkaste pegavosti tobaka (*Tobacco ringspot virus*, TRSV), razširjen v Severni Ameriki, ki okužuje sojo, borovnice, fižol, kumare, jajčevce in lubenice.

Genom nepovirusov je sestavljen iz dveh verig linearne pozitivno polarne enoverižne RNA (RNA1 in RNA2). Vsaka od njiju ima na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), ter na 3' koncu poliA rep. Poleg teh lahko nekateri nepovirusi vsebujejo še veliko satelitsko RNA in/ali krožno satelitsko RNA (Fauquet in sod., 2005).

Najpomembnejša virusna povzročitelja bolezni na vinski trti, ki spadata v rod *Nepovirus* sta GFLV in virus mozaika repnjaka (*Arabis mosaic virus*, ArMV). Bolezen, ki jo povzročata, imenujemo kompleks kužne izrojenosti vinske trte (Grapevine degeneration complex).

GFLV v naravi okužuje zelo ozek krog gostiteljev, predvsem rastline iz rodu vinske trte (*Vitis* L.) in se prenaša z ogorčico *Xiphinema index* (Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). ArMV, ki je serološko in molekularno soroden virusu GFLV, za razliko od GFLV, okužuje širok krog naravnih gostiteljev. Prenašajo ga ogorčice *Xiphinema diversicatum*, *Xiphinema coxi* in *Longidorus caespiticola* (Bovey in sod., 1980).

Leta 2003 so v Turčiji odkrili še tretji nepovirus, zelo podoben prvima dvema, in ga poimenovali virus deformacije listov vinske trte (*Grapevine deformation virus*, GDefV), ki povzroča enaka bolezenska znamenja kot GFLV in ArMV (Cigsar in sod., 2003).

2.2 VIRUS PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)

GFLV je dobil ime po obliki listov nekaterih okuženih trsov, ki imajo nenormalno razporeditev žil (koti med glavnimi žilami se manjšajo), kar jim daje videz pahljače (Slika 6) (Pearson in Goheen, 1998). Glavni naravni gostitelj virusa GFLV je vinska trta, njegovo prisotnost pa so z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) dokazali tudi v vzorcih prstastega pesjaka (*Cynodon dactylon* L.) iz Irana (Horvath in sod., 1994; Izadphanah in sod., 2003; Maček, 1986).



Slika 6: Pahljačast list vinske trte okužene z virusom GFLV (Foto: NIB).

Figure 6: Fan-shaped leaf of GFLV infected grapevine (Photo: NIB).

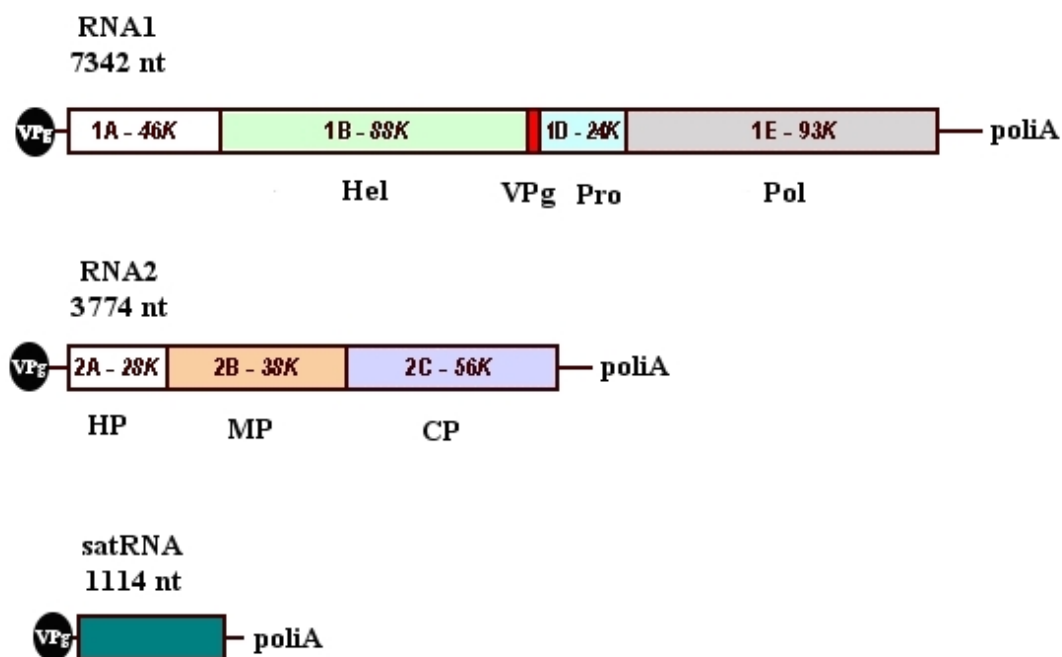
GFLV lahko prizadene večino žlahtnih trsov in podlag ter njihove križance, z mehansko okužbo pa ga je mogoče prenesti še na nekatere zelnate rastline. Uspeli so ga prenesti na prstasti pesjak in iz njega na testno rastlino navadne metlike (*Chenopodium quinoa*) (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998).

Za razliko od ostalih nepovirusov, za katere je značilna geografska omejenost na določeno področje, je virus GFLV razširjen v vseh večjih vinorodnih deželah po svetu (Kurstak, 1981). Pogosto so zaradi visoke stopnje okužbe in prisotnosti prenašalca okuženi celotni vinorodni okoliši (Martelli, 1993).

2.2.1 Zgradba virusa GFLV

Tako kot pri ostalih nepovirusih, je genom virusa GFLV sestavljen iz dveh verig linearne pozitivno usmerjene enoverižne RNA (RNA1 in RNA2) (Fauquet in sod., 2005). Pri virusnih delcih genotipske različice F13, so ob RNA1 in RNA2 našli še satelitsko RNA (satRNA) (Fuchs in sod., 1989). Vse tri RNA imajo na 5' koncu vezan VPg, na 3' koncu pa se zaključijo s poliA repom (Pinck in sod., 1988) (Slika 7).

Vse tri verige RNA vsebujejo le po en odprt bralni okvir (open reading frame, ORF), ki ga obdajata nekodirajoči nukleotidni zaporedji (untranslated regions, UTR) (Fuchs in sod., 1989; Serghini in sod., 1990; Ritzenthaler in sod., 1991). RNA1 in RNA2 se prepišeta v posamezni poliprotein, ki ga nato specifična virusna proteaza, kodirana na RNA1, razcepi v funkcionalne proteine (Viry in sod., 1993).



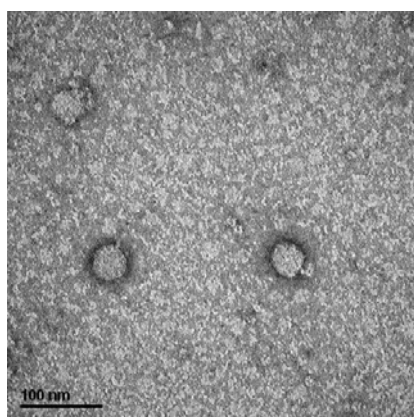
Slika 7: Shematski prikaz genetske organizacije genomskih (RNA1 in RNA2) ter satelitske RNA virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Odprti bralni okvirji so predstavljeni s pravokotniki, 5' in 3' nekodirajoča nukleotidna zaporedja so predstavljena s tanko črto. Hel – helikaza, VPg – virusni protein, Pro – proteinaza, Pol – polimeraza, CP – plašni protein, MP – gibalni protein, HP – homing protein, poliA – poliA rep (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).

Figure 7: Schematic presentation of genetic organization of genomic (RNA1 and RNA2) and satellite RNAs of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). ORFs are represented by wide open boxes and the 5' and 3' untranslated regions by narrow lines. Hel – helicase, VPg – viral protein, Pro – proteinase, Pol – polymerase, CP – coat protein, MP – movement protein, HP – homing protein, poliA – polyA tail (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).

Veriga RNA1 je dolga 7342 nukleotidov in se prepiše v poliprotein P1 z molekulsko maso 253 kDa. P1 se razcepi v pet funkcionalnih proteinov, ki so kodirani na genih: 1A (proteazni kofaktor), 1B^{Hel} (NTP vezavni protein, ki deluje kot helikaza), 1C^{VPg} (VPg), 1D^{Pro} (cisteinska proteaza) in 1E^{Pol} (od RNA-odvisna RNA polimeraza) (Ritzenthaler in sod., 1991; Pinck in sod., 1991). Na RNA1 je zapis za vse proteine, ki so potrebni za replikacijo GFLV, zato se lahko RNA1 podvojuje neodvisno od RNA2 (Ritzenthaler in

sod. 1991). RNA2 pa nasprotno za svojo replikacijo potrebuje replikacijski aparat, ki ga kodira RNA1 (Viry in sod., 1993).

RNA2 je sestavljena iz 3774 nukleotidov in se prepiše v poliprotein P2 z molekulkso maso 122 kDa, ki se razcepi v 3 funkcionalne proteine. Gen 2A^{HP} kodira zapis za homing protein (HP), ki sodeluje pri replikaciji verige RNA2 (Gaire in sod., 1999). Gen 2B^{MP} kodira zapis za gibalni protein (movement protein, MP) z molekulkso maso 38 kDa. Virusno kapsido sestavljajo podenote plaščnega proteina z molekulkso maso 56 kDa, kodirane na genu 2C^{CP}. S spontanym združevanjem 60-ih podenot plaščnega proteina nastane virusna kapsida poliedrične oblike s premerom 28 nm, ki ima hidrofobne lastnosti (Slika 8) (Fuchs in sod., 1989; Fauquet in sod., 2005; Serghini in sod., 1990; Quacquarelli in sod., 1976; Martelli in sod., 2001). Prisotnost RNA ni pogoj za pravilno sestavljanje virusne kapside (Belin in sod., 1999). Plaščni protein je tako odgovoren za enkapsidacijo genomske in satelitske RNA, za specifičnost prenosa GFLV z ogorčico in za sistemsko širjenje po rastlini (Andret - Link in sod., 2004a; Belin in sod., 2001; Callaway in sod., 2001; Hewitt in sod., 1958; Serghini in sod., 1990). Skupaj z gibalnim proteinom pa je odgovoren za širjenje virusa med celicami (Ritzenthaler in sod., 1995; Serghini in sod., 1990).



Slika 8: Virusni delci virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). (Foto: Magda Tušek Žnidarič).

Figure 8: Viral particles of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). (Photo: Magda Tušek Žnidarič).

V kapsidi poliedrične oblike je lahko spravljena posamezna molekula RNA1 ali RNA2, ali pa kapsida ostane prazna (Quacquarelli in sod., 1976). Izgleda, da se v kapsido nepovirusov lahko spravi maksimalno do 8 kb nukleinskih kislin. Tako lahko virusna kapsida vsebuje eno ali več molekul satRNA z ali brez molekule RNA2 (Fritsch in sod., 1993).

SatRNA genotipske različice GFLV-F13 je zgrajena iz 1114 nukleotidov. Na njej je zapis za nestrukturni protein P3 z molekulkso maso 37 kDa, ki je hidrofilne in bazične narave (Fuchs in sod., 1989). Protein, ki ga kodira, naj bi sodeloval pri replikaciji lastne satRNA

molekule, skupaj z genomskimi molekulami RNA1 in RNA2 virusa pomagalca (helper virus) (Hans in sod., 1993; Andret-Link in sod., 2004a; Fuchs in sod., 1989).

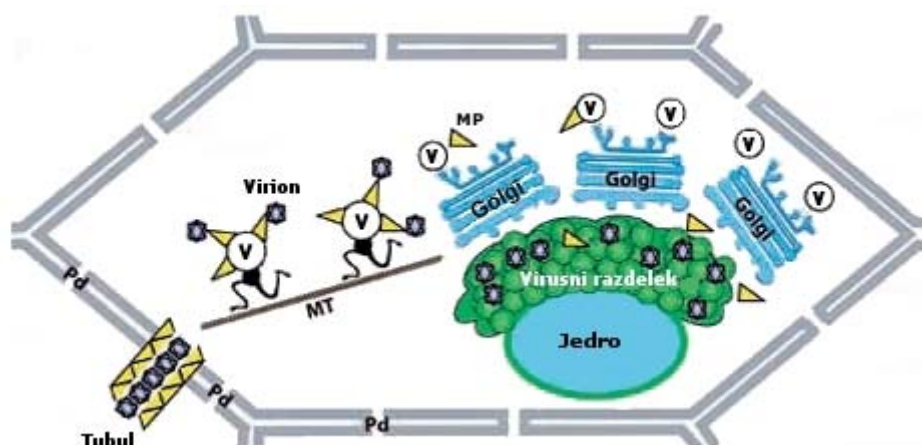
2.2.2 Replikacija in širjenje virusa med celicami

Po vstopu v rastlinsko gostiteljsko celico virus GFLV najprej odvrže kapsido, pri čemer se v citoplazmo sprostita RNA1 in RNA2, ki ju gostiteljev mehanizem prepozna kot informacijski (messenger) molekuli in ju na ribosomih prepíše v poliproteina P1 in P2. Iz P1 z avtokatalitično aktivnostjo nastanejo proteini odgovorni za replikacijo, ki se začnejo združevati z določenimi celičnimi strukturami v virusne replikacijske komplekse. Le-ti prepoznajo 3' konec pozitivno usmerjene molekule RNA virusa in jo prepíšejo v komplementarno verigo (negativno usmerjena RNA). Nastala dvojna veriga se imenuje replikacijska oblika, ki je odporna na hidrolizo z ribonukleazami. Hkratna sinteza več različno dolgih pozitivno usmerjenih verig na negativno usmerjeni verigi predstavlja obliko replikacijskega intermediata. Sinteza več pozitivno usmerjenih verig poteka s pomočjo virusnih encimov od RNA-odvisne RNA polimeraze in helikaze. Takšni kompleksi se najprej pojavljajo razpršeno po citoplazmi, nato pa se nakopičijo v perinuklearnem prostoru (objedrnem prostoru) (Astier in sod., 2007a; Gaire in sod., 1999).

Virus inducira kondenzacijo endoplazmatskega retikuluma (ER) v membranske vezikle ter njihovo premestitev v perinuklearni prostor. Membrane ER tako najverjetneje služijo kot ogrodje za sestavo replikacijskega kompleksa za replikacijo genomske RNA virusa, in ščitijo novonastalo RNA pred razgradnjo z gostiteljskimi RNazami. Z virusom GFLV okužene celice posledično kažejo obsežne spremembe in preoblikovan ER (Ritzenthaler in sod., 2002).

Za replikacijo RNA2 je poleg proteinov kodiranih na RNA1 potreben tudi homing protein (kodiran na genu 2A^{HP}). Domnevajo, da domena HP na nastajajočem poliproteinu privede kompleks P2-RNA2 iz prvotne lokacije v citosolu do perinuklearnega prostora (virusnega razdelka), kjer potekata replikacija in prepisovanje RNA2 (Gaïre in sod., 1999). Znotraj virusnega razdelka (Slika 9) se zaradi procesiranja poliproteinov P1 in P2 s proteazo (kodirano na genu 1D^{Pro}) akumulirajo funkcionalni virusni proteini. Gibalni proteini se ne akumulirajo, ampak se takoj po nastanku prenesejo na celično periferijo, kjer se v bližini plazmodezem začnejo združevati v tubule (Ritzenthaler in sod., 2002). Tubuli imajo bazalni del zasidran v celično steno, konci pa prosto visijo v citoplazmo. Tubularna rast je polarna, na novo sintetizirane podenote gibalnih proteinov se dodajajo le na bazalnem delu znotraj celične stene, kar omogoča prodor tubula v citoplazmo sosednje neokužene celice (Laporte in sod., 2003; Andret-Link in sod., 2004a).

Tudi virusni delci nastali v virusnem razdelku gostiteljske celice potujejo z objednega prostora do celičnega obrobja (Andret-Link in sod., 2004a). V neposredni bližini virusnega razdelka se nahaja veliko Golgijevih aparatov (GA) (Ritzenthaler in sod., 2002). Na površino veziklov GA se vežejo gibalni proteini, ki skupaj z celimi virusnimi delci (virioni), potujejo do roba celice. Vezikle GA k robu celice najverjetneje usmerjajo gostiteljski mikrotubuli (Ritzenthaler in sod., 1995; Laporte in sod., 2003). Preko tubularnih struktur, sestavljenih iz gibalnih proteinov, se na novo nastali virusni delci prenašajo v sosednje neokužene celice preko plazmodezem (Gaire in sod., 1999). Širjenje virusa med sosednjimi celicami predstavlja prvi korak k sistemskemu razširjanju virusa po rastlini (Ritzenthaler in sod., 1995).



Slika 9: Shematski prikaz replikacije ter znotrajceličnega in medceličnega gibanja virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Golgi – Golgijev aparat, V – vezikel iz golgijevega aparata, MT – mikrotubuli, MP – gibalni protein, Pd – plazmodezma (Andret-Link in sod., 2004a).

Figure 9: Schematic representation of the replication, intracellular trafficking and cell-to-cell movement of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). Golgi – Golgi apparatus, V - Golgi-derived secretory vesicles, MT – microtubules, MP – movement protein, Pd – Plasmodesmata, virusni razdelek = viral compartment (Andret-Link in sod., 2004a).

2.2.3 Razporeditev virusa GFLV po rastlini

Doslej so virus GFLV s testom ELISA določili v mladih in starih listih, floemu in žagovini mladih in olesenelih poganjkov ter v koreninah, socvetju in grozdnih jagodah vinske trte (Huss in sod., 1986; Rowhani in sod., 1992; Walter in Etienne., 1987; Franz in Walker., 1995).

Virus GFLV so s testom ELISA uspešno dokazali v listih vinske trte skozi celo rastno sezono (maj - oktober) ne glede na to ali so bili vzorčeni na spodnjem ali zgornjem delu rastline (Walter in Etienne, 1987). Na začetku rastne sezone so s testom ELISA testirali

tudi tri različne vrste listov glede na njihov položaj na poganjku. Ugotovili so, da koncentracija virusa GFLV gradientno narašča od spodnjih bazalnih listov proti zgornjim apikalnim listom poganjka. V nasprotju z listi, pa so pri olesenelih trsih virus lažje določili v spodnjih bazalnih, kot pa v zgornjih apikalnih medčlenkih Bouyahia in sod. (2003).

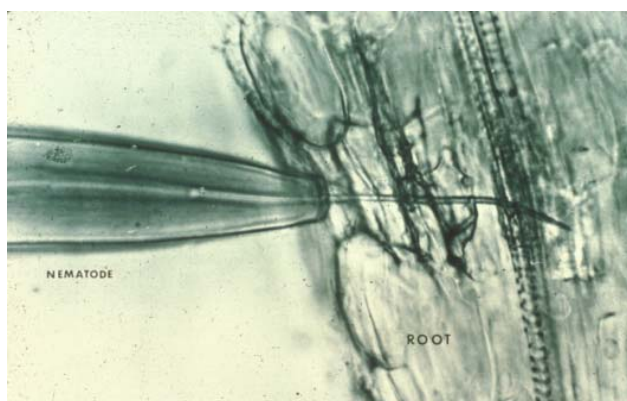
Rowhani in sod. (1992) so med rastno sezono največjo količino virusa GFLV izmerili v aktivno rastočih delih šestih testiranih rastlin (mladih listih in apikalnih poganjkih, socvetjih in nezrelih grozdnih jagodah) v začetku rastne sezone (maj - junij). V listih je količina virusa GFLV julija, verjetno zaradi pomanjkanja padavin in visokih temperatur, padla in je potem čez poletje in jesen (avgusta in septembra) močno variirala med rastlinami, ter se konec rastne sezone zmanjšala tudi do komaj določljivih vrednosti. Po drugi strani je bila količina virusa v floemu poganjka bolj stalna, vendar v splošnem nižja kot v listih. Hitro rastoča tkiva najverjetneje predstavljajo primerno okolje za replikacijo virusa GFLV. To dokazuje tudi dejstvo, da so pri testiranju kalusov, dobljenih iz dormantnih rozg po siljenju, dobili veliko večje količine virusa od pričakovanih, najverjetneje zaradi povišane metabolne aktivnosti in s tem povezane hitrejšre replikacije virusa. Večjo količino virusa so izmerili tudi v ostalih delih mladih poganjkov siljenih iz dormantnih rozg (listi, korenine). Izven rastne sezone (november - marec) so virus zanesljivo določili v floemu poganjka, čeprav so bile izmerjene vrednosti optične gostote (optical density, OD) nižje, kot v aktivno rastočih delih rastlin v začetku rastne sezone. Walter in Etienne (1987) sta dokazala virus GFLV tudi v poganjkih, ki so bili po nabiranju več kot 7 mesecev shranjeni na 6 °C. Poleg floema pa so prisotnost virusa GFLV izven rastne sezone dokazali tudi v koreninah in žagovini (Rowhani in sod., 1992).

Frantz in Walker (1995) sta s testom ELISA določala prisotnost virusa GFLV v grozdnih jagodah trsov iz treh vinogradov v Kaliforniji. Izmerjene vrednosti OD sta primerjala s težo grozdov in jagod, količino pridelka in številom jagod. Višje kot so bile izmerjene OD in s tem virusni titer, manjša je bila teža grozdov, jagod in manjši je bil pridelek. Med številom jagod in virusnim titrom povezave nista odkrila. Predvidevala pa sta, da obstaja sorazmerje med količino virusa GFLV in izražanjem bolezenskih znamenj. Poleg količine virusa naj bi na izražanje bolezenskih znamenj vplival tudi čas trajanja okužbe, število različic virusa s katerimi je trs okužen in prisotnost ogorčic.

2.2.4 Prenos virusa v vinogradu in širjenje okužbe

2.2.4.1 Prenos virusa z ogorčicami

GFLV se v naravi prenaša iz okuženih rastlin na zdrave z ektoparazitsko ogorčico *Xiphinema index*, iz družine *Longidoridae*. Za razliko od drugih nematodnih prenašalcev *X. index* prenaša le GFLV (Hewitt in sod., 1958; Raski in sod., 1983; Andret-Link in sod., 2004a). V dolžino meri približno 3,5 mm in je s prostim očesom komajda vidna (Urek in Hrzič, 1998). Živi prosto v tleh v bližini korenin gostitelja vinske trte, kjer se hrani na mladih koreninah (Slika 10). Neposredna škoda, ki jo povzroča je v primerjavi s posredno škodo, ki nastane zaradi virusa GFLV, ki ga prenaša, skoraj zanemarljiva (Urek in Širca, 2005). Prehranjevalna naprava ogorčice je sestavljena iz dolgega cevastega bodala (odontostileta), ki ga uporabljajo za vbadanje in izsesavanje tkiva mladih koreninic. Na mestu vboda se v korenini razvije posebna zadebelitev, v kateri so vidne povečane, večjedrne celice z gosto citoplazmo.



Slika 10: Ogorčica *Xiphinema index*

(<http://www.nematode.net/Species.Summaries/Xiphinema.index/index.php>, 2010).

Figure 10: Ectoparasitic nematode *Xiphinema index*

(<http://www.nematode.net/Species.Summaries/Xiphinema.index/index.php>, 2010).

Ogorčice z izločki požiralnih žlez rastlinsko celično vsebino prebavijo in jo nato vsesajo. Med hranjenjem na okuženem trsu poleg rastlinskih sokov zaužijejo tudi viruse GFLV, ki se z določenimi determinantami na površini virusne kapside specifično vežejo na mesta na kutikuli v notranjosti požiralnika ogorčice. Znotraj ogorčic se virus GFLV ne pomnožuje (Das in Raski, 1969). Ko se okužena ogorčica hrani na koreninah zdravega trsa, se skupaj z izločki iz požiralnih žlez preko odontostileta v rastlinsko tkivo prenesejo tudi virusi GFLV (Andret-Link in sod., 2004b; Belin in sod., 2001; Urek in Hrzič, 1998).

Razmnoževanje ogorčic poteka zelo hitro, celoten življenjski cikel traja od 2 do 14 mesecev v kontroliranih pogojih. V naravi je lahko to obdobje daljše zaradi bolj raznolikih temperatur. Samci so redki, samice se razmnožujejo partenogenetsko. *X. index* ima 4 larvalne stadije med katerimi se levi. Ob levitvi odvrže celotno kutikulo, ki pokriva tudi del prebavila. Ker so virusni delci locirani v lumnu prebavila, jih ogorčica odvrže skupaj s kutikulo pri levitvi, s čemer izgubi infektivnost. Šele, ko se ponovno hrani na koreninah okuženih rastlin, lahko spet okužuje. Pri hranjenju potrebuje ogorčica *X. index* približno 5 minut za prevzem virusa GFLV iz korenin okužene rastline. Prav toliko potrebuje, da okuži korenine zdravih rastlin (Das in Raski, 1969). Že samo eno hranjenje na okuženi rastlini zadostuje za prenos virusa. V zemlji so ogorčice zaščitene pred visokimi temperaturami in sušo, zato lahko tudi ob odsotnosti gostiteljskih korenin preživijo tudi 4,5 let (Raski in sod., 1983). *X. index* lahko prenese virus na zdravo rastlino še 9 mesecev po hranjenju na okuženi rastlini (Andret-Link in sod., 2004b; Pearson in Goheen, 1998). Ob neugodnih razmerah naj bi ogorčice prešle v fazo mirovanja, ko se naj ne bi razmnoževale in hranile, ter bi posledično zadrževale virus v sebi dalj časa (Demangeat in sod., 2005). Korenine vinske trte v zemlji lahko vsebujejo virus še leta po tem, ko odstranimo rastlino. Ogorčice, ki se nahajajo v takšni zemlji, se lahko hranijo na vitalnih koreninskih ostankih izsekanega vinograda in tako preživijo do posaditve novega vinograda (tudi do 10 let) (Pearson in Goheen, 1998).

Z ogorčicami se virus GFLV prenaša v vinogradu le na kratke razdalje s hitrostjo 1.3 – 1,5 m/leto (Pearson in Goheen, 1998). Pri širjenju z ogorčicami se v vinogradih bolezenska znamenja okužbe z GFLV pojavljajo v koncentričnih krogih velikih od nekaj kvadratnih metrov, do nekaj hektarjev (Kurstak, 1981).

2.2.4.2 Prenos virusa s sadilnim materialom

Na dolge razdalje virus GFLV širimo ljudje z okuženim sadilnim materialom (Pearson in Goheen, 1998). Za to vrsto prenosa je značilna razpršena porazdelitev obolelih trsov v vinogradu (Kurstak, 1981).

Z vnosom ameriških podlag v Evropo se je začelo hitro širjenje virusa GFLV po vsem svetu. Pred vnosom novih podlag, se je virus v Evropi verjetno širil predvsem z ogorčicami, znotraj manjših, omejenih območij (Pearson in Goheen, 1998).

Endosperm semen okuženih trsov je bogat z virusom GFLV in se lahko občasno prenaša na potomke. Virus GFLV se pojavlja v pelodu okuženih trsov vinske trte in zelnatih

gostiteljev. S semeni se prenaša pri *C. amaranticolor*, *C. quinoa* in *Glycine max* (Cory in Hewitt, 1968).

2.2.4.3 Omejevanje širjenja okužbe

Najpomembnejši način omejevanja širjenja okužbe je testiranje trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov in posledično uporaba neokuženega sadilnega materiala. Virus v rastlinskem materialu določimo z indeksiranjem na določene sorte vinske trte, s serološkim testom ELISA ali z molekularnimi testi. Pomembno je, da se zdrav material posadi v zemljo, ki ne vsebuje ogorčic *X. index* (Tomažič, 1999; Pearson in Goheen, 1998).

Drugi način vzgoje zdravega sadilnega materiala je s termoterapijo in tkivno kulturo meristema (Blažina, 1992). Celice v rastnih meristemih se delijo hitreje, kot je hitrost potovanja virusov iz okuženih v novo nastajajoče neokužene celice. Za dodatek pa v njih nastajajo snovi, ki močno zavirajo sestavljanje virusnih delcev. Temperatura in dolžina termoterapije sta različni za različne viruse in sorte vinske trte (Vršič in Lešnik, 2005).

Širjenje okužbe lahko omejujemo tudi z zatiranjem prenašalcev. V že zasajenih vinogradih je zatiranje ogorčic težko izvedljivo. Zelo pomembna pa je priprava zemlje pred nasaditvijo vinograda. Za prekinitev okužbe ogorčic z virusom je potrebno mirovanje tal, zatiranje plevelov, kot potencialnega izvora virusne okužbe. Ogorčice je možno zatirati tudi s kemičnimi sredstvi (nematocidi), le da so zaradi slabega prodiranja neučinkovita v globljih plasteh tal. Nematocidi so tudi zelo neselektivni in zato lahko škodljivi tudi za ostale organizme v tleh. Problem predstavlja tudi njihovo uhajanje v podtalnico (Pearson in Goheen, 1998; Urek in Hrzič, 1998).

Nekatere divje vrste iz rodu *Vitis* L. in podrodu *Muscadinia* so se izkazale kot tolerantne podlage na GFLV prenašalca ogorčico *X. index* (Raski in sod., 1983), ker predstavljajo zanje slabega gostitelja. Kljub temu, da se na *X. index* tolerantne podlage, kot sta *Muscadinia rotundifolia* in *Vitis munsoniana* na prebadanje koreninic s strani ogorčic odzovejo s hipersenzitivnim odgovorom, ki bi potencialno lahko preprečil širjenje virusa GFLV v sosednje celice, se virusa pogosto ne morejo popolnoma znebiti zato prenos virusa GFLV na ta način še vedno ni rešen (Staud in Weischer, 1992).

Novejša možnost omejevanja širjenja okužbe pa je uporaba gensko spremenjenih rastlin vinske trte, odpornih na GFLV, ki imajo vnesen gen za plašni protein virusa. Zaradi mehanizma post-transkripcijskega utišanja genov (post-transcriptional gene silencing, PTGS) so takšne rastline odporne na okužbo z virusom GFLV. PTGS mehanizem sprožijo

visoko strukturirane enoverižne virusne RNA ali dvoverižne RNA, ki nastanejo s pomočjo gostiteljeve ali virusne od RNA-odvisne RNA polimeraze. Dvoverižna RNA deluje kot substrat za Dicer, ki jo razreže na male interferenčne RNA (small interfering RNA, siRNA), ki se združijo z RNA-induciranim utiševalnim kompleksom (RNA-induced silencing complex, RISC), ta pa nato razcepi tarčno RNA. V nadaljevanju razcepljeno tarčno RNA v citoplazmi dokončno razgradijo eksonukleaze (Lin in sod., 2007). V primeru gensko spremenjene rastline ta mehanizem konstantno deluje, tako da kljub stalnemu izražanju gena za plaščni protein, le-ta skorajda ni prisoten v rastlini. Ko virus (ki ima enako oz. zelo podobno zaporedje vnesenemu genu) vstopi v rastlino, takoj pade v kolesje utiševalnega mehanizma, zato se ne more replicirati. Kljub temu obstaja možnost, da bi prišlo do rekombinacije med genom $2C^{CP}$, ki je vstavljen v genom gensko spremenjene vinske trte in genom $2C^{CP}$ virusov, ki so prisotni v okolju, kamor bi naj gensko spremenjeno rastlino posadili. Zato so primerjali raznolikost gena $2C^{CP}$ virusov GFLV izoliranih iz gensko spremenjenih in nespremenjenih trsov, ki so jih gojili tri leta v istem vinogradu v prisotnosti ogorčic. Ugotovili so, da ni prišlo do povečanega števila rekombinant virusa GFLV ali nastanka bolj škodljivih različic virusa v primerjavi z mešanimi okužbami v gensko nespremenjenih trsah (Vigne in sod., 2004a). Verjetnost, da bi gensko spremenjeni trsi povzročili nastanek novih virusov, ki se v naravnih pogojih ne bi pojavili, je zelo majhna (Fuchs in sod., 2007).

2.3 KOMPLEKS KUŽNE IZROJENOSTI VINSKE TRTE

Kompleks kužne izrojenosti vinske trte je bil v Evropi prisoten že pred prinesenimi hibridi ameriških podlag, odpornimi na trtno uš. To dokazujejo herbariji in prvi opisi bolezni evropskih trsov, stari vsaj 200 let, ki opisujejo in prikazujejo tipična bolezenska znamenja kompleksa kužne izrojenosti vinske trte. Gre za najstarejšo virusno bolezen na vinski trti, ki naj bi bila prisotna na območju Sredozemlja in na bližnjem vzhodu že od začetka gojenja vinske trte, danes pa je razširjena po celem svetu, prav tako kot GFLV, ki je njen glavni povzročitelj (Bovey in sod., 1980; Kurstak, 1981; Martelli, 1993; Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Pearson in Goheen, 1998).

Kompleks kužne izrojenosti vinske trte se kaže kot vrsta bolezenskih znamenj, ki so posledica interakcije virusa GFLV z vinsko trto. Med najznačilnejšimi so:

- deformirana oblika listov: majhni listi, asimetrična listna ploskev, pahljačast videz lista (manjši koti med žilami), široko odprti sinusi ob listnem peclju, ostali sinusi na listih skoraj izginejo ter peteršiljast videz lista (izraziti listni zobci);

- rumenenja medžilnih prostorov listov v obliki: pik, obročev ali lis; ter rumenenja žil in rumenenja listov po celotni površini (enako pri belih kot rdečih sortah);
- deformirani poganjki: zraščanja poganjkov in posledično ploščat izgled ter viličasata razrast (bifurkacije), kratki medčlenki (internodiji) in dvojni členki oz. nasproti ležeče oko, cik-cak rast;
- zbita rast in s tem grmast ali metlast izgled trsa;
- slabše razvit koreninski sistem;
- osipavanje in neenakomerno dozorevanje jagod ter slabša kakovost pridelka (zmanjšana vsebnost sladkorjev v grozdju) (Andret-Link in sod., 2004a; Bovey in sod., 1980; Korošec-Koruza, 1992; Maček in sod., 1990; Martelli, 1993; Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Pearson in Goheen, 1998; Šutić in sod., 1999).
- Rast trsov se zmanjša, izgube pridelka se iz leta v leto stopnjujejo. Postopoma ostanejo trsi brez vitalnega rodnega lesa in izgubijo proizvodno sposobnost (Vršič in Lešnik, 2005). Slednje lahko zmanjša letni pridelek grozdja od 10 do 80% (Pearson in Goheen, 1998; Raski in sod., 1983) (Slika 11).

Bolezenska znamenja na listih se razvijejo spomladi, poleti so lahko slabše opazna (Martelli, 1993). Na različnih trsih se bolezen izraža kot različna kombinacija zgoraj naštetih bolezenskih znamenj, kar je lahko posledica okužbe z različnimi genotipskimi različicami virusa (Bovey in sod., 1980), različne občutljivosti sorte vinske trte (Pearson in Goheen 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006), starosti trsa pri kateri je prišlo do okužbe in potencialnih sovplivov ostalih virusov (predvsem ostalih nepovirusov), kondicije trsa, vpliva okolja, letnega časa oz. fenofaze trsa in od interakcije naštetih dejavnikov (Korošec-Koruza, 1992; Šutić in sod., 1999). Pri občutljivih sortah se močno skrajša tudi življenjska doba trsov in s tem vinogradov (s 30-40 let, na 15-20 let), zmanjša se uspešnost cepitve trsov na podlago, sadilni material se težje zakorenini in poveča se občutljivost trsov na podnebne spremembe (Andret-Link in sod., 2004a; Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Šutić in sod., 1999). Pri tolerantnih rastlinah se okužba na pridelku skorajda ne pozna, lahko je celo brez bolezenskih znamenj.



Slika 11: Bolezenska znamenja na vinski trti okuženi z GFLV. Levo – rumenenje celotnih listov. Sredina – zraslost poganjkov. Desno – osip jagod.

Figure 11: Symptoms on grapevine infected with GFLV. Left – leaf yellowing. Middle – stem fasciations. Right – berry drop.

Bolezenska znamenja na listih in poganjkih niso vidna le navzven (Martelli, 1993). Znotrajcelične tubularne strukture, imenovane prečke ali trabekule, ki kot pregrade prečkajo lumen epidermalnih, parenhimskih, floemskih in ksilemskih celic, so značilne za okužbo z virusom GFLV. Te strukture imajo pektinsko jedro, obdano s celulozo, ligninom, suberinom ali kutinom, odvisno od vrste tkiva v katerem se nahajajo. Vidne so v lignificiranih poganjkih in bazalnih medčlenkih. So dobri indikatorji prisotnosti virusa GFLV, vendar pa njihova odsotnost ne izključuje okužbe z GFLV (Pearson in Goheen, 1998).

ArMV povzroča podobna bolezenska znamenja, najpogostejše pa so kloroze listov v obliki mozaikov, pik ali lis, včasih se pojavijo tudi nekroze (Bovey in sod., 1980; Murant, 1985).

Določeni zunanji dejavniki, kot so pomanjkanje magnezija ali železa v tleh in zmrzal, lahko povzročijo fiziološke spremembe v rastlini, ki so podobne nekaterim bolezenskim znamenjem okužbe trsa z virusom GFLV. Na podlagi opazovanja bolezenskih znamenj bi lahko prišlo do zamenjave kompleksa kužnega izrojevanja vinske trte tudi z okužbami, ki jih povzročajo drugi virusi, glive, fitoplazme, bakterije, nekateri insekti, nekateri herbicidi; ali pa z znamenji, ki nastanejo kot posledica genetskih napak v genomu vinske trte (Bovey in sod., 1980; Rowhani, 2002).

2.4 SATELITI

Skupne lastnosti satelitov so, da:

- niso sestavni del genoma virusa pomagalca, niti gostiteljske rastline;
- z genomom virusa pomagalca nimajo podobnosti v nukleotidnem zaporedju ali je ta le majhna (na omejenih predelih, pogosto na terminalnih koncih);
- za svojo replikacijo nujno potrebujejo virus pomagalec;
- niso potrebni za normalno delovanje in življenjski cikel virusa pomagalca z izjemo satRNA virusa rozetavosti arašidov (*Groundnut rosette virus*, GRV) (Astier in sod., 2007b, Roossinck in sod., 1992, Fritsch in Mayo, 1989; Kurath in Robaglia, 1995; Hu in sod., 2009).

Satelite najdemo le pri virusih, ki okužujejo rastlinske gostitelje. Sprva so bili sicer mnenja, da je delta virus pri človeku satelit virusa hepatitisa B, vendar se je izkazalo, da ni pravi satelit, saj potrebuje virus pomagalec le za tvorbo kapside in za prenos, pomnoževati pa se je sposoben sam (Roossinck in sod., 1992; Kurath in Robaglia, 1995; Astier in sod., 2007b).

Satelite lahko razdelimo glede na naravo njihovega genetskega materiala:

- enoverižni satelitski RNA virusi,
- enoverižne satelitske DNA,
- enoverižne satelitske RNA in
- dvoverižne satelitske RNA (Hu in sod., 2009).

Satelitski virusi se od satelitskih RNA (satRNA) in satelitskih DNA (satDNA) ločijo po tem, da kodirajo lastni plaščni protein, medtem ko se satRNA in satDNA pakirajo v proteinske kapside virusa pomagalca (Astier in sod., 2007b; Hu in sod., 2009).

Satelitske viruse in sat RNA so v zadnjih desetletjih veliko proučevali, predvsem zaradi sledečih razlogov:

- ker nimajo lastne RNA-odvisne RNA polimeraze uporabljajo mehanizem pomnoževanja njihovih virusov pomagalcev, zato imajo sateliti potencial kot nadomestni sistem za proučevanje replikacijskih mehanizmov njihovih virusov pomagalcev (Hu in sod., 2009);

- lahko zmanjšajo akumulacijo virusne RNA virusa pomagalca in jih zato pogosto razumemo, kot njihove molekularne parazite (Astier in sod., 2007b; Hu in sod., 2009);
- lahko spreminjajo (povečajo/zmanjšajo) intenziteto bolezenskih znamenj njihovega virusa pomagalca (Hu in sod., 2009; Kurath in Robaglia, 1995; Roossinck in sod., 1992);
- v gostiteljski rastlini se lahko akumulirajo v velikem številu, zato bi jih lahko v nekaterih primerih uporabili kot ekspresijske vektorje za vnos tujih genov (Hu in sod., 2009).

V najnovejših študijah satelitskih virusov in satRNA so odkrili povezavo med obrambnim sistemom rastline (gostitelja), utišanjem RNA ali post-transkripcijskim utišanjem genov ter patogenostjo in molekularno biologijo satRNA (Hu in sod., 2009).

Strokovni izraz satelitski virus je prvi uporabil Kassanis leta 1962, ko je opisal majhen, v premeru 17 nm velik delec t.i. satelitski virus odmiranja tobaka (*Satellite tobacco necrosis virus*, STNV), ki ga lahko najdemo v prisotnosti nekaterih, a ne vseh izolatov virusa odmiranja tobaka (*Tobacco necrosis virus*, TNV) (Fritsch in Mayo, 1989). V to skupino satelitskih virusov uvrščamo tudi satelitski virus mozaika prosa (*Satellite panicum mosaic virus*, SPMV), satelitski virus belo črtastega mozaika koruze (*Satellite maize white line mosaic virus*, SMWLMV) in satelitski virus mozaika tobaka (*Satellite tobacco mosaic virus*, STMV). Omenjene satelitske viruse povezujemo z virusi pomagalcami iz rodov *Aureusvirus*, *Panicovirus*, *Tobamovirus* in *Necrovirus*, za katere je značilno, da nimajo nobene medsebojne podobnosti v nukleotidnem zaporedju, kar kaže na njihov neodvisen razvoj skozi evolucijo. V drugo skupino satelitskih virusov pa uvrščamo satelitski virus kronične čebelje paralize (*Satellite chronic bee-paralysis virus*, SCBPV) (Astier in sod., 2007b; Hu in sod., 2009; ICTVdB Management, 2006).

SatDNA so ponavadi krožne molekule DNA dolžine cca 1,3 kb, ki kodirajo nestrukturni protein in imajo pomembno vlogo pri patogenosti njihovih begomovirusov pomagalcev.

2.4.1 Satelitske RNA (satRNA)

SatRNA so kratke molekule RNA, ki so ponavadi krajše od 1,5 kb. Od svojega virusa pomagalca niso odvisne le za pomnoževanje in premikanje po rastlini ampak tudi za enkapsidacijo in prenos med rastlinami, pri čemer izkoriščajo kapsido svojega virusa pomagalca (Astier in sod., 2007b, Fritsch in sod., 1993; Hu in sod., 2009).

Virusni delci, ki vsebujejo satRNA so serološko identični virusu pomagalcu, razlikovati se jih da le po sedimentacijski stopnji (Kurath in Robaglia, 1995; Bos, 1999).

Enoverižne satRNA so razdeljene v tri podskupine:

- velike satRNA,
- male linearne satRNA in
- krožne satRNA.

Raziskave dokazujejo, da se je vsaka satRNA tekom evolucije razvijala skupaj s svojim virusom pomagalcem (Kurath in Robaglia, 1995). Hipoteze o izvoru satRNA se razlikujejo glede na to ali kodirajo zapis za protein ali ne. Velike satRNA, ki kodirajo zapis za protein se bi lahko razvile iz nukleotidnih zaporedij genomske RNA virusov z izgubo večine funkcij. Male in krožne satRNA brez informacijske aktivnosti pa so bogate s sekundarnimi strukturami, zato predvidevajo, da so se razvile iz malih krožnih molekul RNA (npr. viroidov) (Astier in sod., 2007b).

Rastlina igra kot gostitelj pomembno vlogo pri učinkovitosti pomnoževanja satRNA. Velike satRNA virusa črne obročavosti paradižnika (*Tomato black ring virus*, TBRV) se zelo slabo podvojujejo v rastlinah *Chenopodium quinoa*, vendar zelo učinkovito v rastlinah *Nicotiana clevelandi* in *Petunia hybrida* in najučinkoviteje v rastlinah *Nicotiana benthamiana*. Tudi satRNA virusa rumene lisavosti cikorije (*Chicory yellow mottle virus*, ChYMV) in virusa mozaika kumar (*Cucumber mosaic virus*, CMV) se v buči (*Cucurbita pepo*) veliko slabše podvojujejo kot v tobaku. Prav tako kot gostiteljska rastlina, uspešnost replikacije določa tudi genotipska različica virusa pomagalca. Dve sorodni genotipski različici virusa CMV pomnožujeta satRNA CMV v buči s popolnoma različno učinkovitostjo. Ta razlika naj bi bila določena na molekuli RNA1 virusa pomagalca (Roossinck in sod., 1992).

Številne satRNA, ki se pojavljajo skupaj z nepovirusi, uvrščamo k velikim satRNA ali krožnim satRNA, medtem ko v podskupini malih linearnih satRNA ne najdemo nobenega predstavnika, ki bi se pojavljal z virusi iz rodu *Nepovirus* (Astier in sod., 2007b; Hu in sod., 2009; ICTVdB Management, 2006).

2.4.1.1 Velike satelitske RNA

V to skupino uvrščamo satRNA linearne oblike, ki so velike od 0,7 do 1,5 kb in kodirajo vsaj en nestrukturni protein (v velikosti od 20 do 48 kD), zato jim nekateri rečejo tudi informacijske satRNA (messenger satRNA) (Astier in sod., 2007b; Bos, 1999; Fritsch in

sod., 1993; Hu in sod., 2009; Kurath in Robaglia, 1995). Velike satRNA se podvojujejo na podoben način kot genomska RNA virusov pomagalcev (Kurath in Robaglia, 1995). Protein, ki ga kodira satRNA so najprej odkrili *in vivo* pri okužbi s satRNA TBRV na katerem je bilo kasneje narejenih največ študij o velikih nepovirusnih satRNA (Kurath in Robaglia, 1995). Podobne satRNA so našli tudi pri drugih nepovirusih, npr.: virusu prikrite obročkaste pegavosti rdečelistne slive (*Myrobalan latent ringspot virus*, MLRSV), virusu obročkaste pegavosti pese (*Beet ringspot virus*, BRSV), virusu prikrite obročkaste pegavosti rdečih jagod (*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV), ChYMV, prikritem virusu vinske trte iz Bolgarije (*Grapevine Bulgarian latent virus*, GBLV), ArMV in GFLV. Proteini, ki jih kodirajo, so nujni a ne zadostni za replikacijo satRNA (Astier in sod., 2007b; Fritsch in sod., 1993; Hans in sod., 1993; Hemmer in sod., 1993; Hu in sod., 2009; ICTVdB Management, 2006; Kurath in Robaglia, 1995; Liu in Cooper, 1993). Še vedno ne poznamo funkcije proteina kodiranega na satRNA BRV, ki ga prav tako uvrščamo v rod *Nepovirus* (Latvala-Kilby in sod., 2000).

V nasprotju pa so pri veliki satRNA virusa mozaika bambusa (*Bamboo mosaic virus*, BaMV) iz rodu *Potexvirus* našli protein P20, velik 20 kDa, ki ni nujen za replikacijo satRNA, ampak sodeluje pri sistemskih premikih satRNA BaMV po rastlini. Preferenčno se veže na 5' in 3' nekodirajočo regijo satRNA BaMV in interagira s CP in MP virusa pomagalca BaMV (Astier in sod., 2007b; Hu in sod., 2009; Lin in Hsu, 1994; Tsai in sod., 1999).

Oncino in sod. (1995) so na modelnem primeru velike satRNA TBRV ugotovili, da 48 kDa protein, ki ga kodira, določa specifičnost interakcije med satRNA in virusom pomagalcem na nivoju replikacije. To so nazorno dokazali tudi s psevdo-rekombinantami iz dveh serotipov TBRV. Serotip TBRV-G ne more pomnoževati satRNA serotipa TBRV-S in obratno. Ko so naredili psevdo-rekombinantni izolat, ki je vseboval RNA1 serotipa TBRV-G in RNA2 serotipa TBRV-S, je ta pomnoževal le satRNA TBRV-G. Torej specifičnost interakcije med virusom pomagalcem in satRNA ni na nivoju RNA2 molekule, ki kodira CP, pač pa je na nivoju RNA1 molekule, ki kodira proteine za replikacijo.

Centralni del 48 kDa proteina satRNA TBRV ima najbolj ohranjeno regijo, ki bi lahko predstavljala domeno s katero se veže na replikacijski kompleks virusa (Hemmer in sod., 1987). Torej specifičnost interakcije med satRNA in virusom pomagalcem najverjetneje določa le nekaj aminokislin na domenah replikacijskega kompleksa virusa pomagalca, ki interagirajo z ohranjeno domeno na proteinu satRNA (Oncino in sod., 1995).

Po eni teoriji naj bi protein satRNA interagiral z replikazo virusa pomagalca in jo s tem konformacijsko tako spremenil, da bi prednostno prepoznavala satRNA. Podobno funkcijo imajo tudi določeni proteini kodirani na genovski RNA virusa (npr. HP pri GFLV, za pomnoževanje RNA2 molekule). Po drugi teoriji naj bi protein direktno interagiral z lastno satRNA in s tem omogočil vezavo virusne replikaze na satRNA (Oncino in sod., 1995).

Velike satRNA ne kažejo podobnosti z virusom pomagalcem, razen na zelo kratkih terminalnih delih nukleotidnega zaporedja (Astier in sod., 2007b; Fritsch in Mayo, 1989). Kratko ohranjeno nukleotidno zaporedje (UGAAAA), ki ga najdemo na 5' koncu genoskih RNA virusov TBRV in GFLV ter na 5' koncu satRNA TBRV, satRNA GFLV, satRNA ChYMV in satRNA ArMV, je verjetno povezano s proteinom VPg. Primerjave 3' koncev niso pokazale značilne podobnosti v nukleotidnem zaporedju (Fuchs in sod., 1989; Kurath in Robaglia, 1995). Skupno nukleotidno zaporedje na 5' koncu je skoraj popolnoma ohranjeno med RNA molekulami različnih nepovirusov in popolnoma ohranjeno med RNA molekulami istega virusa (Hemmer in sod., 1987; Le Gall in sod., 1988). Tudi Oncino in sod. (1995) so ugotovili, da 3' nekodirajoča nukleotidna zaporedja satRNA TBRV ne predstavljajo specifične domene za replikacijo, medtem ko imajo 5' konci zaradi specifičnega nukleotidnega zaporedja in sekundarne strukture pomembno vlogo v procesu replikacije.

V glavnem so spremembe bolezenskih znamenj, ki jih povzročajo virusi pomagalci ob prisotnosti velikih nepovirusnih satRNA majhne ali pa jih sploh ni. To so potrdili za satRNA virusov TBRV, SLRSV, ChYMV in GFLV (Fritsch in sod., 1993). Vendar je to zelo odvisno tudi od gostiteljske rastline. V obsežnejši študiji z 42 rastlinami, ki gostijo ArMV, so ugotovili, da lahko satRNA ArMV povzroči povečanje bolezenskih znamenj, ki jih povzroča virus ArMV, pri treh rastlinah (med drugim pri rastlini *Nicotiana megalosiphon*), medtem ko jih zmanjša pri kar 10 gostiteljskih rastlinah. Prav tako satRNA TBRV na gostiteljski rastlini *C. amaranticolor* povzroči zmanjšanje lokalnih poškodb na listih (Fritsch in sod., 1993; Fritsch in Mayo, 1989; Murant in sod., 1973). Fuchs in sod. (1991b) so ugotovili, da satRNA GFLV-F13 zmanjša količino virusa pomagalca GFLV ter zmanjša intenziteto bolezenskih znamenj na gostiteljski rastlini. Saldarelli in sod. (1993) niso potrdili rezultatov prejšnje raziskave.

Za satRNA TBRV, satRNA MLRSV ter satRNA ArMV so dokazali, da se lahko pakirajo v proteinske kapside v različnih kombinacijah, z ali brez genoske RNA virusov pomagalcev. Za satRNA TBRV so dokazali tudi, da se na dolge razdalje prenaša z ogorčicami najverjetneje zato, ker se pakira v kapsido virusa pomagalca TBRV, prenaša pa se tudi preko semen (Fritsch in Mayo, 1989).

2.4.1.2 Male linearne satelitske RNA

Male linearne satRNA so dolge manj kot 700 nukleotidov (Hu in sod., 2009; Kurath in Robaglia, 1995). Ker nimajo biološke informacijske funkcije (njihov genom ne kodira funkcionalnih proteinov) jim rečemo tudi neinformacijske male linearne satRNA (Bos, 1999; Astier in sod., 2007b; Fritsch in Mayo, 1989). Njihova biološka funkcija temelji v glavnem na njihovem nukleotidnem zaporedju in sekundarnih strukturah (Astier in sod., 2007b). So brez poli(A) repa in VPg terminalnih struktur, kot jih najdemo v genomu virusa pomagorca (Kurath in Robaglia, 1995).

Tudi pri malih linearnih satRNA so ugotovili specifične interakcije med satRNA in virusom pomagalcem. Pantaleo in Burgyan (2008) sta odkrila, da se mala linearna satRNA virusa pomagorca obročkaste pegavosti orhidej (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) iz družine *Tombusvirus* lahko še bolje pomnožuje v drugem virusu pomagalcu iz iste družine, saj je podobnost na določenih regijah nukleotidnega zaporedja med malo linearno satRNA CymRSV in virusom pomagalcem iz te družine večja.

Male satRNA v povezavi z virusom pomagalcem povzročajo zelo različna bolezenska znamenja, nekatere jih zmanjšajo, druge povečajo, vendar je to v veliki meri odvisno tudi od gostiteljske rastline. V Južni Evropi so male satRNA povzročiteljice številnih epidemij (Bos, 1999; Astier in sod., 2007b).

V to skupino uvrščamo satRNA CMV, satRNA CymRSV, satRNA virusa izrastkov in mozaika graha (*Pea enation mosaic virus*, PEMV), satRNA GRV, satRNA virusa mozaika prosa (*Panicum small mosaic virus*, PMV), satRNA virusa zaknelosti arašidov (*Peanut stunt virus*, PSV), satRNA virusa kodravosti repe (*Turnip crinkle virus*, TCV), satRNA izolata B10 virusa zaknelosti in grmičavosti paradižnika (*Tomato bushy stunt virus - B10*, TBSV-B10) in satRNA izolata B1 virusa zaknelosti in grmičavosti paradižnika (*Tomato bushy stunt virus - B1*, TBSV-B1) (Hu in sod., 2009, ICTVdB Management, 2006).

2.4.1.3 Krožne satelitske RNA

Med krožne satRNA uvrščamo majhne, do 400 nukleotidov dolge krožne RNA molekule, ki nimajo biološko značilne informacijske funkcije, zato jim rečemo tudi, tako kot malim linearnim satRNA, neinformacijske krožne satRNA (Astier in sod., 2007b; Hu in sod., 2009).

Krožne satRNA se podvojujejo podobno kot viroidi na način kotalečega se kroga, kjer prihaja do samocepitve v monomere z ribocimsko aktivnostjo terciarne strukture molekule

RNA v obliki »glave kladiiva« (hammerhead) (Hu in sod., 2009; Kurath in Robaglia, 1995). Ribocim je molekula RNA, ki zaradi specifične terciarne strukture deluje kot encim, ki katalizira kemijsko reakcijo samocepitve RNA molekule na točno določenih mestih. RNA ligaza v celici pa verjetno sproži zvijanje krožne satRNA (Astier in sod., 2007b). Večina krožnih satRNA ima ohranjeno nukleotidno zaporedje, ki leži ob samocepitvenem mestu in tvori ohranjene sekundarne strukture (Kurath in Robaglia, 1995). Krožna satRNA TRSV ima 69% od skupno 359 nukleotidov povezanih v sekundarne strukture (Astier in sod., 2007b).

Znanih je osem krožnih satRNA, ki jih uvrščamo med rodove *Sobemovirusov*, *Nepovirusov* in *Luteovirusov*. Največ študij na krožnih satRNA iz rodu nepovirusov so naredili na TRSV (Kurath in Robaglia, 1995), njihovo prisotnost pa so potrdili tudi pri ChYMV in izolatu ArMV iz hmelja. Izolati ArMV imajo lahko torej prisotna dva tipa satRNA. V ostale rodove uvrščamo krožne satRNA izolata RPV virusa rumene pritlikavosti žit (*Cereal yellow dwarf virus-RPV*; CYDV-RPV), virusa prehodne progavosti lucerne (*Lucerne transient streak virus*, LTSV), virusa lisavosti pasjega zelišča (*Solanum nodiflorum mottle virus*, SNMoV), virusa lisavosti podzemne detelje (*Subterranean clover mottle virus*, SCMoV), in virusa žametne lisavosti *Velvet tobacco* (*Velvet tobacco mottle virus*, VTMoV) (Astier in sod., 2007b; Hu in sod., 2009; ICTVdB Management, 2006).

Za krožne satRNA TRSV in ArMV so dokazali, da se v okuženem tkivu nahajajo v krožni obliki, medtem ko se enkapsidirajo kot linearne molekule (Fritsch in Mayo, 1989).

Stabilnost satRNA molekul je zaradi njihove sekundarne strukture izredno velika, za satRNA CMV so dokazali, da v rastlinah tobaka ostane infektivna 25 dni v odsotnosti virusa pomagalca (Roossinck in sod., 1992).

Že Davies in Clark (1983) sta v svojih raziskavah pokazala, da male krožne satRNA ArMV igrajo pomembno vlogo pri izražanju bolezenskih znamenj v naravni gostiteljski rastlini hmelju in testni rastlini *Chenopodium quinoa*.

Enako kot za velike satRNA so tudi za krožno satRNA ArMV dokazali, da se enkapsidira skupaj z genomskimi RNA virusa ArMV in se tako prenašajo z ogorčicami, prav tako kot s semeni (Davies in Clark, 1983).

2.4.2 Prisotnost satelitske RNA pri virusih GFLV in ArMV

Za dokazovanje prisotnosti satRNA so v dosedanjih raziskavah uporabljali metodo molekularne hibridizacije s specifično sondo (Mayo in sod., 1982; Pinck in sod., 1988; Fuchs in sod., 1989; Fuchs in sod., 1991a; Hans in sod., 1992; Saldarelli in sod. 1993; Kreiah in sod., 1993; Saldarelli in sod., 1994) ali pa metodo RT-PCR (Latvala-Kilby in sod., 2000; Wetzel in sod., 2006).

Fuchs in sod. (1991a) so testirali deset GFLV in osem ArMV izolatov iz različnih gostiteljskih rastlin in geografskega izvora na prisotnost satRNA z molekularno hibridizacijo s specifično sondo, pripravljeno na podlagi znanega nukleotidnega zaporedja satRNA GFLV-F13. Ugotovili so, da je satRNA prisotna le pri enem izolatu GFLV in dveh izolatih ArMV.

Saldarelli in sod. (1993) so na podoben način analizirali naravno prisotnost satRNA pri 34 izolatih GFLV iz Italije in Jordanije. Rezultati so pokazali, da se male molekule RNA z enako velikostjo in nukleotidnim zaporedjem, podobnim francoski genotipski različici virusa GFLV-F13, pojavljajo pri približno 15% rastlin vinske trte, naravno okuženih z GFLV. SatRNA so odkrili v ekstraktih rastlin *C. quinoa*, ki so bile predhodno okužene z ekstrakti okuženih trsov, vendar so z metodo hibridizacije odtisa northern določili manj satRNA v trsih kot v *C. quinoa*.

Z metodo RT-PCR so Wetzel in sod. (2006) dokazali prisotnost velike satRNA ArMV v 8 od 47 izolatov ArMV iz vinske trte, španskega bezga in hmelja.

2.4.3 Napredki v raziskavah satelitov

SatRNA imajo številne prednosti zaradi katerih so nekatere raziskave lažje izvedljive: so zelo stabilne *in vivo* zaradi odpornosti na cepitve z nukleazami, imajo visoko stopnjo izražanja in se jih lažje pomnožuje in sekvencira zaradi njihove majhnosti. Majhnost satRNA omogoča lažjo določitev nukleotidnega zaporedja in pripravo DNA kopij celotnih dolžin v primerjavi z daljšimi nukleotidnimi zaporedji RNA molekul virusov pomagalecev, lažje se jih tudi klonira in genetsko spreminja (Hu in sod., 2009; Fritsch in Mayo, 1989).

Objavljene so bile številne študije, v katerih so uporabili molekule satRNA v obliki cDNA klonov za okuževanje rastlin. Iz potomk teh rastlin so izolirali klone satRNA, jih analizirali in dokazali nastanek genetskih sprememb. Številne druge raziskave so vključevale replikacijo mutiranih satelitskih genomov, narejenih *in vitro* z manipulacijo cDNA klonov. Ugotovili so, da se lahko številne male substitucije, delecije ali insercije pogosto ohranjajo

pri nekaterih satRNA, večje mutacije pa so ali letalne ali vodijo v genetske spremembe njihovih potomcev (Kurath in Robaglia, 1995).

Od takrat, ko je bila prvič opažena tekmovalnost satRNA z replikacijo virusa pomagalca, ki se je kazala v zmanjševanju bolezenskih znamenj virusne okužbe, so se odprla nova vprašanja in izzivi, kako bi na ta način zaščitili poljščine (Fritsch in Mayo, 1989).

Nedavne raziskave so pokazale, da je patogenost satRNA in virusa pomagalca določena z zapletenim tekmovanjem med gostiteljsko rastlino, virusom pomagalcem in satRNA za RNA-utiševalni sistem gostiteljske rastline. Predvidevajo, da RNA-utiševalni mehanizem gostiteljske rastline igra pomembno vlogo pri patogenosti in evoluciji satRNA. Na ta način specifične strukture in nukleotidna zaporedja na nekodirajoči regiji satRNA verjetno uravnavajo patogenost virusa pomagalca tako, da preusmerijo RNA-utiševalne poti gostitelja v svoj prid. V novejših raziskavah so ugotovili, da lahko satRNA zmanjšujejo, povečujejo ali ne spreminjajo bolezenskih znamenj, ki jih povzročajo virusi pomagalci. S katerimi tarčnimi mesti delujejo na RNA-utiševalni mehanizem in povzročajo različne tipe bolezenskih znamenj pri gostiteljskih rastlinah zaenkrat še ni znano. Pri večini rastlinskih vrst satRNA zmanjšuje replikacijo in kopičenje virusa pomagalca, kar se kaže v manj izraženih bolezenskih znamenjih na gostiteljski rastlini. V nekaterih primerih pa satRNA, ki zmanjšuje bolezenska znamenja v številnih gostiteljih, poveča njihovo izražanje v določenih drugih gostiteljih, kot v primerih letalnega odmiranja paradižnika in močnih sistemskih kloroz pri tobaku, popru in paradižniku (Hu in sod., 2009).

Pantaleo in Burgyan (2008) sta v raziskavah satRNA CymRSV dokazala, da je njeno kopičenje močno odvisno od temperature in prisotnosti P19, ki deluje kot utiševalni zaviralni protein virusa pomagalca, kar kaže na pomembno vlogo RNA-utiševalnega mehanizma pri tekmovanju satRNA in CymRSV v celici. Raziskave so pokazale nenavadno prilagoditev virusa na svojega gostitelja z uporabo protivirusnih utiševalnih odzivov gostitelja za kontrolo satRNA. Szittyi in sod. (2003) so ugotavljali vpliv temperature na RNA-utiševalni mehanizem, ki omogoča osnovno obrambo evkariontskih celic pred virusi. Poizkuse so delali na protoplastih rastline *Nicotiana benthamiana* predhodno okuženih s CymRSV pri temperaturah 15, 21, 24 in 27 °C. Ugotovili so, da nižje temperature zavrejo RNA-utiševalni mehanizem. Mala (21 do 26 nukleotidov) interferenčna RNA (siRNA) je osnovna molekula RNA-utiševalnega mehanizma, katere raven se pri nižjih temperaturah močno zmanjša, zato so rastline v hladnem bolj dovzetne za okužbe z virusi.

Manfre in Simon (2008) sta proučevala vlogo virusnega CP pri uravnavanju RNA-utiševalnega mehanizma za namen vpliva na pomnoževanje genomske RNA TCV. Ugotavljala sta ali zmanjšanje količine virusa pomagalca TCV zaradi prisotnosti satRNA vključuje delovanje RNA-utiševalnega mehanizma in ali CP deluje kot zaviralni protein. Mutirala sta tarčna mesta CP in dokazala, da je CP potreben za s satRNA povezano utišanje virusa pomagalca TCV.

2.5 GENETSKA RAZNOLIKOST RNA VIRUSOV

RNA virusi se zelo hitro spreminjajo oz. so genetsko raznoliki predvsem zaradi manjše natančnosti replikacije in neučinkovitih ali odsotnih popravljalnih mehanizmov. Razlog so tudi kratki generacijski časi, hitra replikacija in posledično velika populacija virusov v okuženem organizmu (Jerman in Štern, 1999; Moya in sod., 2000). Populacije rastlinskih virusov so posledično genetsko heterogene. Potomci, ki se genetsko razlikujejo od svojih staršev se imenujejo mutante ali genotipske različice ali kvazivrst (quasispecies). Genetsko spreminjanje skozi čas imenujemo evolucija virusa (Garcia-Arenal in sod., 2003).

Najpogostejši genetski spremembi pri virusih sta mutacija (sprememba virusnega genetskega materiala) in rekombinacija (izmenjava genetskega materiala med dvema sorodnima virusoma ali genotipskima različicama istega virusa). Mutacije, kot so insercije, delecije ali zamenjave (substitucije) nukleotidov, so primarni vir raznolikosti. O verjetnosti za ohranitev mutacije odloča zlasti njen fenotipski učinek, ki bodisi zvišuje zmogljivost organizma (ugoden oz. pozitiven učinek), jo ohranja (nevtralna mutacija) ali jo zmanjšuje (neugodna oz. negativna mutacija) (Jerman in Štern, 1999). Ni znano koliko je fenotipsko neugodnih mutacij, saj se s selekcijo izločijo iz populacije, zaradi onemogočene replikacije ali širjenja virusa (Jerman in Štern, 1999; Drake in sod., 1998).

Pri rastlinskem RNA virusu mozaika tobaka (*Tobacco mosaic virus*, TMV) so na podlagi preučevanja gibalnega proteina hitrost mutacij ocenili na eno nukleotidno spremembo na genom pri vsaki replikaciji. 69% mutacij so predstavljale insercije in delecije, večkrat celo treh ali več baz, nukleotidnih zamenjav pa je bilo le 31%, kar je ravno obratno kot poročajo za DNA viruse. Tretjina vseh mutant je vsebovala več kot eno mutacijo (multiple mutante) (Malpica in sod., 2002). Velika hitrost mutacij RNA virusov je prej posledica težnje po čim hitrejšem pomnoževanju kemijsko nestabilnega genoma RNA, kot pa evolucijska strategija virusov (Drake in sod., 1999).

Rekombinacija je izmenjava genetskega materiala med procesom replikacije in se pojavi v rastlini, če je ta okužena z dvema ali več sorodnimi virusi ali več genotipskimi različicami istega virusa. Ločimo tri osnovne tipe rekombinacij RNA: natančno homologno, nenatančno homologno (aberrant homologous) in nehomologno rekombinacijo. Obe homologni rekombinaciji se pojavita med dvema verigama RNA z enakim ali sorodnim zaporedjem. Pri prvi pride do prekrivanja verig na natančno homolognem mestu, pri nenatančni homologni rekombinaciji pa tudi na drugih mestih, kar privede do nastanka hčerinske verige z duplikacijami, delecijami ali insercijami. Nehomologna rekombinacija poteče med dvema različnima ali nesorodnima verigama RNA (Lai, 1995). Nagy in Bujarski (1995) sta opozorila na dejstvo, da lahko že zelo kratko homologno zaporedje, 5 do 15 nukleotidov, med dvema nepodobnima RNA molekulama, privede do rekombinacije. Ta ugotovitev zabriše mejo ločevanja med homolognimi in nehomolognimi rekombinacijami RNA (Masuta, 2002).

Vsekakor je najbolj podprt model, po katerem pride do rekombinacije t.i. menjava matrične verige (»copy choice« ali »template switching model«) (Masuta, 2002; Alejska in sod., 2001). Verjetno pride do preskoka virusne od RNA-odvisne RNA polimeraze skupaj z delom že sintetizirane RNA iz verige RNA enega virusa oz. genotipske različice na verigo RNA drugega virusa oz. genotipske različice. Vzrok preskoka so lahko sekundarne strukture na matrični verigi ali nastanek dupleksa med starševskima verigama RNA (Masuta, 2002).

Dokazali so tudi, da se rekombinacija pojavlja med virusi, ki okužujejo gensko spremenjeno rastlino, in v rastlino vstavljenim virusnim genom. Prvič je bil ta pojav opisan pri virusu razbarvanja in lisavosti kitajskega fižola (*Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV). Virusna mutanta z nepopolnim genom za plaščni protein je z rekombinacijo v gensko spremenjeni rastlini z vstavljenim genom za plaščni protein ponovno pridobila funkcionalen gen (Borja in sod., 1999). Pomembno je tudi zavedanje, da veliko število rekombinacij nastalih v eksperimentalnih pogojih niso realen odsev rekombinacij v naravi, kjer so te dokaj redke (Masuta, 2002; Lai, 1995). Rekombinacije RNA so za rastlinske viruse zagotovo pomemben mehanizem evolucije in prilagoditve na novo okolje. Po drugi strani pa imajo rekombinacije v naravi verjetno pomembno vlogo pri popravljanju mutacij, ki so nastale zaradi nenatančnosti virusne replikaze (Masuta, 2002; Lai, 1992). To pa ne pomeni, da rekombinacije v osnovi ustvarijo funkcionalne molekule RNA brez napak, ki jih povzroči polimeraza, saj ni nujno, da ravno mesta z napakami izzovejo rekombinacijo. Vsekakor pa z rekombinacijami nastane več različnih molekul RNA, izmed katerih je s selekcijo izbrana funkcionalna RNA, ki omogoča preživetje virusa (Lai, 1995; Masuta, 2002).

Rekombinantni virusi lahko kažejo podobne ali spremenjene biološke lastnosti kot njihovi izvorni virusi. Poveča se jim lahko patogenost ali krog gostiteljev, spremeni se lahko tudi učinkovitost ali specifičnost njihovega prenosa z vektorjem (Aaziz in Tepfer, 1999).

2.5.1 Genetska raznolikost virusa GFLV

Virus GFLV ima teoretično velik potencial za genetsko raznolikost, saj okužuje vinsko trto, ki je trajnica in se lahko v rastlini obdrži desetletja, kar omogoča kopičenje mutacij in nastanek novih genotipskih različic (Andret-Link in sod., 2004a). Posamezna rastlina lahko hkrati gosti večje število genotipskih različic istega virusa (Vigne in sod., 2004b; Pompe-Novak in sod., 2007).

Že s hibridizacijsko metodo sta Dodd in Robinson (1984) primerjala podobnost nukleotidnega zaporedja štirih GFLV izolatov iz Škotske in Nemčije ter na podlagi kinetike hibridizacije ugotovila 90% podobnost nukleotidnega zaporedja RNA2 molekule in 60-70% podobnost nukleotidnega zaporedja RNA1 molekule med različnimi serotipi, ter večjo podobnost med virusi znotraj posameznega serotipa.

Naraghi-Arani in sod. (2001) so z metodama RFLP in sekvenciranjem dobili podobne rezultate. V Kaliforniji so sekvencirali gen $2C^{CP}$ 14-ih izolatov GFLV iz osmih vinogradov, ki so kazali različna bolezenska znamenja. Njihova nukleotidna zaporedja so se razlikovala za 11 – 13%, aminokislinska zaporedja pa za 4 – 9%, kar nakazuje na to, da je populacija vsakega izolata GFLV sestavljena iz genetsko raznolikega nabora mutant t.i. kvazivrst. V okviru iste študije so izbrane izolate GFLV z mehansko inokulacijo prenesli tudi na testne rastline *C. quinoa* in z vsakim naslednjim prenosom virusa povečali selekcijski pritisk. Na ta način so se obdržale le na novega gostitelja najbolj prilagojene genotipske različice GFLV. S tem so prišli do ugotovitve, da je za bolj realne podatke o genetski raznolikosti virusa potrebno delati takšne raziskave v primarnem gostitelju.

Vigne in sod. (2004a,b) so z analizo RFLP gena $2C^{CP}$ pri 347 francoskih izolatih GFLV dokazali, da jih 55% (191 od 347) vsebuje eno prevladujočo genotipsko različico, pri ostalih pa so na podlagi kompleksnejših restrikcijskih vzorcev sklepali, da jih vsebujejo več. Z določanjem nukleotidnega zaporedja gena $2C^{CP}$ 93 genotipskih različic GFLV so potrdili, da je raznolikost gena $2C^{CP}$ na nukleotidnem nivoju 0,2 - 13,8%, na aminokislinskem nivoju pa 0,2 - 6,9%. Na istem genu so prvič do takrat odkrili tudi rekombinacijo med genotipskimi različicami GFLV. Kljub vsemu je plašni protein, na podlagi majhne raznolikosti v aminokislinskih zaporedjih, precej genetsko stabilen, saj

pomembno sodeluje pri interakciji virusa z gostiteljsko rastlino in ogorčico ter posledično pri širjenju virusa med celicami in med rastlinami (Andret-Link in sod., 2004b; Belin in sod., 1999).

V nadaljnjih raziskavah so Vigne in sod. (2005), poleg že znane rekombinacije znotraj gena $2C^{CP}$, odkrili tudi rekombinacijo znotraj gena $2A^{HP}$. Na mestu med 220 in 225 nukleotidom istega gena v treh od devetih izolatov so odkrili rekombinacijo tudi Pompe-Novak in sod. (2007). Oboji so dokazali, da velikost gena $2A^{HP}$ v primerjavi z genom $2B^{MP}$ in $2C^{CP}$ najbolj variira (765 – 774 nukleotidov ali 255 – 258 aminokislin) in da se gen $2A^{HP}$ na aminokislinskem nivoju razlikuje v 9 – 15%. Rezultati se ujemajo s podatki znanimi za soroden virus ArMV.

Analize RFLP 20 izolatov virusa GFLV v severni Tuniziji so pokazale prisotnost dveh restrikcijskih tipov, ki se v nukleotidnem zaporedju razlikujejo do 11%. Da si s francoskim izolatom GFLV-F13 delijo kar 93% nukleotidnega in 98% aminokislinskega zaporedja si razlagajo s prenosom sadilnega materiala iz Francije v Tunizijo v času kolonializma (Fattouch in sod., 2005a,b). Tudi pri izolatih iz Tunizije so dokazali pogosto pojavljanje rekombinacij na genu $2C^{CP}$, ter 86 – 98% podobnost te regije na nukleotidnem nivoju in 83 – 99% na aminokislinskem nivoju (Boulila, 2007). Bashir in sod. (2007a) so proučevali raznolikost gena $2B^{MP}$ pri iranskih izolatih GFLV, ki so kazali 83 – 86% podobnost na nukleotidnem nivoju ter 93 – 94% podobnost na aminokislinskem nivoju. Ko so Bashir in sod. (2007b) primerjali gen $2C^{CP}$ iranskih izolatov so prav tako ugotovili 83 – 93% podobnost v njegovem nukleotidnem zaporedju.

Genetsko raznolikost dvanajstih južnoafriških izolatov GFLV so prav tako raziskovali na nivoju gena $2C^{CP}$ (Liebenberg in sod., 2009). Filogenetske analize so pokazale, da jih lahko razdelimo v dve različni subpopulaciji, katerih izolati si delijo 86 - 99% podobnosti v nukleotidnem in 94 - 99% podobnosti v aminokislinskem zaporedju. Med raznolikostjo nukleotidnega zaporedja gena $2C^{CP}$ in izražanjem bolezenskih znamenj ali geografskim izvorom subpopulacij niso našli povezav.

Pompe-Novak in sod. (2007) so z metodo RFLP in sekvenciranjem ocenjevali genetsko raznolikost virusa GFLV znotraj celotnega ORF RNA2 ($2A^{HP}$, $2B^{MP}$ in $2C^{CP}$) devetih izolatov virusa GFLV iz trsov sorte Volovnik v Sloveniji. Dobili so veliko število restrikcijskih tipov (največ na genu $2C^{CP}$ in najmanj na genu $2B^{MP}$), iz česar so sklepali na veliko število genotipskih različic GFLV v naravnih populacijah. V štirih od devetih trsov so določili več genotipskih različic virusa GFLV, kar omogoča naravne rekombinacije med njimi. Trsi okuženi z rekombinantami v genu $2A^{HP}$, niso kazali drugačnih bolezenskih

znamenj od tistih okuženih z nerekombinantnimi izolati GFLV. Našli niso nobene povezave med bolezenskimi znamenji pri trsih sorte Volovnik in genetsko raznolikostjo ter pojavljanjem rekombinacij znotraj RNA2 GFLV.

Najnovejše raziskave pa poročajo tudi o odkritju rekombinacij na RNA2 med dvema in tremi različnimi vrstami virusov iz podskupine A nepovirusov. Vigne in sod. so s sekvenciranjem in analizo SISCAN leta 2008 odkrili več medvrstnih rekombinacij znotraj RNA2, in sicer med genotipsko različico GHu virusa GFLV (GFLV-GHu) iz Madžarske in genotipsko različico Ta virusa ArMV (ArMV-Ta), dveh tesno povezanih nepovirusov podskupine A. Ugotovili so, da je genotipska različica GFLV-GHu rekombinant med GFLV in ArMV s številnimi rekombinacijami na genu $2B^{MP}$ (med 1969 in 2031 bp), $2A^{HP}$ (med 880 in 921 bp) ter na 5' nekodirajoči regiji (med 137 in 160 bp), kar je bila prva študija, ki je pokazala rekombinacijo na 5' nekodirajoči regiji genomske RNA nepovirusov. Za ArMV-Ta pa so odkrili, da je rekombinant z GFLV, prav tako na genu $2B^{MP}$. Wetzel in sod. so leta 2001 odkrili, da ima ArMV-NW na genu $2A^{HP}$ večjo podobnost z GFLV kot z ArMV. Tudi iz Italije so poročali o medvrstnih rekombinacijah na genu $2A^{HP}$, med GFLV in ArMV (Jawhar in sod., 2009).

Mekuria in sod. (2009) so ugotovili 85 - 99% podobnost nukleotidnega zaporedja RNA2 med osmimi izolati virusa GFLV iz Washingtona (ZDA). Ti izolati si z GFLV-F13, GFLV-NW in GFLV-GHu delijo 81 - 92% podobnost, z GDefV 72 - 74% ter z različnimi izolati ArMV 66 - 72% podobnosti v nukleotidnem zaporedju molekule RNA2. Kljub temu da nukleotidna zaporedja teh izolatov kažejo največjo podobnost z izolati GFLV, so na štirih od njih odkrili rekombinacije v genih $2A^{HP}$ in $2B^{MP}$. Gre za znotrajvrstne in medvrstne rekombinacije med tremi sorodnimi virusi iz podskupine A nepovirusov: GFLV, GDefV in ArMV. To je prvo odkritje rekombinacije med GDefV in GFLV in sicer na genu $2A^{HP}$. En izolat GFLV je vseboval celo dve rekombinaciji, eno z ArMV virusom na genu $2A^{HP}$ in drugo z GDefV na genu $2B^{MP}$. Znotrajvrstne rekombinacije, ki so pogostejše, so našli tudi na 5' nekodirajoči regiji ter na RNA1 med genoma 1A in $1B^{Hel}$. Molekule RNA1 štirih izolatov iz Washingtona, ki so jih sekvencirali, so si delile 89% podobnosti v nukleotidnem zaporedju ter 87 - 89% podobnosti z genotipsko različico GFLV-F13.

Vigne in sod. (2009) so v vinogradih, okuženih z GFLV, testirali trse, ki so jih za obdobje 12 let navzkrižno okužili z manj virulentnima sevoma GFLV-GHu in ArMV-Ta. Proučevali so genetsko raznolikost populacij virusov na podlagi molekule RNA2 in pojav znotrajvrstnih rekombinacij med izolati virusa GFLV in GFLV-GHu ter medvrstnih rekombinacij z virusom ArMV-Ta. Z analizo SISCAN so ugotovili, da se pri ArMV-Ta in

GFLV-GHu v obdobju 12 let nukleotidno zaporedje RNA2 ni kaj dosti spremenilo (0,1 - 1,1% za ArMV-Ta in 0,1 - 1,2% za GFLV-GHu). Pri izolatih GFLV je raznolikost RNA2 na nukleotidnem nivoju znašala 0,2 - 13%. Rekombinacije so dokazali med izolati GFLV, ne pa tudi med GFLV in GFLV-GHu ter izolati GFLV in ArMV-Ta. V dodatni študiji, kjer so ugotavljali vpliv inserta virusnega gena $2C^{CP}$ v gensko spremenjenih rastlinah, na nastanek novih rekombinant virusa, rekombinacij po treh letih opazovanja prav tako niso zaznali (Vigne in sod., 2004a,b).

V najnovejši študiji so Oliver in sod. (2010) delali raziskave na 14 GFLV izolatih iz treh Kalifornijskih vinogradov, na celotnem kodirajočem nukleotidnem zaporedju molekule RNA2 (na genih $2A^{HP}$, $2B^{MP}$ in $2C^{CP}$) in nukleotidnem zaporedju gena $1E^{Pol}$ molekule RNA1, ki kodira od RNA-odvisno RNA polimerazo. Dokazali so medvrstno rekombinacijo med GFLV in ArMV pri genomih $2A^{HP}$ in $2B^{MP}$ (855 – 1930 bp) ter potencialno rekombinacijo na genu $1E^{Pol}$ in znotrajvrstno rekombinacijo najpogosteje znotraj gena $2C^{CP}$. Raziskava genetske raznolikosti med Kalifornijskimi izolati in izolati razširjenimi po celem svetu je pokazala jasen selekcijski pritisk, najbolj očiten za gena $2C^{CP}$ in $2B^{MP}$ ter srednje očiten za gen $1E^{Pol}$. Dokazali so tudi, da je raznolikost genov $2A^{HP}$ in $1E^{Pol}$ večja na nivoju aminokislinskega zaporedja kot na nivoju nukleotidnega zaporedja, kar ne drži za gena $2B^{MP}$ in $2C^{CP}$. To bi lahko pomenilo, da celotno aminokislinsko zaporedje ni tako pomembno za funkcijo proteina $2A^{HP}$, ki jo ima pri pomnoževanju molekule RNA2, in je zato bolj genetsko fleksibilno, saj je lahko tudi dolžina tega gena raznolika. Za gen $1E^{Pol}$ pa predvidevajo, da bi s primerjavo celotnega gena dobili večje aminokislinske podobnosti (Mekuria in sod., 2009; Pompe-Novak in sod., 2007; Vigne in sod., 2008).

Faktorji, ki vplivajo na izražanje bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah niso znani. Do zdaj v nobeni od omenjenih študij niso našli povezave med močjo oz. raznolikostjo izražanja bolezenskih znamenj in prisotnostjo rekombinacije oz. raznolikostjo genomske RNA2 virusa GFLV v nukleotidnem zaporedju (Fattouch in sod. 2005a, 2005b; Liebenberg in sod., 2009; Pompe-Novak in sod., 2007; Vigne in sod., 2004a, 2004b, 2005). Našli niso nobene povezave med geografskim izvorom in raznolikostjo virusa GFLV, med geografskim izvorom subpopulacij in bolezenskimi znamenji, niti med različnimi sortami vinske trte in bolezenskimi znamenji. Predvideli so, da bi lahko na izražanje bolezenskih znamenj vplivale večkratne okužbe z različnimi genotipskimi različicami virusa GFLV in da so virusne determinante, ki povzročajo bolezenska znamenja, povezane z nekodirajočo regijo na RNA2 in/ali RNA1.

2.6 GENETSKA RAZNOLIKOST SATELITSKIH RNA

Tako kot pri virusih pomagalcih tudi pri satRNA nenehno nastajajo genotipske različice ali kvazivrste. Primerjave nukleotidnega zaporedja so pokazale, da so zamenjave ene baze, insercije, delecije in rekombinacije pogosti mehanizmi genetskih sprememb med evolucijo satelitov. Seleksijski pritisk, ki vpliva na evolucijo satRNA predstavlja gostiteljska rastlina, kjer poteka replikacija in virus pomagalec, katerega mehanizme za replikacijo in prenos izkoriščajo tudi satRNA (Kurath in Robaglia, 1995; Astier in sod., 2007b).

Nekatere satRNA so zelo specifično vezane na določeno različico nekega virusa pomagalca, medtem ko se lahko druge satRNA pomnožujejo in prenašajo s pomočjo heterolognih virusov. TBRV delimo na dva serotipa: G (G, C) in S (S, L). Aminokislinska zaporedja satRNA TBRV istih serotipov so si homologna v 90%, medtem ko je med proteini satRNA TBRV različnih serotipov le maksimalno 60% homologije (Fritsch in sod., 1993). Tudi Hemmer in sod. (1987) so potrdili, da so podobnosti med satRNA, ki imajo serološko bolj podobne viruse pomagalce, večje kot med tistimi satRNA, ki imajo serološko bolj različne viruse pomagalce. Fritsch in sod. (1984) so ugotovili veliko večjo podobnost satRNA znotraj izolatov TBRV, kot pa je podobnost med satRNA TBRV in satRNA MLRSV, čeprav oba virusa spadata v skupino nepovirusov. Na podlagi teh raziskav so predpostavljali, da so se satRNA skozi evolucijo razvijale in spreminjale skupaj z virusi pomagalci, še preden so se virusi razmejili v posamezne serotipe.

Ko so primerjali satRNA GFLV-F13 iz vinske trte in satRNA ArMV-lilac iz španskega bezga so Liu in sod. (1990) ugotovili, da imata 83% podobnost v nukleotidnem zaporedju. Z ostalimi nepovirusnimi satRNA, kot je satRNA TBRV, pa so te podobnosti veliko manjše razen na 5' koncih nukleotidnega zaporedja. Predvidevajo, da izhajata satRNA GFLV in satRNA ArMV iz skupnega prednika, ki se je relativno pozno v evoluciji razšel v dve veji s prilagoditvijo na posamezni virus (Fritsch in sod., 1993).

Obraten primer prestavlja primerjava satRNA ArMV in satRNA SLRSV, katerih virusa pomagalca okužujeta podobne gostitelje ter se prenašata z isto ogorčico, vendar njuni satRNA nimata skoraj nič podobnosti v aminokislinskem zaporedju (Fritsch in sod., 1993).

Latvala-Kilby in sod. (2000) so z metodo RT-PCR ugotovili prisotnost velike satRNA pri virusu atavizma črnega ribeza (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) in določili njegovo nukleotidno in aminokislinsko zaporedje, ki so ga primerjali z ostalimi velikimi satRNA nepovirusov. Pri vseh, razen SLRSV, so dokazali krajšo ohranjeno regijo (cca 39 nt) na 5'

koncu. Največjo podobnost si je BRV delil s satRNA ChYMV in sicer 63% v nukleotidnem in 45% podobnost v aminokislinskem zaporedju.

Za določitev prisotnosti in genetske raznolikosti izolatov velikih satRNA ArMV različnega geografskega izvora in iz različnih naravnih gostiteljskih rastlin so Wetzel in sod. (2006) razvili metodo RT-PCR-PREM, s katero so ločili šest različnih tipov satRNA. Velike satRNA ArMV iz šestih izolatov (štiri iz vinske trte, enega iz španskega bezga ter enega iz hmelja) so klonirali in jih sekvencirali. Dobljena satRNA ArMV-lilac iz španskega bezga in satRNA ArMV-Hop iz hmelja (Anglija) sta kazali 73 - 75% podobnost v nukleotidnem in 57 - 58% podobnost v aminokislinskem zaporedju s satRNA ArMV-NW (Nemčija) iz vinske trte. ArMV-NW si je z GFLV-F13 podoben v 68% nukleotidnega in 64% aminokislinskega zaporedja.

Največ raziskav o raznolikosti in evoluciji satRNA je bilo narejenih na malih satRNA CMV, dolgih 330 – 340 bp, ki so si med sabo v nukleotidnem zaporedju podobne 85 - 99%. Ker ne kodirajo proteinov, na njihov genom vplivajo drugi selekcijski pritiski, kot je ohranitev funkcionalne in stabilne sekundarne strukture molekule. Raznolikost satRNA CMV ni naključna, skoncentrirana je na določenih predelih molekule. Razlike v nukleotidnem zaporedju satRNA CMV kažejo na to, da je med njihovo evolucijo prihajalo do majhnih substitucij, delecij in insercij. Študije dvajsetih satRNA, izoliranih iz okuženega polja iz Španije so pokazale, da nastajajo razlike zaradi kopičenja mutacij že znotraj ene evolucijske linije (Kurath in Robaglia, 1995; Roossinck in sod., 1992).

V primerih, ko izgleda, kot da satRNA niso podvržene raznolikosti, lahko prihaja le do negativne selekcije. Nekatere satRNA se ne pomnožujejo tako učinkovito kot druge, kar je lahko povezano z različnimi različicami virusa pomagorca, ki selektivno pomnožujejo le posamezne satRNA iz mešanice le teh. Na pomnoževanje lahko specifično vplivajo posamezne manjše spremembe v nukleotidnem zaporedju in posledično spremembe sekundarne in terciarne strukture satRNA (Roossinck in sod., 1992).

2.7 METODE ZA DOLOČANJE VIRUSA GFLV V TKIVU VINSKE TRTE IN METODE PROUČEVANJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI

2.7.1 Indeksiranje

Za določanje virusa GFLV v rastlinskem materialu je bilo do sedaj uporabljenih več metod, ki temeljijo na različnih lastnostih virusa. Na infektivnosti virusa temelji indeksiranje, t.j. dokazovanje virusa na rastlinah, ki se po okužbi z določenim virusom vedno in značilno odzovejo na okužbo. Na okužbo z GFLV se tipično odzove vrsta *Vitis rupestris* sorte St. George (Martelli in sod., 1993), ki po 3-4 tednih po okužbi razvije bolezenska znamenja v obliki klorotičnih pik, lis ali črt na listih. Kasneje se lahko razvijejo tudi sistemska bolezenska znamenja, ki se kažejo kot zmanjšana rast, močno nazobčani listi, rumenenje in druge deformacije listov. Testne rastline, ki se uporabljajo za dokazovanje GFLV, so: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphera globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, kumare (*Cucumis sativus*) in fižol (*Phaesolus vulgaris*) (Martelli in sod., 2001).

2.7.2 DAS-ELISA

Med serološkimi metodami se najpogosteje uporablja neposredni sistem dvojnih protiteles t.i. imuno-encimska metoda dvojnega sendviča ELISA (double antibody sandwich, DAS-ELISA) (Huss in sod., 1986), ki je hkrati standardna metoda za določanje GFLV (Nolasco, 2003). Zaradi slabe občutljivosti, za določanje virusa GFLV ni zadovoljiva v primerih, ko je njegova koncentracija nizka (ko je virus v latentni fazi, če vzorčimo floem vinske trte v vročem obdobju rastne sezone) (Walter in Etienne, 1987; Rowhani in sod., 1992; Bouyahia in sod., 2003). Med serološkimi metodami za določanje GFLV pa poznamo tudi test ImmunoStrip, ki je hitrejši in enostavnejši za interpretacijo kot test DAS-ELISA (Liebenberg in sod., 2009).

2.7.3 RT-PCR in LDA

Zaradi slabe občutljivosti seroloških metod je prišlo do razvoja molekularnih metod, ki temeljijo na določanju nukleinskih kislin virusa. Najprej so se za določanje virusa GFLV razvile hibridizacijske metode z radioaktivno ali z dioksigeninom označeno cDNA sondo (Fuchs in sod., 1991; Gemmrich in sod., 1993). Kasneje je prišlo do razvoja RT-PCR, ki sestoji iz dveh reakcij: reakcije reverzne transkripcije (reverse transcription, RT) in verižne reakcije s polimerazo (polymerase chain reaction, PCR). Metoda RT-PCR je primerna za določanje rastlinskih virusov, ki so prisotni v nizkih koncentracijah ali so neenakomerno razporejeni v rastlinskem tkivu (Wetzel in sod., 2002), zato je bilo do zdaj razvitih že

veliko metod RT-PCR za določanje posameznih različic virusa GFLV v tkivu vinske trte ali za namen sekvenciranja. Od teh večina pomnožuje najboljše preučen gen $2C^{CP}$ molekule RNA2 (Buzkan in Walker, 2004; Fattouch in sod., 2001; Gambino in sod., 2006; Liebenberg in sod., 2009; Osman in Rowhani, 2006; Osman in sod., 2008; Pompe-Novak in sod., 2007; Rowhani in sod., 1993; Wetzel in sod., 2002) ena pa tudi gena $2A^{HP}$ in $2B^{MP}$ (Pompe-Novak in sod., 2007).

V zadnjem času avtorji poročajo o razvoju RT-PCR v realnem času (RT-PCR-RČ) (Blahova in Pidra, 2009; Osman in Rowhani, 2006), ki je hitrejša, bolj specifična in občutljivejša metoda v primerjavi z ostalimi molekularnimi metodami ter omogoča kvantifikacijo virusa (Gachon in sod., 2004). RT-PCR-RČ so nadgradili z metodo, imenovano low density arrays (LDA), ki omogoča sočasno določanje različnih rastlinskih virusov v vzorcu. V primerjavi z RT-PCR-RČ je metoda LDA hitrejša in cenejša pri določanju različnih rastlinskih virusov (Osman in sod., 2008). Vendar so vse metode do zdaj narejene za pomnoževanje le določenih različic virusa GFLV in tako niso primerne za diagnostiko virusa, za kar se še vedno uporablja test DAS-ELISA (Nolasco, 2003).

Glavni razlog, da univerzalna molekularna diagnostična metoda še ne obstaja in ni v uporabi je izredno velika raznolikost virusa GFLV (Naraghi-Arani in sod., 2001; Pompe-Novak in sod., 2007; Vigne in sod., 2004b), ki zelo otežuje konstruiranje univerzalnih začetnih oligonukleotidov in sond. Določanje prisotnosti virusov z molekularnimi metodami v rastlinskem materialu je pogosto ovirano ali onemogočeno tudi zaradi inhibitorjev, ki so prisotni v rastlinskih ekstraktih in inhibirajo aktivnost encimov reakcije RT-PCR (Rowhani in sod., 1995; Osman in Rowhani, 2006). Ker lahko to vpliva na omejitev uporabe RT-PCR zaradi zmanjšane občutljivosti metode (Wetzel in sod., 2002), je za odstranitev inhibitorjev oz. zmanjšanje njihove aktivnosti zelo pomembna učinkovita metoda izolacije RNA iz rastlinskega materiala. Do danes je razvitih že kar nekaj takšnih metod izolacije RNA.

2.7.4 PCR v realnem času (PCR-RČ)

Metoda PCR v realnem času se je pojavila leta 1993 kot nadgradnja metode PCR z namenom zaznavanja nastajajočih produktov PCR neposredno med samo reakcijo pomnoževanja DNA (Higuchi, 1993). Posledično analiza produktov PCR z agaroznim gelom pri PCR-RČ ni potrebna, kar zmanjša možnost navzkrižne okužbe in skrajša postopek določanja. Pri PCR-RČ poteka zaznavanje produktov PCR na osnovi merjenja sproščene fluorescence, ki se med reakcijo povečuje ali zmanjšuje, odvisno od kemije reakcije. Zaradi detekcije fluorescence je mogoče pomnoževanje kratkih odsekov DNA

(50-150 bp v primeru hibridizacijskih sond in ≤ 300 bp v primeru uporabe specifičnih barvil za dsDNA), kar zagotavlja večjo specifičnost, ponovljivost in ponavadi tudi občutljivost metode PCR-RČ v primerjavi z metodo PCR. Krajši amplikoni so bolj tolerantni na pogoje reakcije, saj lažje denaturirajo, kar omogoča, da sonde in začetni oligonukleotidi učinkoviteje tekmujejo za vezavna mesta na tarčnem nukleotidnem zaporedju, hkrati pa je čas podaljševanja krajših amplikonov krajši (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002).

Trenutno obstaja več kemij za PCR-RČ in tudi več različnih naprav z viri svetlobe različnih valovnih dolžin in z različnimi detektorji. Ne glede na izbrano kemijo, oz. napravo, je osnovni princip zaznavanja količine nastalega produkta PCR skupen. Zaradi fluorescenčnega označevanja nastajajočih produktov PCR, je njihova količina sorazmerna izmerjeni fluorescenci. In ker fluorescenco merimo ves čas poteka reakcije, torej v realnem času, lahko izrišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov pomnoževanja amplikona. Računalniški program preračuna spremembo v signalu fluorescence (ΔR_n) po enačbi $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$, kjer je R_n^+ fluorescenca produkta v katerikoli časovni točki med pomnoževanjem, R_n^- pa fluorescenca ozadja v isti časovni točki. Končni rezultat, ki ga poda računalniški program za izvedbo PCR-RČ, je prikazan kot diagram odvisnosti ΔR_n od števila ciklov, ki ima vsaj tri faze: lag fazo, kjer je zaradi nizke začetne količine produkta PCR fluorescenčni signal še tako šibak, da ga ne moremo razlikovati od ozadja; eksponentno fazo in plato fazo, kjer fluorescenčni signal saturira zaradi porabe ene od kritičnih komponent reakcije. Prag določljivosti je določen tako, da seka krivuljo fluorescenčnega signala v točki, kjer je fluorescenca nastalega produkta statistično signifikantno višja od fluorescence ozadja, kar je vedno v začetnem delu eksponentne faze. Število ciklov, ki so potrebni za dvig signala fluorescence nad prag določljivosti, predstavlja vrednost C_q (quantitative cycle). Od začetnega števila kopij tarčne molekule je odvisno, koliko ciklov reakcije PCR bo potrebnih, da bo fluorescenčni signal presegel prag določljivosti, pri čemer večje začetno število kopij tarčnega zaporedja zahteva manjše število ciklov (manjša vrednost C_q). Na ta način je s PCR-RČ omogočeno tudi natančno kvantificiranje nukleinskih kislin v širokem dinamičnem razponu ($>10^7$ -krat), zaradi česar PCR-RČ imenujemo tudi kvantitativni PCR (quantitative PCR, qPCR) (Bustin in sod., 2005; Giulietti in sod., 2001; Kubista in sod., 2006; Walker, 2002). Korelacijski koeficient (R^2) in linearni razpon meritev, nam pove kakšen je razpon koncentracij oz. faktorjev redčitve, pri katerih so vrednosti C_q v linearnem odnosu z $\log_{10}$ koncentracijami tarčne RNA.

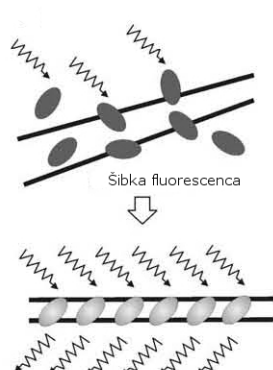
2.7.4.1 Mehanizmi različnih kemij pri PCR v realnem času

V grobem lahko razdelimo načine fluorescenčnega označevanja v dve skupini: v prvo sodijo fluorescenčna barvila, ki se nespecifično, torej neodvisno od nukleotidnega zaporedja, vežejo na dvoverižno DNA (dsDNA) in ob vezavi začnejo oddajati fluorescenco. V drugo skupino pa spadajo s fluorescenčnimi barvili označene sonde ali začetni oligonukleotidi, ki se specifično vežejo na nukleotidno zaporedje tarče pri čemer na različne načine, odvisno od kemije, sproščajo fluorescenco.

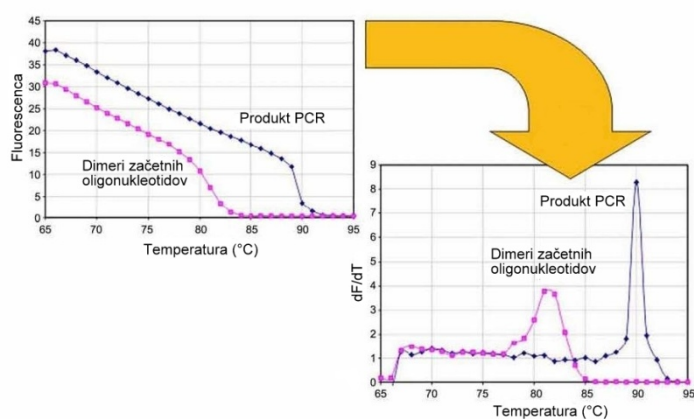
2.7.4.1.1 Nespecifična detekcija

Za nespecifično detekcijo produktov PCR se danes večinoma uporabljata barvili SYBR Green I in BEBO, ki pri enaki količini dsDNA oddajata močnejši signal kot etidijev bromid, ki se uporablja za zaznavanje produktov PCR na agaroznih gelih po reakciji PCR. Fluorescenca teh dveh barvil je v raztopini nezaznavna, ob vezavi na mali jarek DNA pa se za več kot 1000-krat poveča (Kubista in sod., 2006). Pri poteku reakcije PCR se barvilo vgradi v novo nastajajočo dsDNA, zato je njegova fluorescenca, ki jo izmerimo na koncu vsakega koraka podaljševanja, premo sorazmerna s količino nastalega produkta (Slika 12).

Uporaba nespecifičnih barvil ima več slabosti. Ker se vgradijo v vsako dsDNA, zaznamo tudi vse potencialno nespecifične produkte reakcije PCR in dimere začetnih oligonukleotidov, zato moramo biti že pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov pozorni na teoretično tvorbo dimerov. Prisotnost nespecifičnih produktov PCR in dimerov začetnih oligonukleotidov moramo po končani reakciji preveriti z uporabo disociacijske krivulje. To je dodatna stopnja reakcije PCR, pri kateri merimo fluorescenčni signal v odvisnosti od temperature taljenja (melting temperature, T_m). Med dvigovanjem temperature od 60 °C do 95 °C pride pri temperaturi taljenja produkta PCR do sproščanja vezanega barvila in posledično do upada fluorescence. Če je v mešanici PCR prisotnih več produktov PCR, ki imajo različne T_m , zaradi različne dolžine in sestave nukleotidov, jih bomo zaznali na grafu disociacijske krivulje (Slika 13). Druga slabost nespecifične detekcije je, da vezava barvila v dsDNA ni povsem sorazmerna s količino nastalega produkta, saj je odvisna od razmerja med količino prostega barvila in dsDNA, ki se tekom reakcije zmanjšuje. Kljub temu je uporaba nespecifičnih barvil najbolj ekonomsko ugodna različica PCR-RČ in je zato široko uporabljena (Arya in sod., 2005; Kubista in sod., 2006).



Slika 12: Mehanizem delovanja nespecifičnih barvil (SYBRGreen/BOXT0).
Figure 12: Mechanism of sequence non-specific dyes (SYBRGreen/BOXT0)



Slika 13: Disociacijska krivulja prikaže temperaturo taljenja (T_m) amplicona, ki je definirana kot temperatura pri kateri se pojavi najbolj strmo zmanjšanje fluorescenčnega signala, zaradi disociacije obeh verig DNA. Pri SYBRGreen kemiji nam disociacijska krivulja pove ali smo pomnoževali pravilen amplicon, saj imajo nespecifični produkti (npr. dimeri začetnih oligonukleotidov) drugačno dolžino in sestavo nukleotidnega zaporedja in zato drugačno T_m .

Figure 13: Melting curve shows melting temperature (T_m) of the amplicon, which is defined as the point where dye fluorescence drops rapidly as the result of the DNA melting. With SYBRGreen melting curve shows whether right amplicon was amplified, because un-specific product (i.e. primer-dimers) have different length and base pair composition and hence different T_m .

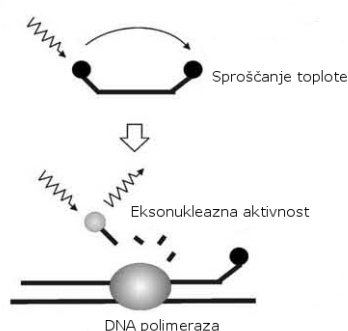
2.7.4.1.2 *Specifična detekcija*

Za specifično detekcijo produktov PCR se danes uporablja že veliko različnih sistemov, ki jih lahko razdelimo v dve podskupini. V prvo spadajo detekcijski sistemi, kjer je sonda označena z dvema barviloma, v drugo pa sistemi kjer je sonda označena z enim barvilom. Sonde, v primerjavi s prej opisanim nespecifičnim detekcijskim sistemom, omogočajo več hkratnih reakcij PCR-RČ (multiplexing) in enostavno detekcijo točkastih mutacij.

Sonde označene z dvema barviloma imajo na eni strani fluorescenčno barvilo ali poročevalec (reporter), na drugi strani pa dušilec (quencher). Vse dokler je sonda intaktna, sta poročevalec in dušilec fizično tako blizu, da se energija poročevalca preko mehanizma fluorescenčnega prenosa resonančne energije (fluorescent resonance energy transfer, FRET), zaradi njunih prekrivajočih spektrov emisije in vzbujanja (ekscitacije), iz poročevalca prenaša na dušilec, ki jo naprej oddaja v obliki toplote ali svetlobe daljše valovne dolžine. Največkrat se uporablja poročevalec, ki ob vzbujanju konstantno fluorescira, in dušilec, ki ne fluorescira (non-fluorescent quencher, NFQ), temveč oddaja prejeto energijo v obliki toplote. Kakor hitro se poročevalec in dušilec prostorsko ločita, bodisi zaradi hidrolize sonde ali zaradi strukturne spremembe v sondi, mehanizem FRET preneha delovati in poročevalec začne ob vzbujanju oddajati energijo v obliki fluorescence. Komercialni sistemi iz te skupine so sonde TaqMan®, kasneje pa so se razvile še druge sofisticirane metode, ki so prav tako osnovane na mehanizmu FRET, med njimi: molekulske svetilke (Molecular Beacons), hibridizacijske sonde in škorpijoni (Scorpion primers) (Arya in sod., 2005; Giulietti, 2001).

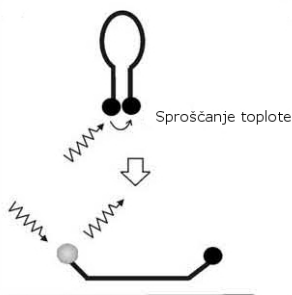
Najpogostejše so v uporabi **hidrolizne sonde ali sonde TaqMan®**, ki so osnovane na izkoriščanju 5'→3' eksonukleazne aktivnosti encima *Taq* polimeraze, kar pomeni, da lahko razgrajuje eno, medtem ko pomnožuje drugo verigo nukleinske kisline. Sonda je skonstruirana tako, da nalega na tarčno zaporedje ene od verig med dvema specifičnima začetnima oligonukleotidoma. Vse tri elemente skupaj imenujemo amplikon. Sonda je na 5' terminalnem koncu označena s poročevalcem (npr. 6-karboksifluorescein: FAM) in na 3' koncu z dušilcem (npr. 6-karboksi-tetra-metilrodamin: TAMRA), ki zaduši ekscitirano fluorescenco poročevalca po principu FRET. Ko začne DNA polimeraza sintetizirati homologno verigo na odseku med obema začetnima oligonukleotidoma naleti na sondo, ki leži med njima, in jo zaradi svoje 5'-eksonukleazne aktivnosti razgradi (Slika 14). To je mogoče, ker se pri sistemu TaqMan naleganje in podaljševanje dogaja pri isti temperaturi, kar zagotavlja, da sonda med samim podaljševanjem nalega na tarčno zaporedje in jo lahko polimeraza uspešno razgradi. Posledično se poročevalec in dušilec oddaljita, poročevalec pa ob ekscitaciji fluorescira, kar zaznamo z detektorjem v aparaturi za PCR-RČ.

Fluorescenca poročevalca je tako sorazmerna količini nastajajočega produkta PCR (Bustin, 2000). Sonde TaqMan® imajo lahko vezano molekulo MGB (minor groove binder) z vlogo dušilca, ki se veže na mali jarek DNA in s tem ojača vezavo z DNA. MGB tvorijo z enoverižno molekulo DNA stabilne duplekse in tako povečajo T_m oligonukleotidov v primerjavi z nemodificiranimi sondami DNA (Afonina in sod., 1997; Kutuyavin in sod., 2000). Zaradi tega sta lahko sonda MGB (višja T_m) in s tem tudi celoten ampikon krajša. Takšne sonde so bolj specifične, saj lahko razločijo polimorfizem posameznih nukleotidov (single nucleotide polymorphism, SNP). Zaradi učinkovitejšega dušenja fluorescence so tudi občutljivejše, saj je fluorescenca ozadja nižja. Podobne rezultate lahko dobimo tudi s sondami, pri katerih je močnejša vezava na tarčno zaporedje zagotovljena z modificiranimi nukleotidi LNA (locked nucleic acid) (Bustin, 2002; Kutuyavin, 2000).



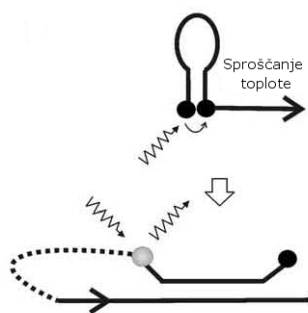
Slika 14: Hidrolizna ali TaqMan sonda.
Figure 14: Hdrolisis or TaqMan probe.

Molekularne svetilke (Molecular Beacons) so sonde s posebno sekundarno strukturo v obliki stebila, ki je sestavljeno iz kratkih komplementarnih regij, in zanke, ki je komplementarna tarčnemu zaporedju. Na terminalnih delih sonde sta pripeta poročevalec in dušilec, ki sta zaradi sekundarne strukture intaktne sonde, čisto skupaj. Zato zaradi pojava FRET intaktne sonde ne oddajajo fluorescenčnega signala. Ob prisotnosti tarčnega zaporedja in ob primerni temperaturi naleganja sonda spremeni konformacijo v linearno obliko in se veže z daljšim delom zanke na tarčno zaporedje v stabilnejše stanje, pri čemer se molekuli poročevalca in dušilca dovolj oddaljita, da pojav FRET ni več mogoč in poročevalec zasveti (Slika 15). Te sonde lahko zaradi visoke specifičnosti razlikujejo tarčna nukleotidna zaporedja, ki se razlikujejo le v enem nukleotidu (Bustin, 2000; Giulietti, 2001).



Slika 15: Molekularne svetilke.
Figure 15: The molecular becons.

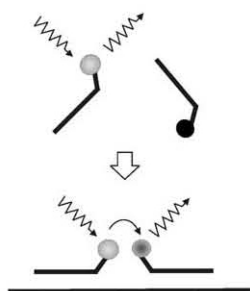
Pri **škorpijonih (Scorpion primers)** gre za kombinacijo dveh začetnih oligonukleotidov, kjer je eden klasičen, drugi pa ima vlogo sonde in začetnega oligonukleotida. Skupaj tvorita dupleks, pri čemer je sonda oblikovana v strukturo zanke, kar povzroči bližanje molekul poročevalca na 5' koncu in dušilca na 3' koncu sonde in onemogoča sproščanje fluorescence. Nukleotidno zaporedje na zanki je komplementarno zaporedju na amplikonu tik za mestom kjer nalega začetni oligonukleotid. Ko se začetni oligonukleotid poveže s komplementarnim delom na tarčnem zaporedju, začne polimeraza na tem mestu podaljševati verigo amplikona. Takoj po disociaciji novonastale verige od matrične verige se zanka škorpijona odpre in poveže s komplementarnim zaporedjem na amplikonu pri čemer poročevalec, zaradi prekinjenega pojava FRET, zasveti (Slika 16). V primerjavi s prej opisanimi sistemi so škorpijoni hitrejši pri vezavi na tarčno zaporedje in oddajajo močnejšo fluorescence, vendar jih ne moremo uporabljati za disociacijsko krivuljo, ker dupleks ostane del produkta PCR (Arya in sod., 2005; Bustin, 2002; Giulietti, 2001).



Slika 16: Dupleks začetni oligonukleotid - sonda pri škorpijonu.

Figure 16: Scorpion duplex primer - probe.

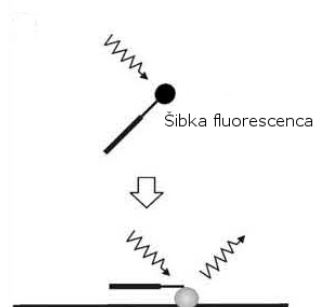
Pri detekciji s pomočjo **hibridizacijskih sond** se uporablja sistem štirih oligonukleotidov: dveh začetnih oligonukleotidov in dveh sond, ki na isto verigo tarčnega zaporedja nalegata čisto skupaj in od katerih je ena na 3' koncu označena z donorskim in druga na 5' koncu z akceptorskim barvilom. V fazi denaturacije sta sondi prosto v raztopini in lahko vzbudimo le fluorescence donorskega barvila, ki jo detektor prezre. Med fazo naleganja začetnih oligonukleotidov in sond na tarčno zaporedje barvili sond prideta čisto skupaj, kar omogoči pojav FRET, pri čemer emitirana energija donorja vzbudi akceptor, ki emitira energijo v obliki fluorescenčne svetlobe daljše valovne dolžine (Slika 17). Fluorescenčni signal detektiramo le, če obe sondi nalegata na pravilno tarčno zaporedje, kar poveča specifičnost reakcije. Med fazo podaljševanja obe sondi oddisocirata od tarčne molekule. Da sondi ostaneta intaktni, je priporočljiva uporaba polimeraze brez 5'-eksonukleazne aktivnosti (Bustin, 2000).



Slika 17: Hibridizacijske sonde.

Figure 17: The hybridization probes.

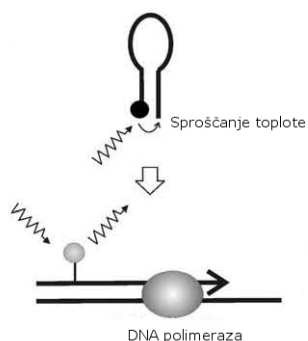
V drugo podskupino pa spadajo sistemi, kjer je sonda označena z enim samim barvilom, kateremu se fluorescenca po vezavi na tarčno DNA močno spremeni. Komercialni sistemi iz te skupine so sonde Light Up, sonde AllGlo, sonde Displacement, ter sonda Simple. **Sonda Light Up** so sestavljene iz peptidnih nukleinskih kislin (peptide nucleic acid, PNA), in imajo vezano le poročevalsko molekulo tiazol oranž. Ob vezavi na tarčno zaporedje se izrazito poveča intenziteta fluorescence (Slika 18) (Kubista in sod., 2006).



Slika 18: Sonda LightUp.

Figure 18: The LightUp probe.

Pri tehnologijah LUX in Plexor se namesto sond uporabljajo fluorescenčno označeni začetni oligonukleotidi. Pri **LUX** je eden od začetnih oligonukleotidov na 3' koncu označen s poročevalcem, drugi pa je navaden. Fluorescenca prvega začetnega oligonukleotida je zadušena zaradi sekundarne zankaste strukture, vse dokler se v času naleganja ne veže na tarčno molekulo, takrat se razpre in poročevalec začne oddajati fluorescenco (Slika 19).



Slika 19: začetni oligonukleotid LUX

Figure 19: LUX primer

Pleksor se od ostalih sistemov razlikuje po močnem fluorescenčnem signalu v začetku reakcije, ki z večanjem količine PCR produkta skozi reakcijo, enakomerno pada. Eden od začetnih oligonukleotidov vsebuje na 5' koncu sintetično bazo izo-citozin (izo-dCTP) vezano na poročevalec, drugi pa je normalen. Med podaljševanjem verige se nasproti izo-dCTP veže izo-gvanin (izo-dGTP) iz reakcijske mešanice, ki je povezan z dušilcem, zato se signal ob njuni vezavi zmanjša.

2.7.4.2 Uporaba PCR v realnem času pri rastlinah

Pri rastlinah se PCR-RČ uporablja za identifikacijo in kvantifikacijo rastlinskih simbiotov in povzročiteljev bolezni, za ugotavljanje mutacij, ugotavljanje prisotnosti in kvantifikacijo tarčne DNA v živilih in krmi (npr. mikotoksinov, vključenega transgena v gensko spremenjenih rastlinah (GSR)); ugotavljanje kontaminacije hrane ali krme z drugimi vrstami ali z gensko spremenjenimi organizmi (GSO), ugotavljanje prisotnosti določenih sestavin v hrani (gluten), za ugotavljanje izražanja rastlinskih genov in razlikovanje med posameznimi pripadniki genskih družin, ki so specifična značilnost rastlin (Gachon in sod., 2004; Giulietti in sod., 2001).

Tudi pri vinski trti se PCR-RČ uporablja za diagnostiko rastlinskih povzročiteljev bolezni (npr. virusov, gliv in bakterij, vključno s fitoplazmami) (Angelini in sod., 2007; Dreo in sod., 2007; Osman in sod., 2007; Osman in Rowhani, 2006; Osman in sod., 2008) ter za njihovo razločevanje (Hren in sod. 2007, Nikolić in sod., 2010). Prav tako pa se kvantitativni PCR-RČ pri vinski trti pogosto uporablja za proučevanje fizioloških procesov s spremljanjem izražanja genov (Fernandez in sod., 2007; Puiggros in sod., 2005; Atoui in sod., 2007) kot pomoč pri analizi funkcionalnosti genov (Hren in sod., 2009; Mathieu in sod., 2005).

2.7.4.3 Kvantifikacija s PCR v realnem času

Dinamični razpon kvantifikacije pri PCR-RČ je ponavadi več kot 7 redov velikosti, kar je veliko več kot pri klasičnem PCR (Bustin in sod., 2005). Obstajata dva principa kvantifikacije pri PCR-RČ: absolutna ali bolje rečeno kvantifikacija s standardno krivuljo, kjer določamo dejansko število kopij tarčne molekule v vzorcu; ter relativna kvantifikacija, kjer primerjamo število kopij tarčne molekule med različnimi vzorci, hkrati pa vrednosti normaliziramo glede na vzdrževalni gen, da izničimo vse variabilnosti, ki so nastale med samim postopkom (Arya in sod., 2005).

2.7.4.3.1 Absolutna kvantifikacija

Za absolutno kvantifikacijo potrebujemo standard, ki predstavlja vzorec (*in vitro* prepisana RNA, *in vitro* sintetizirana ssDNA, prečiščena plazmidna dsDNA, PCR produkt amplikona) z znano koncentracijo (število kopij). Iz standardnega vzorca naredimo serijo redčitev in iz njih standardno krivuljo odvisnosti vrednosti C_q od znane koncentracije, ki predstavlja "absolutni" eksterni standard. (Giulietti in sod., 2001; Valasek in Repa, 2005). Na podlagi vrednosti C_q lahko za neznan vzorec iz standardne krivulje določimo število kopij tarčne molekule.

Izraz "absolutna kvantifikacija" ni čisto točen, saj gre kljub vsemu za kvantifikacijo glede na eksterno kontrolo standardnega vzorca, za katerega, ne glede na izvor ali natančnost meritev, ne moremo resnično vedeti koliko kopij tarčne DNA vsebuje. Velik problem kvantifikacije glede na eksterno kontrolo predstavlja vpliv inhibitorjev v bioloških vzorcih, ki pa niso prisotni v prečiščenem vzorcu RNA, ki se uporablja za pripravo standardne krivulje, kar lahko vodi v podcenitev količine tarčne RNA v testnih bioloških vzorcih Nolan in sod., 2006. Kljub temu pa omenjena metoda omogoča najnatančnejšo določitev števila kopij tarčne molekule v vzorcu. Metoda je zelo zamudna saj je potrebna predhodna priprava standardne krivulje za vsak amplikon posebej (Ginzinger, 2002).

Kot najboljši standard se smatra *in vitro* prepisano RNA, ker je najbolj podobna tarčni molekuli, ki jo kvantificiramo. Pripravimo jo tako, da amplikon ligiramo v plazmidni vektor in ga *in vitro* prepišemo v RNA transkript. Nato prisotno DNA popolnoma razgradimo z DNazami, da lahko fotometrično čim natančneje kvantificiramo le RNA ter iz absorbance (pri 260 nm) in z upoštevanjem molekularne teže RNA, izračunamo število kopij amplikona na μg RNA. Že pri tem koraku so dokazali večje razlike pri uporabi različnih spektrofotometrov, zato je za primerljive rezultate priporočljiva stalna uporaba le enega spektrofotometričnega sistema, kot tudi v nadaljevanju, uporaba istih kemikalij in naprave za PCR-RČ (Bustin in sod., 2005). Standardno krivuljo izrišemo na podlagi PCR-RČ rezultatov dobljenih z uporabo serijsko redčenega standarda RNA, kar 3-krat ločeno

ponovimo. Ker je priprava takega standarda zamudna ter stabilnost pripravljene RNA vprašljiva, se ta metoda uporablja le v primerih, ko je res nujno potrebno poznati število kopij tarčne molekule, npr. pri kvantifikaciji virusov za ugotavljanje napredovanja okužbe v kliničnih študijah ter pri določanju natančne količine GSO v hrani ali krmi (Bustin, 2000; Giuletta in sod., 2001).

Drugi način je sprejemljiva in enostavnejša alternativa prvemu načinu, ko se kot standard uporablja *in vitro* sintetizirana ssDNA celotnega amplikona, kar je mogoče le, če je amplikon krajši od 100 bp (Bustin, 2000).

Najenostavnejša vendar najmanj zanesljiva pa je tudi uporaba prečiščene plazmidne dsDNA z insertom tarčnega zaporedja ali pa kar produkt PCR amplikona, ki predstavlja tarčno zaporedje. Takšen standard je enostaven za kvantifikacijo in vzdrževanje stabilnosti, vendar ne odraža variabilnosti nastale zaradi koraka RT, ki ima ponavadi največji vpliv na učinkovitost reakcije.

2.7.4.3.2 Relativna kvantifikacija

Kadar količina standarda ni poznana, lahko kvantificiramo le relativno glede na izbrani kalibratorski vzorec. Obstajata dva principa relativne kvantifikacije s PCR-RČ: metoda pri kateri lahko iz serijskih redčitev izračunamo in potem tudi upoštevamo učinkovitost reakcij PCR ter primerjalna relativna metoda, kjer učinkovitost reakcij ni upoštevana (Giuletta in sod., 2001).

Za natančno relativno kvantifikacijo je nujna izbira primerne metode normalizacije, ki popravi vire nespecifične variabilnosti (količina in kvaliteta RNA, učinkovitost reakcij RT in PCR-RČ, razlike med tkivi v aktivnosti izražanja genov itd.) (Bustin, 2002). Razlike nastanejo predvsem zaradi razlik v količini in kvaliteti vnesene RNA v reakcijo ter pri reakciji RT. Razlike, ki nastanejo v fazi reakcije PCR-RČ, so praktično zanemarljive, saj se pri kvantifikaciji upoštevajo vrednosti C_q , ki so določene zelo zgodaj v eksponentni fazi reakcije, očitne razlike v PCR-RČ pa nastanejo le med eksponentno in plato fazo reakcije.

Podatke lahko normaliziramo:

- glede na vhodno število celic ali tkiva,
- glede na količino celokupne RNA,
- z uporabo eksternih kontrol,
- z uporabo internih kontrol (vzdrževalni / referenčni geni).

Normalizacija na vhodno število celic ali tkiva je večinoma zelo težko izvedljiva, hkrati pa ne upošteva variabilnosti zaradi različnega izražanja genov, kvalitete RNA ter variabilnosti nastale zaradi učinkovitosti reakcij RT in PCR-RČ.

Normalizacija na količino celokupne RNA je problematična iz več vidikov. Pri zelo majhnih količinah tkiva (npr. pridobljenih z mikrodisekcijo tkiva ali ene celice) je natančna kvantifikacija RNA zelo težko izvedljiva, hkrati pa se ne upošteva učinkovitost reakcij RT in PCR (Brunner in sod., 2004). Še močnejši argument proti takšni normalizaciji je dejstvo, da je celokupna RNA večinoma ribosomalnega izvora (rRNA) in zato velikokrat ne predstavlja realne količine mRNA. To so dokazali z odkritjem nihanja razmerja rRNA : mRNA med različnimi fiziološkimi stanji (Bustin in sod., 2005). Odkrili so, da je nihanje količine rRNA lahko pogojeno tudi z biološkimi dejavniki in zdravili. V prečiščenih vzorcih mRNA ter pri cDNA nastali z uporabo oligo-(dT)₂₁V začetnih oligonukleotidov, pa zaradi odsotnosti rRNA takšna normalizacija ni mogoča (Vandesompele in sod., 2002).

Uporaba eksternih kontrol je problematična s stališča nestabilnosti kontrolne mRNA (npr. luciferazne), ki jo dodamo v eni izmed začetnih faz priprave vzorcev (najbolje pred izolacijo RNA), zato je stalno preverjanje razgrajenosti takšne kontrole nujno potrebno (Brunner in sod., 2004; Toplak in sod., 2004). Pri uporabi plazmidne DNA z vnesenim normalizatorskim genom, kot eksterne kontrole, ni upoštevan vpliv učinkovitosti reakcije RT.

Zato je normalizacija na primeren vzdrževalni / referenčni gen (normalizer gene / reference gene / housekeeping gene / internal reference / endogenous control) najboljša metoda, saj lahko le tako upoštevamo vse dejavnike nepredvidene variabilnosti. Ker se izolira in pomnožuje skupaj s tarčnimi nukleinskimi kislinami, lahko na ta način zaznamo inhibicijo kot tudi izgubo tarčnih molekul med procesiranjem. Primeren vzdrževalni gen mora biti izražen enako v vseh osebkih, ne glede na tkivo, stadij razvoja organizma in eksperimentalne pogoje (Bustin, 2000; Giulietti in sod., 2001). Izbira vzdrževalnega gena je zato ključna in najtežja za natančno relativno kvantifikacijo.

V preteklih raziskavah se avtorji niso pretirano ukvarjali z izbiro vzdrževalnega gena, kasneje pa se je izkazalo, da jih veliko sploh ni primernih za določen eksperiment. Zaključek je, da je najprimerneje za vsak eksperiment preizkusiti več vzdrževalnih genov in med njimi izbrati dva do tri najprimernejše, ter za normalizacijo upoštevati njihovo geometrijsko povprečje. Zelo pomembno je izbirati med geni, ki pripadajo različnim funkcionalnim razredom, kar zmanjša možnost, da bi bili ko-regulirani in zaradi tega izraženi v enakem razmerju. Vandesompele in sod. (2002) so za lažje testiranje primernosti

vzdrževalnih genov razvili program GeNorm, ki izmeri stabilnost izražanja genov na podlagi principa, da mora biti razmerje izraženosti dveh neodvisnih vzdrževalnih genov identično v vseh vzorcih, ne glede na eksperimentalne pogoje ali celični tip. M vrednost pod 0,5 je zagotovilo, da je variacija vrednosti C_q med referenčnimi geni zelo majhna, kar pomeni, da je njihovo izražanje stabilno.

Vzdrževalni geni, ki so kazali stabilno izražanje pri rastlinah, so ribosomska RNA (18S); (Brunner in sod., 2004; Iskandar in sod., 2004; Kim in sod., 2003; Nicot in sod., 2005), geni za ubikvitin (Brunner in sod., 2004), tubulin (Coker in Davies, 2003), aktin (Kim in sod., 2003), elongacijski faktor 1- α (Nicot in sod., 2005), GAPDH (Coker in Davies, 2003; Kim in sod., 2003) in citokrom oksidazo (COX) (Weller, 2000). Izbira idealnega vzdrževalnega gena za vsak poizkus posebej je ključna za zagotovitev kredibilnih rezultatov, še posebej če gre za kvantifikacijo genov v rastlinah gojenih pri različnih eksperimentalnih ali okoljskih pogojih, v različnem tkivu, različnem celičnem tipu, pri različnih stadijih razvoja, itd. (Brunner in sod., 2004; Giulietti in sod., 2001).

2.7.4.3.2.1 Obdelava podatkov PCR-RČ

Začetno obdelavo podatkov se izvede že v programu SDS 2.3 (Applied Biosystems). Fluorescenco produkta v vsaki luknjici program normalizira na fluorescenco referenčnega barvila ROX, s čemer izniči razlike zaradi lokacije na ploščici. Program za vsako luknjico izmeri tudi fluorescenco ozadja - šum (background) in izračuna bazno linijo.

Program za vse luknjice na 384 ploščici izriše graf naraščanja ΔRn skozi cikle reakcije, čemur rečemo krivulja pomnoževanja. Ročno ali avtomatsko se nastavi linija fluorescenčnega praga, ki predstavlja intenziteto fluorescence vzorca (ΔRn), ki je značilno višja od ozadja. Na podlagi tega program za vsako reakcijo posebej izračuna, v katerem ciklu je ΔRn presegel nastavljeni prag (threshold). Točko, pri kateri fluorescenca vzorca preseže fluorescenčni prag, imenujemo C_q . Vrednost C_q je obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNA, zato jo lahko uporabljamo za izračun absolutne ali relativne količine cDNA, ki vsebuje določen ampikon.

Relativno kvantifikacijo lahko razdelimo na dva dela: i) normalizacijo izražanja preučevanega gena z referenčnim genom, katerega izražanje naj se v različnih pogojih in stanjih ne bi spreminjalo in ii) izbor kalibratorskega vzorca, na katerega primerjamo vse ostale vzorce s tem da izračunamo razliko med vrednostmi C_q kalibratorskega in testnega vzorca. Za vrednost C_q vedno upoštevamo povprečno vrednost C_q dveh ponovitev.

Geometrijsko povprečenje vrednosti C_q dveh ali več referenčnih genov, naj bi bilo zelo zanesljivo orodje za normalizacijo (Vandesompele in sod., 2002).

Osnovna metoda relativne kvantifikacije je primerjalna metoda vrednosti C_q ($2^{-\Delta\Delta C_q}$ metoda), kjer se vrednost C_q testiranega gena normalizira na vrednost C_q vzdrževalnega gena. Dobljena vrednost normaliziranega testnega gena pa se nato izrazi relativno glede na izraženost istega gena pri izbranem kalibratorskem vzorcu, ki je lahko npr. netretiran vzorec, vzorec v točki nič ali eden ali povprečje več izbranih testnih vzorcev. Ta metoda sloni na predpostavki, da je učinkovitost pomnoževanja (efficiency, E) vseh testiranih genov 100%. Učinkovitost pomnoževanja se izračuna po formuli:

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

in je vrednost med 0 oz. 0% (do pomnoževanja ni prišlo) in 1 oz. 100% (vse molekule tarčne RNA so se v enem ciklu reakcije PCR podvojile). 100% učinkovitost pomnoževanja ustreza naklonu umeritvene krivulje $s = -3.33$, kar pomeni da se količina DNA z vsakim ciklom točno podvoji, kar pa je v praksi v bioloških vzorcih zelo redek pojav (Livak in Schmittgen, 2001; Giulietti, 2001).

Zelo je pomembno tudi, da imata amplikon za vzdrževalni gen in amplikon za tarčni gen enake ali vsaj zelo podobne učinkovitosti pomnoževanja. Druga predpostavka primerjalne metode, ki velja za vse vrste kvantifikacij pa je, da imamo idealen vzdrževalni gen (van Guilder in sod., 2008).

Za natančnejšo relativno kvantifikacijo uporabljamo izračun, ki upošteva tudi učinkovitost pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena (lahko tudi več njih), za vsak vzorec posebej (Pfaffl, 2001).

$$r = \text{razmerje} = \frac{(E_{\text{tarča}})^{\Delta C_{q \text{ tarča}} (\text{kalibrator-vzorec})}}{(E_{\text{referenca}})^{\Delta C_{q \text{ referenca}} (\text{kalibrator-vzorec})}} \quad \dots(2)$$

Tarča je tarčni gen, katerega izražanje želimo kvantificirati, *referenca* pa referenčni / vzdrževalni gen.

Stoodstotna učinkovitost pomnoževanja se nanaša na vrednost $E = 2$, ki jo v tem primeru izračunamo po enačbi (3).

$$E = 10^{\frac{-1}{s}} \quad \dots(3)$$

Z učinkovitostmi pomnoževanja in normalizacijo na referenčni gen izločimo potencialne razlike med vzorci, nastale zaradi razlik v učinkovitosti izolacije RNA, RT in pomnoževanja. Dobljene vrednosti r so tako proporcionalne količini virusne RNA v vsakem vzorcu glede na količino virusne RNA v kalibratorskem vzorcu. Če gre v testnem vzorcu za višje vrednosti kot so tiste v kalibratorskem vzorcu, dobimo relativno vrednost r , ki je večkratnik 1, če so vrednosti v testnem vzorcu manjše od tistih v kalibratorskem vzorcu dobimo vrednosti med 0-1, pri čemer v končni fazi ne dobimo linearnega razmerja. Če iz dobljenih vrednosti r naredimo logaritem 2 ($\log_2$) dobimo linearno skalo o tem kolikokrat večje oz. manjše je izražanje gena v testnem vzorcu v primerjavi z izražanjem istega gena v kalibratorskem vzorcu.

2.7.5 Metode proučevanja genetske raznolikosti virusov

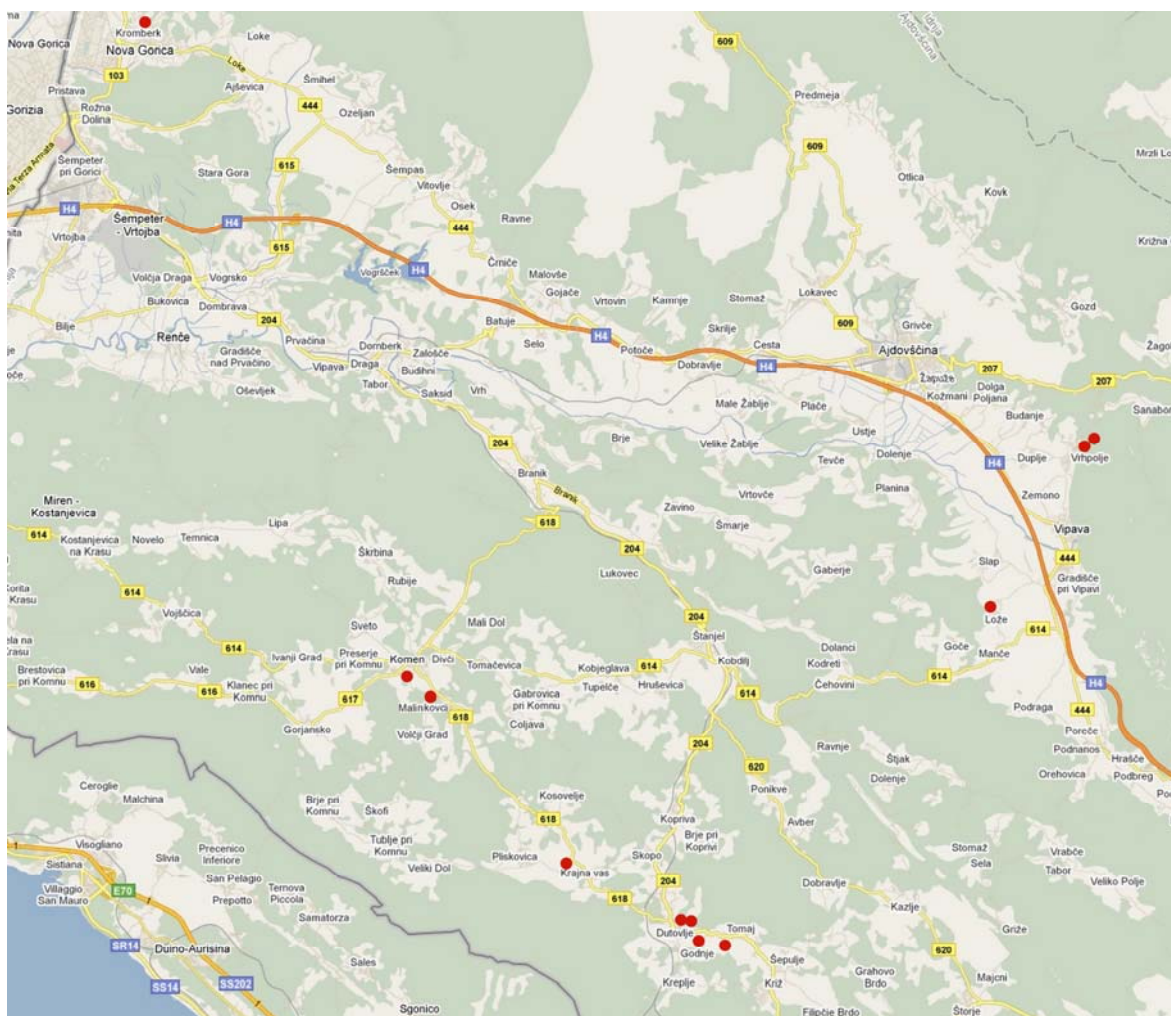
Poleg polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism, RFLP) se za ocenjevanje genetske raznolikosti uporabljajo še druge metode: iskanje prstnih odtisov oz. fingerprinting z ribonukleazo T1, analiza konformacijskega polimorfizma enoverižnih DNA (single stranded polymorphism, SSCP), RT-PCR z delnim kartiranjem z restrikcijskimi encimi (partial restriction enzymatic mapping, PREM), ki omogoča ločevanje zelo podobnih (96%) zaporedij (Wetzel in sod., 2006), ter nekatere hibridizacijske metode (Garcia-Arenal in sod., 2003). Metoda, ki da največ in najnatančnejše informacije o genetski raznolikosti je metoda sekvenciranja.

Z metodo primerjanja nukleotidnih zaporedij, vsakega z vsakim, dobimo za vsak par delež podobnosti med njima. Te deleže lahko na grafu prikažemo kot razmerje med določeno vrednostjo deleža podobnosti v odvisnosti od števila kombinacij s takšno vrednostjo. Rezultati primerjav nukleotidnih zaporedij so eden od pomembnih kriterijev v taksonomiji virusov, takšni grafi pa nam prikažejo jasne razmejitve med vrhovi, ki predstavljajo evolucijsko razdaljo med virusi znotraj ene družine, in s pomočjo katerih lahko uvrstimo viruse ene družine v posamezne taksone (rod, vrsto, različico). Različne družine virusov lahko kažejo podoben vzorec, vendar lahko imajo različne evolucijske razdalje med taksoni (Fauquet in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VINOGRADI

V raziskavo smo vključili trse različnih sort iz vinogradov na različnih lokacijah na Krasu in v Vipavski dolini. Rastlinski material vinske trte *Vitis vinifera* L. smo nabirali v kolekcijskih vinogradih v Ložah in Malinkovcih, selekcijskem vinogradu v Komnu, Ampelografskem vrtu v Kromberku ter privatnih vinogradih v Dutovljah, Tomaju in Vrhopolju (Slika 20).



Slika 20: Geografski prikaz lokacij vinogradov na Krasu in v Vipavski dolini v katerih smo vzorčili material vinske trte. Lokacije so označene z rdečimi pikami (Vir: GoogleMaps).

Figure 20: Geographic representation of locations of vineyards in Kras and Vipava Valley, where the plant material for this study was sampled. Locations are presented with red spots. (Source: GoogleMaps)

Kolekcijski vinograd v Ložah pri Vipavi je bil zasajen leta 1985. Posajenih je bilo 21 starih sort, 10 trsov na sorto, z namenom ohraniti najstarejše vipavske sorte. To so deloma naše stare domače, deloma pa udomačene sorte, ki se pri nas gojijo že najmanj 200 let (Korošec-Koruza, 1992). V Ložah smo opazovali trse sorte Volovnik, ki so kazali sledeča bolezenska znamenja: bifurkacije na členku, kratke medčlenke, dvojne členke, zaraslost poganjkov, ploščata stebila.

Ampelografski vrt Biotehniške fakultete je bil posajen med letoma 1930 in 1940 v Kromberku pri Novi Gorici. Sprva je deloval kot prvi slovenski muzejski vinograd, kjer so bile posajene različne stare sorte vinske trte zbrane iz celotne Vipavske doline. Ker so trse v tem času tudi presajali ter vinograd obnavljali, so trsi, ki smo jih vzorčili in opazovali, mlajši od prvotno posajenih. Danes je vinograd v Kromberku namenjen poskusom, ki potekajo na Biotehniški fakulteti (Klarič, 2004). V Kromberku smo opazovali trse sorte Malvazija, ki so kazali predvsem sledeča bolezenska znamenja: asimetričnost listov, kratki medčlenki, dvojni členki, ni bilo pridelka.

Selekcijski vinograd v Komnu na Krasu je bil zasajen v letih od 1989 do 1991. V njem je od 10 do 20 trsov 78 elit sorte Refoš. Vinograd je bil posajen z namenom izbrati ustrezne elite za klonsko selekcijo in odbiro zdravih cepljenk ter obdržati stare tipe trsov sorte Refoš (Tomažič, 1999). Okuženi trsi so imeli redke bifurkacije na členku, zdravi trsi pa so bili brez bolezenskih znamenj.

Kolekcijski vinograd v Malinkovcih pri Komnu je bil zasajen leta 1998. V njem smo nabrali potomke starih matičnih trsov, ki izvirajo iz vinogradov v Vogljah, Komnu in Krajni vasi. Matični trsi, ki so stari preko 100 let, so pri predhodnih raziskavah pokazali pozitiven rezultat na prisotnost GFLV s testom ELISA. Opazili smo osipavanje jagod ter redkejša grozda. Zaradi pogoste okužbe s plesnimi so imeli ti trsi pogosto suhe jagode ali pa so bili brez pridelka.

Vinogradi v Dutovljah, Tomaju in Vrhpolju so v lasti lokalnih vinogradnikov ter služijo za pridelavo grozdja. Gre za tipične predselekcijske vinograde. V vinogradih v Dutovljah in Tomaju smo pri opazovanih trsih sorte Refoš največkrat opazili kloroze medžilnih prostorov v obliki lis, nagubane liste, zvijanje listov, osipavanje jagod, pa tudi metlasto rast, manjše liste, goste liste in grmast videz trsa. V Vrhpolju smo opazovali trse sort Laški rizling in Župlanka. Trsi sorte Laški rizling so največkrat kazali sledeča bolezenska znamenja: kloroze medžilnih prostorov v obliki lis, kratke medčlenke, dvojne členke. Pri trsih sorte Župlanka smo opazili pahljačavost listov, kratke medčlenke in grmast videz trsa.

Trsi so bili označeni z imenom sorte, ki ji je v nekaterih primerih sledila kratica vinograda, nato pa je sledila številka vrste, v kateri se je trs nahajal, ter zaporedna številka trsa v tej vrsti (npr. Volovnik 2/45 ali Refošk DU 3/13).

V nekaterih vinogradih so bile opravljene tudi analize prisotnosti ogorčice *X. index*, ki predstavlja edinega prenašalca virusa GFLV v naravi. Analize so opravili na Kmetijskem inštitutu v Ljubljani. Prisotnost ogorčic so dokazali na lokacijah: Dutovlje, Kromberk in Vrhpolje, odsotnost pa na lokacijah v Ložah, Malinkovcih in Komnu (neobjavljeni podatki NIB).

3.2 POPISOVANJE BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN ISKANJE NOVIH TRSOV OKUŽENIH Z GFLV

3.2.1 Popisovanje bolezenskih znamenj

Bolezenska znamenja smo popisovali v rastnih sezonah 2006 – 2010 na vseh že okarakteriziranih trsih iz prejšnjih raziskav (Blas, 2006; Vojvoda, 2005) ter na novo najdenih trsih z bolezenskimi znamenji značilnimi za okužbo z virusom GFLV.

Opazovali smo bolezenska znamenja na listih, poganjkih, steblih, socvetjih, grozdih ter celoten izgled trsa. Na listih smo bili pozorni na bolezenska znamenja kot so pahljačavost listov, nesimetrični listi (listni polovici nista enakomerno razviti), peteršiljavost listov, kloroze žil, kloroze medžilnih prostorov v obliki rumenih pik in lis, rumenenje celotnih listov. Na poganjkih smo popisovali bifurkacije na členkih (viličasta rast), bifurkacije na medčlenkih, dvojne členke oz. nasproti ležeča očesa, zraslost poganjkov, ploščata stebila. Na grozdih smo iskali bolezenska znamenja kot so: majhne jagode, majhni grozdi, osipavanje jagod ter redkejši grozdi (manjše število jagod na grozdu), neenakomerno dozorevanje jagod. Pri celotnem izgledu trsa smo opazovali ali so listi manjši in gosti, medčlenki ekstremno kratki ter ali rast trsa posledično daje videz zbite rasti (grma oz. metle).

3.2.2 Nabiranje in homogenizacija rastlinskega materiala novih trsov

Mlade poganjke (mladi list in vršiček) 45 novih trsov različnih sort (Refošk, Sauvignon, Zelen, Vitovska Grganja, Laški rizling, Župlanka) s tipičnimi bolezenskimi znamenji, ki jih povzroča virus GFLV in 4 trse (sort Refošk in Župlanka) brez bolezenskih znamenj smo nabrali na znanih lokacijah v Dutovljah 1 (DU), Komnu, Vrhpolju 1 in Vrhpolju 2, ter na novih lokacijah: Tomaj (TO), Dutovlje 2 (DUK) ter Dutovlje 3 (DUC) na Krasu.

Dvanajst trsov (Preglednica 7, zeleno) smo testirali junija 2007, sedem od teh smo ponovno testirali junija 2008, ko smo testirali še 37 novih trsov (Preglednica 7, črno). Od teh smo jih junija 2009 ponovno vzorčili in testirali še 17 (Preglednica 7, modro).

V ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba, Švica) smo zatehtali po 1 g rastlinskega materiala posameznega vzorca vinske trte, ki smo ga homogenizirali v 10 ml ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (1:10) s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica). Homogeniziran rastlinski material smo s plastičnimi Pasteurjevimi pipetami prenesli iz ekstrakcijskih vrečk v mikrocentrifugirke in shranili na -80 °C do uporabe.

Sestava ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (pH 8,2):

TRIS (Sigma, Nemčija)	264 mM
TRIS-HCl (Sigma, Nemčija)	236 mM
NaCl (Merck, Nemčija)	137 mM
PVP K25 (Fluka, Nemčija)	2%
PEG 6000 (Merck, Nemčija)	2 mM
Tween 20 (Sigma, Nemčija)	0,05%

3.2.3 Test ELISA

S testom ELISA smo dokazovali 9 najpogostejše prisotnih virusov pri vinski trti: GFLV, GFkV, ArMV, GVA, GVB, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 in GLRaV-6. Uporabili smo dve različni tehniki: posredno metodo (indirect PTA ELISA) za virus GVB ter neposredno metodo dvojni sendvič (DAS-ELISA) za vse ostale viruse. V obeh primerih smo na mikrotitrne ploščice v posamezne vdolbinice nanесли negativno in pozitivno kontrolo ter ekstrakcijski pufer. Vse vzorce smo testirali v dveh ponovitvah.

Pri obeh metodah smo uporabili enake pufre:

Pufer za izpiranje za ELISA (pH 7,4)

NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KCl	3 mM
Tween 20	0,05%

Karbonatni pufer za ELISA (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	35 mM

Konjugatni pufer za ELISA (pH 7,4)

TRIS	20 mM
NaCl	137 mM
PVP K25	2%
Tween 20	0,05%
BSA	0,2%
MgCl ₂ *6H ₂ O	1 mM
KCl	3 mM

Substratni pufer za ELISA (pH 9,8)

Dietanolamin	9,7%
--------------	------

3.2.3.1 DAS-ELISA

Test DAS-ELISA smo uporabili za dokazovanje okužb z virusi GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6 in GVA s protitelesi proizvajalca Bioreba.

V vdolbinice mikrotitrne ploščice (Greiner) smo odpipetirali po 200 µl protiteles proti ustreznemu virusu, razredčenih v karbonatnem pufru v razmerju 1 : 1000. Ploščico smo pokrili in jo inkubirali 4h pri temperaturi 30 °C. Po inkubaciji smo vdolbinice 4-krat sprali s pufrom za izpiranje.

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo odpipetirali po 190 µl v ekstrakcijskem pufru homogeniziranega rastlinskega materiala. Ploščico smo inkubirali čez noč pri 4 °C in nato 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. Po izpiranju smo vanje odpipetirali po 180 µl protiteles proti določenemu virusu konjugiranih z alkalno fosfatazo (Bioreba), razredčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000. Po petih urah inkubacije pri 30 °C smo ploščico 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 200 µl p-nitrofenilfosfata s koncentracijo 1 mg/ml v substratnem pufru. Ploščice smo inkubirali na sobni temperaturi ter po 30 minutah, 1 uri, 2 urah in 18 urah pojav rumene barve, ki označuje prisotnost virusa, odčitali fotometrično pri 405 nm. Uporabili smo čitalec mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in program BioLinx 2.20.

3.2.3.2 Neposredni test ELISA (indirect PTA ELISA)

Z neposredno metodo smo dokazovali okužbo z virusoma GVB.

V vdolbinice mikrotitrne ploščice (Greiner) smo odpipetirali po 200 μ l v ekstrakcijskem pufru homogeniziranega rastlinskega materiala ter inkubirali čez noč pri 4 °C. Po končani inkubaciji smo vdolbinice 4-krat sprali s pufrom za izpiranje.

Nadaljevali smo z dodajanjem 190 μ l specifičnih protiteles proti virusu GVB (AgriTest), razredčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000. Po dveh urah inkubacije pri 37 °C smo ploščico 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 180 μ l protiteles proti virusu GVB (AgriTest), konjugiranih z alkalno fosfatazo, razredčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000. Po dveh urah inkubacije pri 37 °C smo ploščico ponovno 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 200 μ l p-nitrofenilfosfata (Sigma, 5 mg tabletko) s koncentracijo 1 mg/ml v substratnem pufru. Ploščice smo inkubirali na sobni temperaturi v temi in po 30 minutah, 1 uri, 2 urah in 18 urah s čitalcem mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in programom BioLinx 2.20 izmerili optično gostoto (OD) pri 405 nm.

3.2.3.3 Obdelava podatkov testa ELISA

Podatke smo obdelali z računalniškim programom Excel (Microsoft). Za vsak vzorec smo iz ponovitev izračunali povprečno vrednost odčitkov. Za vsako ploščico smo narisali grafikon iz fotometričnih odčitkov vzorcev. Iz grafikonov smo na podlagi povišanih in nizkih fotometričnih vrednosti vzorcev določili mejo med pozitivnimi (okuženimi) in negativnimi (neokuženimi) vzorci. Za pozitivne smo večinoma šteli vzorce, pri katerih je bila absorpcija po dveh urah inkubacije vsaj 2-krat večja kot absorpcija referenčne negativne kontrole. Ta način določanja meje med pozitivnimi in negativnimi vzorci se uporablja tudi v rutinskem testiranju.

Kjer meja med pozitivnim in negativnim rezultatom ni bila jasna, smo vzorce, ki imajo povišane fotometrične vrednosti, vendar so te relativno nizke, označili z oznako (?). V takih primerih smo si pomagali tudi s kasnejšimi odčitki po 18 urah, ko smo preverili, ali so se fotometrične vrednosti domnevno pozitivnih vzorcev zares povišale, medtem ko se pri negativnih vzorcih niso bistveno spremenile.

3.3 DOLOČANJE IN RAZPOREDITEV VIRUSA GFLV V VINSKI TRTI SKOZI SEZONO S TESTOM ELISA

3.3.1 Nabiranje rastlinskega materiala

Za izbor trsov smo se odločili na podlagi opazovanj bolezenskih znamenj od leta 2004 naprej ter rezultatov testa ELISA na prisotnost GFLV (Blas, 2006; Vojvoda, 2005). Da bi ugotovili, ali je spreminjanje količine virusa skozi sezono sortno specifično smo na podlagi omenjenih predhodnih raziskav testirali 52 z virusom GFLV okuženih trsov ter 10, z virusom GFLV, neokuženih trsov. Mlade poganjke (mladi list in vršiček) 62 trsov 5 različnih sort (Refošk, Volovnik, Župlanka, Malvazija, Laški rizling) iz sedmih različnih lokacij na Krasu in v Vipavski dolini (Komen, Dutovlje1, Malinkovci, Lože, Kromberk, Vrhpolje1, Vrhpolje2) smo vzorčili 4-krat skozi rastno sezono (junij, julij, avgust in september 2008). Januarja 2009 smo izven rastne sezone vzorčili dormantne rozge (floemsko tkivo) 36 od vseh 64 rastlin (31 okuženih in 5 z virusom GFLV neokuženih trsov). Večina rastlin je kazala izrazita bolezenska znamenja okužbe (različne tipe rumenenja listov in/ali nepravilnosti internodijev in/ali zmanjšanje pridelka), medtem ko smo na sorti Refošk iz Komna le občasno našli posamezne bifurkacije na členkih.

Pri šestih rastlinah vinske trte sorte Refošk (4) in Volovnik (2) iz treh različnih lokacij (Komen, Dutovlje 1, Lože) smo skozi rastno sezono vzorčili vse dele rastlin (mlade liste, stare liste, vitice, grozd/socvetje, floemsko tkivo, korenine) ter izven rastne sezone (januarja) floemsko tkivo dormantnih poganjkov in pri štirih od njih še korenine. Januarja nismo vzorčili floema in korenin obeh trsov iz Dutovelj 1 (Refošk DU 2/19 in Refošk DU 3/13), septembra pa nismo vzorčili korenin trsa Refošk DU 2/19.

3.3.2 Homogenizacija rastlinskega materiala

Liste, cvetove in vitice smo natrgali iz več delov rastline, korenine smo s skalpelom narezali na tanke kolobarje pri grozdnih jagodah pa smo odrezali del jagode z mesom in lupino. Iz mladih zelenih stebel smo nastrgali sočno floemsko tkivo, v primeru dormantnih rozg smo rozge najprej s skalpelom olupili, da smo odstranili olesenele dele in floemsko tkivo nastrgali. V ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba, Švica) smo zatehtali po 1 g rastlinskega materiala posameznega vzorca vinske trte, ki smo ga homogenizirali v 10 ml ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (1:10) s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica). Homogeniziran rastlinski material smo s plastičnimi Pasteurjevimi pipetami prenesli iz ekstrakcijskih vrečk v mikrocentrifugirke in shranili na -80 °C do uporabe.

3.3.3 DAS-ELISA

Za dokazovanje virusa GFLV v tkivu vinske trte smo uporabili semikvantitativni test DAS-ELISA ter primarna in sekundarna protitelesa proti GFLV (Bioreba). Postopek DAS-ELISA ter obdelavo podatkov smo izvedli na že opisan način pod točko 3.2.3.1.

3.4 RAZVOJ METODE RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE IN RELATIVNO KVANTIFIKACIJO VIRUSA GFLV

3.4.1 Rastlinski material

Mlade liste iz rastnih sezon 2008 in 2009 ter floem dormantnih poganjkov (januarja 2009) 72 zdravih in z GFLV naravno okuženih rastlin vinske trte sort: Refošk, Sauvignon, Volovnik, Malvazija, Laški rizling, Cividin, Rebula, Racuk, Zelen, Rečigla, Župlanka, Zunek, Klarnica, Poljšakica; smo vzorčili v vinogradih na Krasu ter v Vipavski dolini nekaj smo jih imeli tudi v zbirki v rastlinjaku na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB). Vsi vzorci so bili testirani na prisotnost virusa GFLV in 8 drugih najpogostejših virusov na vinski trti (GFkV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA in GVB) s testom ELISA. Pri treh vzorcih smo potrdili prisotnost GFLV tudi z metodo RT-PCR po protokolu Pompe-Novak in sod. (2007).

Devet zdravih trsov sort: Renski rizling, Cabernet sauvignon, Rumeni muškat in Sivi pinot; smo vzorčili v okolici Bele Krajine, kjer virus GFLV ni prisoten. Tri zdrave trse sorte Pinot noir, Chardonnay in Rebula smo dobili iz drugih slovenskih pokrajin.

Trideset izolatov GFLV iz drugih lokacij po Evropi in iz Kalifornije (ZDA) so nam podarili, v obliki rastlinskega materiala (vinske trte), RNA ali plazmidov: Dr. A. Rowhani (University of California, Davis, ZDA), Dr. J. Legorburu (Departamento de Producción y Protección Vegetal, Neiker tecnalia, Španija), Dr. V. Padilla Villalba (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, La Alberca—Murcia, Španija), Dr. A. Minafra (CNR—Istituto di Virologia Vegetale, Bari, Italija), Dr. D. Pacifico (CNR—Istituto di Virologia Vegetale, Torino, Italija) ter Dr. E. Vigne in Dr. M. Fuchs (Laboratoire de virologie et vecteur, Colmar, Francija). Eno zdravo rastlino *Vitis rupestris* SCHEELE nam je priskrbel Dr. D. Gonsalves (Cornell University, Geneva, New York, ZDA). Dva izolata ArMV na rastlini *Chenopodium quinoa* nam je podaril Dr. T. Wetzell

(RLP AgroScience GmbH, AIPlanta—Institute for Plant Research, Neustadt an der Weinstrasse, Nemčija) in eden izolat ArMV iz vinske trte Dr. J. Legorburu (Španija).

Primerjavo občutljivosti testa ELISA in RT-PCR-RČ smo izvedli na dveh tipih začetnega rastlinskega materiala vinske trte: floemskem tkivu (mešanica trsov: Volovnik 2/46 in Refošk 26 6/5 vzorčenih januarja v vinogradu v Ložah in Komen) ter mladem listnem tkivu (mešanica listov trsov: Volovnik 2/54, Refošk DU 1/1, Refošk 51 11/69 in Refošk 61 12/68 vzorčenih aprila v rastlinjaku na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB)).

Relativna kvantifikacija virusa GFLV je bila narejena na floemskem tkivu šestih trsov sort Refošk in Volovnik iz dveh lokacij na Krasu (Dutovlje 1, Komen) in eni v Vipavski dolini (Lože) vsak mesec od junija do septembra 2009. Svež material ali ekstrakt z ekstrakcijskim pufrom za ELISA smo shranili na -80°C dokler ga nismo uporabili za izolacijo RNA ali test ELISA.

3.4.2 Homogenizacija rastlinskega materiala za test ELISA

V ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba, Švica) smo zatehtali po 0,5 g listov ali nastrganega floemskega tkiva rozg zdravih oz. okuženih trsov. Liste smo homogenizirali v 5 ml ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (1:10), floem pa v 7 ml ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (1:14) s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica). Homogeniziran rastlinski material smo s plastičnimi Pasteurjevimi pipetami prenesli iz ekstrakcijskih vrečk v mikrocentrifugirke in shranili na -80°C do uporabe.

Za primerjavo testa ELISA z RT-PCR-RČ smo pripravili serijo redčitev homogenata okuženega rastlinskega materiala v homogenatu zdravega rastlinskega materiala v razmerjih 1:10 do $1:10^{-7}$. Test DAS-ELISA za GFLV smo izvedli kot je opisano pod točko 3.2.3.1.

3.4.3 Homogenizacija rastlinskega materiala za izolacijo RNA

V ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba, Švica) smo zatehtali 0,25 g listov ali nastrganega floemskega tkiva rozg vinske trte. Liste smo homogenizirali v 2,5 ml (1:10), floem pa v 3,5 ml (1:14) modificiranega in segretega pufra RLC s homogenizatorjem Homex (Bioreba, Švica). Po 1 ml homogeniziranega rastlinskega materiala smo s plastičnimi Pasteurjevimi pipetami prenesli iz ekstrakcijskih vrečk v mikrocentrifugirke.

Modificiran pufer RLC smo pripravili tako, da smo k 1 ml pufru RLC (Qiagen, ZDA) dodali 10 mg PVP Mw 40000 (Sigma, Nemčija) in ga v vodni kopeli segreli na 56 °C.

Za primerjavo testa ELISA z RT-PCR-RČ smo pripravili serijo redčitev homogenata okuženega rastlinskega materiala v homogenatu zdravega rastlinskega materiala v razmerjih 1:10 do 1:10⁻⁷.

3.4.4 Izolacija celokupne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit

Iz vseh vzorcev smo izolirali celokupno RNA z uporabo kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). V pufru RLC homogeniziran rastlinski material smo inkubirali 3 minute pri 56 °C, ter centrifugirali 30 sekund pri 10.000 rpm (obrti/min) pri sobni temperaturi (23 °C). Lizat (supernatant) smo prenesli na kolono QIAshredder v dveh korakih po 500 µl in centrifugirali 2 minuti pri 14.000 rpm, da smo odstranili preostale grobe delce. Filtrat obeh centrifugiranj smo zmešali z etanolom (Sigma, Nemčija) in RNA vezali na membrano kolone RNeasy Mini spin, centrifugirali 20 sekund pri 10.000 rpm, ter zavrgli filtrat (flowthrough). Kolono smo spirali s pufroma RW1 in RPE, da smo odstranili proteine in ostale nečistoče. RNA smo iz kolon RNeasy Mini spin eluirali z nanosom 30 µl vode brez RNaz (Sigma, Nemčija), segrete na 65°C, inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto pri 10.000 rpm ter postopek ponovili z isto količino vode. Iz posamezne kolone smo tako dobili 60 µl RNA, ki smo jo v alikvotih shranili pri -80 °C do uporabe.

3.4.5 Konstruiranje začetnih oligonukleotidov

Za načrtovanje amplikona za določanje virusa GFLV s PCR-RČ smo pridobili nukleotidna zaporedja molekul RNA2 virusa GFLV iz javno dostopne baze Entrez nucleotide database in jih najprej poravnali v programu Vector NTI 9.0.0 (Invitrogen, InforMax, Bethesda, MD, ZDA). Glede na poravnane celotne ORF vseh takrat dostopnih molekul RNA2 GFLV smo za naleganje začetnih oligonukleotidov in sond izbrali primerne ohranjene regije.

Na izbranih delih nukleotidnih zaporedij smo s programom Primer Express™ 2.0 in 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) izdelali par začetnih oligonukleotidov in dve sondi za določanje vseh dostopnih izolatov virusa GFLV. Degenerirano sondo GFLV-sonda1 smo konstruirali z namenom, da bi pomnoževala vse znane izolate GFLV razen enega dostopnega (A17d) ter nekaj na novo odkritih v tej študiji, za katere smo pripravili nekoliko drugačno sondo GFLV-sonda2. Pri načrtovanju smo upoštevali prednastavljene pogoje programa, ki so se nanašali na delež nukleotidov G in C (30 – 80%), T_m (58 – 60

°C), dolžino amplikona (50 – 150 bp) in optimalno dolžino začetnih oligonukleotidov (20 nukleotidov). V programu smo dodatno preverili, da začetni oligonukleotidi ne bodo tvorili sekundarnih struktur in dimerov. 128 bp dolg amplikon smo konstruirali na genu 2A^{HP} (med nt 676 in 804 glede na celotno molekulo RNA2 izolata GFLV-F13) (Preglednica 1).

Sondi GFLV-sonda1 in GFLV-sonda2 smo označili po principu TaqMan® MGB, kar pomeni, da sta bili na 5' koncu označeni z barvilom FAM, na 3' koncu pa z nefluorescirajočim dušilcem MGB (Preglednica 1). Specifično sondo MGB smo izbrali, ker smo želeli pripraviti specifično metodo za virus GFLV, v tej regiji pa je GFLV zelo podoben tudi virusu ArMV. Začetna oligonukleotida smo namreč že konstruirali na regijah, ki so skupne obema virusoma. Prav tako je bilo na mestu sonde premalo prostora za konstrukcijo klasične TaqMan® sonde. Specifičnost začetnih oligonukleotidov smo preverili *in silico* s primerjavo z znanimi zaporedji v bazi podatkov (Entrez nucleotide database) s pomočjo programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), pri čemer smo uporabili algoritem BLASTN (Altschul in sod., 1990).

Gen za rastlinsko citokrom oksidazo (COX) smo uporabili kot referenčni gen za preverjanje učinkovitosti izolacije RNA in korakov RT-PCR-RČ. Za COX smo uporabili specifične začetne oligonukleotide (COX-FP in COX-RP) in TaqMan® sondo, ki je bila na 5' koncu označena s poročevalsko molekulo FAM in na 3' koncu z dušilcem TAMRA (Preglednica 2) (Weller in sod., 2000).

Kot referenčne gene za relativno kvantifikacijo virusa skozi sezono smo poleg, gena za COX, uporabili še 18S rRNA (eukaryotic 18S rRNA TaqMan® endogenous control, Applied Biosystems), katere začetni oligonukleotidi in sonda so komercialno dostopni.

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev virusa GFLV z metodo RT-PCR-RČ. ^a Položaj glede na referenčno nukleotidno zaporedje RNA2 GFLV-F13

Table 1: Primers and probes for GFLV detection with real-time PCR method. ^a Location according to reference nucleotide sequence of RNA2 GFLV-F13

Ime začetnega oligo. / sonde	Nukleotidno zaporedje (5' – 3')	Položaj ^a	Velikost amplikona
GFLV-FP	AGCTGCGGCACTYTTTGC	676 – 693	
GFLV-sonda1	FAM-TGCTCAARCATAACCACTTG-MGB	759 – 777	128 bp
GFLV-sonda2	FAM-ATGCTTAARCATAACCACTTG-MGB	758 – 777	
GFLV-RP	TCATCACTRGTCATACCACTTCCT	779 – 804	

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev ekspresije referenčnega gena citokrom oksidaze (COX) z metodo RT-PCR-RČ.

Table 2: Primers and probe for determination of expression of reference gene cytochrome oxydase (COX) for real-time PCR method.

Ime začetnega oligo. / sonde	Nukleotidno zaporedje (5' – 3')
COX-FP	CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA
COX-sonda	FAM-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-TAMRA
COX-RP	CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR AAC TG

3.4.6 RT-PCR-RČ za določanje in relativno kvantifikacijo virusa GFLV

Po homogenizaciji in izolaciji RNA smo RNA z reverzno transkripcijo (RT) prepisali v cDNA in pomnožili s PCR-RČ. Da bi zagotovili čim boljšo občutljivost in obenem enostavnost za uporabo ter s tem primernost metode za določanje in kvantifikacijo virusa GFLV ter za vpeljavo metode v diagnostične laboratorije, smo primerjali dva različna postopka RT-PCR-RČ. Pri prvem t.i. dvostopenjski RT-PCR-RČ (two-steps RT-PCR-RČ) smo cDNA pripravili v posebni reakcijski mešanici, pri drugem enostopenjski RT-PCR-RČ pa je sinteza cDNA potekala v isti reakcijski mešanici kot kasneje PCR-RČ, torej v enem koraku (one-step RT-PCR-RČ).

Vse reakcije PCR-RČ smo izvedli z inštrumentom ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) v optičnih ploščicah formata 384, ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems) in centrifugirali 1 minuto pri 1.000 g.

3.4.6.1 Dvostopenjska RT-PCR-RČ

Pri dvostopenjski RT-PCR-RČ smo cDNA sintetizirali ločeno, z uporabo kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ZDA). K 2 µl celokupne RNA smo dodali 2 µl deoksiribonukleotidov (25×dNTP) in 5 µl 10x koncentrirane raztopine naključnih začetnih oligonukleotidov, denaturirali 5 minut pri 85 °C ter nato 2 minuti inkubirali na ledu. Dodali smo 1 µl RNaznega inhibitorja, 5 µl 10x pufra RT, 2,5 µl reverzne transkriptaze MultiScribe™ (50 U/µl) in ddH₂O brez RNaz do končnega volumna 50 µl. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 10 minut pri 25 °C, 120 minut pri 37 °C in 5 sekund pri 85 °C. Reakcijo smo izvedli v aparaturi GeneAmp® PCR System 9700HT (Applied Biosystems).

Za PCR-RČ smo pripravili reakcijsko mešanico iz 5 µl 2x mešanice Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA), ki je vsebovala pasivno referenčno barvilo ROX™,

AmpliTaq Gold® DNA polimerazo, mešanico dNTP-jev in pufer, ter 3 µl mešanice 0,9 µl začetnih oligonukleotidov GFLV-FP in GFLV-RP (10 µM) in 0,5 µl sonde GFLV-sonda1 (5 µM) ter ddH₂O brez RNaz. Reakcijska mešanica za določanje rastlinskega gena COX je namesto začetnih oligonukleotidov in sonde za GFLV vsebovala 0,9 µl začetnih oligonukleotidov COX-FR in COX-RP (10 µM) ter 0,8 µl sonde COX-sonda (2,5 µM).

Na optično ploščico (Applied Biosystems, ZDA) smo nanесли po 8 µl pripravljene reakcijske mešanice in v vsako dodali po 2 µl serijsko 10x redčene cDNA posameznega vzorca ali plazmidne DNA.

Pomnoževanje nukleotidnega zaporedja je potekalo pri sledečih nastavitvah:

- 2 min, 50 °C
- 10 min, 95 °C
- 45 ciklov: - 15s, 95 °C
 - 1 min, 60 °C

3.4.6.2 Enostopenjska RT-PCR-RČ

Za določanje GFLV z enostopenjsko RT-PCR-RČ smo preizkusili štiri različne komplete reakcijskih mešanic.

Mešanica kompleta TaqMan OneStep (Applied Biosystems, ZDA) je bila sestavljena iz 5 µl 2x mešanice PCR Master Mix ter 0,25 µl 40x mešanice RT Master Mix.

Mešanica kompleta Brilliant QPCR Core Reagent Kit (Agilent Technologies) je bila sestavljena iz 1 µl 10x pufra Core PCR, 1,1 µl 50mM MgCl, 0,4 µl dNTP (5 mM vsakega), 0,15 µl 1:50 redčenega referenčnega barvila, 0,1 µl SureStart Taq DNA polimeraze (5U/µl) ter 0,4 µl 1:100 redčene MMLV reverzne transkriptaze (Promega; 200U/µl).

Pri uporabi kompleta RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, ZDA) je reakcijska mešanica vsebovala 0,5 µl mešanice encimov RNA UltraSense™, 2 µl 5x pufra RNA UltraSense™ ter 0,2 µl referenčnega barvila ROX.

Pri uporabi kompleta AgPath-ID OneStep RT-PCR Kit (Ambion, ZDA) pa je mešanica vsebovala 5 µl 2x pufra RT-PCR, 0,4 µl 25x mešanice encimov RT-PCR.

Poleg tega je bila reakcijska mešanica v vseh primerih sestavljena še iz 0,9 µl vsakega začetnega oligonukleotida GFLV-FP in GFLV-RP (10 µM) s končno koncentracijo 900

nM, 0,5 μ l sonde GFLV-sonda1 ali GFLV-sonda2 (5 μ M) s končno koncentracijo 250 nM ter ddH₂O brez RNaz.

Na optično ploščico (Applied Biosystems, ZDA) smo nanegli po 8 μ l pripravljene reakcijske mešanice in v vsako dodali po 2 μ l po 10x serijsko redčene (od neredčene do 10⁻⁷) celokupne RNA, ki smo jo pred RT-PCR-RČ denaturirali 5 minut pri 85 °C ter inkubirali na ledu.

Reakcijska mešanica za določanje rastlinskega gena COX je vsebovala 0,9 μ l vsakega začetnega oligonukleotida COX-FP in COX-RP (10 μ M) s končno koncentracijo 900 nM, 0,8 μ l sonde COX-sonda (2,5 μ M) s končno koncentracijo 200 nM ter ddH₂O brez RNaz.

Pomnoževanje nukleotidnega zaporedja je potekalo pri sledečih nastavitvah:

- 30 min, 48 °C 2 min
- 10 min, 95 °C
- 45 ciklov: - 15s, 95 °C
 - 1 min, 60 °C

Rezultate smo primerjali z rezultati dvostopenjskega RT-PCR-RČ.

Delovanje kompleta AgPath-ID OneStep RT-PCR Kit (Ambion, ZDA) smo primerjali le s kompletom RNA UltraSenseTM One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, ZDA), ker se je ta v prvem poskusu izkazal bolje od kompletov proizvajalcev Applied Biosystems in Agilent Technologies.

3.4.6.3 Kontrole RT-PCR-RČ

Vsak vzorec smo na ploščico nanegli v dveh ali treh tehničnih ponovitvah. V dve vdolbinici z reakcijsko mešanico smo namesto vzorca dodali sterilno ddH₂O (Sigma, Nemčija), ki je služila kot kontrola navzkrižne okužbe reakcijske mešanice (no template control, NTC). Potencialno navzkrižno okužbo vzorcev med procesom izolacije RNA smo preverili s testiranjem ekstrakcijskega pufra, ki je prešel celoten proces od homogenizacije, vključno z izolacijo RNA in RT-PCR-RČ, do končnega rezultata. Za pozitivno kontrolo reakcije smo uporabili RNA vzorcev, za katere smo že prej dokazali prisotnost virusa GFLV s testom ELISA in z metodo PCR-RČ.

Stabilnost izražanja referenčnih genov, ki smo jih uporabili za normalizacijo, smo preverili s programom GeNorm. Program je določil normalizatorski gen, katerega izražanje je bilo

med različnimi vzorci najbolj stabilno in je tako predstavljal najbolj primeren gen za normalizacijo. Testirali smo stabilnost izražanja genov za COX in 18 rRNA.

Kadar nismo kvantificirali ali testirali s serijo redčitev, smo testirali vsaj neredčeno in 10x redčeno RNA, da smo preverjali prisotnost inhibicije reakcije RT-PCR-RČ.

3.4.6.4 Osnovna analiza podatkov RT-PCR-RČ

Začetno analizo podatkov smo izvedli v programu SDS 2.3 (Applied Biosystems). Za nastavitev bazne linije (vrednost cikla pred dvigom fluorescence nad vrednost ozadja) smo izbrali avtomatsko opcijo. Nato smo na eksponentnem delu krivulje pomnoževanja določili linijo fluorescenčnega praga, ki je znašala 0,065 pri 250 nM koncentraciji sonde.

Dobljene vrednosti C_q smo prenesli v program Microsoft Excel (Microsoft, ZDA), kjer smo izračunali povprečne vrednosti C_q vzorca iz dveh oz. treh ponovitev in razliko vrednosti C_q med dvema zaporednima redčitvama (ΔC_q), ki nam je podala informacijo o tem ali bila prisotna inhibicija pomnoževanja.

3.4.6.5 Delovanje metode PCR-RČ

Za prvi vpogled v delovanje nove metode smo pripravili serijo 10x redčitev (od 10^{-1} do 10^{-12}) plazmidne DNA z vneseno molekulo RNA2 izolata Refošk 26 6/2. Koncentracijo neredčene plazmidne DNA (ng/ μ l) smo določili fotometrično z instrumentom NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, ZDA) in iz dobljene vrednosti preračunali število molekul plazmida.

Reakcijo smo izvedli po postopku za dvostopenjsko PCR-RČ brez predhodnega RT koraka (3.4.6.1). Z izrisom vrednosti C_q v odvisnosti od $\log_{10}$ začetne količine tarčne DNA smo pridobili standardno krivuljo. Iz standardne krivulje smo dobili naklon linearne regresijske premice (slope, s), ki nam je omogočila oceniti delovanje reakcije z določitvijo učinkovitosti pomnoževanja po formuli (1).

Določili smo tudi R^2 in linearni razpon meritev. Mejo določljivosti PCR-RČ (LOD) smo določili kot tisto koncentracijo oz. redčino tarčne molekule, kjer smo v več kot 50% izvedenih poskusov zaznali prisotnost tarčne molekule.

Nato smo testirali delovanje nove metode po dvostopenjskem postopku s sondo GFLV-sonda1, vključno z RT korakom, na izolatu GFLV-F13 iz tkivnih kultur vinske trte. Iz prepisane cDNA smo pripravili serije 10x redčitev (od 10^{-1} do 10^{-7}). Pri tem absolutne

začetne količine tarčne molekule niso bile potrebne, zadostovale so relativne količine, pri čemer je bilo pomembno, da se je začetna količina tarčne molekule med redčinami zmanjševala s faktorjem redčitve. Teoretično koncentracijo tarčne molekule smo določili na podlagi upoštevanja stohastičnega efekta v primeru zelo nizkih koncentracij (≤ 10 molekul) tarčne molekule v reakcijski mešanici. Največji redčitvi, kjer smo še dobili signal vsaj v enem od triplikatov oz. je bil koeficient variacije (CV) med triplikati zelo visok, smo pripisali število tarčnih molekul 10 in pri vsaki 10x manjši redčitvi povečali število molekul za 10x dokler nismo prišli do teoretičnega števila tarčnih molekul v neredčenem vzorcu (Ellison in sod, 2006). Mejo določljivosti smo določili kot tisto koncentracijo oz. redčino tarčne molekule, kjer smo v več kot 50% izvedenih poskusov zaznali prisotnost tarčne molekule. Tudi v tem primeru smo iz rezultatov dobili podatke o standardni krivulji, linearnem razponu določljivosti, meji določljivosti, korelacijskem koeficientu in učinkovitosti pomnoževanja.

Poleg tega smo za dvostopenjsko RT-PCR-RČ poiskali optimalno koncentracijo sond in začetnih oligonukleotidov. Preverili smo delovanje reakcije pri koncentraciji začetnih oligonukleotidov 900 nM in koncentracijah sond 150 nM, 250 nM, 500 nM in 750 nM. Izbrana koncentracija za nadaljnje reakcije je bila tista, kjer smo pri najnižji koncentraciji sonde dobili najvišjo fluorescenco (ΔR_n) in najnižjo C_q vrednost.

Vse štiri zgoraj naštetih komplete za enostopenjsko RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1 smo preizkusili na izolatu GFLV-F13, ki smo ga vzdrževali v tkivnih kulturah vinske trte.

3.4.6.6 Preverjanje specifičnosti obeh amplikonov

Specifičnost amplikonov smo ugotavljali s preverjanjem prisotnosti navzkrižnih reakcij z:

- rastlinsko RNA izolirano iz 20 zdravih rastlin vinske trte različnih sort (Refošk, Sivi pinot, Renski rizling, Rumeni muškat, Cabernet sauvignon, Pinot noir, Rebula, Chardonnay) in *V. rupestris*, vključno z njihovo naravno nepatogeno mikrofloro;
- RNA drugih virusov, ki okužujejo vinsko trto (GVA, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFkV, GRSPaV) vključno z ArMV, ki je najsorodnejši virusu GFLV.

3.4.6.7 Določitev meje detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ) metod enostopenjske RT-PCR-RČ za določanje in kvantifikacijo GFLV

S kompletom RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, ZDA) smo preverili delovanje enostopenjske RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1 na istem materialu kot dvostopenjsko RT-PCR-RČ ter s sondo GFLV-sonda2 na listih vinske trte okužene z izolatom A17d. Standardne krivulje smo izrisali na podlagi serije 10x redčitev (od 10^{-1} do 10^{-8}) kot je opisano zgoraj (3.4.6.5). Vsaka redčitev je bila testirana v triplikatu (treh tehničnih ponovitvah) in treh neodvisnih poizkusih, pri čemer smo dobili tri standardne krivulje. Za vsako smo določili, korelacijski koeficient in učinkovitost pomnoževanja. Iz formule standardne krivulje in iz vrednosti C_q za vsako redčitev in paralelko posebej smo izračunali logaritem t.i. izračunane teoretične koncentracije GFLV, ko smo jih odlogaritmirali smo dobili izračunane teoretične koncentracije GFLV. Za mejo določljivosti (LOD) smo določili najnižjo izračunano teoretično koncentracijo GFLV, ki nam je še dala pozitiven rezultat vrednosti C_q v 2 od 3 paralelk v vseh treh poizkusih. Dinamični razpon določljivosti je predstavljalo število redčitev pri katerih smo določili pozitiven rezultat. Iz izračunanih teoretičnih koncentracij GFLV smo izračunali CV med triplikati vsake redčitve znotraj enega poizkusa (intra-assay) ter med tremi ločenimi poizkusi (inter-assay). Najvišjo redčitev in njej pripadajočo izračunano teoretično koncentracijo GFLV pri kateri je bil CV med posameznimi poizkusi 30% ali manj, smo določili za mejo kvantifikacije (limit of quantification, LOQ), število zaporednih redčitev s $CV < 30\%$ pa definirali kot razpon kvantifikacije (Burns in sod., 2004).

Metodo enostopenjske RT-PCR-RČ z uporabo kompleta RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, ZDA) s sondo GFLV-sonda1 smo uporabili za analizo 86 izolatov GFLV iz različnih lokacij v Evropi (Sloveniji, Franciji, Italiji, Španiji) in ZDA (Kaliforniji). Enako metodo z uporabo sonde GFLV-sonda2 smo uporabili za analizo izolatov, ki jih s sondo GFLV-sonda1 nismo mogli določiti. Vsak vzorec smo testirali še z endogeno kontrolo COX (Weller in sod., 2000), s katero smo pomnoževali rastlinsko RNA, ki se je izolirala skupaj z virusno pri postopku izolacije RNA.

Vpliv inhibitorjev v rastlinskem materialu na učinkovitost pomnoževanja smo preverili iz izračunom razlike vrednosti C_q dobljenih s testiranjem neredčene in 10x redčene RNA, izolirane iz različnih tipov tkiva vinske trte (floem, listi).

3.4.6.8 Primerjava občutljivosti testa ELISA in metode RT-PCR-RČ

Primerjali smo mejo določljivosti metode RT-PCR-RČ (s sondo GFLV-sonda1) in testa ELISA ter na ta način primerjali občutljivost obeh metod. Primerjavo smo izvedli na seriji

10x redčin okuženega rastlinskega materiala redčenega v neokuženem rastlinskem materialu (od neredčene do 10^{-7}). S tako pripravo redčin smo posnemali naravne vzorce in na ta način v oceno občutljivosti obeh metod vključili potencialne inhibitorne učinke materiala gostiteljske rastline. Pripravili smo štiri ločene sete serijskih redčin homogenatov: testirali smo dva tipa materiala (mlade liste in floem dormantnih poganjkov) ter dve različni metodi, ki zahtevata uporabo različnih ekstrakcijskih pufrov. Iz 1 ml vsake redčine homogenata pripravljenega s pufrom RLC smo izolirali RNA, medtem ko smo redčine homogenatov pripravljenih z ekstrakcijskim pufrom za ELISA uporabili direktno za test ELISA. Predhodno smo odsotnost virusa GFLV v zdravem rastlinskem materialu potrdili s testom ELISA in RT-PCR-RČ.

3.4.6.9 Relativna kvantifikacija virusne RNA v tkivu vinske trte skozi sezono

Z enostopenjsko RT-PCR-RČ smo kvantificirali GFLV v floemu šestih trsov skozi rastno sezono. Za relativno kvantifikacijo RNA virusa GFLV v posameznem vzorcu smo uporabili enačbo, ki temelji na predpostavki, da je izražanje referenčnih genov konstantno pri vseh vzorcih ne glede na pogoje in časovno točko vzorčenja (Pfaffl, 2001; Van Guilder in sod., 2008).

Vsak vzorec smo testirali z amplikonom za GFLV ter dvema referenčnima amplikonoma (za COX in 18S ribosomalno RNA). Z referenčnima amplikonoma smo pomnoževali rastlinsko RNA, ki se je izolirala skupaj z virusno RNA. Reakcije z vsemi amplikoni smo na isti ploščici formata 384 izvedli v dveh tehničnih ponovitvah (duplikatih) in v treh redčitvah za vsak vzorec (neredčen, 10x in 100x redčen).

Za vsak vzorec smo izračunali relativno količino (r) virusne RNA po enačbi (2), povzeto po Pfaffl in sod. (2001): *GFLV* je bil tarčni gen, katerega izražanje smo želeli kvantificirati, *referenca* pa referenčni / vzdrževalni gen. V našem primeru smo si za referenčna gena izbrali COX in 18S, ter validirali stabilnost njune ekspresije s pomočjo programa GeNorm, ki jo je izrazil v obliki vrednosti M (Pfaffl, 2001; Vandesompele in sod., 2002). Na koncu smo za normalizacijo uporabili geometrijsko povprečje vrednosti C_q obeh referenčnih genov.

Učinkovitost pomnoževanja smo izračunali po enačbi (3) za vsak vzorec posebej iz naklona (s) med 10x in 100x redčino in ne iz standardne krivulje enega vzorca, kot je predlagal Pfaffl (2001). S tem smo se izognili predvidevanju, da je E pri vseh vzorcih enaka.

Za vsako kombinacijo vzorca, tarčnega in referenčnega gena smo izračunali razliko med ΔC_q tarčnega (GFLV) in referenčnega gena ($\Delta \Delta C_q$). To vrednost smo uporabili kot kriterij za kontrolo kakovosti r , saj smo želeli upoštevati le rezultate za tiste vzorce, pri katerih sta bili učinkovitosti pomnoževanja med tarčnim genom in referenčnim genom podobni. V ta namen smo si postavili kriterij, da mora biti razlika $\Delta \Delta C_q < 0,5$. V kolikor je vrednost $\Delta \Delta C_q$ presegla kriterij, smo ta vzorec oz. rezultat označili kot nezanesljiv za kvantifikacijo (*).

Glede na rezultate reakcije RT-PCR-RČ smo se odločili za izris grafa iz povprečja vrednosti r dobljenih iz 10x in 100x redčitve RNA, saj so bili rezultati obeh zelo primerljivi, ker je bil učinek inhibicije reakcije odpravljen. Vrednosti r smo logaritmirali ($\log_2$), da smo dobili linearno razmerja.

3.4.7 Raznolikost molekule RNA2 virusa GFLV

Pri nekaj izolatih GFLV (pozitivnih na GFLV s testom ELISA), ki jih nismo uspeli pomnožiti z metodo RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1, smo njihovo prisotnost dokazali z metodo RT-PCR s parom začetnih oligonukleotidov 2AF / 2AR (Preglednica 3; Pompe-Novak in sod, 2007). Uporabili smo opisan protokol RT-PCR z uporabo kompletov Superscript II (3.5.2) in Platinum Taq DNA Polymerase HiFi Kit (3.5.4). Dobljene produkte PCR gena 2A^{HP} smo prečistili iz gela (3.6.1) in jih direktno poslali na sekvenciranje. Iz poravnave dobljenih nukleotidnih zaporedij smo ugotovili zakaj sonda GFLV-sonda1 ni delovala na teh izolatih ter na podlagi teh informacij skonstruirali dodatno sondo GFLV-sonda2.

Eden od izolatov (Laški rizling 4/29), na katerega sonda GFLV-sonda1 ni prijemala, je bil v nukleotidnem zaporedju gena 2A^{HP} popolnoma drugačen od ostalih, zato smo preverili kateremu nukleotidnemu zaporedju je ta regija tega izolata najpodobnejša. Izkazalo se je, da GDefV, kar nas je spodbudilo, da smo sekvencirali celotno RNA2 tega izolata. Celotno obstoječe nukleotidno zaporedje virusa GDefV smo poravnali z zaporedji GFLV ter skonstruirali univerzalne začetne oligonukleotide za oba virusa. Uporabili smo tudi nekaj že obstoječih začetnih oligonukleotidov (Preglednica 3 in Slika 21).

Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov uporabljenih za pomnoževanje in/ali sekvenciranje odsekov RNA2.

Table 3: List of primers used for amplification and/or sequencing of sections of RNA2.

Oznaka začetnega oligonukleotida	NT zaporedje (5' - 3')	Lokacija glede na GFLV-F13 (bp)
2AF ^a	CTYTTAYTTTGCGCTTTATTGTYTTAG	145 – 171 ^b
2AR*	CAATHGTYTGCCCMCCRGTA	1018 - 1037 ^b
Evoo2 ^a	AAAGGACAAACAACACACTGTCTG	3687 - 3709
GDefV3-fw	AAGGGCAACCATGATGGGTAA	1798 - 1818
GDefV3-rv	TTCGGTGATATGGAGAGCGAAT	2894 - 2915
FPa	ACATCCCCAGCACCTCTGT	978 - 996
RPa	ACTCTGACCAGCAAGCAATCT	2924 - 2944
2BF	CTACYGGKGGGCGARACDATT	1017 - 1036
2BR	GGTTGARCTCARYCTRGGCT	2022 - 2041
FPb	AGGGTCCAGCATGCGTAT	1888 - 1905
RPb	ATCAACATTTCTATCAATCCTCA	1980 - 2002
FPc	ACCACTATGGATTGGAATGAACT	2819 - 2841
RPc	ATTGGAAGTACCCTATGTGA	1058 - 1078
GFLV2-fw	CGGCACTCTTTGCCGAAT	681 - 699
GFLV2-rv	TGTCGGkATACCATTGAGCCTAAAAT	1323 - 1348
T7 promotor	ATACGACTCACTATAGGGCG	Na plazmidu
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC	Na plazmidu

* Uporabljen le za namnožitev gena 2A^{HP} skupaj z začetnim oligonukleotidom 2AF, ne pa tudi za namen sekvenciranja.

^a Uporabljena za namen namnožitve celotnega odprtega bralnega okvirja (ORF) molekule RNA2.

^b Pompe-Novak in sod., 2007

* Used only for amplification of gene 2A^{HP} together with primer 2AF, and not used for the purposes of sequencing.

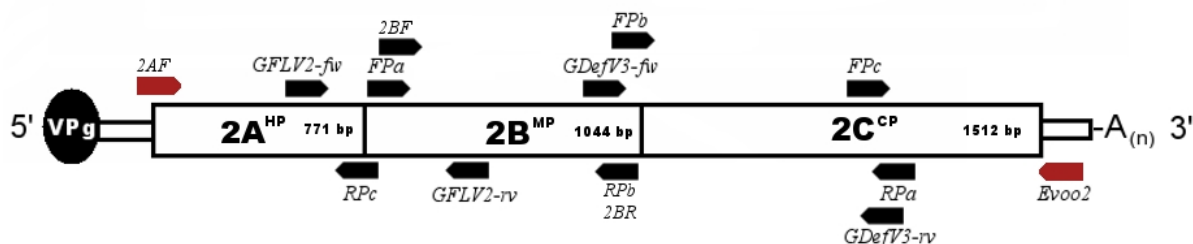
^a Used for amplification of whole ORF of RNA2 molecule.

^b Pompe-Novak in sod., 2007

Z začetnima oligonukleotidoma 2AF in Evoo2 smo namnožili celoten ORF molekule RNA2 in ga ligirali v vektor pGEM-T Easy po zgoraj opisanem protokolu (3.6.2). Nadaljnji postopek je bil identičen tistemu v poglavjih 3.6.3, 3.6.4 in 3.6.5. Izbrali smo enega od več klonov, ter ga poslali na sekvenciranje. Sekvencirali smo z že znanimi začetnimi oligonukleotidi, nekaj pa smo jih na podlagi dobljenega nukleotidnega zaporedja skonstruirali na novo (Preglednica 3).

Posamezna nukleotidna zaporedja, ki so celotno dolžino fragmenta pokrila od 2 do 4x, smo sestavili v celotno nukleotidno zaporedje RNA2 s programom Contig Express (Vector NTI). S programom za iskanje rekombinacij (Recombination detection program version3beta, RDPv3beta) smo na podlagi podobnosti nukleotidnih zaporedij posameznih

regij molekule RNA2 virusov GFLV, ArMV in GDefV iskali možne rekombinacije med njimi.



Slika 21: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na RNA2 virusa GFLV. Začetni oligonukleotidi so označeni s puščicami, nad/pod katerimi je ime posameznega začetnega oligonukleotida. Začetna oligonukleotida, s katerima smo pomnožili celoten ORF RNA2 sta označena z rdečo. Širši del predstavlja odprt bralni okvir (ORF), ožji pa nekodirajoče regije (UTR) molekule RNA2. Številke znotraj okvirjev predstavljajo velikosti posameznih genov.

Figure 21: Schematic presentation of primer annealing on RNA2 of GFLV. Primers are represented by arrows with their names above/below arrow. Primers that amplified whole open reading frame (ORF) of RNA2 are coloured in red. Wide boxes represent ORF, while narrow boxes represent untranslated regions (UTR). Numbers inside boxes represent length of each gene.

3.5 RAZVOJ METODE RT-PCR ZA DOLOČANJE SATELITSKE RNA GFLV

3.5.1 Rastlinski material in izolacija RNA

Junija 2007 in 2008 ter septembra 2010 smo nabrali mlade poganjke 61 rastlin vinske trte (*Vitis vinifera* L.) okuženih z virusom GFLV, vendar brez virusa ArMV. Trsi so bili 17 različnih sort (Cividin, Klarnica, Laški rizling, Malvazija, Pance precoce, Poljšakica, Racuk, Rebula, Rečigla, Refošk, Sauvignon, Sladkočica, Števerjana, Volovnik, Zelen, Zunek in Župlanka) iz 9 različnih vinogradov na Krasu in Vipavski dolini. V analizo smo vključili še 18 vzorcev iz Evrope in Kalifornije (ZDA) (3.4.1; Preglednica 12) v katerih je bila predhodno s testom ELISA dokazana prisotnost virusa GFLV in odsotnost virusa ArMV.

Za izbor slovenskih trsov smo se odločili na podlagi opazovanj bolezenskih znamenj od leta 2004 dalje, ko smo pri večini trsov opazili znamenja, značilna za okužbo z GFLV ter trse s testom ELISA tudi testirali na prisotnost GFLV in ostalih virusov vinske trte: ArMV, GfKv, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA in GVB (Vojvoda, 2005; Blas, 2006; neobjavljeni rezultati NIB), kot opisano zgoraj (3.2.3).

Za nadaljnjo izolacijo RNA z metodo IC smo zatehtali po 0,5 g mladih listov posameznega trsa vzorčenega junija 2007 ali 2008, ter v razmerju 1 : 10 (masa : volumen)

homogenizirali z ekstrakcijskim pufrom za ELISA za vinsko trto s pomočjo homogenizatorja Homex (Bioreba) ter homogenat shranili na -80 °C v 2 ml mikrocentrifugirkah do uporabe.

Zatehtali smo tudi po 250 mg svežih listov vzorcev pobranih junija 2008, ki smo jih uporabili za relativno kvantifikacijo virusa GFLV v prisotnosti in odsotnosti satRNA; vzorcev za določanje prisotnosti in raznolikosti satRNA pobranih začetek septembra 2010; ter vzorcev tujih izolatov GFLV; ter jih shranili na -80 °C. Homogenizacijo in izolacijo RNA smo izvedli na enak način kot je opisano zgoraj (3.4.3, 3.4.4).

Vzorce RNA, ki smo jih kasneje uporabili za relativno kvantifikacijo z enostopenjskim RT-PCR-RČ, smo shranili na -80 °C. Za namen določanja prisotnosti satRNA in proučevanja njihove raznolikosti smo RNA prepisali v cDNA, ki smo jo shranili na -20 °C.

3.5.1.1 Lovljenje virusov na protitelesa (immunocapture, IC)

V jamice mikrotitrne ploščice (Nunc Maxi Sorp) smo nanesti po 100 µl protiteles proti GFLV, redčenih v karbonatnem pufru 1 : 100. Ploščico smo pokrili, inkubirali tri ure pri 37 °C in nato trikrat sprali s pufrom za spiranje. V jamice smo nanesti 100 µl ekstrakta vinske trte, ploščico pokrili in inkubirali vsaj 16 ur pri 4 °C. Nato smo zlili vzorce iz ploščice in jo 4-krat sprali s pufrom za spiranje. V vsako jamico smo dodali po 10 µl 0.05% Tritona X-100, ploščico pokrili s folijo, jo inkubirali 10 minut pri 70 °C in ohladili na ledu.

3.5.2 Reverzna transkripcija (RT)

Komplementarno cDNA smo sintetizirali v 200 µl plastičnih mikrocentrifugirkah. 20 µl reakcijsko mešanico smo pripravili iz 9 µl sproščene virusne RNA, dobljene z metodo IC ali 2 µl celokupne RNA (tujih vzorcev), ki smo ji dodali 1 µl dNTP-jev (10 mM vsakega; Promega), 1 µl oligo-(dT)₂₁V (500 µg/ml) in ddH₂O do skupno 12 µl. Mešanico smo zmešali s pipetiranjem in inkubirali 5 minut pri 65 °C ter takoj ohladili na ledu za 2 minuti. Nato smo reakcijski mešanici dodali po 2 µl RNaznega inhibitorja (AB) (20 U/µl), 4 µl 5x pufra First-strand (Superscript II; Invitrogen) in 2 µl 0,1 M DTT (Superscript II; Invitrogen), zmešali s pipetiranjem in inkubirali 2 minuti pri 42 °C. Za tem smo dodali še po 1 µl reverzne transkriptaze Superscript II (Invitrogen) in rahlo pretresli (soft vortex) ter centrifugirali, nato pa inkubirali 1 uro pri 42 °C. Reakcijo smo ustavili s 15 minutno inkubacijo pri 70 °C in tako dobljeno cDNA shranili do uporabe v zamrzovalniku na -20 °C ali za krajši čas v hladilnik na 4 °C.

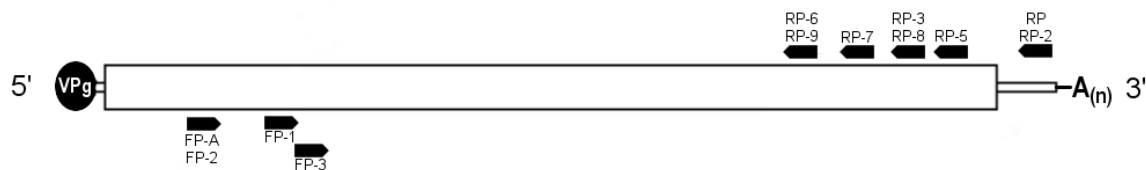
V primeru reverzne transkriptaze Superscript III, ki smo jo uporabili za obraten prepis celokupne RNA izolirane iz jesenskih vzorcev 2010, smo uporabili identičen postopek, le

da je reverzna transkripcija potekala 1h pri 55 °C. Zaradi višje temperature smo pričakovali uspešnejši prepis, saj višja prosta energija omogoča manj sekundarnih struktur, značilnih za molekule satRNA, ki bi motile proces prepisovanja.

3.5.3 Konstruiranje začetnih oligonukleotidov

Edino javno dostopno nukleotidno zaporedje satRNA GFLV je bilo izolirano iz izolata GFLV-F13. Šest drugih nukleotidnih zaporedij, najsorodnejših satRNA GFLV-F13 je bilo izoliranih iz ArMV. Vseh sedem nukleotidnih zaporedij satRNA smo poravnali s programom AlignX, ki je del programa Vector NTI 9.0.0 (InforMax, Bethesda, MD, ZDA) in poiskali primerne ohranjene regije na njihovih terminalnih delih. Na njih smo konstruirali prve 4 univerzalne začetne oligonukleotide s pomočjo programa Primer ExpressTM 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), pri čemer smo se trudili izogniti sekundarnim strukturam med različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov in upoštevati T_m med 55 in 61 °C. Specifičnost začetnih oligonukleotidov smo preverili *in silico* s pomočjo iskalnika po javni bazi podatkov Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). S prvim delujočim parom začetnih oligonukleotidov (FP-A/RP) smo pomnožili in potem tudi sekvencirali satRNA iz 4 (Volovnik 2/47, Volovnik 2/52, Volovnik 2/55, Refošk DU 2/19) od 9 testiranih izolatov GFLV. 20 novih nukleotidnih zaporedij satRNA (dolgi od 978 do 989 nukleotidov) smo dodali obstoječim, jih poravnali ter poiskali še druge ohranjene regije ter na njih skonstruirali nove začetne oligonukleotide.

Delovanje vseh 50 kombinacij začetnih oligonukleotidov smo preizkusili na dveh izolatih GFLV (Refošk DU 2/19 in Volovnik 2/55), katerih nukleotidna zaporedja so se najbolj razlikovala. Vseh 32 kombinacij začetnih oligonukleotidov, ki so dobro delovala smo nato testirali še na ostalih 7 izolatih (Refošk DU 3/13, Refošk 26 6/2, Refošk 26 6/4, Refošk 26 6/6, Refošk 26 5/122, Volovnik 2/47, Volovnik 2/52). S sedmimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov (FP-A/RP3, FP1/RP2, FP1/RP5, FP2/RP5, FP3/RP, FP3/RP3, FP3/RP5) smo uspeli pomnožiti satRNA v vseh devetih testiranih izolatih (Slika 22, Preglednica 3). Ker je kombinacija FP3/RR pomnoževala najdaljši fragment od zadnjih sedmih kombinacij (863 - 875 nukleotidov) smo jo uporabili za določanje prisotnosti satRNA v 70 vzorcih in za proučevanje raznolikosti satRNA.



Slika 22: Shematski prikaz naleganja delujočih začetnih oligonukleotidov na satRNA molekulo izolata GFLV-F13.

Figure 22: Schematic representation of primer annealing locations on satRNA molecule of GFLV isolate F13.

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje satRNA.

Table 4: Primers for satRNA amplification.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5' – 3')	Lokacija (nt) ^a
FP-A	TCGCATGCTTGyATTGTCGTG	122 - 142
FP1	ATGGGAGTAAAAyAATGGGTCAGG	202 - 225
FP2	CATGCTyGyATTGkCGTG	125 - 142
FP3	GTGGsCCCCGrAGTGT	237 - 252
RP	TAAwGAGCAACCAAAATCCCA	1086 - 1106
RP2	GAGCAACCAAAATCCCArCTT	1082 - 1102
RP3	GyTGTCACAArAGTGGGATC	933 - 953
RP5	CGCTGAGGAAArACyGTC	980 - 997
RP6	TTTCwkCAGGrCCCAGrAC	818 - 837
RP7	AGTGTCrCCACrTCGCA	876 - 892
RP8	TGTCCACrArAGTGGGrTC	933 - 951
RP9	TCwGCAGGAGCCCAGrA	819 - 835

^a Lokacija začetnih oligonukleotidov glede na satRNA francoskega izolata GFLV-F13.

^a Location of primers according to satRNA of French isolate GFLV-F13.

Preglednica 5: Kombinacije vseh delujočih začetnih oligonukleotidov.

Table 5: All working primer pair combinations.

Št.	Kombinacija začetnih oligonukleotidov	Št.	Kombinacija začetnih oligonukleotidov
1.	FP1/RP	17.	FP3/RP
2.	FP1/RP2	18.	FP3/RP2
3.	FP1/RP3	19.	FP3/RP3
4.	FP1/RP5	20.	FP3/RP5
5.	FP1/RP6	21.	FP3/RP6
6.	FP1/RP7	22.	FP3/RP7
7.	FP1/RP8	23.	FP3/RP8
8.	FP1/RP9	24.	FP3/RP9
9.	FP2/RP	25.	FP-A/RP
10.	FP2/RP2	26.	FP-A/RP2
11.	FP2/RP3	27.	FP-A/RP3
12.	FP2/RP5	28.	FP-A/RP5
13.	FP2/RP6	29.	FP-A/RP6
14.	FP2/RP7	30.	FP-A/RP7
15.	FP2/RP8	31.	FP-A/RP8
16.	FP2/RP9	32.	FP-A/RP9

3.5.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za preverjanje delovanja začetnih oligonukleotidov in določanje prisotnosti satRNA smo v 200 µl mikrocentrifugirke pripravili po 20 µl reakcijske mešanice, ki jo je sestavljalo po:

4 µl 5x Colorless Go Taq flexi pufra (Promega),
 1,2 µl MgCl₂ (Promega),
 0,4 µl dNTP-jev (10 mM vsakega; Promega),
 0,1 µl Go Taq DNA polimeraze (5 U/µl; Promega),
 2 µl začetnega oligonukleotida F (10 µM),
 2 µl začetnega oligonukleotida R (10 µM),
 2 µl cDNA (< 0,5 µg/50 µl) in
 ddH₂O do končnega volumna 20 µl.

Reakcijsko mešanico smo inkubirali v aparaturi za PCR GeneAmp® PCR System 9700HT (Applied Biosystems) po naslednjem postopku:

94 °C	3 min	
94 °C	30 s	} 30 ciklov
54 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Za nadaljnje kloniranje in sekvenciranje smo v izogib napakam, ki nastanejo pri pomnoževanju in za večjo učinkovitost pomnoževanja za PCR uporabili komplet Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). V 200 µl mikrocentrifugirke smo pripravili po 50 µl reakcijske mešanice sestavljene iz:

5 µl	High Fidelity pufra (Invitrogen),
2 µl	MgSO ₄ (Invitrogen),
2 µl	dNTP-jev (10 mM vsakega; Promega),
0,2 - 0,8 µl	High Fidelity Taq polimeraze (0.2 U/µl; Invitrogen),
0,5 µl	začetnih oligonukleotid FP3 (100 µM),
0,5 µl	začetnih oligonukleotid RP (100 µM),
2 µl	cDNA (< 0,5 µg/50 µl) in
ddH ₂ O do končnega volumna 50 µl.	

Reakcijsko mešanico smo inkubirali v aparaturi za PCR GeneAmp® PCR System 9700HT (Applied Biosystems) po naslednjem postopku:

94 °C	2 min	
94 °C	30 s	} 40 ciklov
54 °C	1 min	
68 °C	1 min	
68 °C	10 min	
4 °C	∞	

Do uporabe smo PCR produkte shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.5.4.1 Gelska elektroforeza

Prisotnost in velikost pomnoženih produktov PCR smo preverili na 1,2% agaroznem gelu s TAE pufrom in etidijevim bromidom. Elektroforeza je potekala 50 minut pri napetosti 100 V.

3.5.4.2 Obdelava podatkov dobljenih s popisovanjem bolezenskih znamenj

Trse, pri katerih smo opazovali prisotnost satRNA, smo razvrstili v tri skupine: z (+) ali brez satRNA (-) ter tiste pri katerih smo satRNA določili le junija (+/-). Naknadno smo slednje (+/-) prišteli tistim s satRNA (+) ali tistim brez satRNA (-) ter tako primerjali le dve skupini trsov (z in brez satRNA). Bolezenska znamenja smo razdelili na 21 kategorij, ki jih lahko razdelimo v 5 grobih skupin: nepravilna oblika listov (pahljačavost listov, asimetrični listi), rumemenje listov (kloroze žil, kloroze medžilnih prostorov v obliki rumenih pik, kloroze medžilnih prostorov v obliki rumenih lis, rumenenje celih listov), nepravilna rast stebel (bifurkacije na členku, bifurkacije na medčlenku, kratki medčlenki, dvojni členki, zraslost poganjkov, ploščata stebila), slab pridelek (majhni grozdi, majhne jagode, redkejši grozdi, osipavanje jagod, ni pridelka) in zbita rast (manjši listi, gosti listi ter grmičasta oz. metlasta rast). Bolezenska znamenja smo označili kot delež pojavljanja bolezenskega znamenja glede na število let popisa za posamezni trs ali le kot 1 ali 0 (prisotnost ali odsotnost bolezenskega znamenja). Za vsako od teh kombinacij smo izračunali ali sta spremenljivki (prisotnost satRNA in bolezenska znamenja) odvisni ali ne in sicer z uporabo testa Hi-kvadrat (χ^2) ter G-testa.

3.6 PROUČEVANJE GENETSKE RAZNOLIKOSTI SATELITSKE RNA VIRUSA GFLV

3.6.1 Izolacija in čiščenje fragmentov iz gela

Ker so se s PCR s kombinacijo začetnih oligonukleotidov FP3/RP poleg specifičnega pomnožili še nespecifični fragmenti, smo jih nanesti na gel, iz katerega smo izrezali specifične fragmente ter DNA očistili s kompletom MontageTM DNA Gel Extraction Kit (Millipore, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Čistost in koncentracijo DNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop (Nano Drop Technologies Inc., ZDA). V primerih, ko je bila koncentracija očiščenih produktov PCR prenizka za ligacijo, smo jih koncentrirali z obarjanjem DNA ali evaporacijo z evaporatorjem GenVac EZ-2 PLUS (SP Scientific). Za precipitacijo smo vzorcu dodali 125

μl absolutnega etanola in 5 μl 3 M Na-acetata (pH 5,2) ter vzorce inkubirali čez noč pri temperaturi -20°C . Centrifugo smo ohladili na 4°C in vzorce centrifugirali 30 minut pri 20000 g. Supernatant smo odstranili in dodali 180 μl 70% etanola. Vzorce smo ponovno centrifugirali 15 min pri 20000 g. Supernatant smo previdno odstranili in DNA posušili v odprtih mikrocentrifugirkah na sobni temperaturi. DNA smo raztopili v ustrezni količini vode in jo shranili pri -20°C do uporabe.

3.6.2 Ligacija v vektorja pGEM-T Easy in pJET 1.2/blunt

Produkte PCR smo vnesli v plazmide in z njimi transformirali kompetentne celice. Tako smo zagotovili, da je vsaka od transformiranih celic prejela plazmid s produktom le ene izmed genotipskih različic satRNA, ki so okuževale rastlino.

Prečiščene in skoncentrirane produkte RT-PCR (863 – 875) tujih ter slovenskih izolatov GFLV vzorčenih junija 2007 in 2008 smo ligirali v vektor pGEM-T Easy, ki je del kompleta pGEM-T Easy Vector System I (Promega, ZDA). Plazmidni vektor pGEM-T Easy je lineariziran z restriktazo EcoRV in ima na obeh 3' koncih dodan timin. Le-ta poveča učinkovitost ligacije produktov PCR, ki imajo na 5' koncih dodan en ali dva adenina, ki jih ustvari termostabilna Platinum Taq polimeraza HiFi (Invitrogen).

Za uspešno ligacijo smo zagotovili, da je molarno razmerje med vektorjem in insertom znašalo 1 : 3. K 3 μl očiščenih in skoncentriranih PCR produktov smo dodali 5 μl pufra Rapid ligation, 1 μl 50 ng/μl plazmidnega vektorja pGEM-T Easy ter 1 μl 3 U/μl DNA ligaze T4. Ligacijsko mešanico smo inkubirali čez noč pri 4°C .

Produkte RT-PCR slovenskih GFLV izolatov vzorčenih septembra 2010 smo ligirali v vektor pJET 1.2/blunt, ki je del kompleta CloneJETTM PCR Cloning kit (Fermentas, ZDA). Molarno razmerje med produkti PCR in vektorjem pri tem sistemu ni bilo tako bistveno, ker ima izredno širok optimalni razpon (od 0,5 : 1 do 15 : 1) zato se nanj nismo ozirali. K 3,5 μl očiščenih produktov PCR smo dodali 5 μl 2x pufra Reaction buffer ter 0,5 μl encima DNA blunting enzyme. Slednji je potreben za odstranitev adeninov iz 5' koncev PCR produkta, ki jih je dodala Taq DNA polimeraza, plazmidni vektor pJET 1.2/blunt namreč najučinkoviteje veže tope konce. Mešanico smo na kratko pretresli (soft vortex) in centrifugirali ter inkubirali 5 minut pri 70°C . Ko smo mešanico ohladili na ledu smo dodali še 0,5 μl vektorja pJET 1.2/blunt (50 ng/μl) ter 0,5 μl DNA ligaze T4. Mešanico smo spet na kratko pretresli in centrifugirali ter inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi.

3.6.3 Transformacija celic

Suspenzijsko kulturo kompetentnih celic Subcloning Efficiency DH5 α *Escherichia coli* (Invitrogen) shranjeno na – 80 °C smo odtalili na ledu. 100 μ l suspenzijske kulture bakterij smo dodali k 5 μ l ligacijske mešanice plazmidnega vektorja pGEM-T Easy (Promega) z vstavljenimi produkti PCR in inkubirali 20 minut na ledu. Transformacijo smo izvedli s toplotnim šokom 30 sekund v vodni kopeli pri 42 °C. Po transformaciji smo bakterije inkubirali 2 minuti na ledu in jim dodali 900 μ l gojišča SOC (segretega na 37 °C) in jih inkubirali 1h pri 37 °C s stresanjem (250 rpm). Na tri petrijevke s trdnim gojiščem LB/Amp/X-Gal/agar smo razmazali po 100, 200 in 300 μ l posameznega vzorca in inkubirali čez noč pri 37 °C.

Preživele so le kolonije z vnesenim plazmidom, ki ima zapis za rezistentni gen na antibiotik. Kolonije, ki so vsebovale plazmid z insertom so bile bele, medtem ko so bile kolonije s praznim plazmidom modre. Modro-beli test sloni na operonu za lacZ protein, ki je lociran na plazmidu in je ena od dveh podenot encima β -galaktozidaze. Druga podenota tega encima je kodirana na bakterijskem kromosomu. X-Gal je brezbarvna modificirana galaktoza, ki jo metabolizira β -galaktozidaza, pri tem pa nastaja svetlo moder produkt, ki pri testu deluje kot indikator, da je operon lacZ intakten. Ker je insercijsko mesto locirano na mestu operona lacZ, se ob inserciji fragmenta v plazmid, operon lacZ prekine in postane nefunkcionalen. Posledično β -galaktozidaze ni, zato ni stranskega metabolnega produkta substrata X-Gal in kolonije ostanejo bele.

Od vsakega vzorca smo izbrali nekaj belih kolonij in jih precepili na trdno gojišče LB/Amp/agar ter inkubirali čez noč pri 37 °C. Posamezne kolonije smo s trdnega gojišča precepili v 5 - 7 ml tekočega gojišča LB/Amp in inkubirali s stresanjem čez noč pri 37 °C. 1 ml suspenzijske kulture smo shranili s sterilnim glicerolom (cca. 0,4 ml) na -80 °C.

Plazmidni vektor pJET 1.2/blunt (Fremontas) z vstavljenimi produkti PCR smo vnesli v kompetentne celice One Shot TOP10 *Escherichia coli* (Invitrogen) po enakem postopku kot je opisano zgoraj. Po transformaciji smo bakterijam dodali 250 μ l gojišča SOC (segretega na 37 °C) in jih 1h pri 37 °C inkubirali s stresanjem (250 rpm). Na dve petrijevki s trdnim gojiščem LB/Amp/agar smo razmazali po 100 in 200 μ l posameznega vzorca in inkubirali čez noč pri 37 °C.

Vektor pJET 1.2/blunt ne potrebuje modro-belega testa, ker ima vstavljen zapis za letalni restriksijski encim, ki vsebuje insercijsko mesto. Če se v tak plazmid vstavi insert se letalni restriksijski encim ne izraža in se bakterije normalno delijo, če pa je plazmid prazen, se bo

letalni restriksijski encim prepisoval in uničil bakterijo. Na gojišču z ampicilinom bodo tako zrasle le bakterije, ki imajo vnesen plazmid z insertom.

Od vsakega vzorca smo izbrali nekaj kolonij in jih precepili na trdno gojišče LB/Amp/agar ter inkubirali čez noč pri 37 °C. Posamezne kolonije smo s trdnega gojišča precepili v 5 - 7 ml tekočega gojišča LB/Amp in inkubirali s stresanjem čez noč pri 37 °C.

Gojišče SOC (pH 7):

Bacto Trypton	2%	}	sterilizirano z avtoklaviranjem (20 min pri 120 °C)
Kvasni ekstrakt	0,5%		
NaCl	10 mM		
KCl	2,5 mM		
MgCl ₂	10 mM		
MgSO ₄	10 mM		
Glukoza	20 mM		

Tekoče gojišče LB/Amp (pH 7):

Bacto Trypton	2%	}	sterilizirano z avtoklaviranjem (20 min pri 120 °C)
Kvasni ekstrakt	0,5%		
NaCl	85 mM		
Ampicilin	0,01%		

Ko se je gojišče ohladilo na 60 °C, smo dodali ampicilin, premešali, napolnili falkonke do 5 – 7 ml in jih pokrili z alufolijo.

Trdno gojišče LB/Amp/X-Gal/agar (pH 7):

Bacto Trypton	2%	}	sterilizirano z avtoklaviranjem (20 min pri 120 °C)
Kvasni ekstrakt	0,5%		
NaCl	85 mM		
Agar	1,5%		
Ampicilin	0,01%		
X-Gal	0,008%		

Ko se je gojišče ohladilo na 60 °C, smo dodali ampicilin in x-Gal, premešali in nalili v petrijevke. Trdno gojišče brez X-Gal smo naredili po istem postopku, le da na koncu nismo dodali X-Gal.

3.6.4 Izolacija plazmidov

Plazmide smo izolirali s kompletom Wizard SV 96 Plasmid DNA Purification System (Promega). Falkonke s suspenzijsko kulturo bakterij smo centrifugirali 5 min pri 5500 rpm (3213 g), odlili supernatant in pelete resuspendirali v 250 µl pufra za resuspenzijo. Nato smo dodali 250 µl pufra za lizo celic in previdno premešali. Po 3 minutah smo dodali 350 µl nevtralizacijskega pufra in bakterijske lizate iz posameznih falkonk prenesli v ploščico za čiščenje bakterijskih lizatov. To smo postavili na vezavno ploščico in obe na poseben podstavek s katerim smo z vakuumsko črpalko odstranili bakterijski lizat, plazmidi pa so se vezali na vezavno ploščico. Ploščico za čiščenje bakterijskih lizatov smo zavrgli, v vdolbinice vezavne ploščice pa nanesti 500 µl nevtralizacijskega pufra in ga s priključitvijo na podtlak za 1 minuto tudi odstranili. Nato smo nanesti po 1 ml pufra za izpiranje in sistem priključili na podtlak za 1 minuto. Zadnji korak smo ponovili, le da smo odstranjevanje pufra za izpiranje s podtlakom podaljšali na 10 minut. Vezavno ploščico smo namestili na elucijsko ploščico in obe na podstavek s povezavo na vakuumsko črpalko. V vdolbinice vezavne ploščice smo nanesti 100 µl sterilne vode in s pomočjo podtlaka plazmide zbrali v elucijsko ploščico. Elucijski volumni so variirali med 60 in 70 µl. Mikrotitrsko elucijsko ploščico smo pokrili s samolepilno folijo in plazmide shranili pri –20 °C do uporabe.

3.6.5 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Velikost vstavljenih produktov PCR v plazmidna vektorja pGEM-T Easy in pJET 1.2/blunt smo preverili s PCR in začetnimi oligonukleotidi T7 promotor/SP6 ter pJET 1_2F/pJET 1_2R, ki nalegajo na posamezni plazmid zelo blizu mesta vstavljenih fragmentov (Preglednica 6).

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na plazmidna vektorja pGEM-T Easy in pJET 1.2/blunt.

Table 6: Primers annealing to plasmid vectors pGEM-T Easy and pJET 1.2/blunt.

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5' → 3')
T7 promotor	ATACGACTCACTATAGGGCG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
pJET 1_2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET 1_2R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

V 200 µl mikrocentrifugirke smo pripravili reakcijsko mešanico sestave (Promega):

4 µl	5x pufra Colorless Go Taq flexi
1,2 µl	MgCl ₂
0,4 µl	dNTP (10 mM vsakega)
0,1 µl	Go Taq DNA polimeraze
0,2 µl	100 µM začetnega oligonukleotida T7 promotor / 10 µM pJET 1_2F
0,2 µl	100 µM začetnega oligonukleotida SP6 / 10 µM pJET 1_2R
do skupno 19 µl	ddH ₂ O

V vsako mikrocentrifugirko smo dodali po 1 µl posameznega plazmida in inkubirali v aparaturi za PCR GeneAmp® PCR System 9700HT (Applied Biosystems) po sledečem protokolu:

94 °C 3 min

94 °C 30 s	} 25 ciklov
55 °C 1 min	
72 °C 2 min	

72 °C 7 min

3.6.5.1 Gelska elektroforeza

Na 1,2% agaroznem gelu s pufrom TAE smo preverili velikost produktov PCR oziroma velikost fragmentov, ki so se vključili v plazmidni vektor. Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 100 V.

3.6.6 Določanje nukleotidnega zaporedja

Od vsakega vzorca smo na sekvenciranje v MacroGen Inc. (Koreja) poslali plazmide 1 - 10 klonov. Insert smo sekvencirali iz obeh smeri, v primeru plazmida pGEM-T Easy z začetnima oligonukleotidoma T7 promotor in SP6, v primeru plazmida pJET 1.2/blunt pa z začetnima oligonukleotidoma pJET 1_2F in pJET 1_2R (Preglednica 6).

3.6.6.1 Obdelava nukleotidnih zaporedij

V programu ContigExpress, ki je del kompleta Vector NTI Suite 9.0.0 (InforMax, Bethesda, MD, ZDA), smo preverili kvaliteto kromatogramov obeh direktnih in obrnjenih-nasprotno enakih (reverse complement) nukleotidnih zaporedij in izrezali nukleotidno zaporedje inserta omejenega z začetnima oligonukleotidoma. Dobljena in že obstoječa nukleotidna zaporedja satRNA ArMV in GFLV-F13 (Entrez Nucleotide Database) smo

prepisali v aminokislinska zaporedja s pomočjo funkcije Translation tool, v programu Vector NTI Suite 9.0.0. Nukleotidna in aminokislinska zaporedja smo vnesli v podatkovno bazo programa Vector NTI Suite 9.0.0.

Za poravnavo vseh tako dobljenih nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij satRNA smo uporabili program AlignX, ki je prav tako del kompleta Vector NTI Suite 9.0.0. Iz programa AlignX smo poravnana zaporedja izvozili v format .msf, ki smo ga lahko odprli s programom Genedoc. Od tu smo jih izvozili v program Notepad (Microsoft Office) v obliki FASTA. Iz tega programa smo izvozili tudi poravnavo nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij v program Word (Microsoft Office).

Vseh 136 sekvenciranih nukleotidnih zaporedij in iz njih prepisanih aminokislinskih zaporedij smo v formatu FASTA uvozili v prosto dostopen program Mega 4.0 (Tamura in sod., 2007), kjer smo jih z algoritmom ClustalW ponovno poravnali (program najprej zaporedja primerja po parih in nato po več skupaj). Poravnana zaporedja smo izvozili v format MEGA (.meg), iz katerega smo lahko izrisali filogenetska drevesa, pri čemer smo uporabili metodo Neighbor-Joining (NJ). Zanesljivost dobljenih filogenetskih odnosov smo ocenili z izvedbo 1000 bootstrap ponovitev, kar pomeni, da je program filogenijo po metodi NJ izračunal 1000x in na podlagi rezultatov izrisal najoptimalnejše filogenetsko drevo ter izpisal, v kolikšnem deležu od vseh poizkusov je prišlo do prikazanih filogenetskih odnosov. Če je bil delež večji od 60% smo ga ohranili napisanega na filogenetskih drevesih. Dobljena drevesa smo skopirali v program za obdelavo grafike CorelDRAW 11.633, kjer smo jih pobarvali in dodali tekst. S funkcijo Show Similarity Table v programu AlignX smo preverili v kolikšnem deležu so si posamezna NK ali AK zaporedja med sabo podobna in te vrednosti dopisali na filogenetska drevesa.

Iz vseh 136 zaporedij smo izločili tista, ki so si bila podobna v več kot 98% in so bila izolirana iz iste rastline, izmed njih smo pustili le po enega predstavnika. Tako smo zmanjšali število proučevanih zaporedij na 65, kar nam je omogočilo uporabo prosto dostopnega programa MatGAT 2.0.2 (Matrix Global Alignment Tool; <http://bitincka.com/ledion/matgat/>), ki optimalno deluje le z do 100 zaporedij. Po vnosu zaporedij v formatu FASTA nam je program MatGAT izrisal tabelo podobnosti, ki jo je izračunal iz primerjave vsakega zaporedja z vsakim (po parih). Tako nam je za vsako kombinacijo izpisal delež podobnosti, ki smo jih izvozili v program Excel (Microsoft Office). Iz teh podatkov smo izrisali graf, ki je prikazoval delež podobnosti v odvisnosti od števila kombinacij (parov nukleotidnih zaporedij).

3.6.7 Relativna kvantifikacija GFLV z RT-PCR-RČ v primeru prisotnosti / odsotnosti satRNA

Pri 13 vzorcih sorte Refošk (7 pozitivnih na satRNA in 6 negativnih na satRNA) iz šestih lokacij na Krasu smo relativno kvantificirali količino GFLV RNA2. COX smo izbrali kot referenčni gen za normalizacijo. Enostopenjski RT-PCR-RČ smo izvedli v dveh tehničnih ponovitvah in treh redčinah vsakega vzorca: neredčenem, 10x in 100x redčenem. Uporabili smo komplet AgPath-ID OneStep RT-PCR kit (Ambion, ZDA) po postopku ki je opisan zgoraj (3.4.6.2).

Relativno kvantifikacijo smo izračunali na enak način kot je opisano v (3.4.6.9), le da smo za normalizacijo uporabili le gen COX.

4 REZULTATI

4.1 ISKANJE NOVIH TRSOV OKUŽENIH Z VIRUSOM GFLV

Od 45 testiranih trsov z bolezenskimi znamenji značilnimi za GFLV smo pri 28 trsih določili le virus GFLV, ostali so imeli poleg virusa GFLV prisoten še kak drug virus (Preglednica 7). Pri štirih dodatnih trsih, ki niso kazali bolezenskih znamenj značilnih za okužbo z virusom GFLV le-tega tudi nismo določili. Pri enem od slednjih trsov smo določili virus GLRaV-6, pri drugem pa virusa GLRaV-1 in GLRaV-3, ki sta bila zaradi nizkih vrednosti OD na meji določljivosti. Virusov ArMV in GVB nismo določili v nobenem od testiranih vzorcev. GVA smo določili le pri enem od 49 vzorcev. Pri devetih trsih je bil ob virusu GFLV prisoten še GFkV, deset trsov je bilo dodatno okuženih z virusom GLRaV-1, pri štirih od njih je bil GLRaV-1 na meji določljivosti. GLRaV-3 smo z gotovostjo določili le pri dveh vzorcih, okuženih z GFLV, pri drugih dveh vzorcih pa je bil na meji določljivosti (Preglednica 7).

Preglednica 7: Rezultati testiranja trsov s testom ELISA na prisotnost 9 najpogostejših virusov.

Table 7: Results of ELISA test for presence of 9 most frequent viruses on grapevines.

Št.	Lokacija	Trs	GFLV	GFkV	ArMV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GVA	GVB
1.	Dutovlje 1	Refošk DU 1/21	++	--	--	--	?-	--	--	--	-
2.		Refošk DU 1/50	++	--	--	--	--	--	--	--	--
3.		Refošk DU 10/1	--	--	--	?-	--	?-	--	--	-
4.		Refošk DU 10/-1	--	--	--	--	--	--	+-	--	-
5.		Refošk DU 2/25	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6.		Refošk DU 2/40	++	--	--	--	--	--	--	--	--
7.		Refošk DU 2/71	+	-	-	-	-	?	-	-	-
8.		Refošk DU 2b/54	++	--	--	--	--	--	--	--	--
9.		Refošk DU 2b/6	++	--	--	--	--	--	--	--	-
10.		Refošk DU 3/19	+	-	-	+	+	-	-	-	-
11.		Refošk DU 3/20	+	-	-	-	-	-	-	?	-
12.		Refošk DU 3/21	+	?	-	-	?	-	-	-	-
13.		Refošk DU 3/3	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14.		Refošk DU 4/4	++	--	--	--	--	--	--	--	--
15.		Refošk DU 4/5	++	--	--	--	--	--	--	--	--
16.		Refošk DU 9/1	--	--	--	--	--	--	--	--	-

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 7: Rezultati testiranja trsov s testom ELISA na prisotnost 9 najpogostejših virusov.

Table 7: Results of ELISA test for presence of 9 most frequent viruses on grapevines.

Št.	Lokacija	Trs	GFLV	GFKV	ArMV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GVA	GVB
17.	Dutovlje 2	Refošk DUK 1/15	++	--	--	--	--	--	--	--	--
18.		Refošk DUK 1/20	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19.		Refošk DUK 1/23	++	--	--	--	--	--	--	--	--
20.		Refošk DUK 1/37	+	-	-	+	-	-	-	-	-
21.		Refošk DUK 1/7	+	-	-	+	-	-	-	+	-
22.		Refošk DUK 1/9	++	--	--	--	--	--	--	--	--
23.		Refošk DUK 2/17	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24.		Refošk DUK 2/3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25.		Refošk DUK 3/37	++	--	--	--	--	--	--	--	--
26.		Sauvignon DUK 1/19	+	-	-	-	-	-	-	-	-
27.		Sauvignon DUK 2/16	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28.		Sauvignon DUK 2/25	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29.		Sauvignon DUK 2/27	+	-	-	-	-	-	-	-	-
30.		Sauvignon DUK 2/28	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31.		Sauvignon DUK 2/30	+	-	-	-	-	-	-	-	-
32.		Sauvignon DUK 2/31	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33.		Sauvignon DUK 3/40	++	--	--	+	--	--	--	--	--
34.		Zelen DUK 3/10	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35.		Zelen DUK 3/41	+	+	-	-	-	-	-	-	-
36.	Dutovlje 3	Refošk DUC 3/13	++	--	--	--	--	--	--	--	--
37.		Refošk DUC 3/8	++	--	--	--	--	--	--	--	--
38.		Refošk DUC 4/10	++	--	--	--	--	--	--	--	--
39.		Refošk DUC 4/9	++	--	--	--	--	--	--	--	--
40.	Komen	Refošk 9 2/72	-	+	-	-	-	-	-	-	-
41.		Refošk 9 2/73	-	+	-	-	-	-	-	-	-
42.	Tomaj	Refošk TO 4/10	+	+	-	-	-	-	-	-	-
43.		Refošk TO 4/11	+	-	-	?	-	+	-	-	-
44.		Refošk TO 4/9	++	--	--	--	--	+	--	--	--
45.		Refošk TO 5/8	++	--	--	+	--	--	--	--	--
46.		Vit. Grganja TO 5/11	+	-	-	+	-	-	-	-	-
47.	Vrhopolje 1	Laški Rizling 4/32	+	+	-	?	-	-	-	-	-
48.	Vrhopolje 2	Župlanka 1/2	+	+	-	?	-	-	-	-	-
49.		Župlanka 1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ pozitiven rezultat, - negativen rezultat, ? nizka OD vrednost na meji določljivosti.

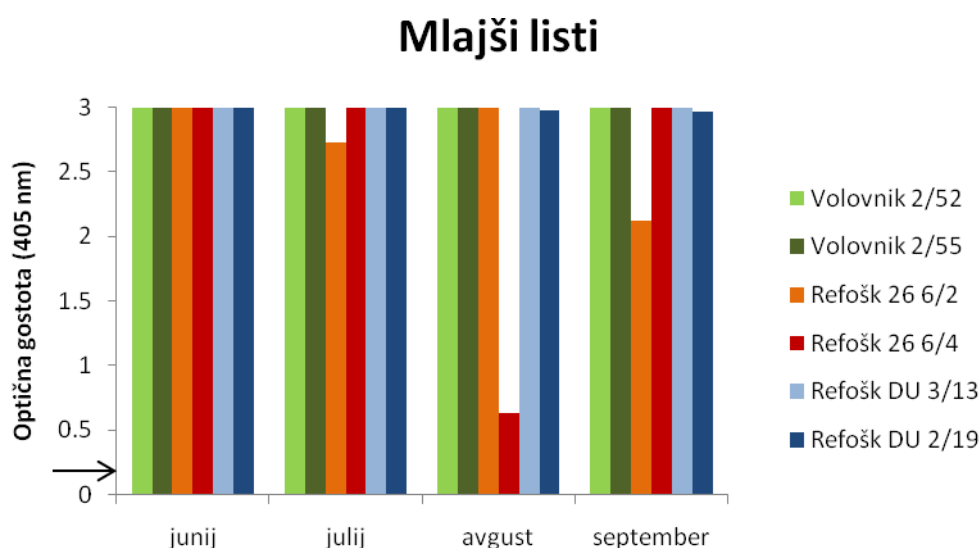
Dva znaka pomenita, da je bil vzorec 2-krat testiran (zeleno – 2007, črno – 2008, modro – 2009).

+ positive result, - negative result, ? low OD value on the limit of detection.

Two signs mean that sample was tested twice (green – 2007, black – 2008, blue – 2009).

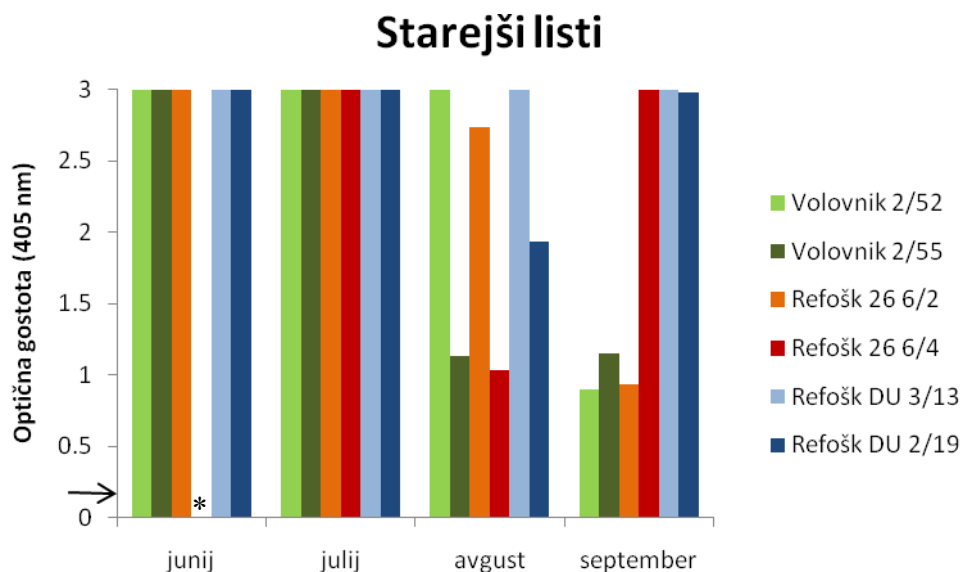
4.2 DOLOČANJE VIRUSA GFLV SKOZI SEZONO S TESTOM ELISA

Optične gostote, ki smo jih fotometrično zmerili pri testiranju mlajših listov in vitic, so bile pri vseh šestih rastlinah vinske trte skozi celo rastno sezono visoke. Le pri trsah sorte Refošk iz Komna (Refošk 26 6/2 in Refošk 26 6 /4) smo zaznali manjši padec virusnega titra v drugi polovici rastne sezone. Zelo podoben trend smo opazili pri starejših listih, le da so v drugi polovici rastne sezone virusni titri padli v več rastlinah ne glede na sorto ali lokacijo. Starejših listov junija in vitic avgusta za vzorec Refošk 26 6/4 nismo testirali (Slike 23, 24, 25).



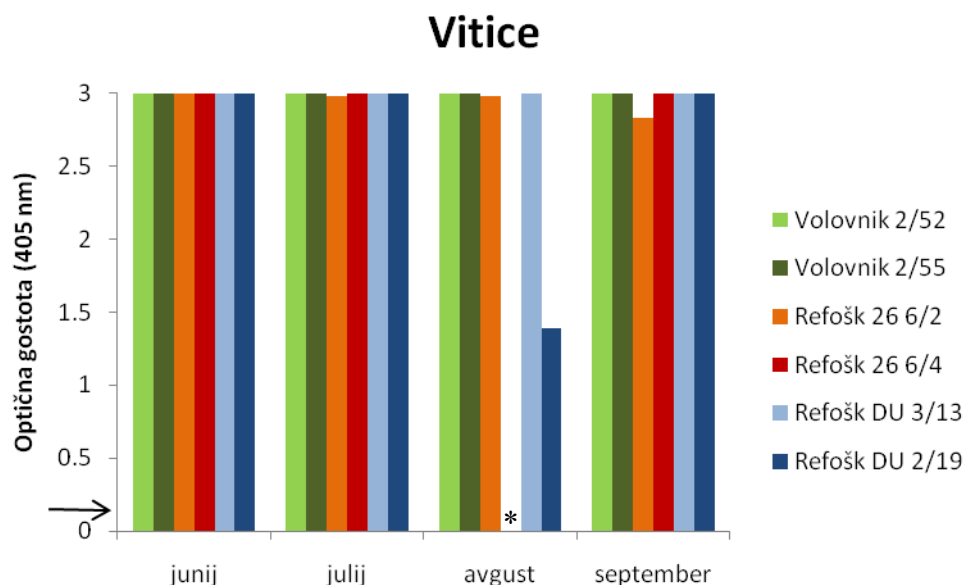
Slika 23: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri mlajših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.

Figure 23: Graphical representation of optical density (OD) values of ELISA test, 2 hours after adding the substrat, for GFLV virus in young leaves of six grapevines (cvs. Refošk and Volovnik from three different locations) throughout the season 2008. Arrow represents 2-fold values of negative control.



Slika 24: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri starejših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. * Vzorec ni bil testiran.

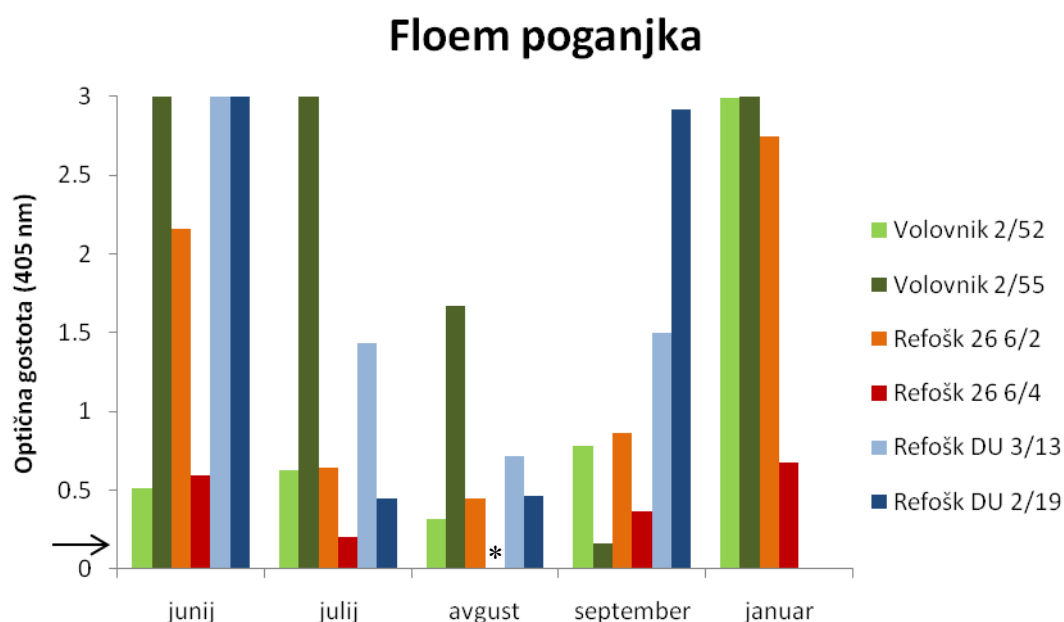
Figure 24: Graphical representation of optical density (OD) values of ELISA test, 2 hours after adding the substrat, for GFLV virus in older leaves of six grapevines (cvs. Refošk and Volovnik from three different locations) throughout the season 2008. Arrow represents 2-fold values of negative control. * Sample was not tested.



Slika 25: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri viticah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. * Vzorec ni bil testiran.

Figure 25: Graphical representation of optical density (OD) values of ELISA test, 2 hours after adding the substrat, for GFLV virus in tendrills of six grapevines (cvs. Refošk and Volovnik from three different locations) throughout the season 2008. Arrow represents 2-fold values of negative control. * Sample was not tested.

V floemu smo pri vseh vzorcih opazili očiten trend padanja virusnega titra sredi rastne sezone in ponovne rasti ob koncu in izven rastne sezone. Najnižji titer virusa smo določili v floemu rastline Refošk 26 6/4, kjer je bil že julija pod mejo določljivosti. Avgusta ni bil testiran. Najvišje virusne titre smo določili v trsih sorte Refošk iz Dutovelj 1 ter v rastlini Volovnik 2/55, pri kateri pa je bil virus v floemu nedoločljiv septembra. Na splošno je bil virusni titer v floemu januarja višji kot med rastno sezono (Slika 26).

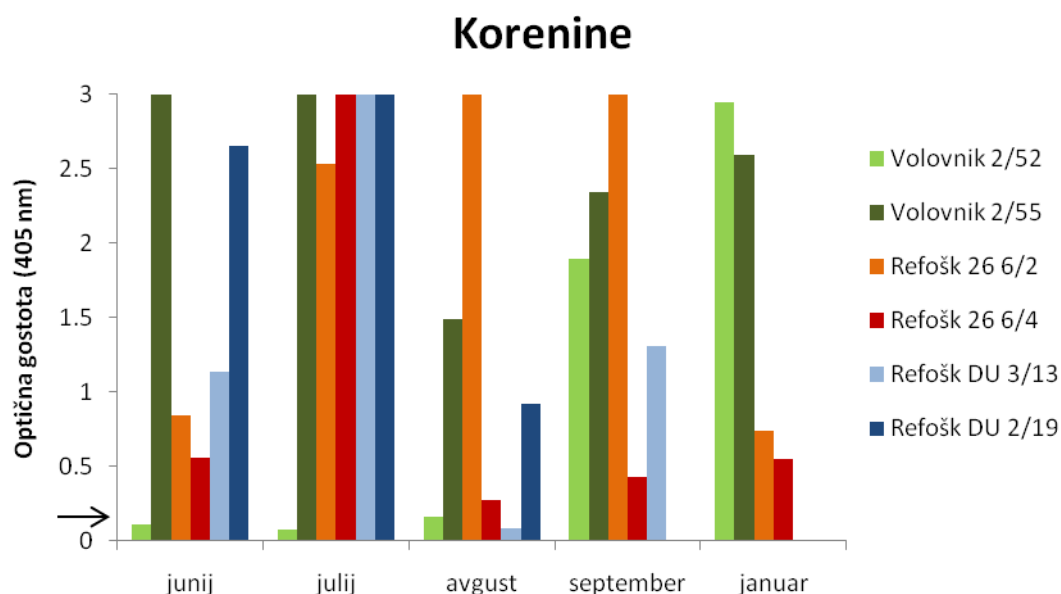


Slika 26: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri floemu poganjka šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008 in zunaj rastne sezone januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.

* Vzorec ni bil testiran.

Figure 26: Graphical representation of optical density (OD) values of ELISA test, 2 hours after adding the substrat, for GFLV virus in phloem of six grapevines (cvs. Refošk and Volovnik from three different locations) throughout the season 2008 and out of the season in January 2009. Arrow represents 2-fold values of negative control. * Sample was not tested.

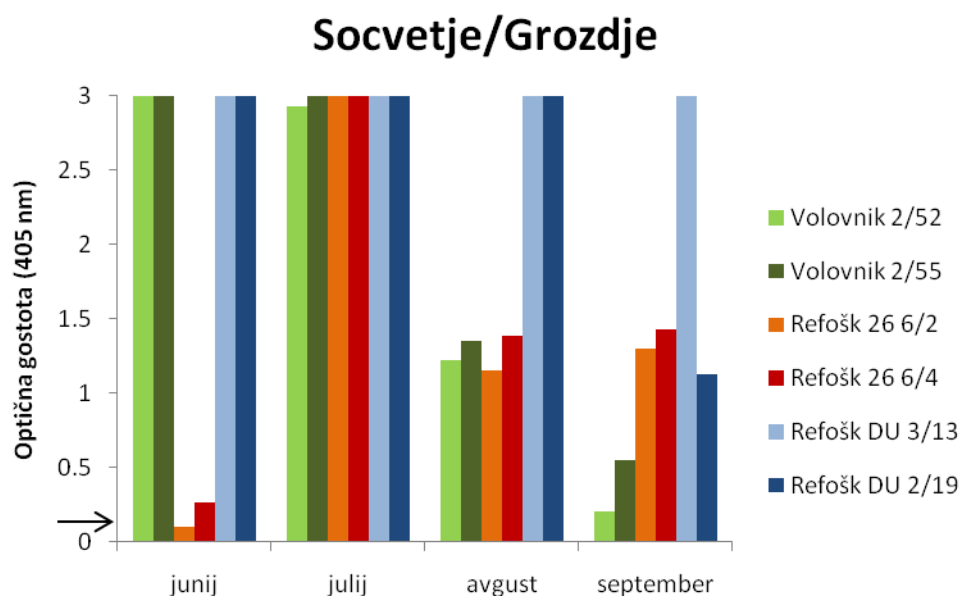
V koreninah je bil titer virusa zelo različen med posameznimi rastlinami, kljub temu pa smo julija opazili najvišjega pri večini vzorcev, razen pri rastlini Volovnik 2/52 kjer je bil virus pod mejo določljivosti od junija do avgusta, septembra in januarja pa se je njegova količina znatno povečala. Avgusta virusa nismo mogli določiti tudi v trsih Refošk DU 3/13 in Refošk 26 6/4. Izven rastne sezone smo testirali prisotnost virusa v koreninah pri 4 trsih in pri vseh je bila količina virusa nad mejo določljivosti (Slika 27).



Slika 27: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri koreninah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008 in znaj rastne sezone januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.

Figure 27: Graphical representation of optical density (OD) values of ELISA test, 2 hours after adding the substrat, for GFLV virus in roots of six grapevines (cvs. Refošk and Volovnik from three different locations) throughout the season 2008 and out of the season in January 2009. Arrow represents 2-fold values of negative control.

V prvi polovici rastne sezone smo visok titer virusa določili tudi v socvetju oz. zelenih nezrelah jagodah grozda, z izjemo trsov sorte Refošk iz Komna, kjer je bil virusni titer v cvetovih (junija) na meji oz. pod mejo določljivosti. V drugi polovici rastne sezone je virusni titer padel v vseh vzorcih razen v trsih sorte Refošk iz Dutovelj 1 (predvsem Refošk DU 3/13), kjer je bil konstantno zelo visok (Slika 28).

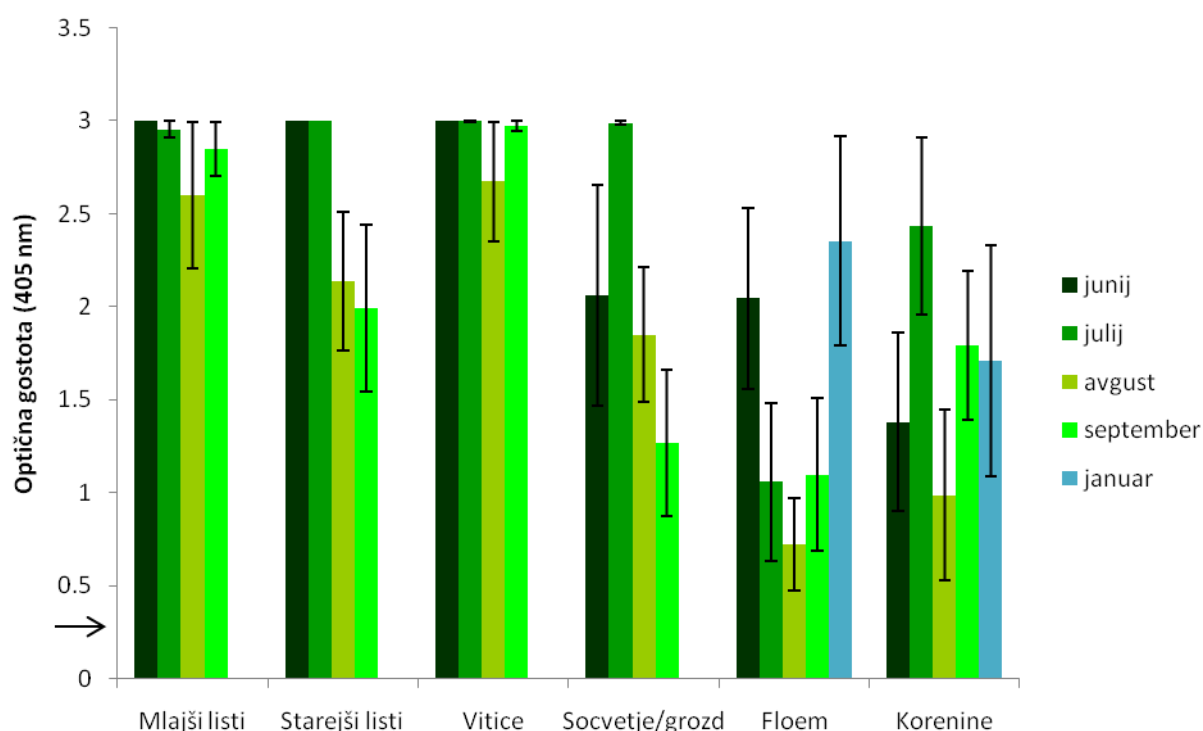


Slika 28: Grafični prikaz fotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri socvetju/grozdu šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.

Figure 28: Graphical representation of optical density (OD) values of ELISA test, 2 hours after adding the substrat, for GFLV virus in flower and berry clusters of six grapevines (cvs. Refošk and Volovnik from three different locations) throughout the season 2008. Arrow represents 2-fold values of negative control.

V povprečju smo pri šestih trsih dveh različnih sort iz treh različnih lokacij na Krasu in v Vipavski dolini dobili najvišje in med vzorci najbolj ponovljive koncentracije virusa pri testiranju vitic ter mlajših in starejših listov. Vrednosti v teh delih rastlin so skozi rastno sezono padale ali pa so se povečevale razlike (Slika 29; prikazano s standardnimi napakami) med vzorci. Bolj spremenljive vrednosti smo dobili pri homogenatih iz cvetov/grozdnih jagod. Tudi pri vzorcih korenin in floema poganjka so bile vrednosti med vzorci zelo raznolike. Pri testiranju floema smo izmerili najvišje povprečne vrednosti na začetku in izven rastne sezone (januarja), medtem, ko so bile najnižje avgusta, sredi rastne sezone. V avgustu smo dobili v povprečju najnižje vrednosti tudi pri vseh zelenih delih rastline in v koreninah. Pri koreninah je bilo spreminjanje količine virusa skozi sezono najbolj dinamično, najvišje vrednosti pa smo v koreninah določili julija in septembra (Slika 29).

Določanje GFLV v različnih organih vinske trte skozi sezono



Slika 29: Grafični prikaz povprečnih vrednosti fotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi napakami za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, v različnih delih šestih trsov iz treh lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (korenine in floem poganjka). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.

Figure 29: Graphical representation of average optical density (OD) values of ELISA test with standard errors, for GFLV virus, 2 hours after adding the substrat, in different parts of six grapevines (cvs. Refošek and Volovnik from three different locations) throughout the season 2008 (young leaves, old leaves, phloem, tendrills, roots and grapes) and out of the season in January 2009 (roots and phloem). Arrow represents 2-fold values of negative control.

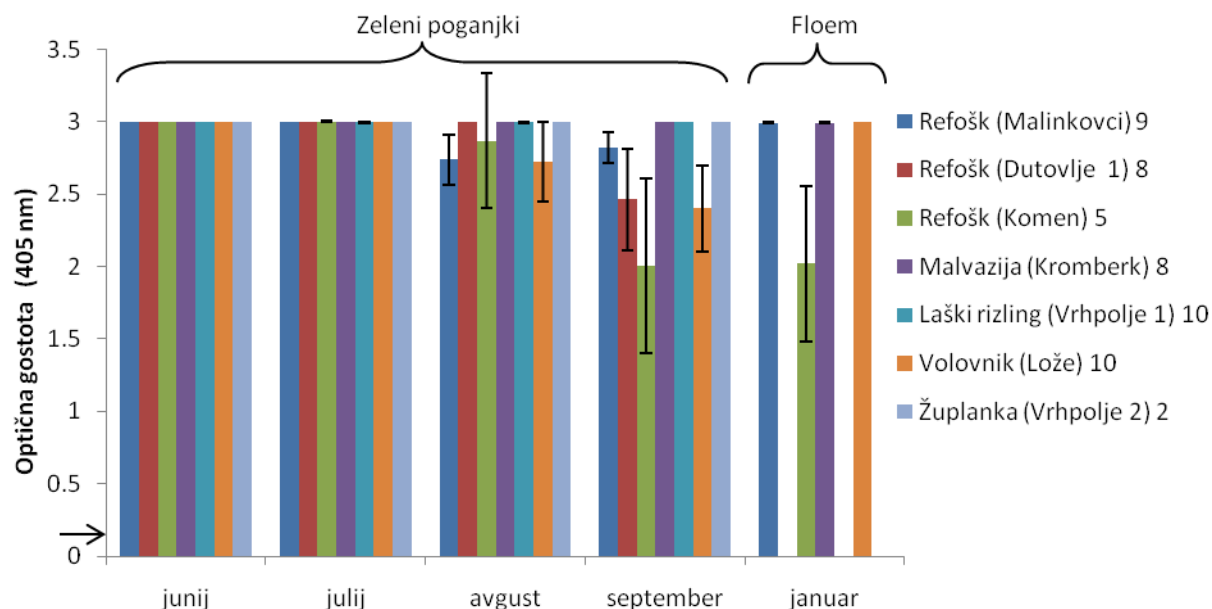
4.3 DOLOČANJE VIRUSA GFLV S TESTOM ELISA V RAZLIČNIH SORTAH VINSKE TRTE SKOZI SEZONO

S testom ELISA smo zanesljivo določili virus GFLV v mladih poganjkih (mladi listi, vršiček) vseh 52 rastlinah 5 sort iz 7 lokacij, vzorčenih junija in julija. Avgusta in septembra pa smo zasledili upad virusnega titra pri trsih sorte Refošk iz Komna in Malinkovcev ter trsih sorte Volovnik, kjer v enem primeru virusa nismo mogli določiti, v treh primerih pa je bil na meji določljivosti (Sliki 30 in 31, prikazano s standardnimi napakami, Priloga A). Trsi sort Malvazija, Laški rizling in Župlanka so imeli virusni titer konstantno visok tudi avgusta in septembra, trsom sorte Refošk iz Dutovelj 1 je virusni titer septembra nekoliko padel.

Pri testiranju floema dormantnih poganjkov (januarja) 36 rastlin smo virus GFLV določili v vseh vzorcih, kljub temu, da je bil fotometrični odčitek pri dveh od njih (sorta Refošk iz Komna) komaj nad mejo določljivosti.

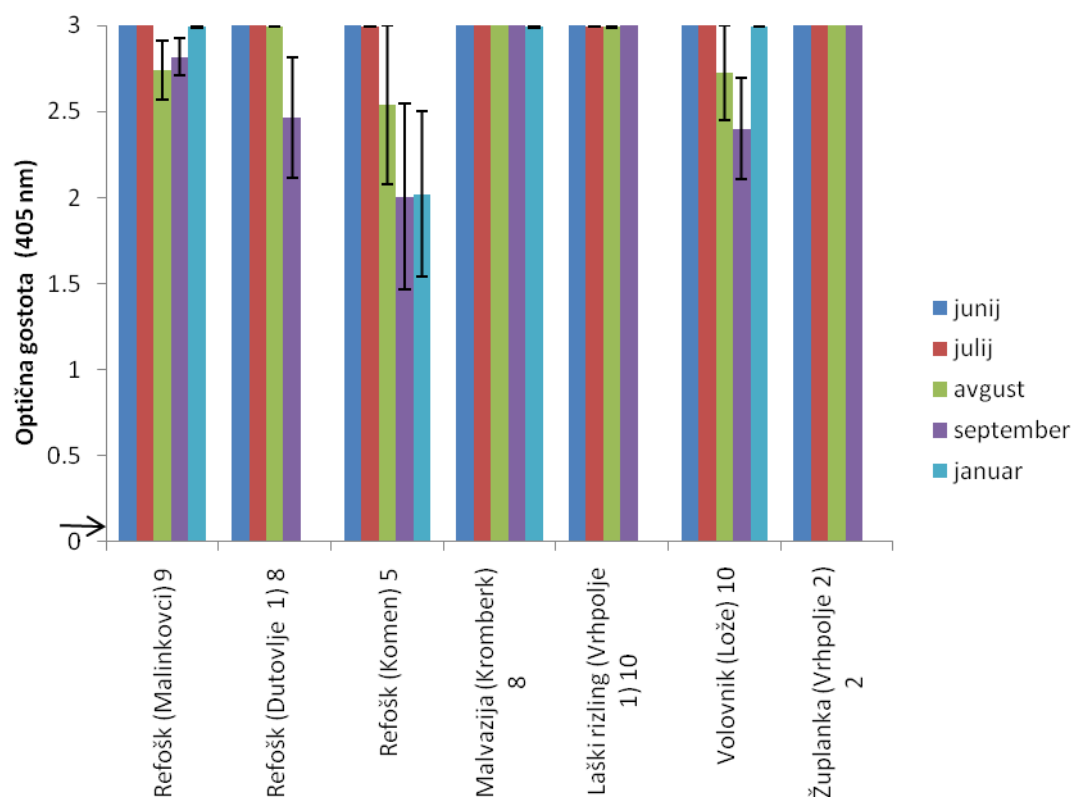
Pri trsih sorte Volovnik iz Lož in trsih sorte Refošk iz Malinkovcev so bile vrednosti, ki smo jih izmerili januarja v floemu višje kot proti koncu rastne sezone (avgusta in septembra) v zelenih delih rastline, a nižje kot junija in julija. Rastlin sorte Refošk iz Dutovelj 1 in Laški rizling ter Župlanka iz Vrhpolja januarja nismo testirali (Sliki 29 in 30).

10 kontrolnih vzorcev, pri katerih virusa s testom ELISA nismo mogli določiti, smo prav tako testirali skozi celotno rastno sezono ter ugotovili, da so bili s testom ELISA vsi vzorci negativni na virus GFLV v vseh časovnih točkah (Priloga A).



Slika 30: Grafični prikaz povprečnih vrednosti fotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi napakami za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri 5 različnih sortah vinske trte iz 7 lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi listi in vitice) in zunaj rastne sezone januarja 2009 (floem). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. V Dutovljah 1 in Vrhopolju 1 ter Vrhopolju 2, zimskih dormantnih poganjkov nismo testirali. V oklepajih so navedene lokacije in zraven število testiranih trsov.

Figure 30: Graphical representation of average optical density (OD) values of ELISA test with standard errors, for GFLV virus, 2 hours after adding the substrat, in five different cultivars of grapevines from seven different locations in Karst and Vipava Valley throughout the season 2008 (young leaves and tendrills) and out of the season in January 2009 (phloem). Arrow represents 2-fold values of negative control. In grapevines form Dutovlje 1, Vrhopolje 1 and Vrhopolje 2 the phloem was not tested in January 2009. In the brackets are written locations and beside the number of tested vines.



Slika 31: Grafični prikaz povprečnih vrednosti fotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi napakami za virus GFLV, 2 uri po dodatku substrata, pri 5 različnih sortah vinske trte iz 7 lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi listi in vitice) in januarja 2009 (floem). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. V Dutovljah 1 in Vrhopolju 1 ter Vrhopolju 2, zimskih dormantnih poganjkov nismo testirali. V oklepajih so navedene lokacije in zraven število testiranih trsov.

Figure 31: Graphical representation of average optical density (OD) values of ELISA test with standard errors, for GFLV virus, 2 hours after adding the substrat, in five different cultivars of grapevines from seven different locations in Karst and Vipava Valley throughout the season 2008 (young leaves and tendrills) and out of the season in January 2009 (phloem). Arrow represents 2-fold values of negative control. In grapevines form Dutovlje 1, Vrhopolje 1 and Vrhopolje 2 the phloem was not tested in January 2009. In the brackets are written locations and beside the number of tested vines.

4.4 RAZVOJ METODE RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE IN RELATIVNO KVANTIFIKACIJO VIRUSA GFLV

4.4.1 Preverjanje delovanja dvostopenjske RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1

Metoda dvostopenjske RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1 je s plazmidno DNA delovala zelo dobro, saj je imela širok dinamični razpon zanesljivega pomnoževanja (10 redov velikosti) z vrednostmi C_q od 4,36 do 36,22, pri čemer je imela še vedno zelo visoko učinkovitost pomnoževanja ($E = 90,6\%$) in visok korelacijski koeficient ($R^2 = 0,9995$). Hkrati je bila metoda zelo občutljiva, saj je omogočala določitev od 1 do 10 virusnih kopij na reakcijsko mešanico s C_q vrednostjo 39,9 (Preglednica 8, Slika 32).

Preglednica 8: Delovanje metode dvostopenjske RT-PCR-RČ v kombinaciji s sondo GFLV-sonda1, testirani na redčitvah plazmidne DNA.

Table 8: Assay performance on plasmid DNA dilutions used in combination with GFLV-probe1.

Konc. ^a	Log konc.	Redčitev	Delež + reakcij ^b	Povprečje C_q	ΔC_q
10^{10}	10	10^{-1}	3 of 3	4,36	NA
10^9	9	10^{-2}	3 of 3	7,33	2,97
10^8	8	10^{-3}	3 of 3	11,49	4,16
10^7	7	10^{-4}	3 of 3	14,62	3,13
10^6	6	10^{-5}	3 of 3	18,19	3,57
10^5	5	10^{-6}	3 of 3	22,08	3,89
10^4	4	10^{-7}	3 of 3	25,53	3,45
10^3	3	10^{-8}	3 of 3	29,09	3,56
10^2	2	10^{-9}	3 of 3	32,71	3,62
10	1	10^{-10}	3 of 3	36,22	3,51
1	0	10^{-11}	1 of 3	39,90	3,68
0	NA	10^{-12}	0 of 3	ND	NA

^a Število molekul plazmida na reakcijo, preračunano iz fotometričnih vrednosti (glej 3.4.6.5)

^b Število pozitivnih reakcij glede na vse paralelke

ΔC_q : Razlika vrednosti C_q med dvema 10x redčitvama

NA: ni na voljo

ND: virus ni bil določen

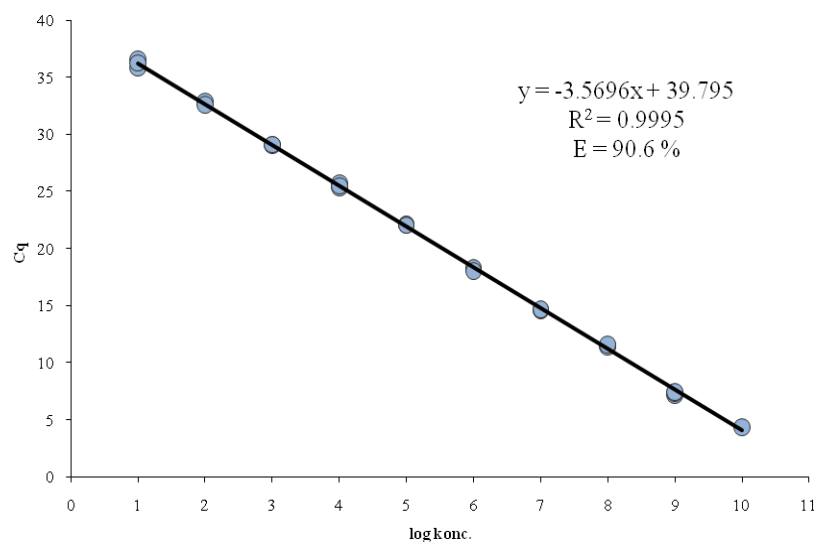
^a Number of plasmid molecules per reaction, calculated from photometrical values (see 3.4.6.5)

^b Number of positive reactions against the total number of replicates

ΔC_q : Difference in quantification cycles between 10-fold dilutions

NA: not applicable

ND: the virus was not detected

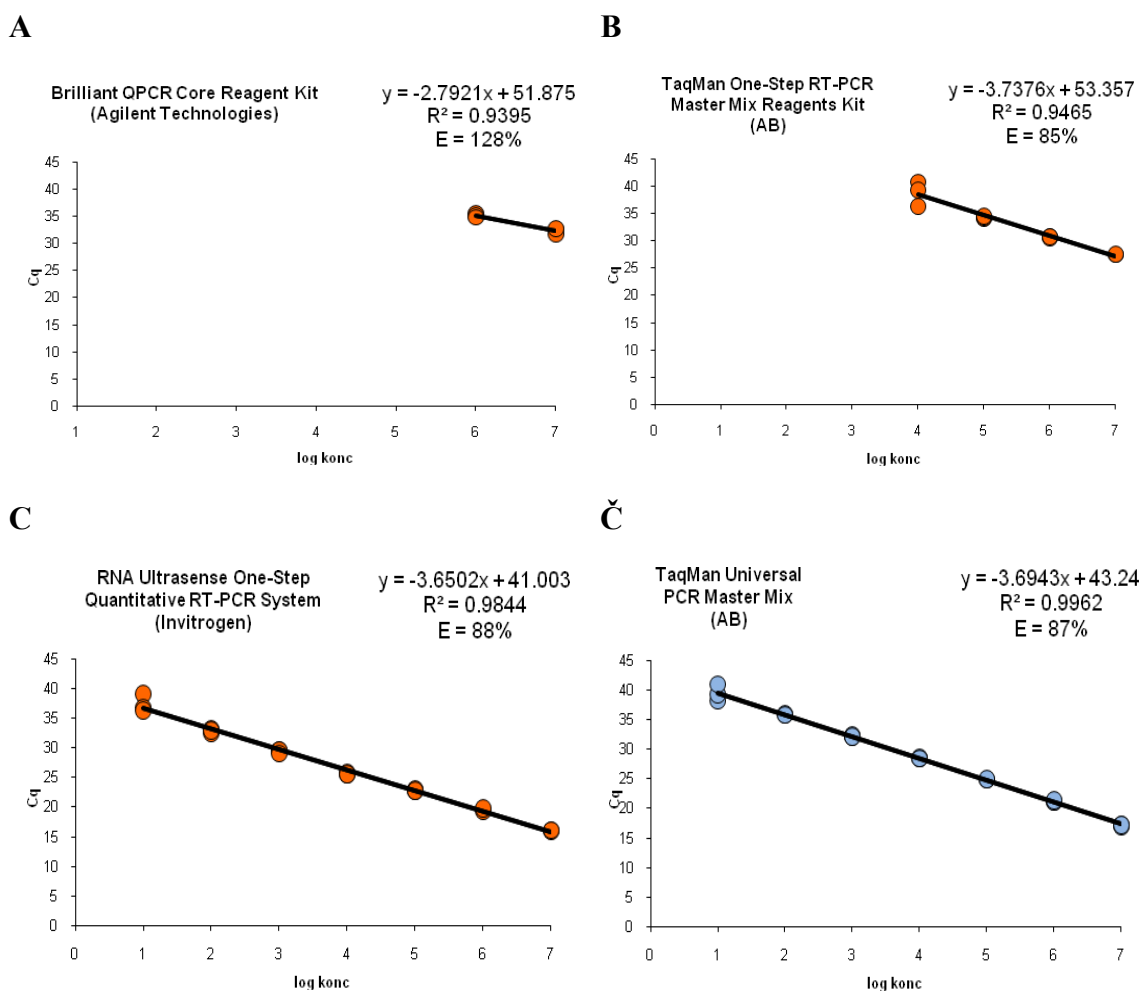


Slika 32: Linearna regresijska krivulja redčin plazmidne DNA (z insertom GFLV RNA2 izolata Ref 26 6/2 prikazanih v logaritemski skali glede na dobljene vrednosti C_q).

Figure 32: Linear regression curves of plasmid DNA (carrying a GFLV RNA2 insert of isolate Ref 26 6/2) dilutions shown in logarithmic scale against the corresponding C_q values.

4.4.2 Primerjava delovanja različnih kompletov za enostopenjsko RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1

Kot najučinkovitejši komplet za enostopenjsko RT-PCR-RČ se je izkazal RNA Ultrasense One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen) (Slika 33, C), ki je bil primerljiv z dvostopenjsko RT-PCR-RČ (Slika 33, Č). Druga dva kompleta se nista izkazala kot primerna za določanje virusa GFLV (Slika 33, A in B).



Slika 33: Linearne regresijske krivulje serije redčin celokupne RNA izolirane iz trsa okuženega z različico GFLV-F13 ter pomnožene s tremi različnimi kompleti za enostopenjsko (oranžno) ter z enim kompletom za dvostopenjsko RT-PCR v realnem času (modro).

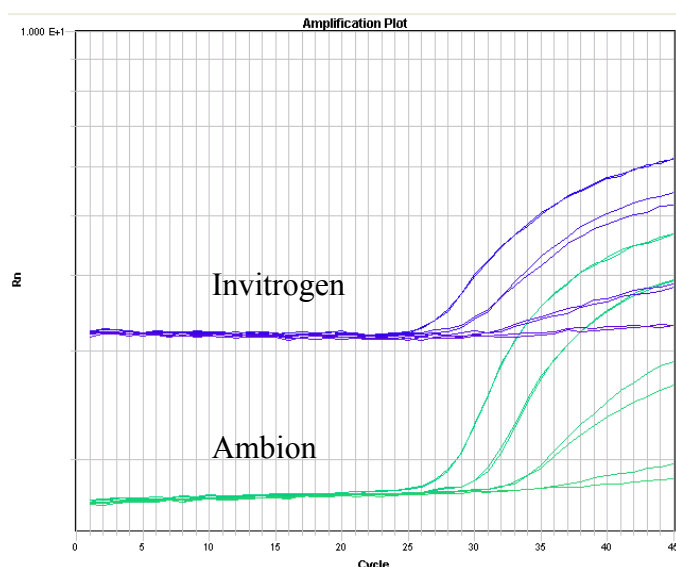
Figure 33: Linear regression curves of serially diluted total RNA isolated from vine infected with GFLV isolate F13 and amplified with three different kits for one-step RT real-time PCR (orange) and one kit for two-steps real-time PCR (blue).

Ko smo primerjali Invitrogenov komplet z Ambionovim, smo ugotovili, da delujeta enako učinkovito in da sta oba primerna za določanje in kvantifikacijo virusa GFLV (Preglednica 9; Slika 34).

Preglednica 9: Primerjava delovanja enostopenjske RT-PCR v realnem času s kompletom proizvajalcev Invitrogen in Ambion na materialu okužene vinske trte redčene v zdravem rastlinskem materialu. ND – virus ni bil določen.

Table 9: Performance of one-step real-time PCR with two different kits from Invitrogen and Ambion using material of GFLV infected grapevine diluted in matrix healthy grapevine. ND – the virus was not detected.

Redčitev RNA	C _q GFLV	Povprečen C _q	Delta C _q
AgPath-ID OneStep RT-PCR Kit (Ambion)			
10 ⁻³	27,04 26,98	27,01	
10 ⁻⁴	29,99 30,19	30,09	3,08
10 ⁻⁵	33,38 33,39	33,38	3,29
10 ⁻⁶	ND ND		
RNA Ultrasense One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen)			
10 ⁻³	26,63 26,87	26,75	
10 ⁻⁴	29,66 29,27	29,47	2,71
10 ⁻⁵	33,62 32,84	33,23	3,77
10 ⁻⁶	ND ND		



Slika 34: Krivulje pomnoževanja v linearni skali za vzorce testirane s kompletom proizvajalcev Invitrogen in Ambion.

Figure 34: Amplification curves in linear scale for samples tested by Invitrogen and Ambion.

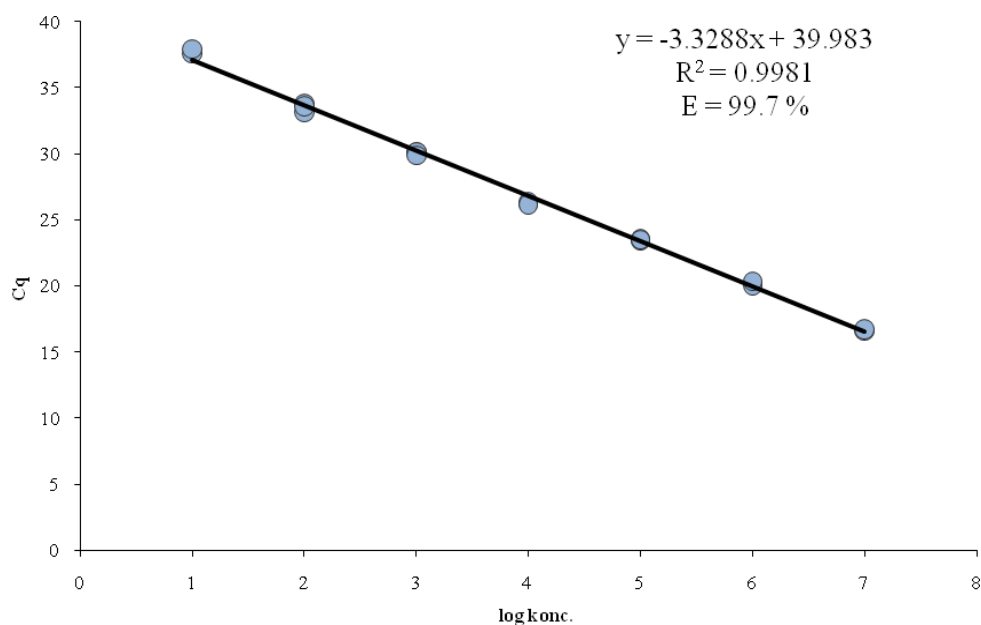
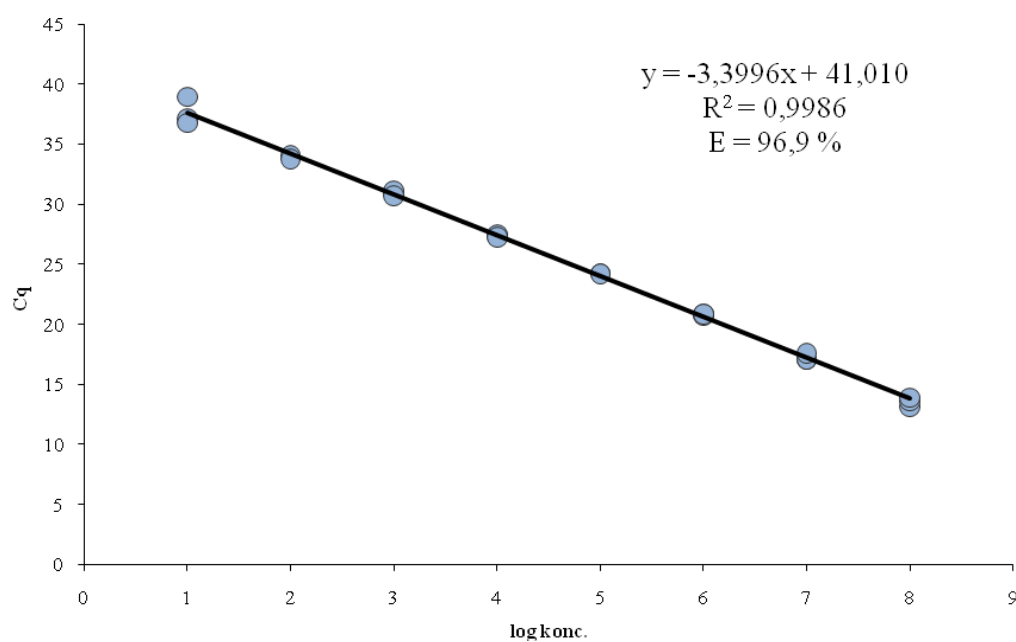
4.4.3 Validacija metod enostopenjske RT-PCR-RČ s sonda1 in GFLV-sonda2

Obe metodi enostopenjske RT-PCR-RČ smo validirali s kompletom UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, ZDA), ki se je izkazal za najboljšega.

Po pričakovanju smo najvišjo raznolikost vrednosti C_q med tremi ponovitvami zaznali pri največji redčini RNA pri kateri smo še zaznali GFLV ($C_q = 36,5 - 40,9$ za metodo 1 in $C_q = 36,8 - 40,3$ za metodo 2), kar je posledica stohastičnega efekta, ki nastane, ko imamo manj kot 10 kopij tarčne molekule na reakcijo (Ellison in sod., 2006).

Obe metodi sta bili zelo občutljivi, saj smo, ko smo v reakciji določili teoretično vrednost 10 kopij virusne RNA dobili za metodo 1 vrednost $C_q = 37,73$, za metodo 2 pa vrednost $C_q = 37,60$ (Preglednica 10, Slika 35), kar se sklada z vrednostjo $C_q = 36,33$, ki smo jo dobili, ko smo v reakcijsko mešanico dodali 10 kopij plazmidne DNA (z insertom RNA2 GFLV) (Preglednica 8).

Metoda 1 je imela dinamični razpon 7 redov velikosti in mejo kvantifikacije (LOQ) približno 90 kopij tarčne molekule. Metoda 2 je imela podoben dinamični razpon (8 redov velikosti) in mejo kvantifikacije (približno 120 kopij tarčne molekule) (Preglednica 10). Naklon regresijske krivulje je ustrezal učinkovitosti pomnoževanja 98,2 - 104% (metoda 1) in 96,4 - 96,9% (metoda 2). R^2 je bil pri obeh metodah in vseh ponovitvah višji od 0,995, kar kaže na dobro korelacijo med začetnim številom kopij tarčne molekule in vrednostjo C_q .

A**B**

Slika 35: Linearna regresijska krivulja logaritmiranih teoretičnih koncentracij RNA (serija redčenj po 10x) izolata GFLV-F13 (A) in izolata A17d (B) prikazanih glede na dobljene vrednosti C_q . Prikazane so vse tri vrednosti triplikata posamezne metode (intra-assay).

Figure 35: Linear regression curves of logarithm of theoretical concentrations of RNA (serially 10x diluted) of isolate GFLV-F13 (A) and isolate A17d (B), plotted against the corresponding C_q values. All intra-assay triplicates are shown.

Preglednica 10: Lastnosti delovanja enostopenjske RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1 (metoda 1) in sondo GFLV-sonda2 (metoda 2).
Table 10: Performance of one-step RT real-time PCR assays 1 and 2.

Vrsta analize									
Metoda 1		Znotraj enega poizkusa (Intra-assay)					Med tremi poizkusi (Inter-assay)		
Redčitev RNA (izolat F13)	Teoret. konc. ^a	Delež + rezultatov reakcij ^b	Povprečen C _q	ΔC _q	Povprečna izračunana konc. ^d	CV (%)	Delež + rezultatov reakcij ^c	Povprečna izračunana konc. ^d	CV (%)
neredčeno	10 ⁷	3 of 3	16,67	NA	10 102 440	4,2	3 of 3	9 158 103	14,7
10 ⁻¹	10 ⁶	3 of 3	20,13	3,46	924 320	12,5	3 of 3	941 688	2,8
10 ⁻²	10 ⁵	3 of 3	23,48	3,35	91 013	4,1	3 of 3	111 000	31,8
10 ⁻³	10 ⁴	3 of 3	26,23	2,75	13 527	6,3	3 of 3	13 225	5,3
10 ⁻⁴	10 ³	3 of 3	30,03	3,80	980	10,7	3 of 3	993	3,4
10 ⁻⁵	LOQ 100	3 of 3	33,48	3,45	91	22,8	3 of 3	86	10,4
10 ⁻⁶	LOD 10	2 of 3	37,73	4,25	5	16,5	3 of 3	9	39,4
10 ⁻⁷	1	0 of 3	/	/	/	/	0 of 3	/	/
0 (voda)	0	0 of 3	/	/	/	/	0 of 3	/	/
Metoda 2		Znotraj enega poizkusa (Intra-assay)					Med tremi poizkusi (Inter-assay)		
Redčitev RNA (izolat A17d)	Teoret. konc. ^a	Delež + rezultatov reakcij ^b	Povprečen C _q	ΔC _q	Povprečna izračunana konc. ^d	CV (%)	Delež + rezultatov reakcij ^c	Povprečna izračunana konc. ^d	CV (%)
neredčeno	10 ⁸	3 of 3	13,54	NA	122864915	26,4	3 of 3	112990025	8,4
10 ⁻¹	10 ⁷	3 of 3	17,24	3,70	9925354	19,1	3 of 3	10079180	5,1
10 ⁻²	10 ⁶	3 of 3	20,81	3,56	877378	3,0	3 of 3	867492	13,9
10 ⁻³	10 ⁵	3 of 3	24,22	3,42	86770	1,2	3 of 3	96515	15,4
10 ⁻⁴	10 ⁴	3 of 3	27,37	3,15	10286	7,7	3 of 3	11667	26,5
10 ⁻⁵	10 ³	3 of 3	30,95	3,58	912	14,2	3 of 3	991	15,0
10 ⁻⁶	LOQ 100	3 of 3	33,95	2,99	124	14,9	3 of 3	117	7,5
10 ⁻⁷	LOD 10	3 of 3	37,60	3,65	16	16,2	3 of 3	9	78,1
10 ⁻⁸	1	0 of 3	/	/	/	/	0 of 3	/	/
0 (voda)	0	0 of 3	/	/	/	/	0 of 3	/	/

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

^a Teoretična koncentracija GFLV na reakcijo je bila izračunana kot je opisano v Materialu in metodah.

^b Reakcija je bila pozitivna, če sta bili vsaj dve od treh replikatov znotraj enega poizkusa pozitivni.

^c Reakcija je bila pozitivna, če je sta bila vsaj dva od treh ločenih poizkusov pozitivna.

^d Teoretična koncentracija GFLV izračunana po postopku opisanem v točki 3.4.6.7.

C_q - Cikel kvantifikacije; **ΔC_q** - Razlika C_q vrednosti med dvema 10x redčitvama; **CV** - Koefficient variacije izračunanih GFLV koncentracij; / - GFLV ni bil določen; **LOD** - meja določljivosti; **LOQ** - meja kvantifikacije.

^a Theoretical concentrations of GFLV copies per reaction were assigned as indicated in Material and methods.

^b Reaction was positive when at least one of three replicates were positive within a run.

^c Reaction was positive when at least one of three separate runs were positive.

^d Theoretical GFLV concentration calculated according to the protocol described in section 3.4.6.7.

C_q - Quantification cycle; **ΔC_q** - Difference in quantification cycles between 10-fold dilutions; **CV** - Coefficient of variation of calculated GFLV concentration; / -GFLV not detected; **LOD** - Limit of detection; **LOQ** - Limit of quantification.

4.4.4 Primerjava občutljivosti RT-PCR-RČ in ELISA za določanje virusa GFLV v različnih tkivih vinske trte

Na podlagi serije 10x redčitev okuženega rastlinskega homogenata v zdravem rastlinskem homogenatu smo ugotovili, da je nova metoda RT-PCR-RČ za tri rede velikosti (1000x) občutljivejša od testa ELISA tako pri testiranju listnega kot floemskega tkiva (Preglednica 10).

Preglednica 11: Primerjava metod RT-PCR-RČ in ELISA za določanje virusa GFLV v različnem materialu.
Table 11: One-step RT real-time PCR vs ELISA for the detection of GFLV in different matrixes.

okužen: neokužen ^a	Mladi listi (april)		Floem (januar)	
redčitve	ELISA (OD) ^b	RT-PCR-RČ (C _q) ^c	ELISA (OD) ^b	RT-PCR-RČ (C _q) ^a
Neredčen homogenat	+ (3,00)	+ (12,64)	+ (3,00)	+ (22,03)
10 ⁻¹	+ (3,00)	+ (15,81)	+ (0,67)	+ (25,29)
10 ⁻²	+ (1,76)	+ (19,44)	- (0,13)	+ (29,76)
10 ⁻³	+ (0,24)	+ (22,65)	- (0,07)	+ (31,95)
10 ⁻⁴	- (0,08)	+ (26,32)	- (0,07)	+ (35,14)
10 ⁻⁵	- (0,07)	+ (29,99)	- (0,07)	- (ND)
10 ⁻⁶	- (0,07)	+ (33,62)	- (0,07)	- (ND)
10 ⁻⁷	- (0,07)	- (ND)	- (0,07)	- (ND)
homogenat zdravih rastlin	- (0,07)	- (ND)	- (0,06)	- (ND)

^a Z GFLV okužen homogenat vinske trte redčen v homogenatu zdravih rastlin vinske trte.

^b OD (optična gostota, optical density) po 2 urah inkubacije s substratom za test ELISA. Rezultat je pozitiven ko je vrednost OD > 0.14.

^c C_q vrednosti pridobljene z enostopenjsko RT-PCR-RČ s sondo GFLV-sonda1, prikazane kot povprečna vrednost triplicate.

ND – v vzorcu virusa nismo določili

^a GFLV infected grapevine sap diluted in healthy grapevine sap.

^b OD (optical density) after 2h of incubation of the ELISA substrat. The result is positive when OD value > 0.14.

^c C_q values were obtained by one-step RT real-time PCR assay with GFLV-probe1 and are expressed as the average value from a triplicate.

ND – the virus was not detected in the sample

4.4.5 Preverjanje specifičnosti in univerzalnosti metode

Specifično naleganje začetnih oligonukleotidov in sond na vsa znana nukleotidna zaporedja v podatkovni bazi Entrez Nucleotide database smo potrdili *in silico*. Sonde so se specifično nalegale le na izolate GFLV, v 84% pa so *in silico* nalegale tudi na DNA vinske trte sorte Pinot noir. Začetni oligonukleotidi so se nalegali na izolate GFLV in ArMV, kar pomeni, da lahko razlikujemo med njimi s tem, da za določanje izolatov ArMV in GFLV

uporabimo le začetne oligonukleotide, za določanje izključno izolatov GFLV pa dodatno uporabimo še sonde.

Novi univerzalni metodi za določanje GFLV (metoda 1 in metoda 2) smo testirali na 86 izolatih virusa GFLV iz Francije, Kalifornije (ZDA), iz treh regij v Italiji, dveh regij v Španiji in več regij v Sloveniji. Poleg tega pa še na 20 zdravih vzorcih, 4 vzorcih okuženih z GFkV, 3 vzorcih okuženih z GLRaV-1, 1 vzorcu okužen z GLRaV-2, 2 vzorca okužena z GLRaV-3, 1 vzorec okužen z GVA, 4 vzorce okužene z GRSPaV in 3 vzorce okužene z ArMV. Nobena od obeh metod ni pomnoževala virusa ArMV, ki je najsorodnejši virusu GFLV, kot tudi ne nobenega od ostalih šestih testiranih virusov vinske trte (GVA, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFkV, GRSPaV). Prav tako ni nespecifično pomnoževala DNA rastlinskega materiala in vključujoče mikroflore vzorcev zdravih trsov, kljub različnim sortam vinske trte (Refošk, Sivi pinot, Renski rizling, Rumeni muškat, Cabernet sauvignon, Pinot noir, Chardonnay, Rebula), ki smo jih testirali (Preglednica 12). Kljub temu, da je BLAST algoritem našel 84% identičnost sonde ter manjšo podobnost začetnih oligonukleotidov s sekvencirano trto Pinot noir, so njihova mesta na rastlinskem genomu več 1000 bp narazen. S testiranjem metod na zdravem materialu trte Pinot noir smo dokazali, da do pomnoževanja rastlinske DNA ne prihaja.

S sondo GFLV-sonda1 smo uspešno pomnožili virus GFLV v 81 od 86 izolatov virusa GFLV. Nukleotidna zaporedja so razkrila, da sonda GFLV-sonda1 ne prijema na izolate A17d, MUR1 in MUR2 zaradi enega drugačnega nukleotida (T/C) (Slika 35). S sondo GFLV-sonda2 smo uspeli pomnožiti GFLV v teh treh izolatih (A17d, MUR1 in MUR2). V primeru izolatov UVASC iz Italije in LR 4/29 iz Vrhpolja 1 v Vipavski dolini, kljub dokazani prisotnosti virusa GFLV s testom ELISA, virusa GFLV nismo mogli določiti z nobeno od sond. Nukleotidno zaporedje amplikonov obeh izolatov je razkrilo, da ge v primeru UVASC za tri in v primeru LR 4/29 za 2 drugačna nukleotida na mestu sonde (Slika 36).

Po drugi strani pa smo določili virus GFLV v dveh izolatih (Ref 56 11/18 in Ref 62 12/110), kjer je bila koncentracijo virusa pod mejo določljivosti testa ELISA ($C_q > 28$) (Preglednica 12). Prisotnost virusa GFLV v teh dveh vzorcih smo dodatno potrdili s standardnim testom PCR s parom začetnih oligonukleotidov 2AF/2AR (Preglednica 5; Pompe-Novak in sod., 2007).

	540	*	560	*	580	*	600	*	620	*	640	
A17d	: GCTCCTTTGAAGTTAAGCCTGGCGATTAAATTTCCTTGTCTTAAACATACCACCTTGGAGGAAGTGGTATGACACAGTGATGAGCGCCTTATGGTGGTCCATCCTGG											: 590
MUR2	: ACTCCTCTGAAGTTGAGCCTGGCGATGAAGTTTCCTTGTCTTAAACATACCACCTTGGAGGAAGTGGTATGACACAGTGATGAGCGCCTTATGGTGGTCCATCCTGG											: 636
LR4/29	: GCTCCTTTGAAGTTGAGCATGGCAATGAAATTTGCCCTTGTCTTAAACATACCACCTTGGAGGAAGTGGTATGACACAGTGATGAGCGCCTTATGGTGGTCCATCCTGG											: 602
UVASC	: GCTCCTTTGCAAGTTGAGTTGGCGATGAAGTTTCCTTGTCTTAAACATACCACCTTGGAGGAAGTGGTATGACACAGTGATGAGCGCCTTATGGTGGTCCATCCTGG											: 633
GFLV-sonda1:	-----TGTCTTAAACATACCACCTTGGAGGAAGTGGTATGACACAGTGATGAGCGCCTTATGGTGGTCCATCCTGG-----											: 19
GFLV-sonda2:	-----TGTCTTAAACATACCACCTTGGAGGAAGTGGTATGACACAGTGATGAGCGCCTTATGGTGGTCCATCCTGG-----											: 20

Slika 36: Poravnava dela NT zaporedja izolatov na katere GFLV-sonda1 ne prijema (R = A/G).

Figure 36: Alignment of NT sequences of isolates on which probe 1 does not bind (R = A/G).

COX smo uporabljali kot kontrolo kvalitete izolacije RNA, kar je povečalo zaupanje v pravilnost diagnostičnih rezultatov. Pri mladih listih so bile povprečne vrednosti C_q za COX 11,64, pri floemskem materialu pa 17,77 (Preglednica 12).

Preglednica 12: Različni izolati GFLV uporabljeni v tej študiji, njihov izvor in rezultati testov ELISA ter enostopenjskega RT-PCR-RČ.

Table 12: Different GFLV isolates used in this study, their origin and the results of ELISA and one-step RT-real-time PCR assays.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	ELISA ^a	RT-PCR-RČ (sonda GFLV1)	GFLV C_q ^b	COX C_q ^b
1.	Francija	<i>V. vinifera</i> sp.	F13	+	+	13,31	12,10
2.	Calabria, Italija	<i>V. vinifera</i> sp.	ITA 1	+ ^c	+	25,28	18,05
3.			ITA 2	+ ^c	+	24,96	15,95
4.			ITA 3	+ ^c	+	23,8	15,06
5.	Piemonte, Italija	<i>V. vinifera</i> sorta Nebiolo	P22	+ ^c	+	21,21	18,54
6.			P14	+ ^c	+	22,77	16,67
7.	Davis, CA, ZDA	<i>V. rupestris</i> sorta St. Geore	GFLV 100	+ ^c	+	24,22	18,88
8.			GFLV 101	+ ^c	+	23,24	20,81
9.		<i>V. vinifera</i> sorta French colombard	GFLV 103	+ ^c	+	20,94	14,92
10.	Baskija, Španija	<i>V. vinifera</i> sp.	DU-99	+ ^c	+	27,90	20,77
11.			BA-2	+ ^c	+	23,96	19,26
12.	Murcia, Španija	<i>V. vinifera</i> sp.	MUR1	+ ^c	+ (sonda GFLV2)	27,60	15,65
13.			MUR2	+ ^c	+ (sonda GFLV2) ^d	24,50	18,56
14.	Apulia, Italija	<i>V. vinifera</i> sorta Somarello rosso	SR1	+ ^c	+	15,53	12,36
15.			SR2	+ ^c	+	17,52	12,93
16.		<i>V. vinifera</i> sorta Primitivo	P 2B-7	+ ^c	+	16,81	11,23
17.			P 2A-25	+ ^c	+	16,03	10,98
18.			P Pav 3	+ ^c	+	16,04	11,46
19.		<i>V. vinifera</i> sorta Regina dei Vigneti	UVASC	+ ^c	- ^d	ND	8,94
20.	Francija	<i>V. vinifera</i> sorta Gewurztraminer	AB9a	+ ^c	+	11,67	NA
21.			AB10a	+ ^c	+	14,32	NA

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 12: Različni izolati GFLV uporabljeni v tej študiji, njihov izvor in rezultati testov ELISA ter enostopenjskega RT-PCR-RČ.

Table 12: Different GFLV isolates used in this study, their origin and the results of ELISA and one-step RT-real-time PCR assays.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	ELISA ^a	RT-PCR-RČ (sonda GFLV1)	GFLV C _q ^b	COX C _q ^b
22.	Francija	<i>V. vinifera</i> sorta Gewurztraminer	AB11a	+ ^c	+	9,95	NA
23.			AB18a	+ ^c	+	12,31	NA
24.			AB20a	+ ^c	+	11,61	NA
25.			AB21b	+ ^c	+	9,08	NA
26.			AB23a	+ ^c	+	11,58	NA
27.			AB24a	+ ^c	+	13,05	NA
28.			AB26a	+ ^c	+	13,36	NA
29.			AB29b	+ ^c	+	12,41	NA
30.			A17d	+ ^c	+ (sonda GFLV2)	14,51	11,80
31.	Dutovlje 1, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref DU 1/50	+	+	15,21	11,34
32.			Ref DU 2/19	+	+	14,37	12,35
33.			Ref DU 2/40	+	+	14,02	10,87
34.			Ref DU 2b/54	+	+	15,01	11,41
35.			Ref DU 3/4	+	+	14,03	8,78
36.			Ref DU 4/4	+	+	14,37	12,60
37.			Ref DU 4/5	+	+	17,61	12,63
38.	Dutovlje 3, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref DUC 3/7	+	+	17,14	11,71
39.			Ref DUC 3/8	+	+	16,09	10,87
40.			Ref DUC 3/13	+	+	18,24	12,10
41.			Ref DUC 4/9	+	+	14,95	11,71
42.			Ref DUC 4/10	+	+	16,42	11,34
43.	Dutovlje2, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref DUK 1/9	+	+	15,82	11,21
44.			Ref DUK 1/15	+	+	15,76	10,11
45.			Ref DUK 1/23	+	+	15,21	10,50
46.		<i>V. vinifera</i> sorta Sauvignon	Sau DUK 3/40	+	+	18,36	10,91
47.	Komen, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref 2 1/36	+	+	14,50	11,34
48.			Ref 9 2/71	+	+	19,74	10,87
49.			Ref 26 5/120	+	+	20,65	12,36
50.			Ref 26 6/2	+	+	16,55	12,49
51.			Ref 26 6/4	+	+	16,20	11,72
52.			Ref 72 13/121	+	+	16,24	10,55
53.	Kromberk, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Malvazija	Mal o/2	+	+	14,88	10,91
54.			Mal o/3	+	+	13,56	10,11
55.			Mal o/5	+	+	12,11	10,50
56.			Mal h/1	+	+	16,61	12,54
57.		<i>V. vinifera</i> sorta Rebula	Reb o/6	+	+	23,09	12,60

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 12: Različni izolati GFLV uporabljeni v tej študiji, njihov izvor in rezultati testov ELISA ter enostopenjskega RT-PCR-RČ.

Table 12: Different GFLV isolates used in this study, their origin and the results of ELISA and one-step RT-real-time PCR assays.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	ELISA ^a	RT-PCR-RČ (sonda GFLV1)	GFLV C _q ^b	COX C _q ^b
58.	Lože, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Volovnik	Vol 2/46	+	+	22,67	16,30
59.			Vol 2/49	+	+	19,37	14,89
60.			Vol 2/51	+	+	21,25	15,72
61.			Vol 2/52	+	+	14,77	12,53
62.			Vol 2/54	+	+	20,13	15,50
63.			Vol 2/55	+	+	15,17	12,48
64.		<i>V. vinifera</i> sorta Zelen	Zel 1 2/6	+	+	25,10	16,86
65.			Zel 1 2/10	+	+	19,14	16,46
66.		<i>V. vinifera</i> sorta Rečigla	Rec 4/25	+	+	23,21	14,25
67.			Pol 4/57	+	+	14,86	10,45
68.		<i>V. vinifera</i> sorta Poljšakica	Kla 5/4	+	+	20,00	15,19
69.			Zun 5/12	+	+	17,69	12,73
70.		<i>V. vinifera</i> sorta Zunek	Zun 5/18	+	+	15,54	11,06
71.			Rac 5/45	+	+	15,82	12,41
72.		<i>V. vinifera</i> sorta Racuk	Rac 5/48	+	+	16,82	12,87
73.			Civ 5/57	+	+	14,52	12,31
74.	Malinkovci, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Cividin	Ref KE 3 10/1	+	+	15,32	10,59
75.			Ref KV 22 11/21	+	+	15,16	10,29
76.			Ref KZ 10 11/82	+	+	15,62	10,97
77.			Ref KO 1 11/88	+	+	14,99	10,26
78.			Ref KV 20 11/10	+	+	16,12	10,14
79.			Ref TO 5/8	+	+	22,48	13,89
80.	Tomaj, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref TO 4/9	+	+	22,65	12,54
81.			LR 4/29	+	- ^d	ND	10,75
82.			LR 5/32	+	+	15,19	11,52
83.	Vrhoplje 1, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Laški rizling	LR 6/33	+	+	18,01	15,34
84.			Žup 1/1	+	+	19,24	14,70
85.			Ref 56 11/18	-	+ ^d	28,29	11,88
86.			Ref 62 12/110 (rastlinjak)	-	+ ^d	29,60	10,70
87.	Komen, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref 9 2/82	- GFkV	-	ND	11,66

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 12: Različni izolati GFLV uporabljeni v tej študiji, njihov izvor in rezultati testov ELISA ter enostopenjskega RT-PCR-RČ.

Table 12: Different GFLV isolates used in this study, their origin and the results of ELISA and one-step RT-real-time PCR assays.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	ELISA ^a	RT-PCR-RČ (sonda GFLV1)	GFLV C _q ^b	COX C _q ^b
88.	Komen, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref 9 2/79	- GFkV	-	ND	10,92
89.			Ref 51 11/69 (greenhouse)	- GLRaV-1, GRSPaV, GVA	-	ND	9,11
90.			Ref 44a 10/84 (greenhouse)	- GLRaV-1, GRSPaV	-	ND	9,54
91.	Komen, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref 63 12/120 (greenhouse)	- GRSPaV	-	ND	10,14
92.			Ref 61 12/68 (greenhouse)	- GLRaV-2, GRSPaV	-	ND	9,88
93.	Dutovlje 1, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref DU 10/1	- GLRaV-1, GLRaV-3	-	ND	11,42
94.	Nemčija	<i>Chenopodium quinoa</i>	ArMV-NW	- ArMV ^c	-	ND	12,60
95.			ArMV-Lv	- ArMV ^c	-	ND	13,21
96.	Baskija, Španija	<i>V. vinifera</i> sp.	DU-d	- ArMV, GFkV ^c	-	ND	20,84
97.	Lože, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Zelen	Zel 1 2/4	- GFkV, GLRaV-3	-	ND	13,60
98.			Zel 1 2/16	- GFkV	-	ND	17,02
99.	Geneva, NY, ZDA	<i>V. rupestris</i> sorta St. Geore	Rup 5	-	-	ND	12,66
100.	Bela Krajina, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Cabernet sauvignon	CS 1/32	-	-	ND	11,09
101.			CS 3/6	-	-	ND	11,00
102.	Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Sivi pinot	SP 1/18	-	-	ND	12,95
103.			SP 7/6	-	-	ND	13,19
104.		<i>V. vinifera</i> sorta Rumeni mušakt	RM 1/18	-	-	ND	10,25
105.			RM 1/7	-	-	ND	11,56
106.			RM 9/32	-	-	ND	11,12
107.		<i>V. vinifera</i> sorta Renski rizling	RR 2/5	-	-	ND	14,19

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 12: Različni izolati GFLV uporabljeni v tej študiji, njihov izvor in rezultati testov ELISA ter enostopenjskega RT-PCR-RČ.

Table 12: Different GFLV isolates used in this study, their origin and the results of ELISA and one-step RT-real-time PCR assays.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	ELISA ^a	RT-PCR-RČ (sonda GFLV1)	GFLV C _q ^b	COX C _q ^b
108.	Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Renski rizling	RR 1/69	-	-	ND	10,22
109.		<i>V. vinifera</i> sorta Pinot noir	PN	-	-	ND	13,29
110.		<i>V. vinifera</i> sorta Chardonnay	Chardonnay (rastlinjak)	-	-	ND	12,81
111.		<i>V. vinifera</i> sorta Rebula	Reb (rastlinjak)	-	-	ND	10,11
112.	Dutovlje1, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref DU 2/25	-	-	ND	12,81
113.			Ref DU 2/77	-	-	ND	12,27
114.			Ref DU 1/1	-	-	ND	10,80
115.	Komen, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref 26 6/1	-	-	ND	21,31
116.			Ref 26 6/3	-	-	ND	19,30
117.			Ref 26 6/5	-	-	ND	18,93
118.	Malinkovci, Slovenija	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref V1 11/93	-	-	ND	20,27

Od št. 1 do 86 so vzorci okuženi z GFLV, od št. 87 do 98 so vzorci, ki niso okuženi z GFLV, vendar so okuženi z drugimi virusi vinske trte, od št. 99 do 118 so zdravi vzorci vinske trte.

^a Rezultati ELISA testa na virus GFLV označeni kot -/+.

^b Predstavljene vrednosti C_q so dobljene iz neredčene RNA. Posivene vrednosti C_q so dobljene iz listnega tkiva, medtem ko so ostale iz floemskega tkiva.

^c Informacije o prisotnosti virusov, ki smo jih dobili od izvirne institucije.

^d Prisotnost GFLV potrjena z metodo RT-PCR in začetnimi oligonukleotidi 2AF ter 2AR po Pompe-Novak in sod. (2007).

ND – v vzorcu virusa nismo določili

From No. 1 to 86 are GFLV positive samples, from No. 87 to 98 are GFLV negative samples infected with other grapevine viruses, from No. 99 to 118 are healthy samples.

^a Results of ELISA testing for GFLV virus presence indicated with -/+.

^b Presented C_q values are obtained from the undiluted RNA. Shadowed C_q values are obtained from leaf tissue, while others are obtained from phloem tissue.

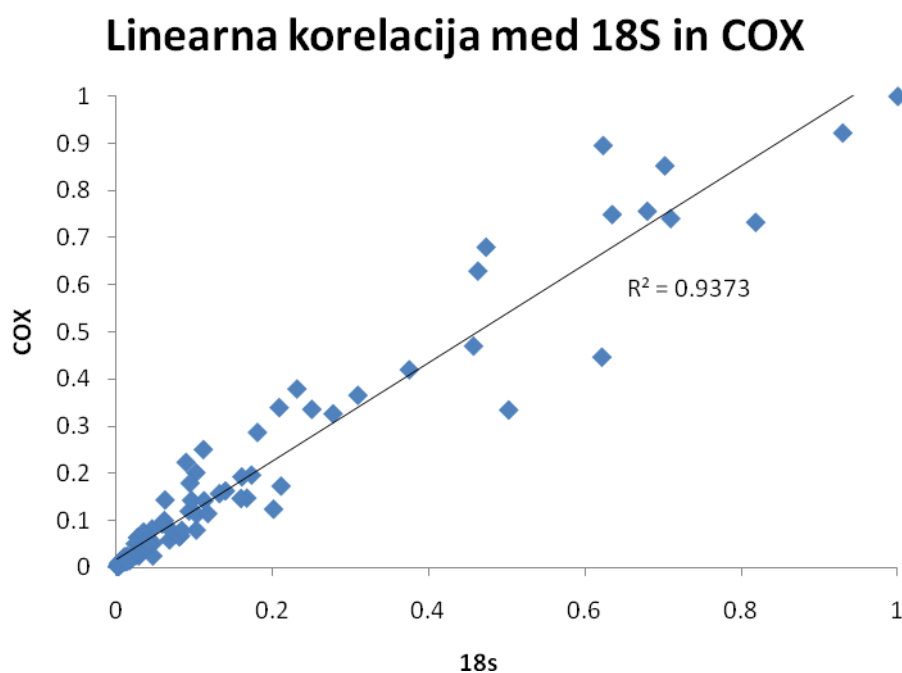
^c Virus detection information as given by the institution of origin.

^d GFLV presence confirmed by RT-PCR with 2AF and 2AR primers according to Pompe-Novak et al. (2007).

ND – the virus was not detected in the sample

4.4.6 Relativna kvantifikacija virusa GFLV skozi sezono

Z metodo RT-PCR-RČ smo uspeli določiti virusno RNA v vseh šestih vzorcih in štirih časovnih točkah skozi rastno sezono, z vrednostmi C_q med 21,2 in 30,0 pri 100x redčitvi. Pri 100x redčitvah so se vrednosti C_q za referenčni gen COX gibale med 17,6 in 22,7, za 18S pa med 8,9 in 15,4. Stabilnost izražanja obeh referenčnih genov smo primerjali z uporabo programa GeNorm, ki nam je iz vseh podatkov, ki smo jih imeli na voljo za oba gena izračunal M vrednost 0,488. Ker je bila pod 0,5 in glede na to, da COX in 18S sodelujeta v različnih metabolnih poteh, sta primerna kandidata za normalizatorja v študiji relativne kvantifikacije GFLV.

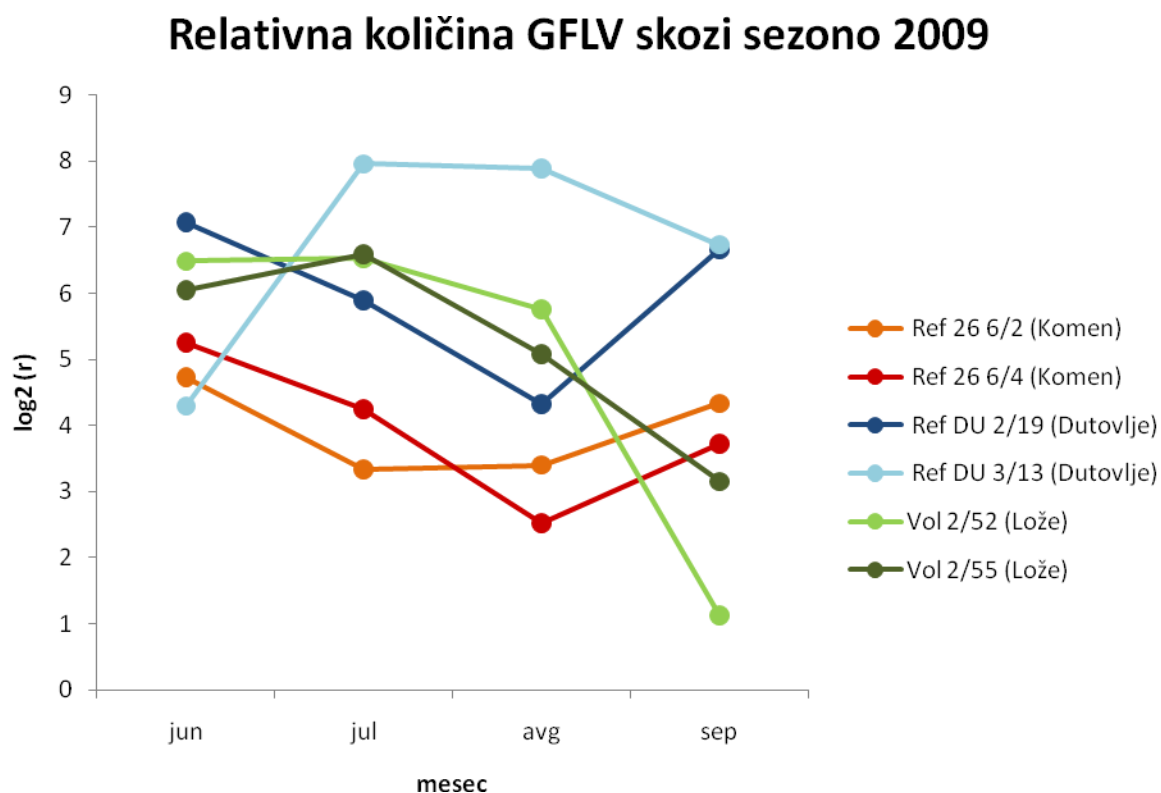


Slika 37: Linearna korelacija izražanja obeh referenčnih genov COX in 18S v vseh vzorcih pri vseh redčitvah dokazuje, da sta primerna kot normalizatorja v tej študiji.

Figure 37: Linear correlation of reference genes (COX and 18S) expression in all samples and all dilutions, implies they are appropriate as normalizers in this study.

Oba trsa sorte Refošk iz Komna, ki ne kažeta izrazitih bolezenskih znamenj, le redke bifurkacije na členkih, sta okužena z istimi restriktotipi GFLV (trsa sta potomca iste rastline, in ker vinograd ni okužen s prenašalcem *X. index*, se virus ni mogel razširiti za tem, ko so bile rastline posajene) (Blas, 2006). Količina virusne RNA v floemu teh dveh rastlin je bila nizka, spreminjanje količine skozi sezono pa je pokazalo najnižje količine virusne RNA sredi poletja in ponovna rast proti koncu rastne sezone (Slika 38). Dva trsa

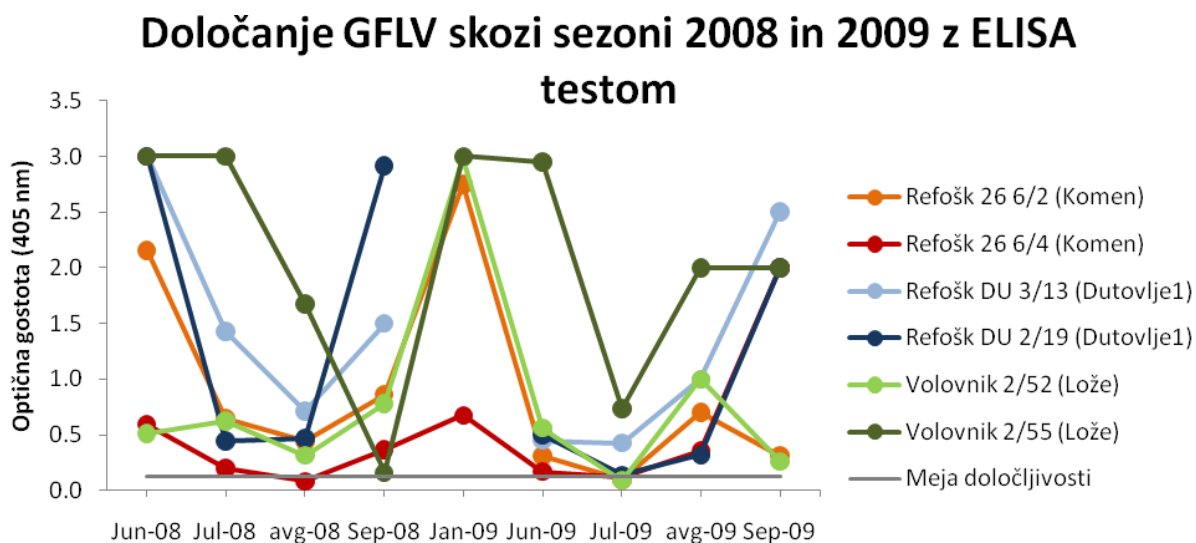
sorte Volovnik iz Lož (brez *X. index*), ki sta imela močno izražena bolezenska znamenja na steblih (zraslost poganjkov, veliko bifurkacij na članku, ploščata stebila, kratki medčlenki) in sta okužena z različnimi restriktotipi virusa GFLV (Pompe-Novak in sod., 2007), sta si delila trend nižanja količine virusne RNA skozi celo rastno sezono (Slika 38). Dva trsa sorte Refošk iz Dutovelj 1 (vinograd okužen s prenašalci *X. index*) sta bila okužena z različnimi restriktotipi GFLV (Blas, 2006). Refošk DU 2/19 je imel močan osip jagod in posamezne bifurkacije na členkih, medtem ko je imel Refošk DU 3/13 manjši osip jagod in zelo pogoste bifurkacije na členkih ter dodatno posamezna medžilna rumenenja listov. Refošk DU 2/19 je kazal podoben trend kot trsa sorte Refošk iz Komna, z minimalno količino virusne RNA v avgustu, vendar je imel večjo celokupno količino virusa GFLV skozi rastno sezono. V primeru trsa Refošk DU 3/13 smo zaznali popolnoma drugačen trend, s povečanjem količine virusne RNA v floemu med poletjem (Slika 37).



Slika 38: Relativna kvantifikacija RNA virusa GFLV v floemu vinske trte skozi rastno sezono 2009 z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Razmerje relativne količine (r) je izračunano iz povprečja 10x in 100 redčitve RNA (Enačba 3) in prikazano kot $\log_2(r)$.

Figure 38: Relative quantification of GFLV RNA in grapevine phloem samples during the growing season 2009 by one-step RT real-time PCR. The present relative amount ratio (r) is calculated from averaged results of 10x and 100x diluted RNA (Eq. 3) and presented as $\log_2(r)$.

Rezultati ELISA testa, ki je bil narejen v dveh letih na istih vzorcih kot RT-PCR-RČ, so pokazali očitno rast titra GFLV v floemu izven rastne sezone ter njegov upad med rastno sezono. Rezultati testa ELISA znotraj rastne sezone 2009 se skladajo s tistimi dobljenimi z metodo RT-PCR-RČ, razen v primeru trsa Refošk DU 3/13, ki je kazal trend padca in ne rasti virusnega titra znotraj rastne sezone (Slika 39).



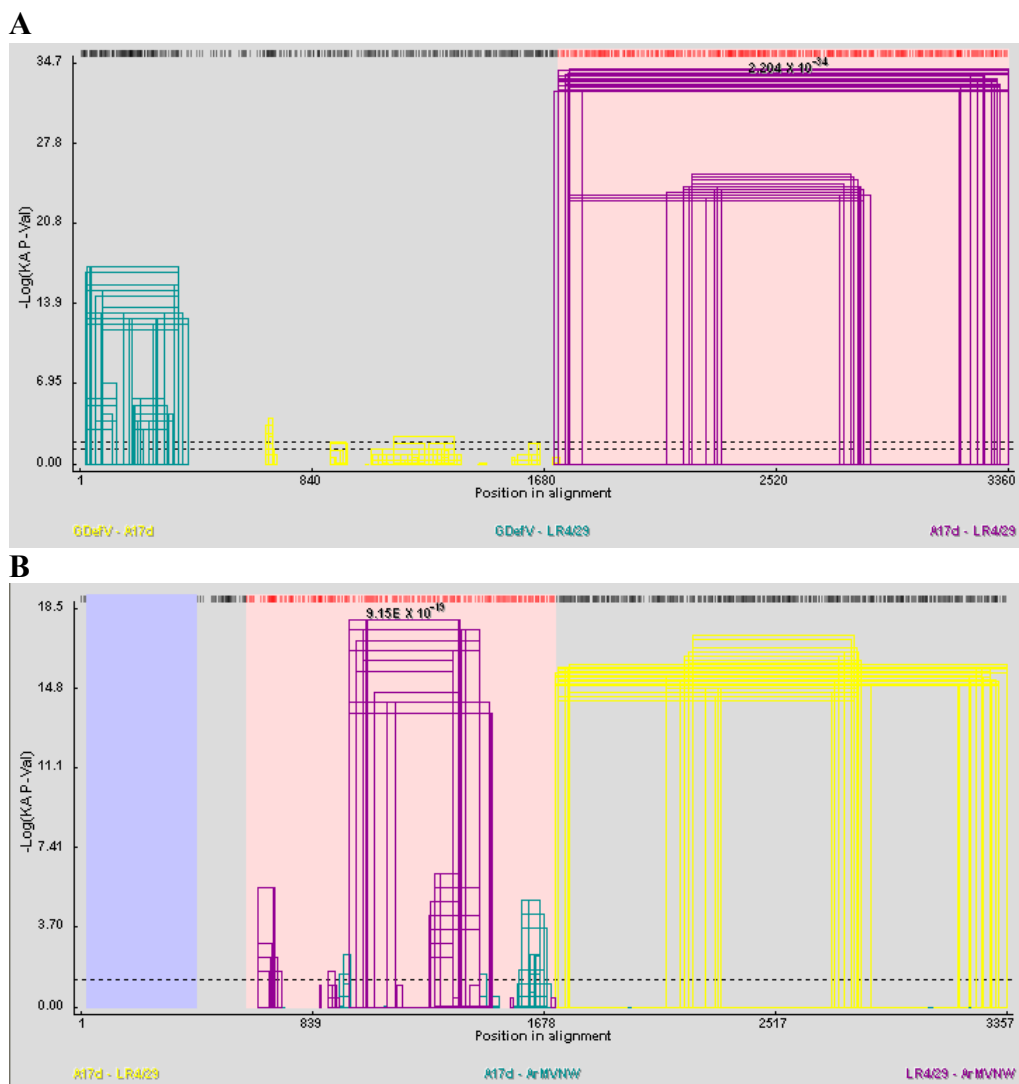
Slika 39: Določanje virusa GFLV s testom ELISA skozi sezoni 2008 in 2009 v floemu vinske trte. Prisotnosti GFLV smo testirali januarja pri obeh vzorcih iz Dutovlj 1.

Figure 39: GFLV detection in phloem samples of grapevines by ELISA method during the seasons 2008 and 2009. GFLV presence was not tested in January for both grapevines from Dutovlje 1.

4.5 RAZNOLIKOST MOLEKULE RNA 2

S programom za iskanje rekombinacij (RDPv3beta) smo na podlagi podobnosti nukleotidnih zaporedij posameznih regij molekul dokazali, da je izolat GFLV iz LR 4/29 rekombinant med virusi GFLV, GDefV ter ArMV, tremi najsorodnejšimi virusi iz podskupine A Nepovirusov. Vendar jasnega mesta rekombinacije med starševskimi molekulami, ki smo jih imeli na razpolago, nismo našli.

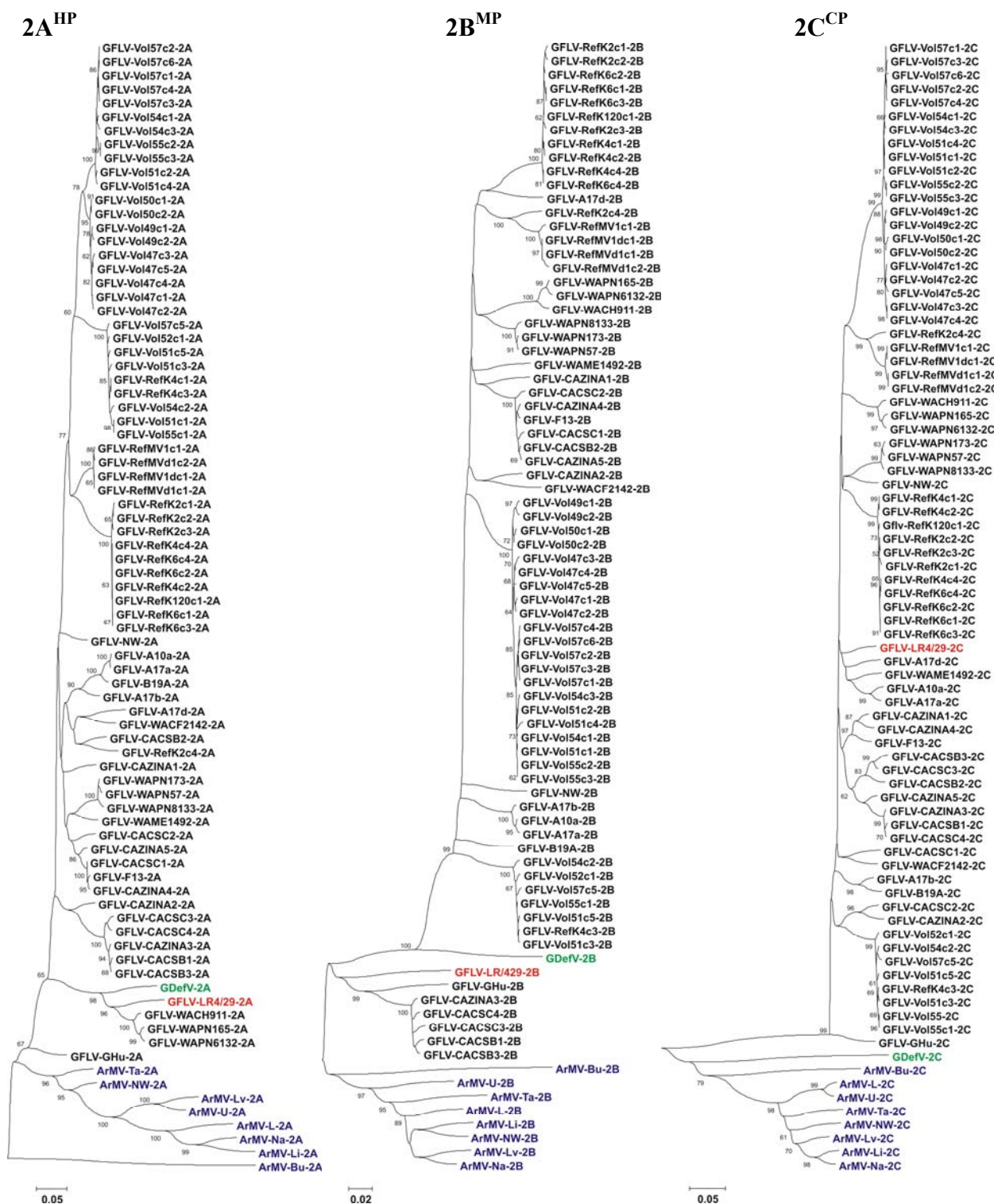
Nukleotidno zaporedje izolata LR 4/29 je v regiji od 251 – 497 nt na RNA2 (glede na GFLV-F13) najbolj podobno GDefV (Slika 40, A), v regijah 298 - 849 in 1979 - 3707 je najbolj podobno GFLV (primer za izolat GFLV-A17d) (Slika 40), med 850 – 918 in 1349 – 1926 pa je v več delih najbolj podobno ArMV (Slika 40, B), vendar nismo našli starševskih molekul, ki bi nam omogočili točno določitev rekombinacijskih mest.



Slika 40: Graf podobnosti med molekulami RNA2 virusov GFLV-A17d, ArMV-NW, GDefV in LR 4/29 izrisan z uporabo programa za iskanje rekombinacij (RDPv3beta).

Figure 40: Graphics of similarity of GFLV-A17d, ArMV-NW, GDefV and LR 4/29 RNA2 molecules, made with program for recombination reconstructions (RDPv3beta).

Filogenetska drevesa, za vsak gen molekule RNA2 posebej, vključujejo vse prosto dostopne celotne molekule RNA2 virusov GFLV, ArMV in GDefV in izolata LR 4/29. Iz filogenetskega drevesa gena 2A^{HP} lahko vidimo, da se LR 4/29 grupira skupaj z GDefV in izolati GFLV iz Washingtona (ZDA), ki so rekombinanti na 2A^{HP} regiji z GDefV (Slika 41, 2A^{HP}). Če gledamo regijo 2B^{MP} vidimo, da se LR 4/29 grupira z rekombinantnimi izolati iz Kalifornije (ZDA) ter madžarskim izolatom GFLV-GHu, ki so po podobnosti nekje med izolati ArMV in GFLV (Slika 41, 2B^{MP}). Pri filogenetskem drevesu iz nukleotidnih zaporedij 2C^{CP} je razvidna jasna razporeditev vseh GFLV izolatov, vključno z LR 4/29, v svojo skupino, ArMV izolatov v drugo skupino ter edinega GDefV izolata med obe omenjeni skupini (Slika 41, 2C^{CP}).



Slika 41: Tri filogenetska drevesa narisana iz nukleotidnih zaporedij molekule RNA2 virusov GFLV (črno), ArMV (modro), GDefV (zeleno) ter izolata LR 4/29 (rdeče) za vsak gen posebej. Merila predstavljajo genetsko razdaljo. Prikazane so le bootstrap vrednosti, ki so $\geq 60\%$.

Figure 41: Three phylogenetic trees created from nucleotide sequences of RNA2 molecules of GFLV (black), ArMV (blue), GDefV (green) and isolate LR 4/29 (red), for each gene separately. Bars represent genetic distance. Only bootstrap values, higher than 60%, are shown.

4.6 DOLOČANJE PRISOTNOSTI SATELITSKE RNA

Z metodo IC-RT-PCR z začetnimi oligonukleotidi FP3/RP smo uspešno pomnožili satRNA GFLV v 58 od skupno 79 vzorcev, torej v 73% (Preglednica 13, Slika 43).

Pri 39 vzorcih smo dobili veliko količino produkta PCR pri 19 vzorcih pa veliko nižjo, kar smo videli kot šibkejši signal na gelu (Sliki 42 in 43). V 12 vzorcih šibkega PCR signala dobljenega v vzorcih pobranih junija 2008 nismo mogli potrditi tudi v vzorcih pobranih septembra 2010. Nasprotno pa smo pri dveh vzorcih (LR 4/29 in Ref DUC 3/7) jeseni dobili močnejši signal kot junija (Preglednica 13). V 21 vzorcih (27%) satRNA nismo določili ne glede na čas rastne sezone (Slika 43).

Jeseni nismo testirali vzorcev, katerih materiala nismo mogli več dobiti (zaradi poseka, propada trsov ali odsotnosti primerne materiala). Tuje vzorce smo testirali le enkrat, ker smo imeli material v različni obliki (RNA ali rastlinski material) v zamrzovalniku.

Sekvencirali smo 136 nukleotidnih zaporedij satRNA (Preglednica 13) od tega 22 nukleotidnih zaporedij satRNA iz materiala vzorčenega junija 2007 (Volovniki in Ref DU 2/19), 69 satRNA iz materiala vzorčenega junija 2008 ter 45 satRNA iz materiala vzorčenega septembra 2010.

Preglednica 13: Prisotnost satRNA v 79 testiranih vzorcih okuženih z GFLV ter število dobljenih nukleotidnih zaporedij iz posameznega vzorca.

Table 13: Presence of satRNA in 79 tested samples infected with GFLV and number of nucleotide sequences obtained from each sample.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	Prisotnost satRNA ^a	Št. satRNA nt zaporedij
1.	Francija	<i>V. vinifera</i> sorta Gewurztraminer	A17d	+	2
2.	Italija, Apulia	<i>V. vinifera</i> sp. (rastlinjak)	GFLV-F13	-	0
3.		<i>V. vinifera</i> sorta Regina dei Vigneti	UVASC	-	0
4.		<i>V. vinifera</i> sorta Primitivo	Pavone 3	-	0
5.			B2/7	+	1
6.	Italija, Calabria		A2/25	+	2
7.		<i>V. vinifera</i> sorta Somarello Rosso	ROSO 1	+	2
8.			ROSO 2	+	1
9.		<i>V. vinifera</i> sp.	ITA1	+	4
10.	Italija, Piedmont		ITA2	+	3
11.			ITA3	+	2
12.		<i>V. vinifera</i> sorta Nebiolo	P22	+	2
13.			P14	-	0
14.	Španija, Basque	<i>V. vinifera</i> sp.	BA-2	-	0
15.	ZDA, CA, Davis		DU-99	-	0
17.		<i>V. rupestris</i> sorta St. George	GFLV101	-	0
16.			GFLV100	-	0
18.		<i>V. vinifera</i> sorta French colombar	GFLV103	+	3
19.	Slovenija, Kromberk	<i>V. vinifera</i> sorta Rebula	Rebula 3/66	-	0
20.		<i>V. vinifera</i> sorta Pance precocce	PP 18	-/-	0/0
21.			PP 21	o	1
22.		<i>V. vinifera</i> sorta Racuk	Racuk B6/18	+	1
23.		<i>V. vinifera</i> sorta Sauvignon	Sau h	+/+	1/2
24.		<i>V. vinifera</i> sorta Malvazija	Mal h/1	+/+	2/2
25.			Mal o/2	+/+	3/2
26.			Mal o/5	+/+	1/3
27.	Slovenija, Malinkovci	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref KV20 11/10	o/-	0/0
28.			Ref KV20 11/12	-/-	0/0
29.			Ref KV20	-/-	0/0
30.			Ref KE1 10/2	+/+	2/2
31.	Slovenija, Komen	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref 9 2/71	o/-	0/0
32.			Ref 26 5/122	o/-	0/0

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 13: Prisotnost satRNA v 79 testiranih vzorcih okuženih z GFLV ter število dobljenih nukleotidnih zaporedij iz posameznega vzorca.

Table 13: Presence of satRNA in 79 tested samples infected with GFLV and number of nucleotide sequences obtained from each sample.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	Prisotnost satRNA	Št. satRNA nt zaporedij
33.			Ref 26 6/2	o/-	0/0
34.			Ref 26 6/4	o/-	0/0
35.			Ref 26 6/6	o/-	0/0
36.			Ref 55 9/110	-/-	0/0
37.			Ref 56 11/28	-/-	0/0
38.			Ref 67 13/57	-/-	0/0
39.	Slovenija, Vrhpolje 1	<i>V. vinifera</i> sorta Laški rizling	LR 4/29	o/+	1/2
40.			LR 5/32	o/-	0/0
41.			LR 6/30	+/+	0/3
42.	Slovenija, Vrhpolje 2	<i>V. vinifera</i> sorta Župlanka	Zup 1/1	+/+	0/2
43.			Zup 1/4	o/o	2/2
44.			Zup 2/1	+/+	0/2
45.	Slovenija, Tomaj	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref TO 5/8	-/-	0/0
46.	Slovenija, Dutovlje 1	<i>V. vinifera</i> sorta Refošk	Ref DU 2/19	+	6*
47.			Ref DU 2b/6	o	1
48.			Ref DU 3/3	-/-	0/0
49.			Ref DU 3/4	-/-	0/0
50.			Ref DU 3/13	o/-	4/0
51.	Slovenija, Dutovlje 3		Ref DUC 3/4	+/+	0/2
52.			Ref DUC 3/7	o/+	7/5
53.			Ref DUC 3/8	o/-	0/0
54.			Ref DUC 4/9	+/+	0/2
55.			Ref DUC 4/10	o/o	5/3
56.	Slovenija, Dutovlje 2		Ref DUK 1/20	+/+	2/2
57.			Ref DUK 2/3	+	3
58.			Ref DUK 2/17	+	0
59.			Ref DUK 3/37	o/o	4/3
60.		<i>V. vinifera</i> sorta Sauvignon	Sau DUK 1/19	o	0
61.			Sau DUK 2/16	-	0
62.			Sau DUK 2/25	-	0
63.			Sau DUK 2/27	+	4
64.			Sau DUK 2/28	+	0
65.			Sau DUK 2/31	+	0
66.	Slovenija, Lože	<i>V. vinifera</i> sorta Poljšakica	Pol 4/56	-	0
67.		<i>V. vinifera</i> sorta Racuk	Racuk 5/45	+	1
68.		<i>V. vinifera</i> sorta Rečigla	Rec 4/25	+/+	1/2

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 13: Prisotnost satRNA v 79 testiranih vzorcih okuženih z GFLV ter število dobljenih nukleotidnih zaporedij iz posameznega vzorca.

Table 13: Presence of satRNA in 79 tested samples infected with GFLV and number of nucleotide sequences obtained from each sample.

Št.	Izvor	Gostitelj	Ime izolata	Prisotnost satRNA	Št. satRNA nt zaporedij
69.		<i>V. vinifera</i> sorta Sladkočica	Sla 1/3	+/+	0/2
70.		<i>V. vinifera</i> sorta Števerjana	Ste 4/37	o/-	0/0
71.		<i>V. vinifera</i> sorta Klarnica	Kla 5/4	o/-	0/0
72.		<i>V. vinifera</i> sorta Zelen	Zelen 1 2/10	o/o	0/2
73.		<i>V. vinifera</i> sorta Zunek	Zunek 5/18	o/-	0/0
74.		<i>V. vinifera</i> sorta Cividin	Civ 5/51	+	1
75.			Civ 5/56	+	0
76.		<i>V. vinifera</i> sorta Volovnik	Vol 2/47	+	6*
77.			Vol 2/52	+	3*
78.			Vol 2/54	+	0
79.			Vol 2/55	+	7*

Od št. 1 – 18 so vzorci iz tujih držav, od št. 19 – 79 so vzorci iz Slovenije (Kras in Vipavska dolina).

(+) močan specifični PCR signal za prisotnost satRNA

(o) šibek specifični PCR signal za prisotnost satRNA

(-) ni specifičnega PCR signala za prisotnost satRNA

(/) ločnica med rezultati dveh vzorčenj in testiranj (prvo junija 2008, drugo septembra 2010), če tega znaka ni je bil vzorec testiran le junija 2009

* satRNA določene in sekvencirane iz vzorcev testiranih junija 2007

From No. 1 – 18 are samples from foreign countries, from No. 19 – 79 are samples from Slovenia (Karst and Vipava Valley).

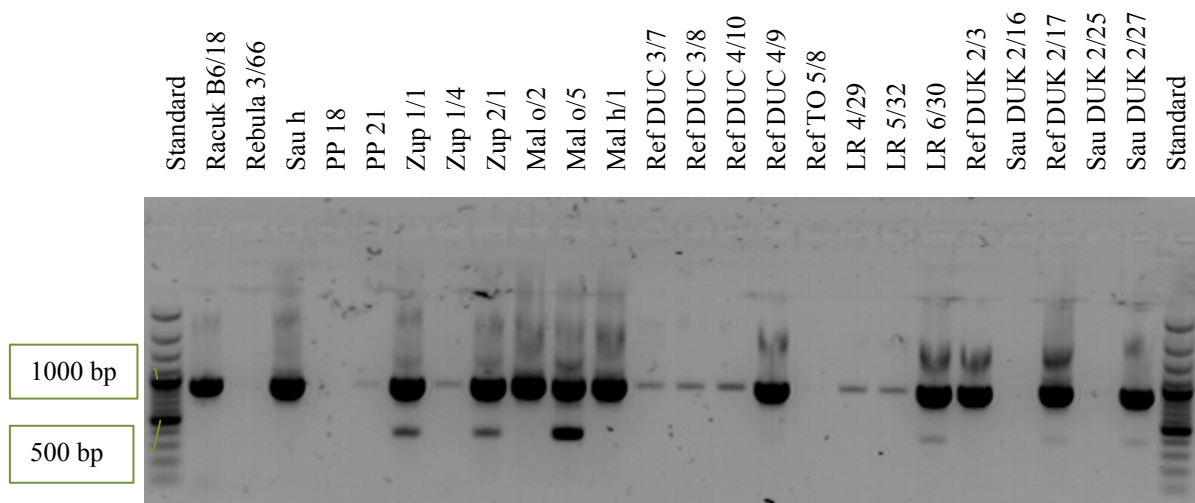
(+) strong and specific PCR signal for satRNA presence

(o) weak and specific PCR signal for satRNA presence

(-) no specific PCR signal for satRNA presence

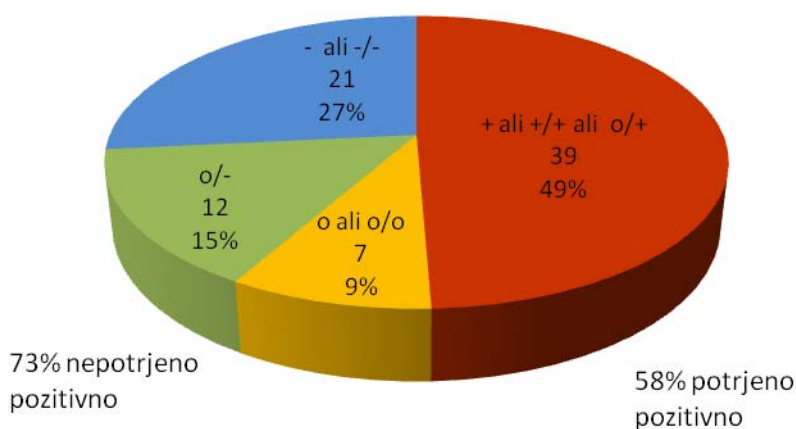
(/) deviding line between results of two samplings and testings (first in June 2008, second in September 2010), if there is no deviding line, the sample was tested only in June 2009

* satRNAs determined and sequenced from the material sampled in June 2007



Slika 42: Primer elektroforetskega gela. Določanje prisotnosti satRNA z RT-PCR in kombinacijo začetnih oligonukleotidov FP3/RP. Za vzorce s šibkimi signali smo gelsko elektroforezo naredili še enkrat in potrdili prisotnost satRNA virusa GFLV.

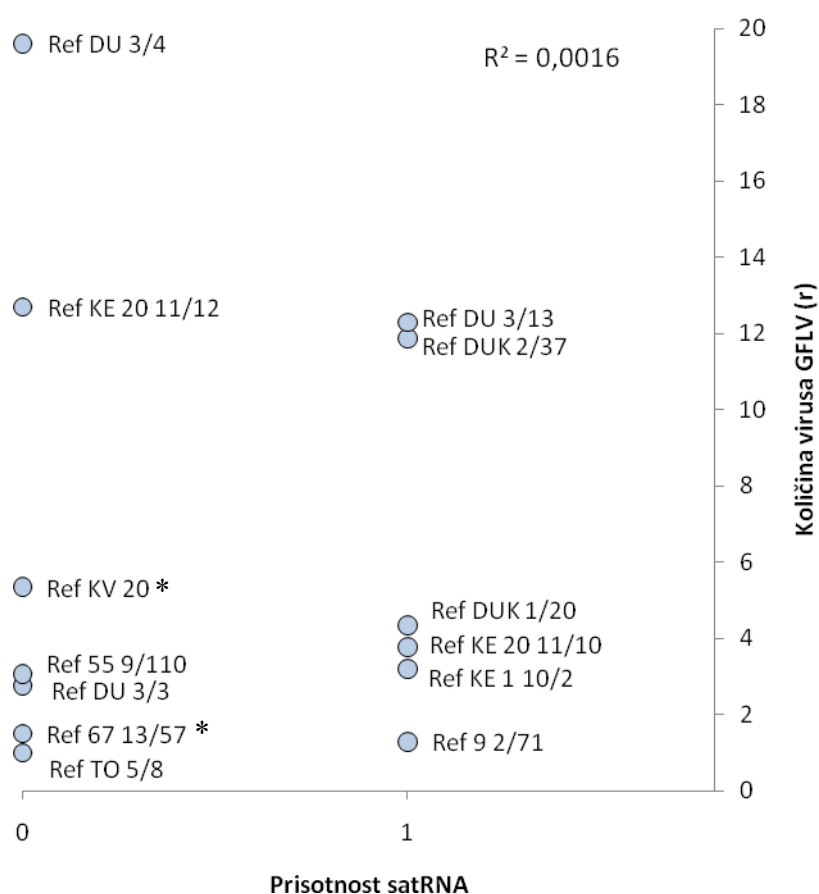
Figure 42: Example of electrophoretic gel. Determination of satRNA presence with RT-PCR and combination of primers FP3/RP. For samples with weak signal, the electrophoresis was repeated to confirm the presence of satRNA GFLV.



Slika 43: Grafični prikaz prisotnosti satRNA virusa GFLV v 79-ih vzorcih različnih sort iz različnih geografskih lokacij v Sloveniji, Evropi in ZDA. (+) močan specifični PCR signal za prisotnost satRNA, (o) šibek specifični PCR signal za prisotnost satRNA, (-) ni specifičnega PCR signala za prisotnost satRNA. Glej sliko 42. (/) ločnica med rezultati dveh vzorčenj in testiranj (prvo junija 2009, drugo septembra 2010), če tega znaka ni je bil vzorec testiran le junija 2009, ker material jeseni 2010 ni bil več na voljo.

Figure 43: Graphical representation of satRNA GFLV presence in 79 samples of different cultivars and locations in Slovenia, Europe and USA. (+) strong and specific PCR signal for satRNA presence, (o) weak and specific PCR signal for satRNA presence, (-) no specific PCR signal for satRNA presence. See figure 42. (/) deviding line between results of two samplings and testings (first in June 2009, second in september 2010), where there is no deviding line, the sample was tested only in June 2009, because material was not accessible in the autumn 2010.

V trinajstih vzorcih (v šestih od njih smo junija 2008 določili satRNA, v sedmih ne) smo z RT-PCR-RČ določali relativno količino virusa GFLV. Za kalibratorski vzorec smo izbrali tistega z najnižjo količino virusa GFLV (Ref TO 5/8). Med prisotnostjo in odsotnostjo satRNA ter količino virusne RNA v trsih iste sorte (Refošk) okuženih z GFLV nismo dokazali nobene povezave ($R^2 = 0,0016$). Kjer trdimo, da je satRNA prisotna, je nismo mogli potrditi jeseni pri večini vzorcev, razen pri Ref DUK 1/20, Ref DUK 3/37, kar nakazuje na splošno nizko količino satRNA ali na slabšo učinkovitost pomnoževanja satRNA v izbranih vzorcih s satRNA.



Slika 44: Relativna količina virusa GFLV v odvisnosti od prisotnosti satRNA v trsih sorte Refošk (junjski vzorci). * razlika v učinkovitosti pomnoževanja (E) med referenčnim genom in GFLV genom je večja od 0.5, zato izračunana vrednost ni čisto natančna.

Figure 44: Relative GFLV quantity in the presence/absence of satRNA in vines cv. Refošk (samples from June). * difference in efficiency of amplification (E) between reference and GFLV gene is > 0.5 , hence calculated value might not be precise.

4.7 DOLOČANJE RAZNOLIKOSTI SATELITSKE RNA

Raznolikost satRNA smo določili na podlagi 136 nukleotidnih zaporedij. Nukleotidna zaporedja satRNA, ki smo jih pridobili s sekvenciranjem so bila dolga med 861 in 873 nukleotidi in so zajemala velik del ORF ter del nekodirajoče regije na 3' koncu. Aminokislinska zaporedja so bila dolga med 287 in 291 aminokislinami, vključujoč nekodirajočo regijo.

Nukleotidna in aminokislinska zaporedja satRNA virusov GFLV in ArMV so se grupirala v dve filogenetsko ločeni skupini, ki sta se v nukleotidnem zaporedju razlikovali za 23 - 29% (Sliki 45 in 47), v aminokislinskem zaporedju pa za 25 - 34% (Slika 46 in 48). Ta razlika najverjetneje predstavlja mejo med satRNA, ki pripadajo dvema ločenima, a podobnima vrstama virusov: ArMV in GFLV.

Kljub večji podobnosti med nukleotidnimi zaporedji v primerjavi z aminokislinskimi zaporedji se njuni filogenetski drevesi ne razlikujeta bistveno. Z upoštevanjem deležev podobnosti in njihovih frekvenc so bile pri aminokislinskem zaporedju meje med različki satRNA bolj izrazite, kot če smo primerjali frekvenco deležev podobnosti nukleotidnega zaporedja (Sliki 47 in 48, Preglednici 14 in 15).

SatRNA izolatov iz Kalifornije (GFLV-103) in Francije (GFLV-A17d in GFLV-F13) so se grupirale skupaj s satRNA izoliranimi iz izolatov ArMV. Ostale satRNA iz izolatov GFLV, sestavljajo svojo skupino, ki se naprej razveji na satRNA iz slovenskih izolatov GFLV ter satRNA iz italijanskih izolatov. Med satRNA iz Italije, sta se grupirali tudi dve satRNA izolirani iz izolatov ArMV, ArMV-NW iz Nemčije in ArMV-J86 neznanega izvora (Wetzel in sod., 2006) (Sliki 45 in 46).

Večinoma so se nukleotidna zaporedja satRNA iz iste rastline grupirala skupaj. SatRNA iz vseh treh trsov sorte Volovnik iz Lož se grupirajo skupaj, saj imajo v 98% podobna nukleotidna zaporedja. Več klonov, ki smo jih dobili iz posameznega izolata ne glede na čas vzorčenja, je bilo praktično enakih. V posameznem trsu sorte Volovnik tako nismo dobili več različic satRNA, kakor je bilo dokazano za molekulo RNA2 virusa pomagorca GFLV v istih trsih (Pompe-Novak in sod., 2007). Tudi satRNA iz treh Župlank iz vinograda Vrhpolje 2 so se grupirale skupaj.

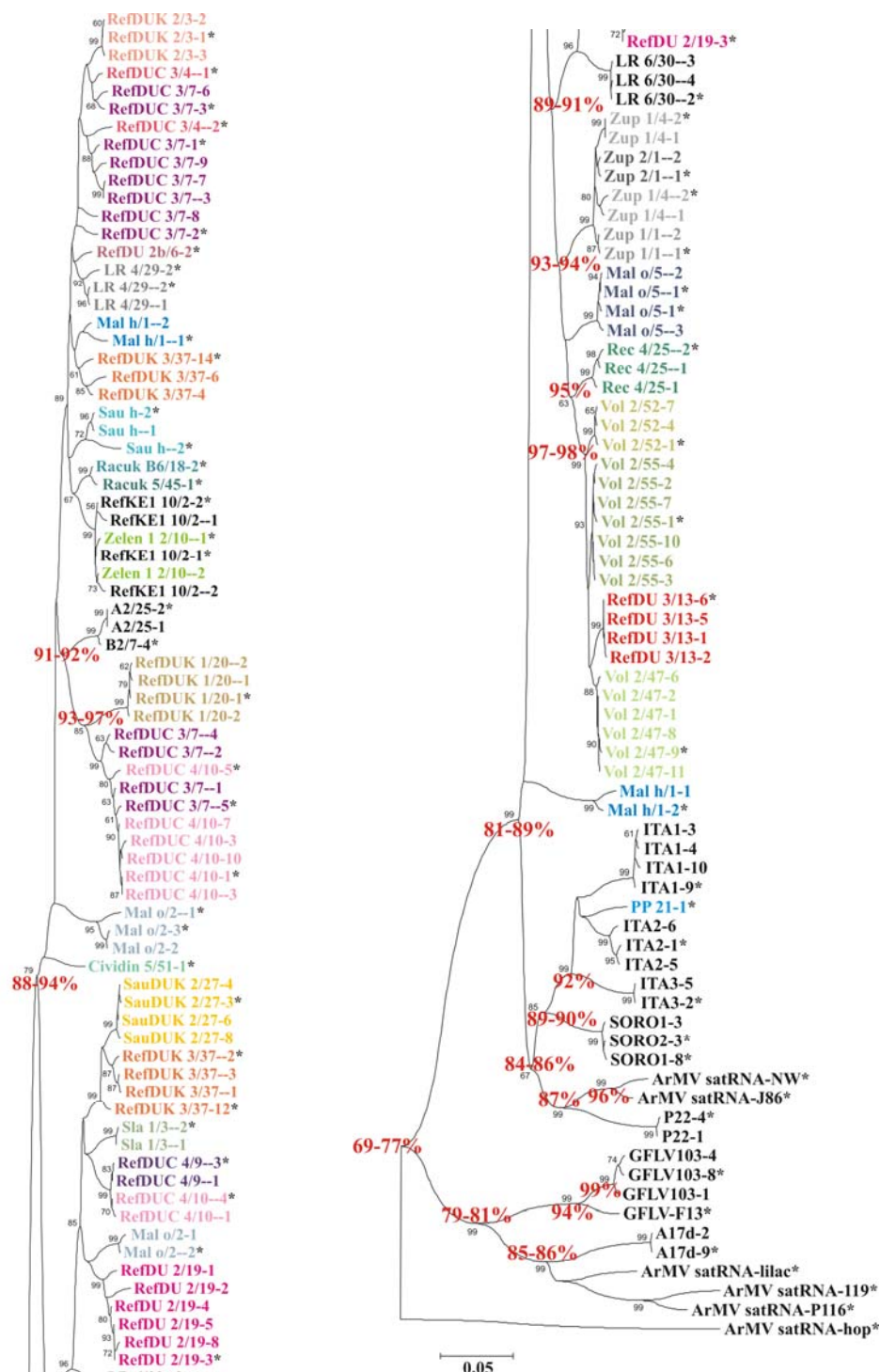
SatRNA iz dveh trsov sorte Refošk iz vinograda Dutovlje 1 (Ref DU 2/19 in Ref DU 3/13) pa so se kljub isti lokaciji ločile za 10%. Veliko je bilo primerov, ko so se satRNA iz istega izolata na filogenetskem drevesu razdružile in so bile bolj podobne satRNA iz drugih izolatov. SatRNA iz petih trsov sorte Refošk iz vinograda Dutovlje 2 so pripadale štirim skupinam, v eni so bile satRNA izolatov Ref DUK 2/27 in Ref DUK 3/37 (97 - 98% podobnosti), v drugi samo Ref DUK 1/20, v tretji je bil izolat Ref DUK 2b/6 skupaj s preostalimi kloni izolata Ref DUK 3/37, vzorčenimi junija (96% podobnosti), v četrti pa je bil samo Ref DUK 2/3. Slednji se je grupiral v eno skupino skupaj s satRNA izolatov iz vinograda Dutovlje 3 (Ref DUC 3/4 in Ref DUC 3/7) (95 – 98% podobnost), pri katerih so bile meje še bolj zabrisane. Namreč satRNA izolata Ref DUC 3/7 smo lahko našli tudi v drugi skupini, skupaj s satRNA iz vzorcev Ref DUC 4/10 (99% podobnosti), te pa še v tretji skupini skupaj s satRNA Ref DUC 4/9 (99% podobnosti).

SatRNA iz LR 4/29 je bila v 6% drugačna od satRNA iz LR 6/30, po drugi strani pa so bile satRNA iz Malinkovcev (Ref KE1 10/2) skoraj identične (99,5 - 99,9%) s satRNA iz Lož (Zelen 1 2/10). Ostale satRNA iz trsov v Ložah do se grupirale skupaj s satRNA iz popolnoma drugih lokacij, razen satRNA Rečigle 4/25 je bila na isti filogenetski veji kot Volovniki iz iste lokacije.

SatRNA iz različnih rastlin in iste lokacije so lahko bile zelo podobne, kot npr. iz obeh Racukov in Sauvignona iz Kromberka (94 - 99%), ali pa so se popolnoma razlikovale, kot npr. PP21, ki se je grupiral skupaj s satRNA iz italijanskih izolatov GFLV. Pri satRNA iz vseh treh trsov sorte Malvazija iz Kromberka smo opazili zanimiv pojav, namreč satRNA iz vsake je bila na filogenetskem drevesu popolnoma zase, hkrati pa se je satRNA iz dveh trsov sorte Malvazija, ki smo jih izolirali junija popolnoma razlikovala od tistih izoliranih septembra. Tako ekstremen pojav smo opazili le pri sorti Malvazija.

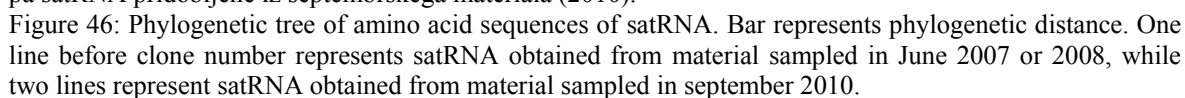
SatRNA iz dveh italijanskih izolatov B2/7 in A2/25 so se grupirale skupaj s satRNA iz trsov iz vinogradov Dutovlje 2 in 3, s katerimi so si delile 90 – 91% podobnosti v nukleotidnem zaporedju.

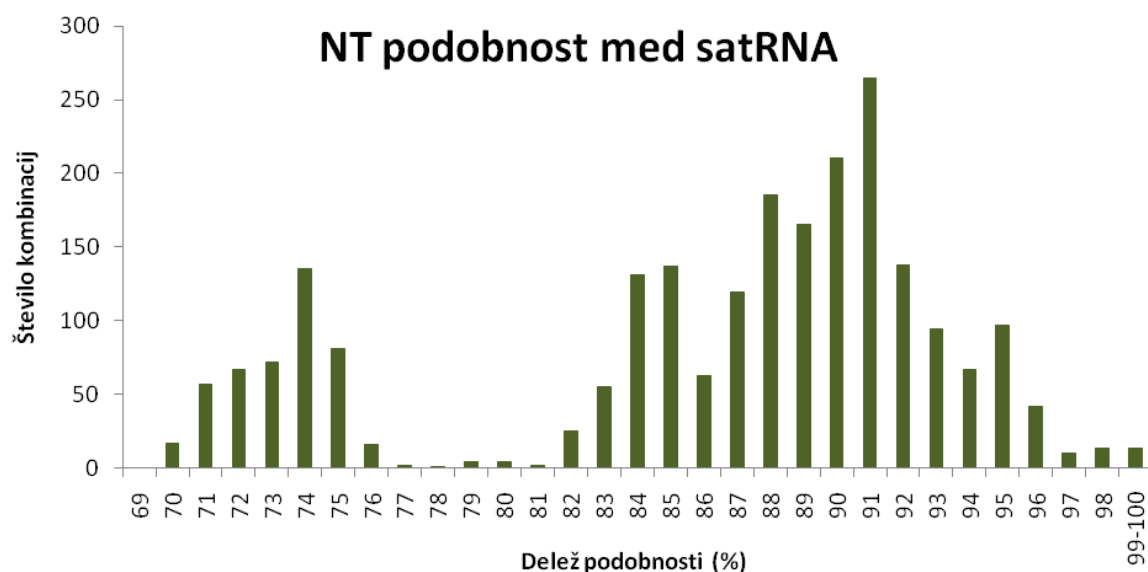
Barve na filogenetskih drevesih (Sliki 45 in 46) so izbrane po lokacijah: zeleno – Lože; rumeno, oranžno, rjavo, roza, vijolično – Dutovlje 1, 2 in 3; sivo – Vrhpolje 1 in 2; modro – Kromberk; črno – tuji izolati in Malinkovci. Z zvezdico (*) so označeni kloni izolatov satRNA, ki smo jih izbrali za primerjavo in pridobitev deležev podobnosti na podlagi katerih smo izrisali graf podobnosti na nukleotidnem in aminokislinskem nivoju (Sliki 47 in 48).



Slika 45: Filogenetsko drevo nukleotidnega zaporedja satRNA. Merilo predstavlja genetsko razdaljo. Ena črtica pred številko klonov predstavlja satRNA pridobljene iz junjskega materiala (2007 ali 2008), dve črtici pa satRNA pridobljene iz septembrskega materiala (2010).

Figure 45: Phylogenetic tree of nucleic acid sequences of satRNA. Bar represents phylogenetic distance. One line before clone number represents satRNA obtained from material sampled in June 2007 or 2008, while two lines represent satRNA obtained from material sampled in September 2010.





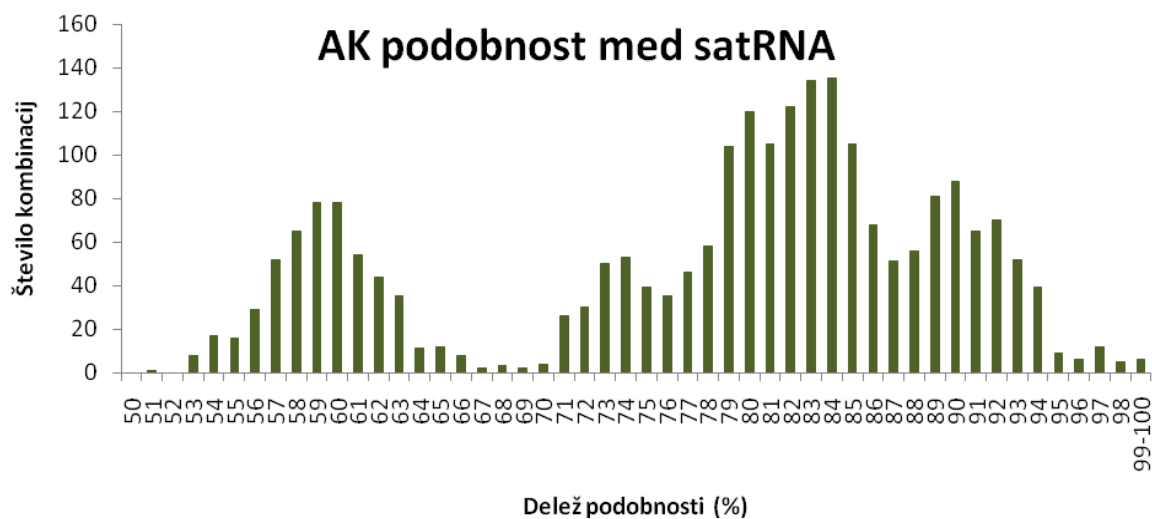
Slika 47: Nukleotidna podobnost med satRNA.

Figure 47: Nucleic acid similarity between satRNAs.

Preglednica 14: Seznam 65-ih nukleotidnih zaporedij satRNA razporejenih v preglednico glede na odstotek podobnosti, ki jo ima posamezna satRNA z ostalimi satRNA.

Table 14: List of nucleotide sequences of 65 satRNAs, arranged in the table according to the percentage of similarity between each satRNA and all other satRNAs.

70 – 78%	82 - 86%	87 – 100%		
ArMV satRNA-119	ITA1-9	RefDUC2/3-1	RacukB6/18-2	RefDUC4/9--3
ArMV satRNA-hop	ITA2-1	RefDUC3/4--1	Racuk5/45-1	RefDUC4/10--4
ArMV satRNA-lilac	ITA3-2	RefDUC3/4--2	RefKE110/2-1	Malo/2--2
ArMV satRNA-P116	PP21-1	RefDUC3/7--4	RefKE110/2-2	RefDU2/19-3
GFLV103-8	P22-4	RefDUC3/7--5	Zelen12/10--1	LR6/30--2
GFLV-F13	ArMV satRNA-J86	RefDUC3/7-3	A2/25-2	Zup1/4-2
A17d-9	ArMV satRNA-NW	RefDUC3/7-1	B2/7-4	Zup2/1--2
		RefDUC3/7-2	RefDUC1/20-1	Zup2/1--1
		RefDU2b/6-2	RefDUC4/10-1	Zup1/1--1
		LR4/29-2	RefDUC4/10-5	Rec4/25--2
		LR4/29--2	Malo/5--1	Vol2/55-1
		Malh/1--1	Malo/5-1	Vol2/52-1
		RefDUC3/37--2	Malo/2-3	Vol2/47-9
		RefDUC3/37-12	Malo/2--1	RefDU3/13-6
		RefDUC3/37-14	Cividin5/51-1	Malh/1-2
		Sauh-2	SauDUC2/27-3	SORO1-3
		Sauh--2	Sla1/3--2	SORO1-8



Slika 48: Aminokislinska podobnost med satRNA.

Figure 48: Amino acid sequence similarity between satRNAs.

Preglednica 15: Seznam 65-ih aminokislinskih zaporedij satRNA razporejenih v preglednico glede na odstotek podobnosti, ki jo ima posamezna satRNA z ostalimi satRNA.

Table 15: List of amino acid sequences of 65 satRNAs, arranged in the table according to the percentage of similarity between each satRNA and all other satRNAs.

50 – 67%	70 – 76%	77 – 87%		88 – 100%	
Malo/5--1	P22-4	RefDUC3/37--2	Zup1/1--1	RefDUC2/3-1	Sauh--2
ArMV satRNA-119	ArMV satRNA-J86	RefDUC3/37-12	Rec4/25--2	RefDUC3/4--1	RacukB6/18-2
ArMV satRNA-hop	ArMV satRNA-NW	Malo/5-1	Vol2/52-1	RefDUC3/4--2	Racuk5/45-1
ArMV satRNA-lilac		SauDUC2/27-3	Vol2/55-1	RefDUC3/7--4	RefKE110/2-1
ArMV satRNA-P116		Slal/3--2	Vol2/47-9	RefDUC3/7--5	RefKE110/2-2
GFLV103-8		RefDUC4/9--3	RefDU3/13-6	RefDUC3/7-3	Zelen12/10--1
GFLV-F13		RefDUC4/10--4	Malh/1-2	RefDUC3/7-1	A2/25-2
A17d-9		Malo/2--2	ITA1-9	RefDUC3/7-2	B2/7-4
		RefDU2/19-3	ITA2-1	RefDU2b/6-2	RefDUC1/20-1
		LR6/30--2	ITA3-2	LR4/29-2	RefDUC4/10-1
		Zup1/4-2	SORO1-3	LR4/29--2	RefDUC4/10-5
		Zup2/1--2	SORO1-8	Malh/1--1	Malo/2-3
		Zup2/1--1	PP21-1	RefDUC3/37-14	Malo/2--1
				Sauh-2	Cividin5/51-1

4.8 POVEZAVA MED PRISOTNOSTJO IN ODSOTNOSTJO SATELITSKE RNA IN BOLEZENSKIMI ZNAMENJI

Ne glede na način prikaza rezultatov bolezenskih znamenj (v deležih glede na sezono ali le kot 1/0 ne glede na sezono), ter z upoštevanjem prisotnosti in odsotnosti satRNA (+, -) ali tudi mejnih vrednosti satRNA (+, -, +/-), so izračuni pokazali, da v našem primeru prisotnost oz. odsotnost satRNA ne vpliva na izražanje bolezenskih znamenj značilnih za okužbo z GFLV. To smo dokazali s statističnima testoma χ^2 in G (Preglednica 16). Kljub temu pa ne moremo izločiti možnosti, da v določenih rastlinah nismo določili satRNA, ker se te razlikujejo v nukleotidnem zaporedju od naših začetnih oligonukleotidov. Prav tako bi se dalo izračune narediti še na mnogo drugih načinov, z upoštevanjem različnih skupin bolezenskih znamenj ali z drugačnim načinom prikaza obsega bolezenskih znamenj, saj so ti kriteriji zelo subjektivni.

Preglednica 16: Odvisnost bolezenskih znamenj od prisotnosti/odsotnosti satRNA izračunana po testu χ^2 in G-testu, pri upoštevanju 21 bolezenskih znamenj izračunanih na dva načina: kot delež pojavljanja skozi več sezon (%) ali le kot prisotnost/odsotnost bolezenskega znamenja (1/0) ne glede na delež pojavljanja skozi več sezon; ter upoštevanju treh (+, -, +/-) oz. dveh postavk za prisotnost satRNA (+ (+/-), -) ali (+, -(+/-)).

Table 16: Dependence of symptoms on satRNA presence/absence calculated according to χ^2 test and G-test when 21 symptoms given as percent of symptom presence through the seasons (%) or only as presence/absence (1/0) of each symptom irrespective to number of seasons and three (+, -, +/-) or two categories of satRNA presence (+(+/-), -) or (+, -(+/-)) are taken under consideration.

satRNA		df ^a	p (χ^2)	p (G)
21 bolezenskih znamenj	+ , - , +/-			
	(%)	40,00	> 0,05	> 0,05
	(1/0)	40,00	> 0,05	> 0,05
	+(+/-), -			
	(%)	20,00	> 0,05	> 0,05
	(1/0)	20,00	> 0,05	> 0,05
	+ , -(+/-)			
	(%)	20,00	> 0,05	> 0,05
	(1/0)	20,00	> 0,05	> 0,05

^a stopnja prostosti

p > 0,05: povezava med bolezenskimi znamenji in prisotnostjo satRNA ni signifikantna. Hipoteza je ovržena s 5% tveganjem.

^a degree of freedom

p > 0,05: there is no significant correlation between the symptoms and presence of satRNA. The hypothesis is rejected with 5% chance for wrong decision.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Razporeditev virusa GFLV po rastlini skozi sezono

Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja serološka imuno-encimska metoda ELISA, katere dobra lastnost je, da je zaradi univerzalnosti protiteles zanesljiva v primeru zadostne koncentracije virusa v rastlinskem tkivu. V primeru neenakomerne porazdelitve virusa po rastlini in sezonskih spremembah virusnih koncentracij, je lahko določanje s testom ELISA v nekaterih delih sezone nezanesljivo (Bovey in sod., 1980; Rowhani in sod. 1992). Zato je za določanje virusa GFLV s testom ELISA pomembno najti najprimernejše tkivo vinske trte, kot tudi najprimernejši čas rastne sezone za vzorčenje, pri katerem dobimo najvišje izmerjene fotometrične vrednosti (Rowhani in sod., 1992). Kljub temu pa latentnih okužb z zelo nizko koncentracijo virusa s testom ELISA ne moremo določiti.

Cilj doktorskega dela je bil dobiti vpogled v razporeditev virusa po rastlini vinske trte skozi rastno sezono s pomočjo testa ELISA. Test ELISA je semi-kvantitativna metoda, ki omogoča ocenitev virusnega titra, kljub temu, da zaradi prisotnosti inhibitorjev (Walter in Etienne, 1987) ter robustne narave metode, fotometrični odčitek in virusni titer nista vedno direktno sorazmerna. Da ni vpliva inhibicije v problematičnih vzorcih korenin in floema je potrdila že Krsmanović (2010) s tem, da je vzorce redčila v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto. Tako smo lahko nizke fotometrične odčitke pripisali dejanskim nizkim titrom virusa.

Virus smo s testom ELISA določili v vseh testiranih delih vinske trte: mladih in starejših listih, floemu, viticah, koreninah, socvetju in grozdju, kar je v skladu z dosedanjimi objavami, ki poročajo o prisotnosti virusa v mladih in starejših listih, vršičkih, žilah medčlenkov, koreninah, socvetju in grozdju manjšega števila testiranih trsov (Rowhani in sod., 1992; Walter in Etienne, 1987; Frantz in Walker, 1995). V literaturi nismo zasledili, da bi prisotnost virusa kadarkoli prej ugotavljali v viticah, kjer smo določili stalne in zelo visoke virusne titre, primerljive tistim v mladih listih in grozdih, kar si lahko razlagamo s tem, da so vitice pri vinski trti preobražena socvetja (imajo isti izvor kot grozd).

Med rastno sezono smo v vseh testiranih delih rastline, izključujoč korenine, najvišji virusni titer določili junija ter večinoma tudi julija, medtem ko je avgusta izrazito padel

(Slika 29). Septembra je virusni titer ponovno nekoliko narasel, z izjemo pri grozdju. Ta opažanja podpirajo izsledki raziskav na satRNA CymRSV (Pantaleo in Burgyan, 2008), ki pravijo, da je RNA utiševalni mehanizem aktivnejši pri visokih temperaturah ($> 26^{\circ}\text{C}$), in je posledično zmanjšana akumulacija virusa.

Najizrazitejši padec virusnega titra med rastno sezono smo opazili v floemu, v nekaterih primerih je avgusta padel tudi pod mejo določljivosti. Hkrati je bil porast virusnega titra v floemu konec rastne sezone in izven nje (januarja) najočitnejši (Slika 26). To se ne ujema z opažanji iz leta 1992, ko so Rowhani in sod. dobili nizke vendar konstantno zanesljivo pozitivne rezultate pri testiranju floema poganjka okuženih rastlin *V. rupestris* sorte St. George skozi rastno sezono. Na virusni titer vpliva veliko dejavnikov, med drugim najverjetneje tudi sorta gostiteljske rastline (Slika 31). Za naše razmere bi, v nasprotju z njimi, za določanje virusa GFLV s testom ELISA, odsvetovali vzorčenje floemskega tkiva med rastno sezono. Je pa floem še vedno edina in dobra možnost za določanje virusa GFLV izven rastne sezone.

Rowhani in sod. (1992) so si nizke vrednosti avgusta razlagali z neugodnimi vplivi visokih temperatur in pomanjkanjem padavin, ki naj bi vplivale na zmanjšanje replikacije virusa GFLV. Rezultati pridobljeni v Sloveniji kažejo na večji negativni vpliv daljšega sončnega sevanja in pomanjkanja padavin na replikacijo virusa GFLV v rastlinah, temperature pa naj ne bi imele večjega vpliva na pomnoževanje virusa (Krsmanović, 2010).

Najvišji virusni titer smo izmerili v mladih listih ter viticah skozi vso rastno sezono (Sliki 23 in 25). Tudi starejši listi so se izkazali kot dober rastlinski material za dokazovanje virusa GFLV s testom ELISA, kljub temu da so imeli nekoliko nižji in med rastlinami manj konsistenten virusni titer, kar se sklada z rezultati Bouyahia in sod. (2003), ki so ugotovili očitno višanje virusnega titra od bazalnih (starejših) do apikalnih (mlajših) listov.

Ti rezultati so v skladu z rezultati Rowhani in sod. (1992), ki so določili največ virusa GFLV v aktivno rastočem tkivu vinske trte (mladi listi in vršički poganjka) v začetku rastne sezone (od brstenja do julija). Hkrati pa so, tako kot mi, dokazali nizek virusni titer v dormantnih poganjkih (dormantni popki, floem, žagovina), iz njih inducirani mladi poganjki pa so imeli veliko višji titer virusa GFLV (Rowhani in sod., 1992; Walter in Etienne, 1987).

Ta opažanja nam orisujejo spreminjanje koncentracije virusa po rastlini. V pomladnih mesecih je virusa največ v aktivno rastočih delih rastlin, kjer so ugodni pogoji za hitro pomnoževanje virusa, tako so ta tkiva tudi primeren rastlinski material za dokazovanje

virusa GFLV s testom ELISA (Slika 29). V jesenskih mesecih se virus začne kopičiti v žilah olesenelih poganjkov, kjer najverjetneje prezimi, kar sklepamo iz zelo nizkega virusnega titra v floemu znotraj rastne sezone in povečanja virusnega titra v floemu konec rasne sezone in najvišjim virusnim titrom v dormantnih poganjkih izven rastne sezone.

V socvetju/grozdju se je virusni titer skozi rastno sezono spreminjal s spreminjanjem fiziologije in morfologije grozda. Pri rastlinah sorte Refošk iz Komna junija v socvetju nismo določili virusa, za kar nimamo obrazložitve, saj je bil njegov titer pri ostalih štirih trsih zelo visok. V vseh testiranih rastlinah smo največ virusa določili julija v nezrelih zelenih jagodah, kot poročajo že Rowhani in sod. (1992), medtem ko je virusni titer avgusta padel, vendar so bili rezultati zanesljivo pozitivni, medtem ko so bili rezultati septembra slabši in manj zanesljivi (Slika 28). Ta trend bi lahko pripisali aktivnemu namnoževanju virusa v zelenih jagodah, ki se je prenehalo v času dozorevanja jagod. Po tej teoriji je količina virusa v jagodi ostala enaka, vendar se je z večanjem celic in posledično jagod količina virusa, na isto enoto testiranega materiala, sorazmerno zmanjšala. Ker je bila količina začetnega materiala vedno manjša od cele zrele jagode, smo testirali le del mesa in kožice ene jagode. Pri vzorčenju grozda bi bilo torej zanimivo ločiti še kožico, meso in pečke ter testirati vsak del grozda posebej ter tako določiti razporeditev virusa GFLV v jagodi. Hkrati nimamo realne slike o tem ali je v vseh jagodah enega grozda oz. vseh grozdih na rastlini podoben virusni titer. Za to bi bilo potrebno testirati večje število jagod na več grozdih.

V koreninah smo določili nizke in večinoma raznolike virusne titre med rastlinami skozi celo rastno sezono. Kljub temu lahko rečemo, da smo najvišje virusne titre v koreninah izmerili julija, najnižje pa avgusta (Slika 27). Koreninski sistem vinske trte sestavljajo stare in mlade korenine. Trs vse življenje razvija mnogo mladih koreninic, hkrati pa naravno odmira del starih korenin. Mlade koreninice, s časom razvijejo sekundarno strukturo in olesenijo. Vzorčenje korenin vinske trte, še posebej mladih, je težavno saj so zelo težko dostopne. Najverjetnejši razlog za veliko variiranje izmerjenih vrednosti je, da smo vzorčili različne tipe korenin. Če je to res, sta vsaj dva razloga za razlike: homogenizacija pri starejših, olesenelih koreninah je zahtevnejša in verjetno manj učinkovita kot pri mladih, prav tako pa je mogoče, da so vsebnosti virusa v različnih tipih korenin različne.

5.1.2 Določanje virusa GFLV skozi rastno sezono v trsih različnih sort iz različnih vinogradov na Krasu in v Vipavski dolini

Prisotnost virusa GFLV smo dokazali v vseh 52 trsih, kjer je bil virus že predhodno določen s testom ELISA, medtem ko virusa nismo dokazali v 10 trsih, ki so bili na podlagi predhodnih raziskav določeni kot z virusom GFLV neokuženi trsi.

Vzroki zakaj so pri nekaterih trsih nihanja virusnega titra v drugi polovici rastne sezone očitna, pri drugih pa ne bi lahko bili: prisotnost ogorčic v zemlji, sortna značilnost, različen izvor in lastnost genotipov posameznih trsov, prisotnost različnih genotipskih različic virusa GFLV ali kombinacije okužb z različnimi virusi oz. različicami istega virusa ter lokacija s specifično mikroklimo in podlago.

Pri sortah Župlanka, Malvazija in Laški rizling poteka obnavljanje in nastajanje novih mladih poganjkov, kjer je virusno namnoževanje najučinkovitejše, skozi vso rastno sezono, medtem ko pri sorti Refošk (iz vseh treh lokacij, manj izrazito v vinogradu Dutovlje 1) ter Volovnik, proti koncu rastne sezone skorajda nismo več našli mlajših listov.

Na virusni titer bi lahko vplivale tudi ogorčice, ki stimulirajo obnovo trsa s stalnim objedanjem korenin, saj so prisotne ravno v vinogradih v Kromberku (Malvazija), Vrhpolju1 (Laški rizling), Vrhpolju2 (Župlanka) ter v Dutovljah1 (Refošk), kjer smo zaznali stalno visoke virusne titre, niso pa prisotne v Ložah (Vrhpolje), Malinkovcih (Refošk) in Komnu (Refošk), kjer so virusni titri nihali v drugi polovici rastne sezone.

Kot kaže, izvor in lastnost genotipov trsov, ter kombinacija genotipskih različic virusa GFLV nimajo vpliva na razlike v količini virusa med trtami znotraj iste sorte, saj smo pri sorti Refošk iz Komna (Priloga A) opazili velike razlike med trsi, kljub temu, da so potomke iste matične rastline in so posledično okužene z istimi genotipskimi različicami virusa GFLV (Blas, 2006), ki se zaradi odsotnosti prenašalca, do sedaj niso spremenili (Vojvoda, 2005). Obratno pa je genetska raznolikost virusa GFLV med trsi sort Malvazija, Župlanka in Laški rizling zelo velika (Vojvoda, 2005), rastline pa kljub temu ne kažejo signifikantnih razlik v količini virusa.

Tudi lokacija s svojo podlago in vremensko sliko verjetno nima bistvenega vpliva na količino virusa v trsih iste sorte, kljub temu, da smo opazili, da so imeli trsi iz Vipavske doline (Kromberk in Vrhpolje 1, 2) višje virusne titre in zato manjša nihanja proti koncu sezone, kot trsi iz Krasa (Malinkovci, Komen, Dutovlje 1). Vendar so trsi sorte Volovnik iz

Lož (Vipavska dolina), kazali ravno nasprotno, zelo velika nihanja virusnega titra. O vplivu mikroklima ne moremo govoriti saj nimamo podatkov.

5.1.3 Razvoj metode RT-PCR v realnem času za določanje in relativno kvantifikacijo virusa GFLV

DAS-ELISA je še vedno standardna diagnostična metoda za določanje virusa GFLV (Nolasco, 2003). Zaradi nizkih titrov virusa v poletnem obdobju bi bila občutljivejša metoda dobrodošla.

Glavni cilj je bil konstruirati hitro, specifično, občutljivo in kvantitativno metodo RT-PCR-RČ, ki bi jo lahko uporabili za določanje raznolikih genotipov virusa GFLV, s tem da bi ciljala na najbolj ohranjeno regijo molekule RNA2. Delovanje dveh novih metod (metode 1 in 2) smo ocenili na formatu enostopenjske reakcije na široki paleti 10-kratnih redčitev RNA. Primerjali smo rezultate med tehničnimi ponovitvami (replikati) znotraj ene ponovitve (intra-assay) in rezultate ločenih neodvisnih ponovitev (inter-assay) (Preglednica 9). Z izvedbo reverzne transkripcije in pomnoževanja v eni reakcijski mešanici, smo skrajšali celokupni čas od priprave vzorca do končnega rezultata, s tem smo zmanjšali tudi tveganje za kontaminacijo (Gutierrez-Aguirre in sod., 2009).

Dokazali smo, da z metodo 1 in v primeru negativnega rezultata dodatno z metodo 2, ki se razlikujeta le po sestavi sonde, specifično in zanesljivo določimo skoraj vse genotipske različice GFLV, ki so trenutno znane in prisotne v produkcijskih vinogradih v Sloveniji, Evropi ter Kaliforniji. Le pri dveh vzorcih od 86 testiranih, virusa GFLV nismo mogli določiti, kljub temu, da smo ga predhodno dokazali s testom ELISA in nato njegovo prisotnost potrdili še z RT-PCR (Preglednica 11).

Izbor ohranjene regije za konstrukcijo amplikona znotraj gena 2A^{HP}, podpirajo rezultati študij rekombinacije med različnimi izolati GFLV in med virusoma GFLV in ArMV ali GDefV. Večino rekombinacij na molekuli RNA2 so do zdaj našli na genih 2B^{MP} in 2C^{CP} ter 5' UTR regiji (Boulila, 2007; Vigne in sod., 2004a, 2004b, 2005, 2008 in 2009). Nekaj rekombinacij so našli tudi na genu 2A^{HP} med nt 225 – 269 in nt 880 – 921 (Pompe-Novak in sod., 2007, Vigne in sod., 2008), vendar so te regije vstran od ohranjene regije, ki smo jo izbrali za mesto amplikona.

Obe metodi sta specifični za določanje GFLV, saj z njima nismo uspeli pomnožiti nobenega drugega virusa vinske trte ali DNA iz tkiva vinske trte ter njene mikroflora. Izolacija RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) je uspešno odstranila inhibitorne nečistoče (npr. fenole in polisaharide, ki so v tkivu vinske trte zelo pogosti) saj smo pri uporabi neredčene RNA redko zaznali inhibicijo, z 10x redčinami RNA pa inhibicije nismo več zaznali.

Dokazali smo tudi, da ima nova metoda RT-PCR-RČ za 3 rede velikosti boljšo občutljivost v primerjavi s testom ELISA, ki se redno uporablja v diagnostične namene virusa GFLV (Preglednica 11). Takšna izboljšava v smeri občutljivosti v primerjavi s testom ELISA nam je omogočila, da smo virus zaznali v dveh trsih, ki sta bila s testom ELISA določena kot GFLV negativna (Preglednica 12). Hkrati tako občutljiva metoda omogoča določanje virusa v vzorcu sestavljenem iz večje skupine rastlin (pool), kar je časovno zelo učinkovita strategija pregledovanja (screening). Enostopenjska RT-PCR-RČ je časovno učinkovitejša metoda od obstoječih metod RT-PCR, ki zahtevajo med drugim uporabo škodljivih kemikalij npr. etidijev bromid.

Razlike v rezultatih dobljenih z različnimi diagnostičnimi testi lahko nastanejo zaradi nizkih začetnih koncentracij tarčne RNA v rastlinskem vzorcu, zaradi polimorfizmov na predelu amplikona med različnimi tarčnimi molekulami in zaradi rekombinacij med GFLV in njemu sorodnimi virusi, kot je ArMV (Mekuria in sod., 2009; Vigne in sod., 2008), katerih posledica so zamenjave odsekov nukleotidnih zaporedij, ki lahko vključujejo odsek amplikona. Zaradi visoke stopnje raznolikosti virusa GFLV ter medvrstnih rekombinacij bi bila uporaba več RT-PCR-RČ metod, ki ciljajo na različne gene, uporabna za potrditev prisotnosti virusa GFLV. V tem smislu je nova kombinacija dveh metod RT-PCR-RČ, ki cilja na gen $2A^{HP}$, v kombinaciji z že obstoječo metodo RT-PCR-RČ, ki cilja na gen $2C^{CP}$ (Osman in Rowhani, 2006; Osman in sod., 2008) močno diagnostično orodje za zanesljivo določitev virusa GFLV. Pozitivni rezultat ene od metod skoraj zagotovo predstavlja prisotnost virusa GFLV v analiziranem vzorcu, medtem ko negativni rezultat vseh treh metod, z zelo visoko stopnjo zanesljivosti, predstavlja vzorec, ki ni okužen z virusom GFLV. Pri vzorcih, kjer bi dobili negativni rezultat le z eno od metod, bi lahko sklepali na raznolikost nukleotidnega zaporedja v predelu tarče te metode ali celo razkrili medvrstno rekombinacijo na genu $2A^{HP}$ ali $2C^{CP}$.

Nova metoda omogoča kvantitativno določanje virusa GFLV ne glede na širok razpon števila kopij virusne RNA (Preglednica 10). V kombinaciji s primerno referenčno metodo jo lahko uporabljamo v različnih aplikacijah, npr. za določanje koncentracije GFLV v različnih rastlinskih organih in v ogorčicah, za ocenjevanje sezonske variacije virusne

koncentracije ali pri kakšnih drugih primerjalnih študijah bolezni kužne izrojenosti vinske trte.

COX in 18S sta se izkazala kot primerna referenčna gena za ocenjevanje sezonskega variiranja koncentracije GFLV v tkivu vinske trte iz vinogradov. Rezultati so pokazali, da je koncentracija RNA virusa GFLV v floemu skozi poletje nizka v večini testiranih trsov. Vzrok za to naj bi bil v vročih okoljskih razmerah oz. visokem sončnem sevanju, ki negativno vplivajo na GFLV pomnoževanje (Rowhani in sod., 1992; Krsmanović, 2010) hkrati pa se virus v času rastne sezone najverjetneje raje pomnožuje v metabolno aktivnejšem tkivu mladih zelenih listov.

Zanimivo je, da se različen trend spreminjanja koncentracije GFLV v floemu skozi rastno sezono v vzorcu Refošk DU 3/13 (naraščanje koncentracije sredi rastne sezone) sklada z drugačnimi bolezenskimi znamenji, ki jih ima ta trs v primerjavi z ostalimi trsi, vključno s trsom iste sorte Refošk DU 2/19 iz istega vinograda, pri katerih je koncentracija virusa skozi rastno sezono le padala (Slika 38). Kljub temu pa je težko najti direktno povezavo med bolezenskimi znamenji in virusnim pomnoževanjem, saj je lahko vpletenih še mnogo drugih dejavnikov, kot je npr. različna sestava genotipskih različic virusa GFLV v vsakem trsu. Razlike v rezultatih testov ELISA in RT-PCR-RČ, ki smo jih dobili za vzorec Refošk DU 3/13, lahko izvirajo iz tega, da z eno metodo določamo proteine z drugo pa RNA in ni nujno, da je razmerje med njima vedno enako (Sliki 38 in 39). Kolikor nam je znano, je to prva raziskava, v kateri je bila metoda RT-PCR-RČ uspešno uporabljena za relativno kvantifikacijo RNA virusa GFLV v tkivu vinske trte iz vinogradov skozi rastno sezono, z uporabo primernih referenčnih genov za normalizacijo.

5.1.4 Raznolikost molekule RNA2

Plaščni protein, ki je kodiran na genu $2C^{CP}$, je eden izmed pomembnejših kriterijev za ločevanje med vrstami virusov znotraj rodu *Nepovirus*. Aminokislinsko zaporedje plaščnega proteina mora biti vsaj v 75% homologno med virusi, ki pripadajo isti vrsti in morajo enako reagirati tudi na protitelesa. Poleg plaščnega proteina je pomembno tudi, da imajo virusi iste vrste vsaj 75% podobnost v aminokislinskem zaporedju polimeraze, kodirane na molekuli RNA1 ter iste vrste prenašalcev. Med komponentami virusov naj ne bi bilo mogočih pseudo-rekombinant (izmenjave posameznih genomskih molekul med virusi) (Fauquet in sod., 2005). Grupiranje izolatov glede na gen $2C^{CP}$ (Slika 41), se posledično sklada z rezultati seroloških metod. Vendar to ne drži nujno za ostale regije virusnega genoma, saj je vsaj na nivoju RNA2, za katero je dostopnih več informacij,

dokazana velika genetska raznolikost virusa GFLV, z mnogimi rekombinacijami, ne le znotraj vrste, temveč tudi med sorodnimi vrstami.

V našem primeru smo našli izolat virusa iz Laškega rizlinga 4/29 (Vrhopolje 1), ki ima gen 2C^{CP} najbolj podoben virusu GFLV, zaradi česar smo ga z DAS-ELISA testom tudi zaznali. Tega izolata pa nismo mogli pomnožiti z novo metodo RT-PCR-RČ, zaradi česar smo izolat proučevali na nivoju nukleotidnega zaporedja, ki nam je razkrilo, da je izolat v genu 2A^{HP} rekombiniran s pred kratkim odkritim virusom GDefV iz Turčije (Cigsar in sod., 2003). GDefV drugod še ni bil odkrit, vendar tudi raziskav v ta namen ni bilo veliko.

Pred kratkim so tudi Mekuria in sod. (2009) objavili podobno najdbo. V Washingtonu so našli tri izolate GFLV (WAPN165, WAPN6132, WACH911), ki so bili na genu 2A^{HP} rekombinirani z GDefV.

Že pred tem pa je bilo odkritih več rekombinacij med dvema sorodnima virusoma ArMV in GFLV na genih 2A^{HP} in 2B^{MP}. O njih poročajo iz Madžarske (2B^{MP}) (Vigne in sod., 2008); Italije (2A^{HP}) (Jawhar in sod., 2009); Washingtona (ZDA; Mekuria in sod., 2009) in Kalifornije (ZDA; Oliver in sod., 2010). Slednji so odkrili rekombinacijo na 3' koncu gena 2A^{HP} in gena 2B^{MP} šestih izolatov iz Kalifornije, na podobnih mestih kot so jo odkrili Vigne in sod. (2008) na madžarskem izolatu GHu. Obstajata vsaj dve razlagi. Prva je, da vsi omenjeni izolati prihajajo iz istega vira, kjer je prišlo do te rekombinacije, druga pa, da so ta rekombinacijska mesta v splošnem favorizirana. Predvidevajo, da ima rekombinacija na genu 2B^{MP}, ki so jo dokazali tudi pri drugih nepovirusnih rekombinantih npr. med GCMV in TBRV (Le Gall in sod., 1995), vlogo pri prilagajanju in specializaciji virusa na novega gostitelja (Oliver in sod., 2010). Tudi na našem izolatu se kažejo na tej regiji krajši ali daljši odseki nukleotidnega zaporedja, ki so bolj podobni virusom ArMV kot GFLV.

Ker so nukleotidna zaporedja izven in znotraj rekombinacijskih mest kalifornijskih in madžarske rekombinante kljub vsemu zelo različna (11,6 - 12%) predvidevajo, da so omenjene rekombinacije nastale ločeno. V ZDA do zdaj virusa ArMV, kljub veliko raziskavam na tem področju, še niso dokazali, tako kot tudi ne njegovega prenašalca ogorčice *Xiphinema diversicaudatum*. Posledično je zelo malo verjetno, da je do rekombinacij med ArMV in GFLV pri kalifornijskih rekombinantih in tistih iz Washingtona (Mekuria in sod., 2009) prišlo v Ameriki. Najverjetneje so bili rekombinanti tja prineseni z okuženim sadilnim materialom iz Evrope, kjer obstajajo področja s prisotnima virusoma ArMV in GFLV ter njunimi prenašalci. Dejstvo, da so nekateri kalifornijski izolati GFLV izredno podobni izolatu GFLV-F13 iz Francije, ki je sicer zelo drugačen od ostalih do zdaj znanih izolatov GFLV iz Evrope, potrjuje hipotezo o prenosu

okuženih francoskih trsov v Ameriko (Mekuria in sod., 2009; Oliver in sod., 2010). Tudi v Sloveniji virus ArMV in njegov prenašalec nista prisotna, hkrati pa za segment, ki je sicer najbolj podoben ArMV ne najdemo izolata ArMV, ki bi bil direktni starš in bi se popolnoma poravnal s to regijo. Sklepamo, da je do nastanka tega izolata prišlo posredno preko več rekombinacij med GFLV, ArMV in GDefV.

Če to drži, obstaja več razlag, kako je prišlo do hkratne okužbe z virusom GFLV in z enim ali dvema sorodnima virusoma (GDefV in ArMV) iste rastline, kar je predpogoj za nastanek rekombinacij med njimi. Prenašalec (ogorčica) v evropskem vinogradu je lahko bil že v osnovi prisoten in okužen z enim od treh virusov. V vinograd se je zaradi takrat še slabe zdravstvene selekcije lahko zasadil latentno okužen trs z enim od drugih dveh virusov. Kasneje, ko so začeli cepiti žlahtne trse na odporne podlage, so začeli z ekstremnim mešanjem rastlinskega materiala pri čemer ni bilo težko združiti dveh trsov z različnima virusoma. V primeru, da so cepič vzeli od trsa, ki je bil zaradi prenosa z ogorčicami okužen z dvema virusoma, se je tako preko podlage v cepič prenesel še tretji virus. Tako je lahko prišlo skozi daljše obdobje do rekombinacije med dvema ali tremi virusi.

V primeru, da je bil vinograd okužen z ogorčico *X. index*, so se na sosednje trse prenesli le nerekombinantni virusi GFLV ali rekombinante, ki so imele gen $2C^{CP}$ virusa GFLV, saj slednji določa specifični prenos z ogorčico *X. index*. Čisto možno je, da so se takšne rekombinante virusa GFLV, s cepiči prenesle v druge vinograde po Evropi in tudi v Ameriko. To hipotezo potrjuje tudi odkritje, da rekombinante med ArMV in GFLV (npr. GFLV-GHu) povzročajo manj bolezenskih znamenj kot sam virus GFLV (Legin in sod., 1993; Vigne in sod., 2008). Tako je povsem mogoče, da so bili takšni trsi vizualno izbrani za cepiče.

Takšnih rekombinant z današnjimi serološkimi testi, ki slonijo na protitelesih proti CP, ne moremo razlikovati od nerekombinantnih različic virusa, kar najverjetneje zelo omejuje naš pogled na resnično raznolikost virusa, ki je ključ do razumevanja evolucije nepovirusov (Mekuria in sod., 2009).

Kljub temu, da pri virusu GFLV pogosto zasledimo znotrajvrstne rekombinacije na različnih predelih molekule RNA2 (Vigne in sod., 2004), tudi na genu $2C^{CP}$, so medvrstne rekombinacije omejene na manj rekombinacijskih mest, primernih za nastanek viabilnega rekombinanta. Glede na to, da je plaščni protein udeležen pri specifičnem prenosu virusa z ogorčicami, je logično, da do zdaj pri nepovirusih še niso odkrili medvrstnega rekombinanta, ki bi imel rekombinacijo na genu $2C^{CP}$ (Oliver in sod., 2010). Kot kaže, so

najaktualnejši deli molekule RNA2 za medvrstno rekombinacijo med sorodnimi *Nepovirusi* locirane na 5' nekodirajoči regiji ter genih 2A^{HP} in 2B^{MP}.

5.1.5 Določanje satRNA virusa GFLV

Z metodo RT-PCR smo dokazali satRNA v 58 od skupno 79 vzorcev (73%), okuženih z GFLV, iz Slovenije, Španije, Francije, Italije in Kalifornije (ZDA) (Slika 42). Ta delež je 4-krat večji od do sedaj znanega. Fuchs in sod. (1991a) so s hibridizacijsko metodo in specifično sondo dokazali veliko satRNA le pri dveh od desetih izolatov GFLV iz Francije, Madžarske in Tunizije ter pri treh od osmih izolatov ArMV iz Bolgarije, Francije, Italije in Anglije. Saldarelli in sod. (1993) so na podoben način analizirali naravno prisotnost satRNA pri 34 izolatih GFLV iz Italije in Jordanije. Dokazali so jo le pri približno 15% trsov, naravno okuženih z GFLV. Z metodo RT-PCR, so Wetzel in sod. (2006) dokazali prisotnost velike satRNA ArMV le v 8 od 47 (17%) izolatov ArMV iz vinske trte, španskega bezga in hmelja.

Pri 15% vzorcev šibkega junijskega PCR signala nismo potrditi tudi v jesenskem materialu. To je smiselno saj smo z ELISA testom dokazali, da je vse splošni virusni titer v začetku rastne sezone veliko višji kot jeseni, kar je še posebej očitno pri trsih sorte Refošk iz Komna, ki predstavljajo kar 5 od 12 vzorcev z različnim rezultatom. Ker se satRNA pomnožuje skupaj z genomsko RNA virusa pomagalca, je najverjetneje tudi količina satRNA konec rastne sezone nižja. Če bi želeli potrditi prisotnost satRNA v teh 12 vzorcih, bi mogli še enkrat vzorčiti mlade poganjke na začetku rastne sezone.

Isti pojav smo opazili tudi pri trsu Ref DU 3/13 iz vinograda Dutovlje 1, kjer so virusni titri v splošnem višji kot pri trsih sorte Refošk iz Komna (Slika 31). Kljub temu pa smo ob kvantifikaciji virusa GFLV v floemu skozi sezono ravno pri tem trsu opazili drugačen trend spreminjanja količine virusne RNA, kot ga imajo ostali. Junija je bila koncentracija RNA nizka, čez poletje je narasla, septembra smo zaznali močan padec RNA koncentracije (Slika 38), kar razloži dejstvo, da smo tudi satRNA junija dobili malo, septembra pa sploh ne več.

Kljub temu pa smo pri dveh vzorcih (LR 4/29 in Ref DUC 3/7) jeseni dobili močnejši signal kot junija (Preglednica 12). Možno je, da smo pri njiju junija vzorčili z virusom revnejši del poganjka. Hkrati smo iz jesenskih vzorcev izolirali celokupno RNA, kar pomeni, da nismo virusov lovili na protitelesa tako kot junija, zato obstaja možnost, da so bili virusi v obliki proste RNA in niso bili enkapsidirani ali pa je bila iz omenjenih vzorcev junija adsorpcija teh virusov na protitelesa slabša (mogoče drugačna virusna različica) kot

adsorpcija virusov iz ostalih vzorcev in je bila pri njiju celokupna izolacija RNA (jeseni) zato uspešnejša od izolacije z IC (junija).

Do takih nasprotji je lahko prišlo tudi zaradi tega, ker smo jeseni nabrali zelo raznolik material. V nekaterih primerih je bil na voljo le starikav listni material, pri drugih pa sveži mladi listi, ki so pogнали iz mesta že odpadlih starih listov.

Verjetno je bil ključnega pomena za določitev satRNA GFLV v tako velikem deležu trsov (58 – 73%) dovolj splošna metoda RT-PCR, ki je bila izbrana na podlagi preizkušanj 32 različnih kombinacij začetnih oligonukleotidov. Tako smo našli primeren par (FP3/RP), s katerim smo z metodo RT-PCR uspeli pomnožiti satRNA GFLV v vseh 9 preliminarnih vzorcih in hkrati pridobiti fragment, ki je pokrival 77 – 78% dolžine nukleotidnega zaporedja satRNA.

Odsotnost oz. različno močne signale, ki smo jih dobili z metodo RT-PCR, lahko pripišemo več dejavnikom: različnim titrom virusa in s tem različnim vsebnostim satRNA; specifičnosti začetnih oligonukleotidov, ki so lahko v primerih močnega signala nalegali 100% v primerih šibkejšega signala so nalegali slabše, zato je bila učinkovitost pomnoževanja slabša, v 27% vzorcev z našimi začetnimi oligonukleotidi nismo mogli pomnožiti satRNA. Možno je, da so se satRNA od tarčnega nukleotidnega zaporedja preveč razlikovale, ali satRNA sploh ni bila prisotna. Tretja možnost je, da je bila satRNA v vzorcih, kjer je nismo mogli določiti, le v sledovih in je bila tako pod pragom določljivosti za našo metodo. Če bi želeli odsotnost satRNA v teh vzorcih potrditi, bi se mogli poslužiti metode hibridizacije celotne satRNA z RNA iz vzorcev kjer satRNA še nismo dokazali.

5.1.6 Vpliv satRNA na bolezenska znamenja

Velike satRNA redko spreminjajo bolezenska znamenja povzročena s strani virusa pomagalca. Do zdaj niso dokazali nobenih vplivov velike satRNA virusa TBRV na njegov titer in patogeni učinek. Fuchs in sod. (1991b) so objavili povzetek, kjer poročajo o negativnem vplivu satRNA na titer virusa GFLV-F13 in na zmanjšanje bolezenskih znamenj, ki jih virus povzroča na rastlini *C. quinoa*. Stopnjo pomnoževanja virusa so ocenili s testom ELISA in metodo hibridizacije. Do danes teh rezultatov ni na rastlinah vinske trte potrdil še nihče. Saldarelli in sod. (1993) so dokazali, da prisotnost satRNA virusa GFLV ne vpliva na izražanje bolezenskih znamenj na vinski trti, kar potrjujejo tudi naši rezultati. Ker pa nismo stoodstotno prepričani, da satRNA ni prisotna tudi v ostalih 27% testiranih rastlinah, bi bilo potrebno tak zaključek preveriti. Po drugi strani o vplivu

na bolezenska znamenja težje govorimo, saj so odvisna še od mnogih drugih dejavnikov, najverjetneje tudi od različnih sort vinske trte, ki jo okužujejo.

5.1.7 Raznolikost satRNA

To je prva študija o raznolikosti nukleotidnih zaporedij satRNA GFLV, ki smo jih primerjali z do sedaj edinim znanim nukleotidnim zaporedjem satRNA GFLV-F13 ter s šestimi obstoječimi nukleotidnimi zaporedji satRNA ArMV. V študijo smo zajeli 136 nukleotidnih zaporedij satRNA iz 31 z GFLV okuženih trsov. Analiza je pokazala njihovo veliko raznolikost, tako v dolžini kot v nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju, ki je bilo od nukleotidnih zaporedij še večje. V primeru satRNA to očitno ni tako novo, saj so do istih opažanj prišli tudi Latvala-Kilby in sod. (2000), ki so ugotovili, da je v nukleotidnem zaporedju večinoma drugačna prva in/ali druga baza kodona, kar definira drugačno amino kislino, kot če bi bil različen le tretji nukleotid kodona, ki je ponavadi degeneriran in lahko zato predstavlja isto aminokislino. V našem primeru smo v analizo vključili tudi 3' nekodirajočo regijo satRNA, ki ima gotovo že v osnovi manjši selekcijski pritisk od ORF regije. Verjetno bi bile razlike manjše, če bi primerjali celotne ORF regije satRNA, brez nekodirajočih regij.

Poleg satRNA je bil gen $2A^{HP}$ do sedaj edini, pri katerem so ugotovili variabilnost njegove velikosti in večjo raznolikost na aminokislinskem kot na nukleotidnem nivoju. Dokazali so, da je $2A^{HP}$ podvržen šibkejšemu selekcijskemu pritisku kot gena $2B^{MP}$ in $2C^{CP}$ (Oliver in sod., 2010). Predvidevajo, da celotno aminokislinsko zaporedje ni tako pomembno za funkcijo proteina $2A^{HP}$, ki jo ima pri pomnoževanju RNA2 molekule. Posledično je gen genetsko fleksibilnejši in njegova dolžina raznolika (Mekuria in sod., 2009; Pompe-Novak in sod., 2007; Vigne in sod., 2008). SatRNA ima podobno funkcijo, le da pri pomnoževanju satRNA, kar nakazuje na to, da je funkcionalni del, ki vpliva na pomnoževanje posamezne molekule zelo kratek in ni na nivoju celotne molekule.

Filogenetsko drevo, ki vključuje nova ter vsa do sedaj znana nukleotidna zaporedja satRNA virusov GFLV in ArMV, nam daje vpogled v raznolikost in odnose med satRNA in sorodnima virusoma pomagalcema iz podskupine A. Jasno se ločita dve veji, ki sta si na nukleotidnem nivoju podobni v 70 – 77% in na aminokislinskem nivoju v 52 – 67%. V nadaljevanju ju bomo imenovali skupina satRNA GFLV, ki vključuje vse satRNA iz slovenskih ter italijanskih GFLV izolatov in dveh izolatov ArMV. Drugo skupino bomo imenovali satRNA ArMV, ki vključuje satRNA iz vseh ostalih izolatov ArMV ter GFLV izolatov iz Kalifornije ter Francije.

Da se satRNA ArMV izolatov J86 in NW grupirata k satRNA GFLV lahko razlagamo s skupno evolucijo obeh virusov pomagalcev, namreč del gena 2A^{HP} izolata ArMV-NW je bolj podoben GFLV kot ostalim izolatom ArMV (Vigne in sod., 2008; Wetzel in sod., 2001). Najverjetneje gre za rekombinant med GFLV in ArMV virusom, kar je popolnoma mogoče, saj so takih primerov našli že veliko (Mekuria in sod., 2009; Oliver in sod., 2010; Vigne in sod., 2008). Če je bila omogočena medvrstna rekombinacija, je bila mogoča tudi izmenjava satRNA molekul in njena prilagoditev novemu virusu pomagalcu. Ta rezultat torej ni presenetljiv saj je znano, da je v nemških vinogradih, od koder izvira ArMV-NW, veliko mešanih okužb z ArMV in GFLV virusom (Wetzel in sod., 2001).

Obratno situacijo, ko sta se satRNA francoskih izolatov GFLV-F13 in GFLV-A17d grupirali v skupino satRNA ArMV, si lahko razlagamo na enak način, saj so tudi za francoske vinograde značilne mešane okužbe z obema virusoma. V Sloveniji in Italiji virusa ArMV praktično ni, pojavlja se zelo redko ter sporadično in ga v naših vzorcih nismo dokazali. To bi razložilo zakaj ob naših GFLV izolatih nismo odkrili nobene satRNA, ki bi pripadala skupini satRNA ArMV, kljub temu, da je metoda tako splošna, da bi lahko pomnoževala tudi satRNA, do zdaj znanih izolatov ArMV.

Grupiranje satRNA kalifornijskega izolata GFLV-103 med skupino satRNA ArMV si razlagamo s tem, da so ta in verjetno tudi podobni drugi izolati prišli v Ameriko iz evropskega območja (npr. Francije, Madžarske) skupaj z okuženim rastlinskim materialom v 19. stoletju. Namreč v Kaliforniji do sedaj, kljub številnim raziskavam, virusa ArMV in njegovega prenašalca *Xiphinema diversicaudatum*, še niso našli. Do istega zaključka, da so ameriški GFLV izolati potomci evropskih, so prišli tudi Oliver in sod. (2010), ko so si poskušali razložiti od kod izvirajo ameriški izolati GFLV, ki so rekombinanti med GFLV in ArMV virusom na RNA2 molekuli.

Da se lahko satRNA pomnožujejo s pomočjo različnih virusov pomagalcev potrjujejo rezultati raziskovalcev Hans in sod. (1992), ki so satRNA izolata GFLV-F13 uspeli pomnoževati s pomočjo virusa pomagalca ArMV-S, vendar ne z GFLV-24, ki je sicer serološko sorodnejši virusu GFLV-F13. Po drugi strani pa GFLV virus ni deloval kot virus pomagalec za satRNA izolata ArMV-S. Podoben primer sta ArMV iz bršljana in jesena, ki nista delovala kot virusa pomagalca za satRNA ArMV-lilac iz španskega bezga, medtem ko se je omenjena satRNA normalno namnoževala v prisotnosti ArMV izolatov iz hmelja in sladkorne pese, kljub temu, da so si vsi omenjeni virusi serološko sorodni (Liu in sod., 1991).

Iz teh opazanj je razvidno, da specifičnost interakcije med virusom pomagalcem in satRNA verjetno ni določena na genu za plaščni protein RNA2 molekule, ampak na delu genoma za prepoznavanje in pomnoževanje virusne RNA. Fritsch in Mayo (1989) predvidevata, da je ta specifičnost določena na RNA1 molekuli genomske RNA virusa pomagalca, katere produkti sodelujejo pri pomnoževanju virusne RNA. Zelo mogoče je, da ima tudi protein, kodiran na satRNA, pomembno vlogo pri specifični povezavi s virusom pomagalcem. Mogoče interagira direktno z lastno RNA in ji s tem omogoči vezavo na replikazo virusa pomagalca ali pa se veže na replikazo kar protein sam in replikazo s tem spremeni, tako da prepozna njegovo satRNA ali pa postane replikaza celo bolj dovzetna za pomnoževanje njegove satRNA kot genomskih RNA. To pa ni nujno razlog, da bi mogle biti satRNA podobnih virusov pomagalcev med sabo prav tako podobne, saj je specifična povezava med satRNA in virusom pomagalcem najverjetneje določena z nekaj aminokislinami (Oncino in sod., 1995), kar se sklada tudi s tem, da so satRNA zelo raznolike na aminokislinskem nivoju.

Vsi ti rezultati podpirajo idejo o izmenjavi velikih satRNA med sorodnima virusoma ArMV in GFLV, ki lahko soobstajata v istem trsu skozi daljše časovno obdobje. Predvidevamo, da je na tak način satRNA izolata ArMV našla pot tudi v virus pomagalec GFLV-F13, GFLV-A17d ali GFLV-103, s tem da se je prilagodila le toliko, da je zadostila kriterijem za specifičen soobstoj satRNA z virusom pomagalcem in zato ohranila zelo veliko podobnost v nukleotidnem zaporedju z ostalimi satRNA ArMV. Obratno pa bi lahko bilo res za satRNA izolatov GFLV, ki so se prilagodili na soobstoj z virusom ArMV, kot v primeru satRNA izolatov ArMV-NW in J86.

Večkrat se je že pokazalo, tako kot tudi v našem primeru, da imajo sorodnejši virusi podobnejše satRNA. Kot v primeru satRNA virusa TBRV, kjer so dokazali, da imajo serološko sorodnejši virusi TBRV podobnejše satRNA (90%), kot serološko bolj oddaljeni TBRV katerih satRNA si delijo le 60% nukleotidnega zaporedja (Fritsch in sod., 1984; Hemmer in sod., 1987). Razlog je verjetno ločena evolucija satRNA različnih virusov, ki so okuževali različne rastline iz različnih lokacij. V primeru, da so virusni izolati s satRNA prišli zaradi določenih razlogov skupaj (človeški faktor, naravno širjenje virusa) je lahko med takimi virusi prišlo do izmenjave in prilagoditve genomskih RNA (rekombinacija) ter satRNA, zaradi česar so se meje med virusi in njim pripadajočimi satRNA, začele brisati.

Pri nekaterih malih linearnih satRNA, kot je CMV, so določili manjše razlike v nukleotidnem zaporedju (1 – 20%), ki niso spremenile sekundarne strukture satRNA. Te razlike niso bile naključno razporejene, pač pa so bile skoncentrirane na določenih mestih (ang. hot spots) satRNA (Roossinck in sod., 1992). Pri velikih satRNA pa je selekcijski

pritisk drugačen, najverjetneje je vezan na funkcionalnost proteina, ki ga kodirajo. Evolucija satRNA je vodena s selekcijskim pritiskom, pri tem nima pomembne vloge le virus pomagalec pač pa tudi gostiteljska rastlina, ki lahko ima pri pomnoževanju satRNA pomembno vlogo, saj satRNA preko RNA utiševalnega mehanizma gostiteljske rastline vpliva na svoje pomnoževanje (Hu in sod., 2009). Zanimivo, da se je v filogenetskem drevesu satRNA izolatov ArMV-hop iz hmelja in ArMV-lilac iz španskega bezga ločila od drugih satRNA ArMV izoliranih iz vinske trte (Sliki 45 in 46). Za primer, velika satRNA TBRV se zelo slabo pomnožuje v rastlini *C. quinoa* in zelo učinkovito v rastlinah *Nicotiana clevelandi* in *Petunia hybrida* (Murant in Mayo, 1982). V nobeni od teh rastlin ne spreminja bolezenskih znamenj, ki jih povzroča njen virus pomagalec, medtem ko pri okužbi rastline *C. amaranticolor* inhibira nastanek lokalnih lezij na listih (Fritsch in sod., 1993). Tako sta se lahko tudi satRNA ArMV iz hmelja in satRNA ArMV iz španskega bezga prilagodila svoji gostiteljski rastlini in se posledično tudi na nukleotidnem nivoju zdaj bolj razlikujeta od satRNA, ki so prilagojene pomnoževanju v vinski trti.

Glede na naše rezultate lahko rečemo, da se satRNA ločijo glede na širšo regijo (slovenski, izolati, italijanski izolati, kalifornijski in francoski izolati), vendar tega ne moremo trditi na nivoju posamezne regije, saj se v okviru Krasa in Vipavske doline izolati iz različnih lokacij grupirajo skupaj, izolati iz iste lokacije pa se večinoma ločijo v različne skupine. Predvidevamo, da se satRNA kot tudi virus GFLV na tako majhni lokaciji kot je slovenski Kras in Vipavska dolina lahko prenašajo s sadilnim materialom, mehanizacijo, znotraj posameznih krajev (npr. Dutovlje, Vrhpolje, Kromberk) pa tudi po naravni poti z ogorčicami, ki so na teh lokacijah prisotne.

Primer, ko so se s slovenskimi satRNA (Dutovlje 2 in 3) grupirale satRNA iz dveh italijanskih izolatov B2/7 in A2/25 (Sliki 45 in 46) si razlagamo s tem, da je enkrat v preteklosti prišlo do stika oz. mešanja rastlinskega materiala ne glede na to ali je šlo za podlage ali žlahtne trse, preko katerega se je satRNA prenesla, prav tako kot smo ugotovili v primeru ameriških izolatov, ki so prišli iz evropskih vinogradov. Pri trsih sorte Refoški iz Dutovelj smo zasledili največ razlik, kar nakazuje na več mešanja rastlinskega materiala, kot tudi prenosa virusa ter satRNA med njimi s pomočjo ogorčic.

V eni rastlini smo našli od 1 do 2 zares drugačni satRNA (Ref DUK3/37, Ref DUC 4/10, Ref DUC 3/7, Mal o/2), drugače pa veliko satRNA, ki se razlikujejo le v nekaj nukleotidih. Razlog za manjšo raznolikost je lahko nastajanje napak zaradi od RNA odvisne RNA polimeraze, ki je brez popravilnega mehanizma; in majhnega selekcijskega pritiska, ki ga predstavljata gostiteljska rastlina, kjer poteka replikacija, ter virus pomagalec, katerega mehanizme za replikacijo in prenos izkoriščajo tudi satRNA (Kurath in Robaglia, 1995;

Astier in sod., 2007b). Kot kaže je tudi za satRNA, tako kot za virus pomagalec, značilna kvazivrstna narava populacije, saj nenehno z mutacijami nastajajo nove genotipske različice ali kvazivrste (Naraghi-Arani in sod., 2001). Kljub temu napak, ki lahko nastanejo pri reverzni transkripciji in med PCR reakcijo, ne moremo izključiti. SatRNA zaradi velike raznolikosti in nekonsistentne prisotnosti ob virusu ni primerna za razvoj diagnostične metode za določanje virusa GFLV.

Ker smo iz posamezne rastline kljub več klonov dobili večinoma le po eno genotipsko različico virusa sklepamo, da je populacija satRNA sestavljena iz ene glavne genotipske različice, ki je najbolj prilagojena trenutnim razmeram in konkurira ostalim genotipskim različicam satRNA, ki jo zato spremljajo le v majhni količini. To bi razložilo pojav, ki smo ga opazili pri dveh Malvazijah iz Kromberka (Mal h/1 in Mal o/5), ko so se satRNA, ki smo jih izolirali junija popolnoma razlikovale od tistih izoliranih septembra, predvsem na aminokislinskem nivoju (Slika 46). Razlog za to bi lahko bil, da so bili pogoji za replikacijo satRNA v tej rastlini med sezonama tako drugačni, da so se v trenutni situaciji replicirale satRNA, ki so bile na dane razmere bolj prilagojene, ostale pa so sicer preživele, a se replicirale v veliko manjšem številu. Pri tretji Malvaziji (Mal o/2) smo pri obeh vzorčenjih zaobjeli dve popolnoma drugačni različici satRNA, ki sta verjetno imeli zelo podobno učinkovitost pomnoževanja v tej rastlini, zato sta bili enakomerno zastopani, kar smo opazili tudi pri nekaterih trsih sorte Refošk iz Dutovelj. Tako očitnih razlik med sezonama kot smo jih opazili pri Malvazijah, nismo opazili pri drugih sortah vinske trte. V Kromberku, od koder so Malvazije so prisotne tudi ogorčice, ki lahko pomagajo pri nastanku raznovrstne populacije virusa GFLV ter satRNA v posamezni rastlini.

SatRNA iz vseh treh trsov sorte Volovnik iz Lož so se grupirale skupaj, ne glede na čas vzorčenja in večje število sekvenciranih klonov. V enem trsu tako nismo dobili več različic satRNA kakor je bilo pri istih trsah dokazano za RNA2 molekulo virusa pomagalca GFLV (Pompe-Novak in sod., 2007). Sklepamo, da populacija satRNA iz vseh treh trsov sorte Volovnik izhaja iz istega vira, in se je raznoliki populaciji virusa pomagalca GFLV pridružila šele naknadno, zaradi česar se ni občutno spremenila. Vidne so le manjše razlike med satRNA iz različnega trsa, kar kaže na prilagoditev na trenutno okolje. V Ložah do prenosa ni moglo priti po naravni poti preko ogorčic, saj te na tej lokaciji niso prisotne, tako da je verjetno do prenosa prišlo na primarni lokaciji, preden so trse nasadili v kolekcijski vinograd.

Nasprotno nismo odkrili razlik med satRNA v trsih sorte Župlanka iz Vrhopolja 2, kjer so tudi prisotne ogorčice. Populacija satRNA na tem področju verjetno že v osnovi ni tako raznolika.

5.2 SKLEPI

Najvišje koncentracije virusa smo izmerili v začetku sezone v mladih listih, viticah, starejših listih in nezrelih zelenih grozdnih jagodah, medtem ko so bile v floemu in koreninah vrednosti v tem času zelo nizke. Sklepamo, da so zelena hitrorastoča tkiva najprimernejše okolje za namnoževanje virusa GFLV in da so zato najprimernejši rastlinski material za njegovo določanje. Floem poganjka je primeren material za določanje virusa GFLV izven rastne sezone.

Opazili smo, da se koncentracija virusa v rastlini spreminja skozi sezono: spomladi ga je največ v mladih poganjkih, kjer se aktivno namnožuje, medtem ko ga je jeseni največ v floemu dormantnih rozg, kjer prezimi.

Kombinacija novih molekularnih metod PCR-RČ je primerna za splošno določitev virusa GFLV v primerih, ko je test ELISA premalo občutljiv ali za določanje virusa v velikem številu vzorcev na enkrat, saj je 1000x občutljivejša od testa ELISA.

Nova molekularna metoda je primerna za relativno kvantifikacijo virusa v floemskem tkivu vinske trte skozi sezono pri uporabi referenčnih genov COX in 18S, za katera smo dokazali stabilno izražanje skozi rastno sezono.

Novi molekularni metodi sta v kombinaciji z že obstoječimi metodami (ELISA in RT-PCR-RČ), ki ciljajo na plašni protein oz. regijo gena za plašni protein, primerni tudi za karakterizacijo virusa, natančneje za odkrivanje rekombinant na 2A^{HP} genu.

V Sloveniji (Vrhopolje 1) smo odkrili medvrstni rekombinantni virus med GDefV, ArMV in GFLV. O razširjenosti GDefV še ni skoraj nič znanega, vendar kljub temu predvidevamo, da je prišel rekombinant k nam s prenosom sadilnega materiala iz drugih delov sveta, kjer so podobne rekombinante odkrili že prej (Washington, Francija, Madžarska), saj pri nas virusa ArMV praktično nimamo.

Razvili smo metodo RT-PCR za določanje satRNA virusa GFLV s katero smo uspeli določiti satRNA v 73% testiranih trsov iz Slovenije in ostalih delov Evrope ter Kalifornije, kar je vsaj 4x več kot so dokazali do sedaj.

Korelacije med bolezenskimi znamenji in prisotnostjo oz. odsotnostjo satRNA nismo ugotovili.

Ugotovili smo, da imajo satRNA virusa GFLV podobno lastnost kot njihov virus pomagalec in sicer, da obstajajo kvazivrste, od katerih se v posamezni rastlini v največji meri namnožuje najuspešnejša za dane razmere.

S primerjavo vseh 136 nukleotidnih zaporedij satRNA pridobljenih iz 31 z GFLV okuženih rastlin in obstoječih satRNA GFLV in ArMV virusov smo ugotovili, da se satRNA virusov ArMV in GFLV grupirajo v dve skupini, pri čemer ni nujno, da so si satRNA, ki imajo za virus pomagalec ArMV med sabo bolj podobne kot tiste, ki uporabljajo kot virus pomagalec GFLV. Znotraj skupine satRNA GFLV se nakazujejo še podskupine.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) povzroča bolezen imenovano kompleks kužne izrojenosti vinske trte, katere posledice so zmanjšanje pridelka in njegove kakovosti, ter propad trsov. Je eden ekonomsko najpomembnejših virusov, ki okužuje vinsko trto. Virus se prenaša preko okuženega sadilnega materiala ter s talno ogorčico *Xiphinema index*. Načini preprečevanja okužbe so sajenje zdravih podlag in cepičev v neokuženo zemljo brez ogorčic ali uporaba gensko spremenjenih vinskih trt, ki vsebujejo zapis za plašni protein GFLV.

Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja serološka imuno-encimska metoda ELISA. Ena izmed slabosti te metode je slabša občutljivost, kar je lahko problem, ko določamo virus GFLV v trsih z latentno okužbo ali ko je virusa v določenih delih sezone manj. Razlog je predvsem v neenakomerni porazdelitvi virusa po rastlini in sezonskih spremembah koncentracije virusa, pri čemer lahko te padejo pod prag določljivosti testa ELISA. Eden od ciljev doktorskega dela je bil najti najprimernejše tkivo vinske trte ter čas vzorčenja za najzanesljivejšo določitev virusa GFLV s testom ELISA. Za primere latentnih okužb in presejalne teste z veliko vzorci pa razviti ter validirati molekularno metodo RT-PCR-RČ za splošno določitev virusa GFLV, ki bi bila primerna tudi za kvantifikacijo virusa v tkivu vinske trte skozi sezono.

S testom ELISA smo virus najzanesljiveje določili v začetku rastne sezone v zelenih hitro rastočih tkivih šestih izbranih trsov. Opazili smo, da se koncentracija virusa v rastlinah spreminja skozi sezono. Spomladi je bil virusni titer najvišji v mladih poganjkih, kjer se je aktivno namnoževal, medtem ko je bil v floemu izredno nizek. Jeseni je virusni titer v starejših zelenih delih nekoliko padel, v floemu, kjer je prezimil, pa narasel. To smo potrdili tudi s testiranjem 52 trsov 5 sort iz 7 lokacij na Krasu in Vipavski dolini, pri katerih smo testirali mlade poganjke skozi sezono s testom ELISA. V dveh primerih virusa v drugi polovici rastne sezone nismo mogli določiti, v štirih primerih pa je bil na meji določljivosti, šlo je za trse sort Refošek in Volovnik. Trsi sort Malvazija, Laški rizling ter Župlanka so imeli virusni titer konstantno visok tudi avgusta in septembra. Pri testiranju floema dormantnih poganjkov 36 rastlin izven rastne sezone smo virus GFLV določili v vseh vzorcih, kljub temu, da je bil pri dveh od njih (trsa sorte Refoška iz Komna) komaj

nad mejo določljivosti. Floem poganjka se je torej izkazal kot dober material za določanje virusa GFLV izven rastne sezone.

Z validacijo dveh novih molekularnih metod RT-PCR-RČ smo dokazali, da specifično pomnožujeta odsek virusa GFLV, sta primerni za splošno določanje virusa GFLV v primerih, ko je test ELISA premalo občutljiv za določanje virusa v velikem številu vzorcev na enkrat, saj sta 1000x občutljivejši od testa ELISA. Z novima molekularnima metodama virusa nismo mogli določiti le v dveh od 86 GFLV izolatov, ki sta se razlikovala v tarčnem nukleotidnem zaporedju sonde. Pri slovenskem izolatu (LR 4/19) smo ugotovili, da gre za medvrstni rekombinant med virusi GDefV, ArMV in GFLV. S tem smo dokazali, da lahko nova specifična molekularna metoda služi tudi za karakterizacijo virusa oz. za odkrivanje medvrstnih rekombinant na genu 2A^{HP}. Zaradi njene visoke občutljivosti, ki omogoča določitev do 10 kopij genoma na reakcijo, smo dokazali virus v dveh trsih, ki sta bila okužena z virusom GFLV in ga s testom ELISA nismo dokazali. Okužbo smo potrdili tudi z metodo klasičnega PCR. Novi molekularni metodi sta primerni tudi za relativno kvantifikacijo virusa v floemskem tkivu vinske trte skozi sezono pri uporabi referenčnih genov COX in 18S, ki sta kazala stabilno izražanje skozi rastno sezono.

Ta doktorska disertacija obsega prve raziskave o genetski raznolikosti satRNA virusa GFLV ter prve raziskave o prisotnosti satRNA v slovenskem prostoru. Dotika se tudi iskanja povezave med prisotnostjo satRNA in bolezenskimi znamenji, ki jih povzroča GFLV, kar še ni sistematično dokazano. V primeru virusa GFLV je vprašanje pomena genske raznovrstnosti virusnega genoma za razvoj bolezenskih znamenj na gostitelju odprto in pereče vprašanje, ki bo po odkritju prineslo doprinos tudi v raziskavah drugih interakcij rastlina – virus.

Za določanje satRNA virusa GFLV smo razvili splošno metodo RT-PCR, ki smo jo izbrali na podlagi testiranj 32 različnih kombinacij začetnih oligonukleotidov in s katero smo uspeli določiti satRNA v 58 od skupno 79 vzorcev trsov (73%) iz Slovenije, Španije, Francije, Italije in Kalifornije (ZDA), kar je 4x več kot so dokazali do zdaj s hibridizacijsko metodo in specifičnimi sondami v vzorcih iz Francije, Madžarske in Tunizije, Bolgarije, Francije, Italije, Anglije in Jordanije.

V 27% vzorcev z našimi začetnimi oligonukleotidi satRNA nismo mogli pomnožiti, za kar je možnih več vzrokov: da so se satRNA od tarčnega nukleotidnega zaporedja preveč razlikovale, da satRNA sploh ni bila prisotna ali pa je bilo satRNA v teh vzorcih le v sledovih in je bila tako pod pragom določljivosti za našo metodo. Če bi želeli odsotnost satRNA v teh vzorcih potrditi, bi bilo potrebno testirati še več različnih setov začetnih

oligonukleotidov, ponovno vzorčiti v začetku rastne sezone, alternativna možnost bi bila tudi metoda hibridizacije celotne satRNA z RNA vzorcev, v katerih satRNA še nismo dokazali.

Velike satRNA redko spreminjajo bolezenska znamenja, ki jih povzroča virus pomagalec. Vendar so Fuchs in sod. (1991b) objavili povzetek o negativnem vplivu satRNA na titer virusa GFLV-F13 in na zmanjšanje bolezenskih znamenj, ki jih virus povzroča na rastlini *C. quinoa*. Nasprotno so Saldarelli in sod. (1993) dokazali, da prisotnost satRNA virusa GFLV ne vpliva na izražanje bolezenskih znamenj na vinski trti, kar potrjujejo tudi naši rezultati. Ker pa nismo stoodstotno prepričani, da satRNA ni prisotna tudi v ostalih 27% testiranih rastlinah, bi bilo potrebno tak zaključek preveriti.

S primerjavo vseh 136 nukleotidnih zaporedij satRNA pridobljenih iz 31 z GFLV okuženih rastlin in obstoječih satRNA virusov GFLV in ArMV smo ugotovili, da imajo satRNA virusa GFLV podobno lastnost kot njihov virus pomagalec in sicer, da se pojavljajo kot kvaziviruse, od katerih se v posamezni rastlini v največji meri namnožuje najuspešnejša za dane razmere. V splošnem so se satRNA virusov ArMV in GFLV grupirale v dve skupini, ki sta si bile na nukleotidnem nivoju podobni v 70 – 77% in na aminokislinskem nivoju v 52 – 67%, pri čemer ni nujno, da so si satRNA, ki imajo za virus pomagalec ArMV med sabo bolj podobne kot tiste, ki uporabljajo kot virus pomagalec GFLV. Tak primer je satRNA izolata ArMV-NW, ki se grupira k satRNA GFLV. Del gena 2A^{HP} izolata ArMV-NW je bolj podoben GFLV kot ostalim izolatom ArMV, kar nakazuje na medvrstno rekombinacijo med njima. Če je bila mogoča medvrstna rekombinacija na genomski RNA, je bila mogoča tudi izmenjava satRNA molekul in njena prilagoditev novemu virusu pomagalcu. Ta rezultat ni presenetljiv, saj je znano, da je v nemških vinogradih, od koder izvira ArMV-NW, veliko mešanih okužb z virusoma ArMV in GFLV.

Kljub temu pa se je večkrat pokazalo, tako kot tudi v našem primeru, da imajo sorodnejši virusi tudi podobnejše satRNA. Razlog je verjetno ločena evolucija satRNA različnih virusov, ki so okuževali različne rastline iz različnih lokacij. V primeru, da so virusni izolati s satRNA prišli zaradi določenih razlogov skupaj (človeški faktor, naravno širjenje virusa) je lahko med takimi virusi prišlo do izmenjave in prilagoditve genomskih RNA (rekombinacija) ter satRNA, zaradi česar so se meje med virusi in njim pripadajočimi satRNA, začele brisati.

Odkritja v sklopu tega doktorata nam omogočajo veliko boljše možnosti za zanesljivo določitev virusa GFLV v vinski trti, možnost odkritja medvrstnih rekombinacij med

sorodnimi virusi, možnost kvantifikacije virusa in veliko boljše razumevanje pojavljanja, raznolikosti ter lastnosti molekule satRNA virusa GFLV.

6.2 SUMMARY

Grapevine fanleaf virus (GFLV) is the causal agent of Grapevine degeneration complex, which is responsible for bad fruit quality, yield loss and grapevine decline. Hence it is economically one of the most important viruses on grapevines. It is transmitted by infected planting material and by soil-born nematode vector (*Xiphinema index*). Ways of infection prevention include nematode suppression, planting of healthy rootstocks and scions, and usage of transgene grapevines containing gene sequence for the viral coat protein.

For GFLV detection serological immuno enzyme test ELISA is mainly used. One of its disadvantages is lower sensitivity, which can be a problem when detecting virus in latently infected vines or when virus is in low amounts in some periods of growing season. The reason is that virus is not equally distributed throughout the plant throughout the growing season, so in some cases it can fall under detection limit of ELISA test. One of the objectives of doctoral thesis was to find the most appropriate part of the grapevine plant and time within the growing season for reliable detection of GFLV with ELISA test. Our other objective was development of molecular method based on RT real-time PCR technology for use in cases of dealing with latent infections and as a screening test of pools of samples. The method was designed to be reliable for general GFLV detection as well as for virus quantification during the season in problematic grapevine tissues.

With ELISA test virus was the most reliably detected in the beginning of the growing season in the green actively growing tissues of six tested grapevines. We noticed that virus concentration in grapevines was changing through the season. In the spring the virus titre was highest in young shoots where it was actively replicated, while the lowest amount was found in phloem. In the autumn the virus titre slightly fell in green shoots and rose in phloem where it spent the winter. This was confirmed also for 52 grapevines of five cultivars from seven locations in Slovenian Karst region and Vipava Valley, of which young green shoots were tested during the season with ELISA test. In two cases virus fell under the limit of detection and in four samples the virus amount was on the limit of detection in grapevines of cultivars Refošk and Volovnik in the second part of the growing season. Grapevines of cultivars Malvazija, Laški rizling and Župlanka contained constantly high virus concentrations including in August and September. While testing phloem

samples of 36 grapevines out of the season the GFLV virus was detected in all samples, despite the fact it was barely detectable in two of them (Refošk form Komen). Phloem of dormant canes was shown to be appropriate material for virus detection out of the growing season.

The validation of two new molecular RT real-time PCR methods confirmed their specificity of being able to amplify only GFLV isolates and at the same time to serve as general detection methods for GFLV, useful in the cases when ELISA test fails or when detecting virus in a pool of samples, since it is 1000-fold more sensitive than ELISA test. The virus could not be confirmed in only two out of 86 GFLV isolates, because they differentiated in their target sequence for probe. One of those two samples, the Slovenian LR 4/29, was subsequently proven to be the interspecies recombinant between GFLV, GDefV and ArMV viruses, with which we proved that new specific molecular method can also serve as a tool for interspecies recombination determination on 2A^{HP} gene. Because of its high sensitivity, being able to detect down to 10 genome copies per reaction, it could detect virus in two samples, where it was previously not detected by ELISA test. The infection was confirmed also by conventional PCR. New molecular methods were also shown to be appropriate for relative virus quantification in phloem tissue during the season, by using COX and 18S as reference genes, which had stable expression during the season.

We are the first who have done the genetic variability study of satRNA GFLV and survey of satRNA presence in Slovenian GFLV infected grapevines. There is still no real proof of correlation between satRNA presence and symptoms of GFLV infection. The meaning of genetic variability of GFLV genome for development of symptoms is an important question and remains open, and will, once discovered, bring a lot of answers about virus – plant interaction.

For general detection of satRNA of GFLV and ArMV viruses, RT-PCR method was developed. One set of primers was chosen from 32 different primer combinations tested, with which satRNA was detected in 58 out of 79 GFLV infected samples (73%) from Slovenia, Spain, France, Italy and California (USA). This is 4-fold more than proven by hybridisation method and specific probes tested up to now on samples from France, Hungary, Tunisia, Bulgaria, France, Italy, England and Jordan.

The method could not detect satRNA in 27% of samples, which could be explained as one of the following: there was too big difference in target and primer sequence so they were not align appropriately; satRNA was not present at all; satRNA was in too low amount for

reliable detection. One way to confirm those results would be by hybridisation of total RNA of satRNA negative samples with one known satRNA.

Large satRNAs rarely change the symptoms caused by helper virus. Fuchs et al. (1991b) published the abstract about negative effect of satRNA GFLV on virus titre and symptoms development on *C. quinoa* plant. Until now nobody has confirmed those results. On the contrary, Saldarelli et al. (1993) found out that satRNA presence does not affect symptoms expression on grapevine plants, which is in agreement with our results. But as we are not completely sure if we have not missed the satRNA in 27% of plants, additional studies should be done to confirm this result.

With comparison of 136 nucleotide sequences, obtained from 31 GFLV infected grapevines, and already existing sequences of satRNA of GFLV and ArMV viruses, we discovered that satRNAs have the same characteristics as their helper viruses, which is that new quasispecies appear continually, of which the mostly adapted ones replicate most successfully. In general all satRNAs separated into two groups, which shared 70 – 77% of nucleotide and 52 – 67% of aminoacid sequences. It is not necessary that satRNAs isolated from ArMV infected plants share higher similarity between themselves when we compare them to satRNAs isolated from GFLV infected plants. SatRNA of the isolate ArMV-NW is one of the examples which is more similar to satRNAs isolated from GFLV infected plants. Part of its 2A^{HP} gene of RNA2 molecule is more similar to GFLV than ArMV viruses, which suggests that interspecies recombination happened between them. If this was possible, the satRNA exchange and its adaptation to new helper virus was also possible. This result is not surprising since it is known that mixed infections of GFLV and ArMV viruses are common in German vineyards.

On the other hand it was more frequently observed that more related viruses also contained more related satRNAs, which was shown in our case as well. The reason might be separated evolution of different helper viruses with their satRNAs, infecting different plants from different locations. When different virus isolates with their corresponding satRNAs came together, because of human factor or natural spreading of virus; the exchange of their genomic RNAs (recombinations) and satRNAs could happen and hence the borders between them began to blur.

The conclusions of this doctoral dissertation bring us much better options for reliable detection of GFLV in grapevine material, offer possibility of interspecies recombinations discovery between related viruses, bring possibility of virus quantification and much better understanding of satRNA appearance, characteristics and variability.

7 VIRI

- Aaziz R. in Tepfer M. 1999. Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *Journal of General Virology*, 80: 1339-1346
- Afonina I., Zivarts M., Kutyavin I., Lukhtanov E., Gamper H., Meyer R.B. 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research*, 25, 13: 2657-2660
- Alejska M., Kurzynska-Kokorniak A., Broda M., Kierzek R., Figlerowicz M. 2001. How RNA viruses exchange their genetic material. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 2: 391-407
- Alkowni R. in Rowhani A. 2003. Molecular characterization of grapevine leafroll-associated virus 9, a new closterovirus associated with grapevine leafroll disease complex. V: 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 12-17 September 2003, Locorotondo, Italy: Extended abstracts. Bari, University of Bari: 33-33
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3: 403-410
- 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, 3:183-195
- 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
- Angelini E., Bianchi G.L., Filippin L., Morassutti C., Borgo M. 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 3: 613-622
- Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5, 2: 209-219
- Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C. in Lecog H. (ur.). 2007a. Infection of the cell: Replication of the viral nucleic acid. V: *Principles of Plant Virology. Genomes, Pathogenicity, Virus Ecology*. Science Publishers. USA: 55 str.
- Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C. in Lecog H. (ur.). 2007b. Subviral Pathogenic RNAs: Satellites and Viroides. V: *Principles of Plant Virology. Genomes, Pathogenicity, Virus Ecology*. Science Publishers. USA:147-156
- Atoui A., Mathieu F., Lebrihi A. 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 3: 313-318

- Bashir, N.S., Hajizadeh, M., 2007a. Survey for Grapevine fanleaf virus in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates. *Australas. Plant Pathology*, 36, 1, 46-52
- Bashir, N.S., Zarghani, S.N., Hejazi, M.S., 2007b. Diversity of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran. *Virus Research*, 128, 1-2, 144-148
- Belin C., Schmitt C., Gaire F., Walter B., Demangeat G., Pinck L. 1999. The nine C – terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *Journal of General Virology*, 80: 1347-1356
- Belin C., Schmitt C., Demangeat G., Komar V., Pinck L., Fuchs M. 2001. Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology*, 291: 161-171
- Blahova L. in Pidra M. 2009. Real-time PCR of grapevine fanleaf virus. V: 16th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 31 August-4 September, 2009, Dijon, France: Extended abstracts. *Le Progres Agricole et Viticole*, 126: 83-84
- Blas M. 2006. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 104 str.
- Blažina I. 1992. Vzgoja zdravih trsov vinske sorte zelen (*Vitis vinifera* L. cv. Zelen) z metodo termoterapije in tkivne kulture. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 92 str.
- Borja M., Rubio T., Scholthof H.B., Jackson A.O. 1999. Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 2: 153-162
- Bos L. 1999. Plant viruses, unique and intriguing pathogens-a textbook of plant virology. Backhuys Publishers, Leiden, 329-332
- Boscia D., Masannat K.M., Abu-Zurayk A.R., Martelli G.P. 1995. Rugose wood of the grapevine in Jordan . *Phytopathologia Mediterranea*, 34, 2: 126-128
- Boulila, M., 2007. Phylogeny and genetic recombination of Grapevine fanleaf virus isolates from naturally infected vineyards in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 3, 285-294
- Bouyahia H., Potere O., Boscia D. 2003. Sampling methodology for the detection of grapevine fanleaf virus by ELISA. V: 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 12-17 September 2003, Locorotondo, Italy: Extended abstracts. Bari, University of Bari 204-205
- Bouyahia H., Materazzi A., Triolo E. 2006. Grapevine Vein Necrosis: Further Data on Etiology and Diagnosis. *Environment Identities and Mediterranean Area*, 2006. ISEIMA '06. First international Symposium on: 629-631
- Bovey R., Gartel W., Hewitt W.B., Martelli G.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like disease of grapevines. Colour atlas of symptoms. Lausanne, Editions Payot: 181 str.

- Brunner A.M., Yakovlev I.A., Strauss S.H. 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*, 4, 14
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E.J. od 1996 naprej. Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE database. <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie//refs.htm>
- Burns M., Valdivia H., Harris N. 2004. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 6: 1616-1623
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 2: 169-193
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 1
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597-601
- Buzkan N. in Walker A. 2004. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from grapevine dormant cuttings infected with GFLV. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3, 3: 387-390
- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillok E. T., Sit T. L. in Lommel S. A. 2001. The multifunctional capsid protein of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 39: 419-460
- Cigsar I., Digiario M., Gokalp K., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., De Stradis A., Boscia D., Martelli G.P. 2003. Grapevine deformation virus, a novel nepovirus from Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 85, 3: 183-191
- Coker J.S. in Davies E. 2003. Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *Biotechniques*, 35, 4: 740-748
- Colnarič J. 1980. Vinogradništvo. Ljubljana, Kmečki glas: 270 str.
- Cory in Hewitt 1968. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385>
- Das S. in Raski D.J. 1969. Effect of grapevine fanleaf virus on the reproduction and the survival of its nematode vector *Xiphinema index* Thorne & Allen. *Journal of Nematology*, 1: 107 Cit. po Demangeat G., Voisin R., Minot J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005 Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95: 1151-1156
- Davies D. L. in Clark M. F. 1983. A satellite-like nucleic acid of arabic mosaic virus associated with hop nettlehead disease. *Annals of Applied Biology*, 103: 439-448

- Demangeat G., Voison R., Monit J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95, 10: 1151-1156
- Dodd S. M. in Robinson D. J. 1984. Nucleotide sequence homologies among RNA species of strains of Tomato black ring virus and other nepoviruses. *Journal of General Virology*, 65: 1731-1740
- Drake J. W., Charkesworth B., Charkesworth D., Crow J. F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148: 1667-1686
- Drake J.W. in Holland J.J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 13910-13913
- Dreo T., Gruden K., Manceau C., Janse J.D., Ravnikar M. 2007. Development of a real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathology*, 56, 1: 9-16
- Ellison S., English C., Burns M., Keer J., 2006. Routes improving and reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 6, 1, 33
- Fattouch S., Acheche H, M'hirshi S., Marrakchi M. in Marzouki N. 2005a. Detection and characterization of two strains of Grapevine fanleaf nepovirus in Tunisia. *OEPP/EPPO Bulletin*. 35: 265-270
- Fattouch S., Acheche H, M'hirshi S., Meleouli L., Bejar S., Marrakchi M in Marzouki N. 2005b. RT-PCR-RFLP for genetic diversity analysis of Tunisian Grapevine fanleaf virus isolates in their natural host plants. *Journal of Virological methods*. 127: 126-132
- Fattouch S., M'hirshi S., Acheche H., Marrakchi M., Marzouki N. 2001. RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for detection of grapevine fanleaf virus in Tunisian grapevines. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 3: 235-244
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. 2005. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eight report of the International Committee on the taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 1259 str.
- Fernandez L., Torregrosa L., Terrier N., Sreekantan L., Grimplet J., Davies C., Thomas M.R., Romieu C., Ageorges A. 2007. Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Molecular Biology*, 63, 3: 307-23
- Frantz E.J. in Walker M.A. 1995. Correlating ELISA values with the growth and yield components of GFLV infected grapevines. *Vitis*, 34(2): 131-132
- Fritsch C., Koenig I., Murant A. F., Raschke J. H. in Mayo M. A. 1984. Comparisons among satellite RNA species from five isolates of Tomato black ring virus and one isolate of Myrobalan latent ringspot virus. *Journal of General Virology*, 65: 289-294
- Fritsch, C in Mayo M. A., 1989. Satellites of plant viruses. V: *Plant Viruses. Structure and replication*. Mandahar, C. L. (ur.). CRC Press, Inc., Florida, 1, 289-321

- Fritsch C., Mayo M, Hemmer O. 1993. Properties of the satellite RNA of nepoviruses. *Biochimie*, 75: 561-567
- Fuchs M., Pinck M., Serghini M.A., Ravelonandro M., Walter B., Pinck L. 1989. The nucleotide sequence of satellite RNA in Grapevine fanleaf virus, strain F13. *Journal of General Virology*, 70: 955-962
- Fuchs M., Pinck M., Etienne L., Pinck L., Walter B. 1991a. Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. *Phytopathology*, 81, 5: 559-565
- Fuchs M., Pinck M., Serghini Ma., Pinck L., Walter B. 1991b. The satellite RNA associated with grapevine fanleaf virus strain F13. V: Proceedings of the 10th meeting of the international council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine ICVG. Rumbos I. C., Bovey R., Gonsalves D., Hewitt W. B. in Martelli G. P. (ur.). ORES publishing Ermon (GRC): 131-137
- Fuchs M., Cambra M., Capote N., Jelkmann W., Kundu J., Laval V., Martelli G.P., Minafra A., Petrovič N., Pfeiffer P., Pompe-Novak M., Ravelonandro M., Saldarelli P., Stussi-Garaud C., Vigne E., Zagari I. 2007. Safety assesment of transgenic plumps and grapevines expressing viral coat protein genes: New insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *Journal of Plant Pathology*, 89, 1: 5-12
- Gachon C., Mingam A., Charrier B. 2004. Real-time PCR: What relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55, 402: 1445-1454
- Gaire F., Schmit C., Stussi-Garaud C., Pinck L., Ritzenthaler C. 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, 264, 1: 25-36
- Gambino G. in Gribaudo I. 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, 96, 11: 1223-1229
- Garau R., Prota V.A., Piredda R., Boscia D., Prota U. 1994. On the Possible Relationship Between Kober Stem Grooving and Grapevine Virus-A. *Vitis*, 33, 3: 161-163
- Garcia-Arenal F., Fraile A., Malpica J.M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6, 4: 225-232
- Gemmrich A.R., Link G., Seidel M. 1993. Detection of grapevine fanleaf virus (GFLV) in infected grapevines by nonradioactive nucleic-acid hybridization. *Vitis*, 32, 4: 237-242
- Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 6: 503-512
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 4: 386-401
- Goszczynski D.E. in Jooste A.E.C. 2003. Shiraz disease is transmitted by mealybug *Planococcus ficus* and associated with grapevine virus A. Extended abstracts: 219

- Goszczynski D.E., du Preez J., Burger J.T. 2008. Molecular divergence of Grapevine virus A (GVA) variants associated with Shiraz disease in South Africa. *Virus Research*, 138, 1-2: 105-110
- Gutierrez-Aguirre I., Mehle N., Delic D., Gruden K., Mumford R., Ravnikar M. 2009. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 162, 1-2: 46-55
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791
- Hans F., Fuchs M., Pinck L. 1992. Replication of grapevine fanleaf virus satellite RNA transcripts in *Chenopodium quinoa* protoplasts. *Journal of General Virology*, 73: 2517-2523
- Hans F., Pinck M., Pinck L. 1993. Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf virus (strain F13). *Biochimie*, 75, 7: 597-603
- Hemmer O., Meyer M., Greif C., Fritsch C. 1987. Comparison of the nucleotide-sequences of 5 Tomato black ring virus satellite RNAs. *Journal of General Virology*, 68, 1823-1833
- Hemmer O., Oncino C., Fritsch C. 1993. Efficient replication of the *in vitro* transcripts from cloned cDNA of tomato black ring virus satellite RNA requires 48K satellite RNA-encoded protein. *Virology* 194: 800-806
- Hewitt W. B., Raski D. J., Goheen A. C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, 48: 586-595
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis - Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio-Technology*, 11, 9: 1026-1030
- Horvath J., Tobias I., Hunyadi K. 1994. New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus. *Horticultural Science*, 26: 31-32
- Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence doree and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology*, 56, 785-796
- 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, 1, 170-180
- Hu C.C., Hsu Y.H., Lin N.S. 2009. Satellite RNAs and Satellite Viruses of Plants. *Viruses*, 1, 3: 1325-1350
- Huss B., Walter B., Etienne L., Van Regenmortel M.H.V. 1986. Grapevine fanleaf virus detection in various grapevine organs using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vitis*, 25, 3: 178-188

- Huss B., Walter B., Fuchs M. 1989. Cross- protection between arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Applied Biology*, 114: 45-60
- ICTV. 2009. Virus Taxonomx: 2009 Release.
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>
- ICTVdB Management. 2006. 81.002.4.01. Large ssRNA satellites. V: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (ur.), Columbia University, New York, USA
- Iskandar H.M., Simpson R.S., Casu R.E., Bonnett G.D., Maclean D.J., Manners J.M. 2004. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 4: - 325
- Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Zhang Y. P., Daubert S. D., Rowhani A. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for Grapevine fanleaf virus. *Plant Disease*, 87: 1178-1182
- Jawhar J., Minafra A., La Notte P., Pirollo C., Saldarelli P., Boscia D., Savino V., Martelli G.P. 2009. Recombination events in RNA2 of *Grapevine fanleaf virus* and *Arabis mosaic virus* in grapevines affected by Yellow mosaic V.: Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France, 31 Aug-4 Sept 2009, 73 str.
- Jerman I. in Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, Študentska založba: 129 str.
- Kassanis B. 1962. Properties and behaviour of virus depending for its multiplication on another. *Journal of General Virology*, 27: 477 – 488
- Kim B.R., Nam H.Y., Kim S.U., Kim S.I., Chang Y.J. 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, 25, 21: 1869-1872
- Klarič M. 2004. Polimorfizem plaščnega proteina pri virusu pahljačaste deformiranosti lista vinske trte (GFLV). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 52 str.
- Korošec-Koruza Z. 1992. Virusne bolezni vinske trte – pomen pri pridelavi grozdja. *Sodobno kmetijstvo* 25, 5: 219-222
- Krastanova S., Perrin M., Barbier P., Demangeat G., Cornuet P., Bardonnnet N., Otten L., Pinck L., Walter B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports*, 14, 9: 550-554
- Kreiah S., Cooper J. I., Strunk G. 1993. The nucleotide sequence of a satellite RNA associated with strawberry latent ringspot virus. *Journal of General Virology*, 74: 1163-1165
- Krsmanović, S. 2010. Razporeditev in določanje virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) skozi sezono. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 2-3: 95-125
- Kurath G. in Robaglia C. 1995. Genetic variation and evolution of satellite viruses and satellite RNAs. V: *Molecular basis of virus evolution*. Gibbs A., Calisher, C. H., Garcia-Arenal, F. (ur.). Cambridge University Press: 385-403
- Kurstak E. 1981. *Handbook of plant virus infections comparative diagnosis*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier: 943 str.
- Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempchy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28, 2: 655-661
- Lai M.M.C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews*, 56, 1: 61-79
- Lai M.M.C. 1995. Recombination and its evolutionary effects on viruses with RNA genomes. V: *Molecular basis of virus evolution*. Gibbs A., Calisher C.H., Garcia-Arenal F. (eds.) Cambridge, Cambridge University Press: 119-132
- Laporte C., Vetter G., Loudes A.M., Robinson D.G., Hillmer S., Stussi-Garaud C., Ritzenthaler C. 2003. Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY – 2 cells. *Plant Cell*, 15: 2058-2075
- Latvala-Kilby S., Lemmetty A. in Lehto K. 2000. Molecular characterisation of a satellite RNA associated with blackcurrent reversion nepovirus. *Archives of Virology* 145: 51-61
- Le Gall O., Candresse T., Dunez J. 1988. Nucleotide-sequence of the 3' ends of the double-stranded RNAs of Grapevine chrome mosaic nepovirus. *Journal of General Virology*, 69, 423-428
- Le Gall O., Candresse T., Dunez J. 1995. Transfer of the 3' Non-Translated Region of Grapevine Chrome Mosaic-Virus RNA-1 by Recombination to Tomato Black Ring Virus RNA-2 in Pseudorecombinant Isolates. *Journal of General Virology*, 76, 1285-1289
- Legin R., Bass P., Etienne L., Fuchs M. 1993. Selection of Mild Virus-Strains of Fanleaf Degeneration by Comparative Field Performance of Infected Grapevines. *Vitis*, 32, 2: 103-110
- Liebenberg A., Freeborough M.J., Visser C.J., Bellstedt D.U., Burger J.T. 2009. Genetic variability within the coat protein gene of grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. *Virus Research*, 142, 1-2: 28-35
- Lima M.F., Alkowni R., Uyemoto J.K., Golino D., Osman F., Rowhani A. 2006. Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem-pitting associated virus isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of Virology*, 151, 9: 1889-1894

- Lin N.S in Hsu Y.H. 1994. A satellite RNA associated with bamboo mosaic potexvirus. *Virology* 202: 707-714
- Lin S.S., Henriques R., Wu H.W., Niu Q.W., Yeh S.D., Chua N.H. 2007. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. *Plant Biotechnology reports*, 1: 125 – 134
- Liu Y.Y., Hellen C.U.T., Cooper J.I., Bertoli D.J. Coates D., Bauer G. 1990. The nucleotide sequence of a satellite RNA associated with arabis mosaic nepovirus. *Journal of General Virology*, 71: 1259-1263
- Liu Y.Y., Cooper J.I., Coates D., Bauer G. 1991. Biologically active transcripts of a large satellite RNA from arabis mosaic nepovirus and the importance of 5' end sequence for its replication. *Journal of General Virology* 72: 2867-2874
- Liu Y.Y. in Cooper J.I. 1993. The multiplication in plants of arabis mosaic virus satellite RNA requires the encoded protein. *Journal of General Virology*, 74: 1471-1474
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 25, 4: 402-408
- Maček J. 1986. Posebna fiopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Maček J. 1990. Posebna fitopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. 2. izd. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Maliogka V.I., Dovas C.I., Katis N.I. 2008. Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus. *Virus Research*, 135, 1: 125-135
- Malpica J.M., Fraile A., Moreno I., Obies C.I., Drake J.W., Garcia-Arenal F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics*, 162: 1505-1511
- Manfre A.J. in Simon A.E. 2008. Importance of coat protein and RNA silencing in satellite RNA/virus interactions. *Virology*, 379: 161-167
- Martelli G.P. 1993. Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Martelli G.P. (ed). Rome, FAO: 263 str.
- Martelli, G.P., Minafra, A., Saldarelli, P. 1997. Vitivirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*, 142, 9
- Martelli G.P., Walter B., Pinck L. 2001. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385> (maj 2010): 15 str.
- Martelli G.P., Arganovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.j., Wisler G.C., Yoshikawa N. 2002. The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*, 147, 10: 2039-2044

- Martelli G.P. in Boudon-Padieu E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine. Bibliographic report 1998-2004. Bari, CIHEAM: 279 str.
- Martelli G.P. 2009. Grapevine virology highlights 2006-09. V: 16th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 31 August-4 September, 2009, Dijon, France: Extended abstracts. Le Progres Agricole et Viticole, 126: 15-23
- Masuta C. 2002. Recombination in plant RNA viruses. V: Plant viruses as molecular pathogens. Khan J. A., Dijkstra J. (eds.). New York, Food Products Press: 203-224
- Mathieu S., Terrier N., Procureur J., Bigey F., Gunata Z. 2005. A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. Journal of Experimental Botany, 56, 420: 2721-2731
- Maule A., Leh V., Lederer C. 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. Current Opinion in Plant Biology, 5, 4: 279-284
- Mauro M.C., Toutain S., Walter B., Pinck L., Otten L., Coutos-Thevenot P., Deloire A., Barbier P. 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. Plant Science, 112, 1: 97-106
- Mayo M.A., Barker H., Robinson D.J. 1982. Satellite RNA in particles of Strawberry Latent Ringspot Virus. Journal of General Virology, 63: 417-423
- Mekuria, T.A., Gutha, L.R., Martin, R.R., Naidu, R.A. 2009. Genome diversity and Intra- and Interspecies Recombination events in Grapevine fanleaf virus. Phytopathology, 99: 1394-1402
- Meng B., Pang S., Forsline P.L., McFerson R., Gonsalves D. 1998. Nucleotide sequence of Grapevine Rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to Apple stem pitting virus. Journal of General Virology, 79: 2059-2069.
- Moya A., Elena S. F., Bracho A., Miralles R., Barrio E. 2000. The evolution of RNA viruses: A population genetics view. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 13: 6967-6973
- Murant A.F., Mayo M.A., Harrison B.D., Gold R.A. 1973. Evidence of two functional RNA species and a satellite RNA in Tomato black ring virus. Journal of General Virology, 19: 275-278
- Murant A.F. in Mayo M.A. 1982. Satellites of plant viruses. Annual Review of Phytopathology, 20, 49-70
- Murant A.F. 1985. Descriptions of plant viruses. Arabis mosaic virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists.
- Nagy P.D., Bujarski J.J. 1995. Efficient system of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: Sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. Journal of Virology, 69: 131-140

- Nakaune R., Inoue K., Nasu H., Kakogawa K., Nitta H., Imada J., Nakano M. 2008. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of rupestris stem pitting-associated virus. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 2: 156-163
- Naraghi-Arani P., Daubert S., Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82: 1792-1795
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 421: 2907-2914
- Nikolić P., Mehle N., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M. 2010. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and Cellular Probes*, 24, 5: 303-309
- Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protocols*, 1, 3: 1559-1582
- Nolasco G. 2003. Diagnosis: Recent developments and routine implementation. V: 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 12-17 September 2003, Locorotondo, Italy: Extended abstracts. Bari, University of Bari: 184-187
- Oliver J.E., Vigne E., Fuchs M. 2010. Genetic structure and molecular variability of grapevine fanleaf virus populations. *Virus Research*, 152, 1-2: 30-40
- Oncino C., Hemmer O., Fritsch C. 1995. Specificity in the association of Tomato black ring virus satellite RNA with helper virus. *Virology*, 213: 87-96
- Osman F. in Rowhani A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133, 2: 130-136
- Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. 2007. Real-time RT-PCR (TaqMan (R)) assays for the detection of Grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9. *Journal of Virological Methods*, 141, 1: 22-29
- Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. 2008. Comparison of low density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in the detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 149, 2: 292-299
- Pantaleo V. in Burgyan J. 2008. Cymbidium ringspot virus harnesses RNA silencing to control the accumulation of virus parasite satellite RNA. *Journal of Virology*, 82: 11851-11858
- Pearson R.C. in Goheen A.C. 1998. Compendium of grape diseases. 4th ed. St.Paul, The American Phytopathological Society Press: 93 str.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002-2007

- 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
- Pinck L., Reinbolt J., Loudes A.M., Le Ret M., Pinck L. 1991. Primary structure and location of the genome-linked protein (VPg) of grapevine fanleaf nepovirus. *Federation of European Biochemical Societies*, 284, 1: 117–119
- Pompe-Novak M., Gutiérrez-Aguirre I., Vojvoda J., Blas M., Tomažič I., Vigne E., Fuchs M., Ravnikar M., Petrovič N. 2007. Genetic variability within RNA2 of grapevine fanleaf virus. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 3: 307–312
- Puiggros F., Llopiz N., Ardevol A., Blade C., Arola L., Salvado M.J. 2005. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 15: 6080–6086
- 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, 3: 335–339
- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M., Pinck L. 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology*, 72: 2357–2356
- Ritzenthaler C., Schmit A.C., Michler P., Strussi-Garaud C., Pinck L. 1995. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules *In Vivo*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 3: 379–387
- Ritzenthaler C., Laporte C., Gair F., Dunoyer P., Schmitt C., Duval S., Piequet A., Loudes A. M., Rohfritsch O., Strussi-Garaud C., Pfeiffer P. 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of Virology*, 76, 17: 8808–8819
- Roossinck M. J., Sleat D., Palukaitis P. 1992. Satellite RNAs of plant viruses: Structures and biological effects. *Microbiological Reviews*, 1, 265–279
- Rowhani A., Walker M.A., Rokni S. 1992. Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. *Vitis*, 31, 1: 35–44
- Rowhani A., Chay C., Golino D.A., Falk B.W. 1993. Development of a polymerase reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83, 7: 749–753
- Rowhani A., Manigas M.A., Lile L.S., Daubert S.D., Golino D.A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85, 3: 347–352
- Rowhani A., Zhang Y.P., Chin J., Minafra A., Golino D.A., Uyemoto J.K. 2000. Grapevine rupestris stem pitting-associated virus: population diversity, titer in the host and possible transmission vector. Extended abstracts 13th Meeting of ICSV: 37

- Rowhani A. 2002. Laboratory testing for grapevine diseases. Grape growing. By Ed Weber, UC Cooperative Extension Deborah Golino.
- Saldarelli P., Minafra A., Walter B. 1993. A survey of grapevine fanleaf nepovirus isolates for the presence of satellite RNA. *Vitis*, 32, 99-102
- Saldarelli P., Minafra A., Martelli G.P., Walter B. 1994. Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus III by molecular hybridisation. *Plant Pathology*, 43: 91-96
- Sanfançon H., Wellink J., Le Gall O., Karasev A., van der Vlugt R., Wetzel T. 2009. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Archives of Virology*, 154, 5: 899-907
- Sefc K.M., Leonhardt W., Steinkellner H. 2000. Partial sequence identification of grapevine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *Journal of Virological Methods*, 86, 1: 101-106
- 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
- Staudt G. in Weischer B., 1992. Resistance to transmission of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index* in *Vitis rotundifolia* and *Vitis munsoniana*. *Viticultural and Enological Sciences* 47: 56-61
- Szittyá G., Silhavy D., Molnar A., Havelda Z., Lovas A., Lakatos L., Banfalvi Z., Burgyan J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal*, 22: 633-640
- Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. 1999. Handbook of plant virus diseases. Boca Raton (Florida), CRC Press: 553 str.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 8: 1596-1599
- Tomažič I. 1999. Določanje virusov in njihov vpliv na ampelografske lastnosti vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 96 str.
- Toplak N., Okršlar V., Stanič-Racman D., Gruden K., Žel J. 2004. A high throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants using real-time PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 237-250
- Tsai M.S., Hsu Y.H., Lin N.S. 1999. Bamboo mosaic potexvirus satellite RNA (satBaMV RNA) – encoded P20 protein preferentially binds to satBaMV RNA. *Journal of Virology*, 73: 3032-3039
- Urek G. in Hržič A. 1998. Ogorčice - nevidni zajedalci rastlin, fitonematologija. Ljubljana, samozaložba: 240 str.

- Urek G. in Širca S. 2005. Longidoridne ogorčice v vinogradnih tleh Slovenije. V: Zbornik predavanj in referatov 7. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Zreče, 8. do 10. marec 2005. Vajs S., Lešnik M. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 356-359
- Uyemoto, J.K., Martelli, G.P., Rowhani A. 2009. Grapevine Viruses, Viruslike Diseases and Other Disorders. In: Virus Diseases of Plants: Grape, Potato, and Wheat Image Collection and Teaching Resource CD-Rom. APS Press, St. Paul, MN 55121
- Valasek M.A. in Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159
- Van Guilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, 5: 619-626
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: research0034.1-research0034.11(Nolan, 2006 175 /id)
- Vigne E., Komar V., Fuchs M. 2004a. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research*, 13, 2:165-179
- Vigne E., Bergdoll M., Guyader S., Fuchs M. 2004b. Population structure and genetic variability within isolates of grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, 85: 2435-2445
- Vigne E., Demangeat G., Komar V., Fuchs M. 2005. Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology*, 150, 11: 2241-2255
- Vigne E., Marmonier A., Fuchs M. 2008. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of grapevine fanleaf virus and arabis mosaic virus. *Archives of Virology*, 153, 9: 1771-1776
- Vigne E., Marmonier A., Komar V., Lemaire O., Fuchs M. 2009. Genetic structure and variability of virus populations in cross-protected grapevines superinfected by Grapevine fanleaf virus. *Virus Research*, 144, 1-2: 154-162
- Viry M., Serghini M.A., Hans F., Ritzenthaler C., Pinck M., Pinck L. 1993. Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *Journal of General Virology*, 74: 169-174
- Vojvoda J. 2005. Raznolikost izbranih genov virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 74 str.
- Vršič S. in Lešnik M. 2005. Vinogradništvo. 2. natis. Ljubljana, Kmečki glas: 360 str.
- Walker N.J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296, 5567: 557

- Walter B. in Etienne L. 1987. Detection of the grapevine fanleaf virus away from the period of vegetation. *Journal of Phytopathology*, 120, 4 : 355-364
- 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
- Wetzel T., Meunier L., Jaeger U., Reustle G.M., Krczal G. 2001. Complete nucleotide sequences of the RNAS 2 of German isolates of Grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus research*, 75, 2: 139-145
- Wetzel T., Jardak R., Meunier L., Ghorbel A., Reustle G.M., Krczal G. 2002. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, 101, 1-2: 63-69
- Wetzel T., Bassler A., Amren M.A. W. In Krczal G. 2006. A RT/PCR-partial restriction enzymatic mapping (PREM) method for the detection and characterisation of the satellite RNAs of Arabis mosaic virus isolates. *Journal of Virological Methods*, 132, 1-2: 97-103
- Xue B., Ling K.S., Reid C.L., Krastanova M., Sekiya M., Momol E.A., Sule S., Mozsar J., Gonsalves D., Burr T. 1999. Transformation of five grape rootstocks with plant virus genes and a virE gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 35: 3: 226-231

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mojima mentoricama prof. dr. Maji Ravnikar in doc. dr. Maruši Pompe Novak, ki sta krivi, da sploh lahko pišem tole zahvalo. Obema se poleg strokovne pomoči zahvaljujem za podporo, spodbudne besede, zaupanje in razumevanje. Iskreno mislim, da sta najboljši mentorici! Maruši se zahvaljujem še za mnoge diskusije ter pomoč tako pri laboratorijski izvedbi dela kot pri pisanju končnega izdelka.

Hvala članicama komisije, prof. dr. Branki Javornik in prof. dr. Tatjani Avšič Županc za hiter pregled doktorske disertacije kljub izredni časovni stiski.

Dr. Ion Gutierrez-Aguirre gracias ☺ za veliko smeha in dobre volje, s katero me vedno znova okužiš, ter za strokovno pomoč pri laboratorijskem delu in pisanju članka.

Prof. dr. Kristini Gruden in dr. Tanji Dreo hvala za koristne nasvete pri analizi podatkov.

Dr. Magdi Tušek Žnidarič se zahvaljujem za dobro družbo, nešteto koristnih življenjskih modrosti, ter za strokovno podporo predvsem glede dela s TEM, od katerega je žal ostal le tale stavek in ena slika v doktoratu.

Čisto vsak iz Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo je ključno in na svoj način prispeval k nastanku tega doktorata. Teh prispevkov (pomoči, nasvetov, debat,...) je bilo nešteto in čisto za vsakega posebej sem neizmerno hvaležna. Ker ni dovolj papirja in časa, da bi vse omenila, naj kot primer omenim le Polono, ki sem ji hvaležna, da mi je čisto na začetku te poti pomagala "shoditi" v laboratoriju. Delo, pa če še tako zanimivo, mi brez vas ne bi bilo v tako veselje. Prav vsem hvala za prijateljski odnos, zaupanje, za iskrene debate ob kavici in čaju, ki mi vlivajo nove energije ter za pomoč in nasvete pri delu!

Hvala prijateljem in mojim domačim za pozitivizem ter ne nazadnje Nejcu za razumevanje, vsestransko pomoč in trdne živce.

PRILOGE

Priloga A: Seznam trsov analiziranih na prisotnost virusa GFLV v različnih obdobjih sezone s testom ELISA. Fotometrične vrednosti odčitane po 2h inkubacije s substratom.

Appendix A: List of grapevines and results of ELISA test for GFLV presence during the season.

Photometrical values detected after 2h of incubation with substrate.

Kraj	Trs	GFLV	junij	julij	avgust	sept.	januar
Malinkovci	Refošk KZ 6 11/67	+	3	3	3	3	2.980
	Refošk KZ 10 11/82	+	3	3	3	3	3
	Refošk KV 20	+	3	3	3	2.821	2.991
	Ref KO 1 11/88	+	3	3	3	2.241	3
	Ref KV 20 11/10	+	3	3	1.828	2.305	2.953
	Ref KV 20 11/12	+	3	3	3	3	3
	Ref KV 22 11/21	+	3	3	3	3	3
	Refošk KE 1 10/2	+	3	3	1.826	3	3
	Refošk KE 3 10/1	+	3	3	3	3	3
	Refošk V 1 11/93	-	0,093	0,096	0,079	0,076	0,068
Dutovlje 1	Refošk DU 1/21	+	3	3	3	3	/
	Refošk DU 2/18	+	3	3	3	3	/
	Refošk DU 2/19	+	3	3	3	3	/
	Refošk DU 2/20	+	3	3	3	0.912	/
	Refošk DU 2b/6	+	3	3	3	0.803	/
	Refošk DU 3/4	+	3	3	3	3	/
	Refošk DU 3/13	+	3	3	2.980	3	/
	Refošk DU 4/3	+	3	3	3	3	/
	Refošk DU 1/1	-	0,080	0,096	0,102	0,077	/
	Refošk DU 2/25	-	0,086	0,084	0,102	0,082	/
	Refošk DU 2/77	-	0,087	0,091	0,101	0,077	/
	Refošk DU 9/80	-	0,084	0,075	0,074	0,077	/
	Refošk DU 10/1	-	0,085	0,085	0,119	0,074	/
Vrhoplje 1	Laški Rizling 4/28	+	3	3	3	3	/
	Laški Rizling 4/29	+	3	3	3	3	/
	Laški Rizling 4/30	+	3	2.964	2.937	3	/
	Laški Rizling 5/31	+	3	2.997	3	3	/
	Laški Rizling 5/32	+	3	3	3	3	/
	Laški Rizling 6/30	+	3	3	3	3	/
	Laški Rizling 6/32	+	3	3	3	3	/
	Laški Rizling 6/33	+	3	3	3	3	/
	Laški Rizling 6/34	+	3	3	3	3	/
	Laški Rizling 6/35	+	3	3	3	3	/
Kromberk	Malvazija o/1	+	3	3	3	3	3
	Malvazija o/2	+	3	3	3	3	3
	Malvazija o/3	+	3	3	3	3	3
	Malvazija o/4	+	3	3	3	3	3
	Malvazija o/5	+	3	3	3	3	3
	Malvazija o/7	+	3	3	3	3	/
	Malvazija h/1	+	3	3	3	3	2.951
	Malvazija h/2	+	3	3	3	3	3

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Priloga A: Seznam trsov analiziranih na prisotnost virusa GFLV v različnih obdobjih sezone s testom ELISA. Fotometrične vrednosti odčitane po 2h inkubacije s substratom.

Appendix A: List of grapevines and results of ELISA test for GFLV presence during the season. Photometrical values detected after 2h of incubation with substrate.

Kraj	Trs	GFLV	junij	julij	avgust	sept.	januar
Komen	Refošk 26 6/1	-	0,087	0,078	0,078	0,076	0,065
	Refošk 26 6/3	-	0,071	0,090	/	/	0,065
	Refošk 26 6/5	-	0,078	0,107	0,072	0,079	0,067
	Refošk 26 6/7	-	0,086	0,081	0,083	/	0,062
	Refošk 26 6/2	+	3	3	3	1.484	2.749
	Refošk 26 6/4	+	3	3	1.151	3	0.675
	Refošk 26 6/6	+	3	/	/	0.544	1.659
	Refošk 26 5/120	+	3	3	3	3	3
	Refošk 26 5/122	+	3	2.982	3	/	/
Lože	Volovnik 2/45	+	3	3	3	3	2.984
	Volovnik 2/46	+	3	3	3	2.598	3
	Volovnik 2/47	+	3	3	3	3	3
	Volovnik 2/49	+	3	3	3	0.618	3
	Volovnik 2/50	+	3	3	3	3	3
	Volovnik 2/51	+	3	3	3	0.9	3
	Volovnik 2/52	+	3	3	3	1.902	2.986
	Volovnik 2/53	+	3	3	0.233	3	3
	Volovnik 2/54	+	3	3	3	3	3
	Volovnik 2/55	+	3	3	3	3	3
Vrhopolje 2	Župlanka 1/1	+	/	3	3	3	/
	Župlanka 2/1	+	3	3	3	3	/

/ ni bilo testirano

Modro –mejna vrednost OD

Rdeče – negativno

/ not tested

Blue –limit of detection

Red – not detecte