

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Stina KRSMANOVIĆ

**RAZPOREDITEV IN DOLOČANJE VIRUSA
PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)
SKOZI SEZONO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Stina KRSMANOVIC

**RAZPOREDITEV IN DOLOČANJE VIRUSA PAHLJAČAVOSTI
LISTOV VINSKE TRTE (GFLV) SKOZI SEZONO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DISTRIBUTION AND DETECTION OF GRAPEVINE FANLEAF
VIRUS (GFLV) DURING THE SEASON**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija biologije z dne 15.1.2010 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Maja Ravnikar in za recenzentko prof. dr. Marjana Regvar.

Mentorica: prof. dr. Maja Ravnikar
Recenzentka: prof. dr. Marjana Regvar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Katarina Vogel Mikuš
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo,
 Katedra za fiziologijo rastlin
Članica: prof. dr. Maja Ravnikar
 Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko
 biologijo
Članica: prof. dr. Marjana Regvar
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo,
 Katedra za fiziologijo rastlin

Datum zagovora: 9. 7. 2010

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.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Stina Krsmanović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.76:634.84(043.2)=163.6
KG	virusi/virus pahljačavosti listov vinske trte/GFLV/vinska trta/bolezni vinske trte/ELISA
AV	KRSMANOVIĆ, Stina
SA	RAVNIKAR, Maja (mentor)/REGVAR, Marjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	RAZPOREDITEV IN DOLOČANJE VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV) SKOZI SEZONO
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 67 str., 2 pregl., 23 sl., 4 pril., 85 vir.
IJ	Sl
Jl	sl/en
AI	Virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) povzroča bolezen imenovano kužno izrojevanje vinske trte, katere posledice so zmanjšanje količine pridelka in njegove kakovosti, ter tudi propad trsov. Virus se prenaša preko okuženega sadilnega materiala ter s talno ogorčico (<i>Xiphinema index</i>). Načini preprečevanja okužbe so zatiranje talnih ogorčic, sajenje zdravih podlag in cepičev ali uporaba gensko spremenjene vinske trte. Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja serološka imunoencimska metoda ELISA. Cilj diplomskega dela je bil določiti prisotnost in razporeditev virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) v različnih delih rastline v 6 izbranih trsih (<i>Vitis vinifera</i> L.) na treh različnih lokacijah na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono, ter najti najprimernejše tkivo, kot tudi najprimernejši čas za določanje virusa GFLV s testom ELISA. Ugotovili smo, da je v zelenih hitrorastočih tkivih v začetku rastne sezone količina virusa GFLV največja in so zato najprimernejša za njegovo določanje. Floem poganjka je dober material za določanje virusa izven rastne sezone. Da bi ugotovili, ali je spreminjanje količine virusa skozi sezono sortno specifično, smo testirali mlade poganjke petih sort vinske trte skozi rastno sezono in nastrgano floemsko tkivo treh sort v zimskem obdobju. Ugotovili smo, da klimatske razmere, kot so malo padavin in veliko sončnega obsevanja, korelirajo z zmanjšano količino virusa sredi rastne sezone ter da je količina virusa v posamezni trti skozi sezono najverjetneje sortno specifična.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
 DC UDC 578.76:634.84(043.2)=163.6
 CX viruses/grapevine fanleaf virus/GFLV/grapevine/grapevine diseases/ELISA
 AU KRSMANOVIĆ, Stina
 AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/REGVAR, Marjana (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology
 PY 2010
 TI DISTRIBUTION AND DETECTION OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS
 (GFLV) DURING THE SEASON
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XIV, 67 p., 2 tab., 23 fig., 4 ann., 85 ref.
 LA Sl
 AL sl/en

Grapevine fanleaf virus (GFLV) is the causal agent of grapevine degeneration disease, which causes progressive decline of infected vines, lowers yield and decreases fruit quality. The virus spreads through the use of infected planting material and by its nematode vector *Xiphinema index*. Strategies to prevent a spread of the disease are therefore use of healthy planting material, control of nematode vector and introduction of transgenic grapevines. The conventional diagnostic assay for GFLV detection is DAS-ELISA. Our objectives were to determine the presence and distribution of GFLV across the 6 grapevine plants (*Vitis vinifera* L.) in 3 different locations in Slovenian Karst region and Vipava Valley, during the season, and to determine which plant tissue and part of the season are the most appropriate for detection of GFLV by ELISA. Young shoots at the beginning of the vegetative season were shown to be the most appropriate and reliable grapevine material for GFLV detection. The phloem scrapings were proven to allow virus detection after the end of vegetation period. In order to find out if the virus titre fluctuation is cultivar specific, young shoots of five different cultivars during the vegetative season and phloem scrapings of three different cultivars after the end of vegetative season were tested. We confirmed that unfavourable climate conditions during the summer i.e. dry period without rain and high solar irradiation correlate with the decrease in virus concentration and that the virus titre fluctuation during the season is cultivar specific.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
1.3 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREGLED BOLEZNI VINSKE TRTE	3
2.2 VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE	4
2.2.1 Rod Nepovirus	4
2.3 VIRUS GFLV	6
2.3.1 Splošne značilnosti virusa GFLV	6
2.3.2 Zgradba virusa GFLV	6
2.3.3 Odziv vinske trte na okužbo z virusom GFLV	8
2.3.4 Podvojevanje virusa in širjenje med celicami	9
2.3.5 Razporeditev virusa GFLV po rastlini	11
2.3.6 Prenos virusa v vinogradu in širjenje okužbe	12
2.3.6.1 Prenos virusa z ogorčicami	12
2.3.6.2 Prenos virusa s sadilnim materialom	14

2.3.6.3	Omejevanje širjenja okužbe	14
2.3.7	Genska variabilnost virusa GFLV	16
2.4	VPLIV KLIME IN VREMENA NA RAZVOJ VINSKE TRTE	18
2.5	METODE ODKRIVANJA VIRUSNIH OKUŽB.....	19
2.5.1	Metode, ki temeljijo na infektivnosti virusa.....	19
2.5.2	Metode, ki temeljijo na seroloških značilnostih virusa	19
2.5.2.1	Encimoimunska metoda ELISA.....	20
2.5.2.1.1	Neposredna metoda ELISA	21
2.5.2.1.2	Posredna metoda ELISA.....	22
2.5.2.1.3	Metoda dvojnega sendviča (Double antibody sandwich ELISA, DAS ELISA).....	23
2.5.2.1.4	Metode ELISA za določanje prisotnosti virusa GFLV	24
2.5.3	Metode, ki temeljijo na morfoloških lastnostih virusa.....	25
2.5.4	Metode, ki temeljijo na lastnostih nukleinskih kislin.....	26
3	MATERIALI IN METODE	28
3.1	VINOGRADI	28
3.1.1	Opis vinogradov.....	28
3.1.2	Nabiranje rastlinskega materiala.....	29
3.2	ANALIZA VZORCEV	30
3.2.1	Homogenizacija rastlinskega materiala za test ELISA.....	30
3.2.2	DAS ELISA	30
3.2.3	Obdelava podatkov testa ELISA.....	33
4	REZULTATI.....	34
4.1	Test ELISA	34
4.1.1	Preverjanje inhibicije reakcije antigen – protitelo	35
4.1.2	Prisotnost virusa GFLV v različnih delih rastlin vinske trte skozi rastno sezono	37

4.1.2.1	Prisotnost virusa GFLV v posameznih organih vinske trte skozi rastno sezono 2008 in januarja 2009	37
4.1.2.2	Razporeditev virusa po različnih delih posameznih rastlin vinske trte skozi rastno sezono 2008 in januarja 2009	43
4.1.3	Spreminjanje količine virusa v mladih delih rastline skozi rastno sezono in v olesenelih rozgah zunaj rastne sezone	50
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	53
5.1	RAZPRAVA.....	53
5.1.1	Razporeditev virusa GFLV po rastlini	53
5.1.2	Določanje prisotnosti virusa GFLV	56
5.2	SKLEPI.....	58
6	POVZETEK.....	59
7	VIRI	61
	ZAHVALA	1
	PRILOGE.....	2

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (pH 8,2):	30
Preglednica 2: Sestava pufrov za test ELISA:.....	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditve genov na RNA1, RNA2 in RNA3. Z UTR so označena nekodirajoča zaporedja. Z VPg je označen virusni protein (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).	7
Slika 2: Shematski prikaz podvojevanja, znotrajceličnega in medceličnega gibanja virusa GFLV. Oznake na sliki: Golgi - Golgijev aparat, V - vezikli iz Golgijevega aparata, MP - gibalni protein, Pd - plazmodezma (Andret – Link in sod., 2004a).	10
Slika 3: Direktna metoda ELISA (Crowther, 1998).....	21
Slika 4: Indirektna metoda ELISA (Crowther, 1998)	22
Slika 5: Direktna metoda dvojnega sendviča (DAS ELISA) (Crowther, 1998).....	24
Slika 6: Grafični prikaz logaritmiranih spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri različnih delih trsa Volovnik 2/55 iz lokacije Lože junija 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd). Vzorce smo v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto redčili v razmerjih: 1:10, 1:10 ² , 1:10 ³ , 1:10 ⁴ , 1:10 ⁵	35
Slika 7: Grafični prikaz logaritmiranih spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri mladih poganjkih trsa Volovnik 2/53 iz lokacije Lože skozi rastno sezono 2008. Vzorce smo v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto redčili v razmerjih: 1:10, 1:10 ² , 1:10 ³ , 1:10 ⁴ , 1:10 ⁵	36
Slika 8: Grafični prikaz logaritmiranih spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri mladih poganjkih trsa Refoš 26 5/120 iz lokacije Komen skozi rastno sezono 2008. Vzorec smo v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto redčili v razmerjih: 1:10, 1:10 ² , 1:10 ³ , 1:10 ⁴ , 1:10 ⁵	36
Slika 9: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri mlajših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refoš in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.	37
Slika 10: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri starejših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refoš in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost junijskega vzorca Refoš 26 6/4 tudi po dveh urah inkubacije ni presegla praga določljivosti.	38

- Slika 11: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri floemu poganjka šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008 ter januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrični vrednosti avgustovskega vzorca Refošk 26 6/4 in septembrskega vzorca Volovnik 2/55 tudi po dveh urah inkubacije nista presegli praga določljivosti, medtem ko je julijski vzorec Refošk 26 6/4 po 2 urah inkubacije ravno presegel prag določljivosti. 39
- Slika 12: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri viticah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost avgustovskega vzorca Refošk 26 6/4 tudi po dveh urah inkubacije ni presegla praga določljivosti. 40
- Slika 13: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri koreninah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008 ter januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti junijskega, julijskega in avgustovskega vzorca Volovnik 2/52 in avgustovskega vzorca Refošk DU 2/19 tudi po dveh urah inkubacije niso presegle praga določljivosti, medtem ko je avgustovski vzorec Refošk 26 6/4 po 2 urah inkubacije ravno presegel prag določljivosti. 41
- Slika 14: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri grozdih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti junijskega vzorca Refošk 26 6/2 tudi po dveh urah inkubacije niso presegle meje določljivosti, medtem ko sta junijski vzorec Refošk 26 6/4 in septembrski vzorec Volovnik 2/52 po 2 urah inkubacije ravno presegla prag določljivosti. 42
- Slika 15: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih vzorca Volovnik 2/52 iz lokacije Lože skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost junijskega, julijskega in avgustovskega vzorca korenin tudi po 2 urah inkubacije ni presegla praga določljivosti, medtem ko je septembrski vzorec grozdja po 2 urah inkubacije ravno presegel prag določljivosti. 43

- Slika 16: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih vzorca Volovnik 2/55 iz lokacije Lože skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost septembrskega vzorca floema tudi po 2 urah inkubacije ni presegla praga določljivosti. 44
- Slika 17: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih trsa Refošk 26 6/2 iz lokacije Komen skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost junijskega vzorca grozdja tudi po 2 urah inkubacije ni presegla praga določljivosti. 45
- Slika 18: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih vzorca Refošk 26 6/4 iz lokacije Komen skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti junijskega vzorca starejših listov, avgustovskega vzorca floema poganjka in avgustovskega vzorca vitic tudi po 2 urah inkubacije niso presegle praga določljivosti, medtem ko so vrednosti julijskega vzorca floema poganjka, avgustovskega vzorca korenin in junijskega vzorca grozdja po 2 urah inkubacije ravno presegli prag določljivosti. 46
- Slika 19: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri različnih delih trsa Refošk DU 2/19 iz lokacije Dutovlje skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd). Puščica prikazuje dvakratno vrednost izmerjene negativne kontrole. Korenine in floem nista bila vzorčena septembra in januarja, medtem ko korenine niso bile vzorčene tudi septembra. 47
- Slika 20: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih trsa Refošk DU 3/13 iz lokacije Dutovlje skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti avgustovskega vzorca korenin tudi po 2 urah inkubacije niso presegle praga določljivosti. Korenine in floem nista bila vzorčena januarja. 48
- Slika 21: Grafični prikaz povprečnih vrednosti spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi deviacijami za virus GFLV, 1 uro 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. 49

Slika 22: Grafični prikaz povprečnih vrednosti spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi deviacijami za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri petih različnih sortah vinske trte iz osmih lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi deli rastline) in januarja 2009 (olesenele rozge). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. V Dutovljah in Vrhpolju zimskih dormantnih poganjkov nismo testirali. V oklepajih so navedene lokacije in število testiranih trsov posamezne sorte 51

Slika 23: Grafični prikaz povprečnih vrednosti spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi deviacijami za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri petih različnih sortah vinske trte iz osmih lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi deli rastline) in januarja 2009 (olesenele rozge). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Številke v oklepajih pomenijo število testiranih trsov posamezne sorte in lokacije. 52

KAZALO PRILOG

- Priloga A 1: Geografski prikaz lokacij vzorčenja vinske trte. Lokacije so označene z rumenimi pikami, medtem ko sta vremenski postaji Bilje in Godnje označeni z roza pikami (Vir: Ministrstvo za okolje in prostor – Agencija republike Slovenije za okolje)
- Priloga A 2: Povprečni mesečni vremenski podatki za glavno meteorološko postajo Bilje in klimatološko postajo Godnje od januarja 2008 do januarja 2009. (Vir: meteo.si, ARSO 2010)
- Priloga A 3: Povprečni spektrofotometrični odčitki testa ELISA za virus GFLV v posameznih trsih vseh sort pri odčitavanju po 1 uri in 2 urah. Znak (/) pomeni, da trte nismo vzorčili. Z vijolično barvo so pobarvani razdelki s spektrofotometričnimi odčitki večjimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole, z zeleno barvo pa razdelki s spektrofotometričnimi odčitki manjšimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole.
- Priloga A 4: Povprečni spektrofotometrični odčitki testa ELISA za virus GFLV v posameznih delih trsov sort Volovnik iz Lož in Refošk iz Dutovelj in Komna pri odčitavanju po 1 uri in 2 urah. Znak (/) pomeni, da trte nismo vzorčili. Z vijolično barvo so pobarvani razdelki s spektrofotometričnimi odčitki večjimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole, z zeleno barvo pa razdelki s spektrofotometričnimi odčitki manjšimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ArMV	virus mozaika repnjaka (<i>Arabis mosaic virus</i>)
BN	rumenica tipa počrnelosti lesa (<i>Bois noir</i>)
cDNA	komplementarna DNA
CP	plaščna beljakovina (<i>coat protein</i>)
DAS ELISA	metoda dvojnega sendviča ELISA (<i>double antibody sandwich ELISA</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>Deoxy ribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleotidi
ELISA	encimsko imunosorpcijski test (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EM	elektronska mikroskopija
FD	zlata trsna rumenica (<i>Flavescence doree</i>)
FISH	fluorescentna in-situ hibridizacija (<i>fluorescent in situ hybridisation</i>)
GA	golgijev aparat
GDefV	virus deformacije listov vinske trte (<i>Grapevine deformation virus</i>)
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte (<i>Grapevine fanleaf virus</i>)
HP	homing protein
IC	lovljenje virusa na protitelesa (<i>immunocapture</i>)
IEM	imunska elektronska mikroskopija (<i>Immuno electron microscopy</i>)
ISEM	lovljenje virusov s protitelesi (<i>Immunosorbent electron microscopy, trapping</i>)
MP	gibalni protein (<i>movement protein</i>)
OD	optična gostota (<i>optical density</i>)
OLRSV	obročasti latentni virus oljke (<i>Olive latent ringspot virus</i>)
ORF	odprt bralni okvir (<i>open reading frame</i>)
PBS	fosfatni pufer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>polymerase chain reaction</i>)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
RNA	ribonukleinska kislina (<i>Ribonucleic acid</i>)
RpRSV	virus obročavosti maline (<i>Raspberry ringspot virus</i>)
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (<i>reverse transcription and polymerase chain reaction</i>)
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TRSV	virus obročavosti tobaka (<i>Tobacco ringspot virus</i>)
UTR	untranslated region
VPg	virusni protein

1 UVOD

1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE

Virus pahljačavosti listov vinske trte ali Grapevine fanleaf virus (GFLV) povzroča bolezen, imenovano kužno izrojevanje vinske trte (*Vitis vinifera* L.), ki je ena najresnejših boleznih vinske trte in je razširjena v vseh večjih vinorodnih regijah po svetu. Je najstarejša znana virusna bolezen vinske trte, ki povzroča zmanjšan pridelek, nizko kvaliteto grozdja, skrajšano življenjsko dobo vinogradov in neodpornost rastlin na okoljske spremembe. Virus se v vinogradih na kratke razdalje prenaša s talno ogorčico (*Xiphinema index*), ki se hrani na koreninah okužene vinske trte, na daljše razdalje pa ga prenašamo ljudje s pomočjo okuženega sadilnega materiala. Okužbo lahko preprečimo s testiranjem trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov, z uporabo neokuženega sadilnega materiala, z zatiranjem prenašalcev in z uporabo gensko spremenjene vinske trte, odporne na GFLV. Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja serološka imunoencimska metoda ELISA. Dobre lastnosti te metode so, da je hitra in poceni. Eden izmed problemov določanja virusa GFLV v tkivih rastlin vinske trte je, da je detekcija s testom ELISA lahko v nekaterih delih sezone nezanesljiva. Razlog je predvsem v neenakomerni porazdelitvi virusa po rastlini in sezonskih variacijah koncentracij virusa, pri čemer lahko koncentracije padejo pod mejo določljivosti s testom ELISA. Za določanje virusa GFLV s testom ELISA je tako pomembno najti najprimernejšo vrsto tkiva 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 primerno za določanje virusa GFLV s testom ELISA, v tem delu sezone.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da:

- je najprimernejši čas za določanje virusa GFLV začetek rastne sezone in da je najprimernejši material za vzorčenje in testiranje s testom ELISA mladi poganjek,
- se količina v posameznih delih rastline spreminja skozi rastno sezono zaradi spremenjenih rasti pogojev.

1.3 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je:

- določiti najprimernejši čas in material za testiranje okužbe vinske trte z virusom GFLV s testom ELISA,
- ugotoviti ali je spreminjanje količine virusa skozi sezono sortno specifično,
- na serološkem nivoju, s testom ELISA, določiti prisotnost in razporeditev virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) v različnih delih rastline na 6 izbranih trsih vinske trte (*Vitis vinifera* L.) na treh različnih lokacijah na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREGLED BOLEZNI VINSKE TRTE

Tako kot vse druge rastline je tudi vinska trta izpostavljena vplivom okolja ter boleznim in škodljivcem. Nekatere bolezni in škodljivci lahko resno ogrozijo njen pridelek in obstoj, drugi pa ji škodujejo le občasno in v zanemarljivem obsegu (Vršič in Lešnik, 2005). Na vinski trti se lahko pojavijo tudi nepravilnosti abiotskega izvora, ki so posledica neravnotežja hranil, okoljskega stresa ali kemične toksičnosti (Pearson in Goheen, 1998).

Po podatkih iz literature lahko trto okužujejo glive, virusi, fitoplazme, bakterije in viroidi, veliko povzročiteljev bolezni vinske trte pa še ni raziskanih. Med biotske faktorje pa štejemo tudi škodljivce (žuželke, pršice, ogorčice, itd.). Pri žuželah navajajo več kot 40 škodljivih vrst, pri pršicah 8 do 10 in pri ogorčicah vsaj 5 do 6 vrst. Škodljivci objedajo ali izsesavajo nadzemne ali podzemne organe vinske trte, lahko imajo eno ali več generacij na leto ter povzročajo neposredno in posredno škodo. Med posredne škode spadajo tudi učinki glivičnega, virusnega in fitoplazmatskega izvora (Vršič in Lešnik, 2005).

Glive so najobsežnejša skupina povzročiteljev bolezni rastlin. Med glivne bolezni in njene povzročitelje na vinski trti spadajo: peronospora vinske trte (*Plasmopara viticola* Berl. & de Toni), pepelovka vinske trte (*Uncinola necator* (Schwein.) Burr.), siva plesen ali grozdna gniloba (*Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuck), črna pegavost vinske trte (*Phomopsis viticola* Sacc.), rdeči listni ožig (*Pseudopeziza tracheiphila* Müller), črna grozdna gniloba (*Guignardia bidwellii* (Ell.) Viala & Ravaz), črni pikec ali antraknoza (*Elsinoë ampelina* Shear), kap ali apopleksija ali evtipoza (*Eutyoa lata* Pers.) ter propadanje, imenovano eska ali eskarioza (*Phaeoacremonium* sp., *Phellinus* sp., *Stereum* sp.) (Vršič in Lešnik, 2005; Pearson in Goheen, 1998).

Tudi med bakterijami najdemo povzročitelje bolezni vinske trte. Najpomembnejši sta: bakterijsko propadanje (ožig) mladik in listov trte, ki ga povzroča bakterija *Xylophilus amplus* Pagan, in bakterijski koreninski rak trte (rak koreninskega vratu), ki ga povzročata bakteriji *Agrobacterium tumefaciens* Smith in *Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr. (Vršič in Lešnik, 2005)

Poznamo več bolezni vinske trte, ki jih povzročajo fitoplazme različnih tipov. Od teh sta najpomembnejša zlata trsna rumenica (Flavescence doree, FD) in rumenica tipa počrnelosti lesa (Bois noir, BN) (Petrovič in sod, 2004).

Bolezni, ki jih povzročajo virusi veljajo za ekonomsko najbolj škodljive (Šutič in sod., 1999). Pomembnejše bolezni vinske trte, katerih vzrok so virusne okužbe so: kužno

izrojevanje vinske trte (grapevine fanleaf disease), rumeni mozaik (yellow mosaic), virusno zvijanje listja vinske trte (grapevine leafroll) ter razbrazdanost in oplutenelost lesa vinske trte (rugose wood) (Vršič in Lešnik, 2005).

2.2 VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE

Do sedaj je znanih 55 virusov iz 20 rodov, ki okužujejo vinsko trto (Martelli, 2003). Najbolj škodljivi spadajo v rodove *Nepovirus*, *Closterovirus*, *Vitivirus*, *Foveavirus* in *Maculavirus* (Fauquet in sod., 2005). V nasprotju z večino glivnih bolezni, rastline po okužbi z virusi ostanejo sistemsko okužene vse življenje, brez možnosti ozdravitve. Virusi resno poškodujejo strukturo in funkcije okuženih rastlin. Znaki, ki kažejo na virusno okužbo, se izražajo na različne načine, z različnimi bolezenskimi znamenji. Najpogosteje zmanjšajo pridelek in kvaliteto grozdja, skrajšajo življenjsko dobo rastlin. Škoda je odvisna od značilnosti posameznih virusov, dovzetnosti rastlin za viruse in od razširjenosti virusa. (Šutič in sod., 1999) Proti virusnim boleznim se najbolje borimo tako, da sadimo zdrav material, ki ga dobimo v kontroliranih trsnicah in z ustrezno pripravo zemlje pred nasaditvijo vinograda (Rečnik, 1998).

2.2.1 Rod *Nepovirus*

Rod *Nepovirus* zajema poliedrične viruse, ki se širijo s talnimi ogorčicami iz rodov *Xiphinema* in *Longidorus* (Bovey in sod., 1980). Ti dve lastnosti sta vplivali na poimenovanje tega rodu (Nematodi, Poliedrični virusi). Spadajo v družino *Comoviridae* (Bovey in sod., 1980). Posamezni nepovirusi naj bi imeli omejeno razširjenost, kot skupina pa se pojavljajo po vsem svetu (Hewitt in sod., 1970). Razširjeni so predvsem v zmerno toplih območjih. Lahko okužujejo le eno rastlinsko vrsto lahko pa širok krog rastlinskih vrst, odvisno od virusa. (Fauquet in sod., 2005; Kurstak, 1981).

Nepovirusi lahko okužujejo kritosemenke ter nekatere golosemenke. Rastline okužene z nepovirusi pogosto kažejo izrazita bolezenska znamenja na listih: nekroze, zakrnelost, obročkaste kloroze, druge oblike kloroz, kot so razbarvanje listov v obliki lis ali točk. Na listih se bolezenska znamenja navadno pojavijo spomladi po okužbi, poleti postanejo manj izrazita ali popolnoma izginejo in se jeseni pogosto ponovno pojavijo. Cikel bolezenskih znamenj se ponavlja vsako leto, rastline postajajo šibkejše in lahko tudi odmrejo. (Fauquet in sod., 2005; Kurstak, 1981). Mnoge divje rastline ob okužbi z nepovirusi ne razvijejo bolezenskih znamenj, kar kaže na zmožnost prilagoditve rastline na virus (Kurstak, 1981).

Genom nepovirusov sestavljata dve enoverižni pozitivno usmerjeni molekuli RNA (RNA1 in RNA2). Za okužbo sta potrebni tako RNA1 kot tudi RNA2 (Kurstak, 1981). Nekateri virusi lahko vsebujejo še linearno ali krožno satelitno RNA3 (Serghini in sod., 1990;

Faquet in sod., 2005). RNA1 nosi informacijo za podvajanje virusa, RNA2 pa zapis za gibalni protein (MP) in plaščni protein (CP) (Van Regenmortel in sod., 2000).

Rod *Nepovirus* se deli na tri podskupine in sicer A, B in C. Virus GFLV spada v podskupino A kamor spadajo tudi virusu GFLV najbolj sorodna virus deformacije listov vinske trte (*Grapevine deformation virus*, GDefV) in virus mozaika repnjaka (*Arabis mosaic virus*, ArMV) ter obročkasti latentni virus oljke (*Olive latent ringspot virus*, OLRV), virus obročkavosti maline (*Raspberry ringspot virus*, RRSV) in virus obročaste gnilobe tobaka (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) (Martelli, 2005).

Najpomembnejša virusa, ki okužujeta vinsko trto in spadata med nepoviruse, sta virus GFLV in virus ArMV (Bovey in sod., 1980).

ArMV je serološko soroden GFLV (Pearson in Goheen, 1998) vendar za razliko od GFLV okužuje širok krog naravnih gostiteljev (Bovey in sod., 1980). Pogoste so kloroze listov v obliki mozaikov, pik ali lis, včasih se pojavijo tudi nekroze (Murant, 1985). Prenaša ga ogorčica *Xiphinema diversicaudatum* (Kurstak, 1981).

2.3 VIRUS GFLV

2.3.1 Splošne značilnosti virusa GFLV

Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) je eden ekonomsko najpomembnejših virusov, ki okužujejo vinsko trto (Bovey in sod., 1980). Ime je dobil po obliki listov nekaterih z njim okuženih rastlin, ki imajo široko odprte peceljne sinuse in nenormalno, skoraj vzporedno razporeditev žil, kar daje listu pahljačasto obliko (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 pokrajinah po svetu (Kurstak, 1981). Pogosto so zaradi visoke stopnje okužbe okuženi celotni vinorodni okoliši (Martelli, 1993). Bolezen, ki jo povzroča, se imenuje kužno izrojevanje vinske trte (Maček, 1986). To je najstarejša znana virusna bolezen vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Bolezen se je v Evropski literaturi pojavila že pred več kot 200 leti (Pearson in Goheen, 1998).

Glavni naravni gostitelj virusa GFLV je *Vitis* spp., občasno virus GFLV lahko okužuje tudi plevel (Horvath in sod., 1994). Izadpanah in sod. (2003) so z molekularno metodo RT-PCR in s testom ELISA dokazali severno ameriško različico virusa GFLV v prstastem pesjaku (*Cynodon dactylon* L.) iz Irana.

2.3.2 Zgradba virusa GFLV

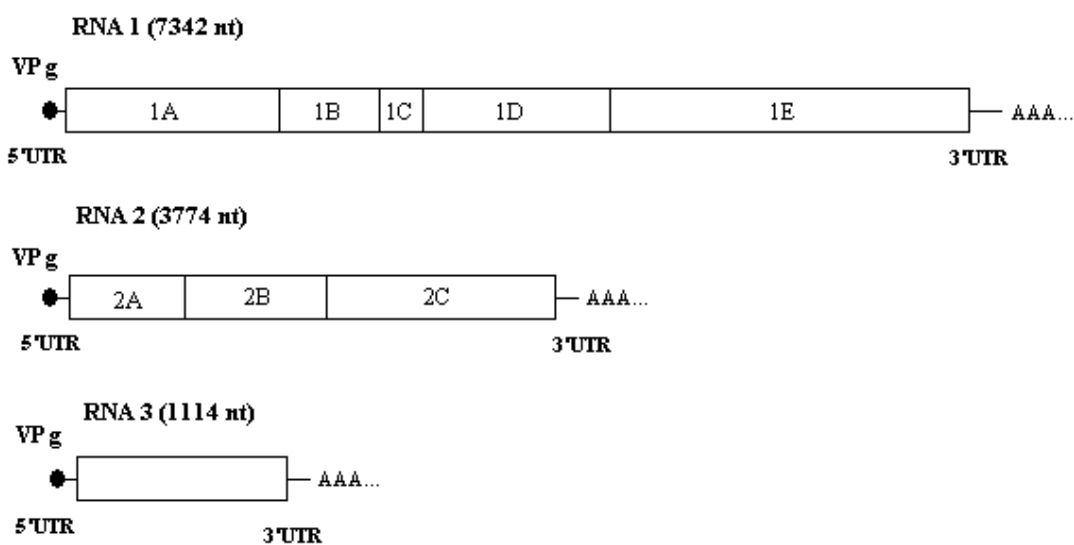
Virusni delci GFLV so izometrične oblike s premerom okrog 28 nm in niso obdani z membrano (Fuchs in sod., 1989). Kapsida je sestavljena iz 60 polipeptidnih podenot z molekulsko maso 56kDa in ima hidrofobne lastnosti (Fauquet in sod., 2005; Serghini in sod., 1990; Quacquarelli in sod., 1976).

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). Virusni delci genotipske variante F13, vsebujejo poleg RNA1 in RNA2 še satelitno RNA, dolgo 1114 nukleotidov (Fuchs in sod., 1989). Vse tri RNA imajo na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), na 3' koncu pa se zaključijo s poliA repom (Pinck in sod., 1988). Posamezna veriga RNA je vključena v ločen izometrični virion (Serghini in sod., 1990) (Slika 1).

Vse tri verige RNA (RNA1, RNA2 in satelitna RNA) vsebujejo le po en odprt bralni okvir (ORF), ki ga obdajata nekodirajoči regiji (Fuchs in sod., 1989; Serghini in sod., 1990; Ritzenthaler in sod., 1991). Verige se prepišejo, vsaka v posamezen poliprotein, ki ga nato specifična virusna proteaza, ki je kodirana na RNA1, razcepi v funkcionalne proteine (Viry in sod., 1993).

Veriga RNA1 je dolga 7342 nukleotidov in se prepiše v poliprotein P1 z molekulkso maso 253 kDa. P1 se razcepi v funkcionalne proteine: 1A (proteazni kofaktor), 1B (NTP vezavni protein, ki deluje kot helikaza), 1C (VPg), 1D (cisteinska proteaza) in 1E (od RNA odvisna RNA polimeraza) (Ritzenthaler in sod., 1991; Pinck in sod., 1991). Na RNA1 je zapis za vse proteine, ki so potrebni za podvojevanje GFLV, RNA1 se lahko sama podvaja, neodvisno od RNA2 (Ritzenthaler in sod. 1991). Za podvojevanje RNA2 je potreben podvojevalni aparat, ki ga kodira RNA1 (Viry in sod., 1993). RNA2 je dolga 3774 nukleotidov in se prepiše v poliprotein P2 z molekulkso maso 122 kDa. Ta se razcepi v 3 proteine: 2A, 2B in 2C.

RNA2 je potrebna za širjenje virusa po rastlini in nosi zapis za prenos virusa (Viry in sod., 1993). Protein 2A (homing protein, HP) sodeluje pri podvajanju verige RNA2 (Gaire in sod., 1999). Protein 2B je gibalni protein (movement protein, MP) z molekulkso maso 38 kDa, ki sodeluje pri širjenju virusa v sosednje neokužene celice (Ritzenthaler in sod., 1995). Protein 2C je plaščni protein (coat protein, CP) virusa GFLV z molekulkso maso 56 kDa, ki prav tako sodeluje pri širjenju virusa med celicami (Serghini in sod., 1990). S spontanym združevanjem plaščnih proteinov nastane virusna kapsida, ki lahko vsebuje virusno RNA. Prisotnost RNA ni pogoj za pravilno sestavljanje virusne kapside (Belin in sod., 1999).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditve genov na RNA1, RNA2 in RNA3. Z UTR so označena nekodirajoča zaporedja. Z VPg je označen virusni protein (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).

2.3.3 Odziv vinske trte na okužbo z virusom GFLV

Odziv vinske trte na okužbo z virusom GFLV je odvisen od odpornosti rastline na virus, različka virusa, starosti trsa ob okužbi in potencialnih sovplivov ostalih virusov (predvsem ostalih nepovirusov) ter kondicije trsa, okolja, letnega časa oz. fenofaze trte in od interakcije naštetih dejavnikov (Korošec – Koruza, 1992). Različne sorte vinske trte so različno občutljive na okužbo z GFLV in se na okužbo odzovejo z različnimi bolezenskimi znamenji. Pri tolerantnih rastlinah se okužba na pridelku skorajda ne pozna, lahko je celo asimptomatska. Občutljive rastline so bolj prizadete. Pri njih pride do zmanjšanja količine pridelka tudi do 80%, nizke kvalitete grozdja, skrajšane življenjske dobe vinogradov, zmanjšane zmožnosti zakoreninjenja sadilnega materiala in oslabiljene odpornosti rastlin na spremembe klimatskih dejavnikov (Pearson in Goheen, 1998; Šutić in sod., 1999).

Bolezenska znamenja se kažejo na vseh organih vinske trte kot deformacije listov, poganjkov, stebel, grozdov in socvetij ter spremenjen izgled in oblika trsov (Šutić in sod., 1999).

Na listih se bolezenska znamenja izražajo kot deformirani listi, nenormalna razporeditev primarnih žil (glavne žile so razporejene vzporedno v obliki pahljače), pahljačavost listov, asimetrični listi, nepravilna nazobčanost, poglobljene stranske zareze, široko odprti sinusi ob listnem peclju, sinusi na listih skoraj izginejo, peteršiljast izgled listov, kloroze žil, kloroze medžilnih prostorov v obliki rumenih pik, obročev ali črt, rumenenje listov (enako pri belih kot rdečih sortah), manjša velikost listov in nagubani listi (Korošec – Koruza, 1992; Pearson in Goheen, 1998; Raski in sod., 1983; Šutić in sod., 1999).

Bolezenska znamenja na listih se razvijejo spomladi, poleti so lahko slabše opazna (Martelli, 1993). Listi so včasih krhki in lomljivi, njihova površina pa hrapava (Šutić in sod., 1999).

Na poganjkih so opazili bolezenska znamenja kot so deformirani poganjki, kratki medčlenki, dvojni členki, zraslost poganjkov in cik-cak rast (Raski in sod., 1983). Opazili so tudi nenormalno razvejanje poganjkov (viličasta rast), nasproti ležeča očesa, ploščata stebela in rumenenje poganjkov (Korošec – Koruza, 1992; Pearson in Goheen, 1998; Šutić in sod., 1999; Vršič in Lešnik, 2001).

Bolezenska znamenja na listih in poganjkih pa 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).

Kot posledica okužbe z virusom GFLV so cvetni nastavki manjši, socvetja rumenijo. Na grozdu se lahko pojavi močno osipanje, grozd je redek. Lahko pa v grozdu ostanejo le drobne, slabo obarvane, nedozorele jagode. Grozdi zorijo nepravilno, so slabo obarvani, jagode ne vsebujejo semen, grozdje je slabe kvalitete in pridelek je majhen (Korošec – Koruza, 1992; Pearson in Goheen, 1998; Raski in sod., 1983; Šutić in sod., 1999).

Koreninski sistem z virusom GFLV okuženih rastlin vinske trte je slabše razvit in koreninice podtaknjencev okuženih trsov so manj številne in podaljšane (Šutić in sod., 1999).

Virus GFLV lahko prizadene celotno rast vinske trte, okužen trs ima pritlikav oz. grmičast videz (Korošec – Koruza, 1992). Rast trsov se zmanjša, izgube pridelka se iz leta v leto stopnjujejo. Postopoma ostanejo trsi brez vitalnega rodnege lesa in izgubijo proizvodno sposobnost (Vršič in Lešnik, 2001). Izgube pridelka so lahko od 10% do 80% (Raski in sod., 1983).

Določeni zunanji dejavniki, kot so pomanjkanje magnezija ali železa v tleh in zmrzal, lahko povzročajo fiziološke oz. funkcionalne spremembe v rastlini, ki so podobne nekaterim bolezenskim znamenjem okužbe rastline z virusom GFLV. Na podlagi opazovanja bolezenskih znamenj bi lahko prišlo do zamenjave bolezni 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).

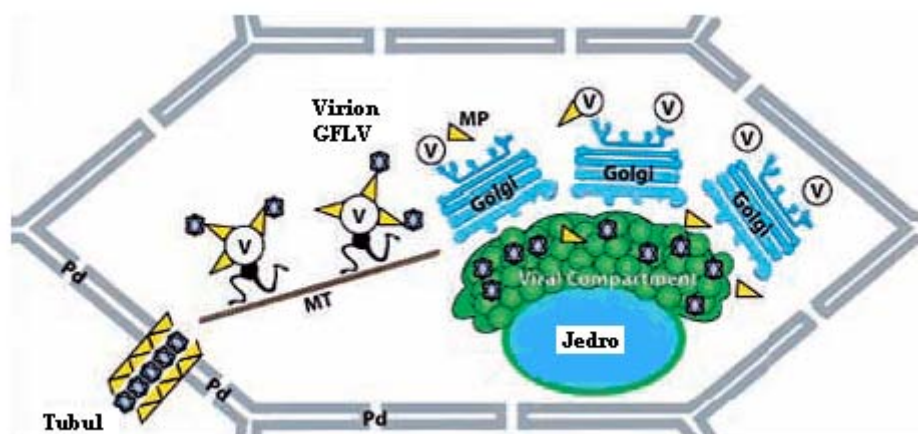
2.3.4 Podvojevanje virusa in širjenje med celicami

Po vstopu v rastlinsko gostiteljsko celico virus GFLV najprej odvrže kapsido. Nato se v citoplazmo iz virusnih delcev sprostita RNA1 in RNA2. Verigi RNA se v citoplazmi prepiseta v poliproteina P1 in P2. Iz P1 se z avtokatilitično aktivnostjo sprostijo proteini odgovorni za podvojevanje, ki se začnejo združevati z določenimi celičnimi strukturami in tvorijo virusni podvojevalni kompleks. Ti agregati se najprej pojavljajo razpršeno po citoplazmi, nato pa se nakopičijo v perinuklearnem prostoru (Gaire in sod., 1999).

Agregati so sestavljeni iz intracelularnih membran oz. membranskih veziklov, ki izvirajo iz ER. Virus inducira kondenzacijo endoplazemskega retikla in nastanek agregatov, v katerih poteka prepisovanje in podvojevanje virusne RNA. Membrane endoplazemskega retikla tako verjetno služijo kot ogrodje za sestavo podvojevalnega kompleksa in ščitijo novonastalo RNA pred razgradnjo s strani gostiteljskih RNaz (Ritzenthaler in sod., 2002).

Z virusom GFLV okužene celice tako kažejo obsežne spremembe in preoblikovanje endomembranskega sistema (Ritzenthaler in sod., 2004).

Za podvojevanje RNA2 je potreben protein 2A ter proteini, kodirani na RNA1. Domnevajo, da domena 2A na nastajajočem poliproteinu privede kompleks P2-RNA2 iz prvotne lokacije v citosolu do objedrnega prostora, kjer poteka podvojevanje RNA2 (Gaire in sod., 1999). Znotraj virusnega razdelka se zaradi procesiranja poliproteinov P1 in P2 s proteazo 1D akumulirajo funkcionalni virusni proteini. Gibalni protein 2B se ne akumulira, ampak se takoj po nastanku prenese na celično periferijo (Ritzenthaler in sod., 2002).



Slika 2: Shematski prikaz podvojevanja, znotrajceličnega in medceličnega gibanja virusa GFLV. Oznake na sliki: Golgi - Golgijev aparat, V - vezikli iz Golgijevega aparata, MP - gibalni protein, Pd - plazmodezma (Andret – Link in sod., 2004a).

Podvojevanje virusa GFLV poteka v perinuklearnem prostoru gostiteljske celice, kjer se akumulirajo vsi proteini potrebni za podvojevanje virusa. Virusni delci morajo najprej potovati z objedrnega prostora do celičnega obrobja in nato najverjetneje do plazmodezem, skozi katere preidejo v sosednje neokužene celice. Zgodnje faze gibanja GFLV lahko razdelimo na znotrajcelično gibanje z objedrnega mesta podvojevanja RNA in sestavljanja novih virusov do roba celic ter na medcelično gibanje virusov preko celične stene v sosednje celice (Andret – Link in sod., 2004a) (Slika 2).

Gibalni proteini 2B se v bližini plazmodezem začnejo združevati v tubule (Ritzenthaler in sod., 1995). Dokazali so, da so za tvorbo tubulov potrebni le gibalni proteini 2B (Laporte in sod., 2003). Domnevajo, da gibalni protein 2B na površini veziklov, ki izvirajo iz Golgijevega aparata (GA), skupaj s plaščnim proteinom 2C ali z virioni potuje do roba celice. Vezikle GA k robu celice najverjetneje usmerjajo še gostiteljski mikrotubuli (Ritzenthaler in sod., 1995; Laporte in sod., 2003). GA se nahajajo v neposredni bližini virusnega podvojevalnega razdelka (Ritzenthaler in sod., 2002). Tubuli imajo bazalni del zasidran v celični steni, konci pa prosto visijo v citoplazmo. Tubularna rast je polarna, na

novo sintetizirane podenote 2B 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). Širjenje virusa med sosednjimi celicami predstavlja prvi korak k sistemskemu razširjanju virusa po rastlini (Ritzenthaler in sod., 1995).

2.3.5 Razporeditev virusa GFLV po rastlini

Doslej je bil virus GFLV z ELISA testom določen v mladih listih, starejših listih, mladih poganjkih, internodijih, koreninah, cvetu in grozdih vinske trte (Rowhani in sod., 1992; Walter in Etienne., 1987; Franz in Walker., 1995).

S testiranjem listov, floema poganjka, zrelih grozdov in korenin vinske trte s testom ELISA so dokazali prisotnost virusa GFLV. Virus so določili v floemu poganjka, kar pomeni, da lahko virus GFLV v poganjkih vinske trte zanesljivo določimo skozi vse leto, brez gojenja poganjkov siljenih iz dormantnih rozgov trsov (Huss in sod., 1986).

Walter in Etienne (1987) sta virus GFLV s testom ELISA uspešno dokazala v listih vinske trte od maja do oktobra. Nista ugotovila znatnih razlik v optičnih gostotah izmerjenih v ekstraktih listov nabranih iz spodnjega ali zgornjega dela rastline vinske trte. Izven rastne sezone, ko so na voljo le dormantna tkiva, so zanesljivo določili prisotnost virusa GFLV v floemu poganjka, tudi če so bili poganjki več kot 7 mesecev po nabiranju shranjeni pri 6 °C. Izven rastne sezone se tako lahko namesto listov testirajo drugi deli rastline, kot so korenine, dormantni poganjki, floem poganjka in žagovina. Na podlagi testiranja listov in floema poganjka iz različnih delov rastline vinske trte v obdobju 12 mesecev s testom ELISA so ugotovili, da so primerni za določanje virusa GFLV od novembra do marca. Mladi popki, nabrani maja, so primeren material za vzorčenje. Večjih razlik v optičnih gostotah izmerjenih v listih nabranih iz različnih delov rastline niso ugotovili, virus je v listih določljiv od maja do oktobra. Najnižje optične gostote v listih so izmerili v najtoplejšem delu leta, iz česar so sklepali, da virus v najtoplejšem delu leta z metodo ELISA ni določljiv.

Rowhani in sod. (1992), so v aktivno rastočem in dormantnem rastlinskem materialu rupestrisa (*Vitis rupestris*) sorte St. George enkrat do dvakrat na mesec skozi rastno sezono testirali mlade poganjke, mlade liste, starejše liste in floem poganjka. Visoke optične gostote virusa GFLV s testom ELISA so izmerili v aktivno rastočih delih rastline (mladi listi in apikalni poganjki) od začetka rastne sezone do julija ter v cvetovih in nezrelih grozdih. Pri mladih in starejših listih so bile vrednosti julija verjetno zaradi pomanjkanja padavin in visokih temperatur že veliko nižje. Vrednosti so pri testiranih listih skozi sezono poleti in jeseni močno variirale, pri testiranju floema poganjka pa so bile vrednosti bolj stalne, ampak nižje kot vrednosti, ki so jih dobili s testiranjem listov. V dormantni sezoni so testirali mlade poganjke siljene iz dormantnih rozg (mlade poganjke, korenine, kalusno tkivo); žagovino, floem poganjka in dormantne popke vzete direktno iz sveže rastline.

Visoke optične gostote so bile izmerjene tudi v mladih poganjkih siljenih iz dormantnih rozg. Hitro rastoča tkiva najverjetneje predstavljajo primerno okolje za podvojevanje virusa GFLV. Ob zaključeni rasti poganjkov (avgust in september), se je zmanjšala koncentracija virusa tudi do komaj določljivih vrednosti. V poletnih mesecih so bile v starejših listih izmerjene vrednosti virusa nižje kot spomladi. Izven rastne sezone so virus zanesljivo določili v floemu poganjka, čeprav so bile izmerjene optične gostote nižje, kot v aktivno rastočih delih rastlin v začetku rastne sezone. Pri testiranju kalusov pa so bile dobljene vrednosti veliko višje, najverjetneje zaradi povišane metabolne aktivnosti in s tem povezane hitrejše replikacije virusa.

Frantz in Walker (1995) sta s testom ELISA določala prisotnost virusa GFLV v grozdih vinske trte v 3 vinogradih v Kaliforniji. Na vseh treh lokacijah je bila v tleh prisotna *X. index*. Izmerjene optične gostote sta primerjala s težo grozdov, jagod, količino pridelka in številom jagod. Višje kot so bile izmerjene optične gostote, manjša je bila teža grozdov, jagod in manjši je bil pridelek. Med številom jagod in izmerjenimi optičnimi gostotami povezave niso odkrili. Predvidevali so, da obstaja sorazmerje med optičnimi gostotami in bolezenskimi znamenji okužbe z virusom GFLV. Poleg količine virusa naj bi na izražanje bolezenskih znamenj vplival tudi čas trajanja okužbe, število različkov virusa in prisotnost ogorčic.

Bouyahia in sod. (2003) so od maja do junija testirali tri različne vrste listov glede na njihov položaj na mladem poganjku. Na podlagi testiranja so ugotovili, da koncentracija virusa GFLV v testiranih listih, izmerjena s testom ELISA, gradientno narašča od spodnjih bazalnih listov proti zgornjim apikalnim listom poganjka. V nasprotju z listi, pa je pri olesenelih trsih virus lažje določiti v spodnjih bazalnih internodijih, kot v zgornjih apikalnih.

2.3.6 Prenos virusa v vinogradu in širjenje okužbe

2.3.6.1 Prenos virusa z ogorčicami

V vinogradih se GFLV prenaša iz okuženih rastlin na zdrave z ektoparazitsko talno ogorčico *Xiphinema index* (Hewit in sod., 1958), ki za razliko od ostalih ogorčic lahko prenaša samo virus GFLV (Raski in sod., 1983).

Ogorčice iz rodov *Xiphinema* in *Longidorus*, med katerimi so nekateri zelo pomembni gospodarski škodljivci vinske trte, uvrščamo v družino *Longidoridae*. Škodo lahko povzročajo neposredno s hranjenjem na koreninah gostitelja in/ali posredno s prenašanjem rastlinskih virusov (Nepovirusov). *Longidoridne* ogorčice se od drugih razlikujejo po izredno dolgem in vitkem telesu (od 2 do 12 mm) ter precej dolgem bodalu (med 50 in 200 µm), ki je sestavljeno iz odontostileta in odontofora. Predstavniki obeh rodov živijo v

bližini korenin gostitelja prosto v tleh. Neposredna škoda, ki jo povzročajo vrste iz rodov *Xiphinema* in *Longidorus* je v primerjavi s posredno škodo, ki nastane zaradi nepovirusov, ki jih te ogorčice prenašajo, skoraj zanemarljiva (Urek in sod., 2005).

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 tem ogorčica izgubi infektivnost. Šele, ko se ponovno hrani s koreninami okuženih rastlin, lahko ogorčica spet okužuje. Razmnoževanje poteka zelo hitro, življenjski cikel od jajca do jajca traja 15 dni. Samci so redki, samice se razmnožujejo partenogenetsko. V zemlji so ogorčice zaščitene pred visokimi temperaturami in sušo, zato tam lahko tudi ob odsotnosti gostiteljskih korenin preživijo mesece kot infektivni vektorji (Raski in sod., 1983).

Ogorčica *X. index* med hranjenjem na koreninskih laskih okužene trte poleg rastlinskih sokov zaužije tudi delce virusa GFLV, ki se vežejo na specifična mesta na kutikuli, ki obdaja notranjost požiralnika. Ko se okužena ogorčica hrani na koreninah zdrave trte, se skupaj z izločki iz požiralnih žlez preko odontostileta v rastlinsko tkivo prenesejo tudi virusi GFLV. Izločki požiralnih žlez služijo za prebavo rastlinske celične vsebine (Raski in sod., 1983; Urek in Hržič, 1998; Andret – Link in sod., 2004a). Na mestu vboda se v korenini razvije zadebelitev, v kateri so vidne povečane, večjedrne celice z gosto citoplazmo (Belin in sod., 2001). Opazne so tudi nekroze in razbarvanje tkiv meristema in skorje korenin (O'Bannon in Inserra, 1990).

Za privzem virusa GFLV iz koreninskih laskov okužene rastline pri hranjenju potrebuje zdrava ogorčica *X. index* približno 5 minut. Prav toliko potrebuje okužena ogorčica, da okuži korenine zdravih rastlin (Das in Raski, 1969). Že samo eno hranjenje na okuženi rastlini zadostuje za prenos virusa. *X. index* lahko prenese virus na zdravo rastlino do 8 mesecev po hranjenju na okuženi rastlini (Andret – Link in sod., 2004b; 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). V vinogradih se bolezenska znamenja okužbe z GFLV pojavljajo v koncentričnih krogih velikih od nekaj kvadratnih metrov, do nekaj hektarjev (Kurstak, 1981).

Prenos virusa GFLV s *X. index* v naravi je visoko specifičen. Andret – Link in sod., (2004b) so dokazali, da je za specifično vezavo in zadrževanje virusa GFLV v prebavilu ogorčice odgovoren le virusni plaščni protein. GFLV se veže na kutikulo v prebavilu ogorčice z determinantami, ki so verjetno nameščene na površini virusne kapside.

Znotraj ogorčic se virus GFLV ne podvaja in tudi ne vpliva na njihovo razmnoževanje (Das in Raski, 1969). 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 (Pearson in Goheen 1998).

Ogorčice *X. index* lahko ob odsotnosti gostiteljskih rastlin v zemlji preživijo in zadržijo virus GFLV vsaj 4 leta. Ob neugodnih razmerah naj bi ogorčice prešle v fazo mirovanja, ko se naj ne bi razmnoževale in hranile, ter posledično ne bi sproščale virusov (Demangeat in sod., 2005).

2.3.6.2 Prenos virusa s sadilnim materialom

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

Trsna uš, ki se je pojavila konec devetnajstega stoletja, je z malo izjemami v razmeroma kratkem času uničila vse naše vinograde. Pričeli so s cepljenjem evropske vinske trte na odporno ameriško trto kot podlago (Hrček in Korošec – Koruza, 1996). Z vnosom ameriških podlag v Evropo se je začelo hitro širjenje virusa GFLV po vsem svetu (Pearson in Goheen, 1998). Pred vnosom novih podlag, se je virus v Evropi verjetno širil predvsem z ogorčicami, znotraj manjših, omejenih območij (Pearson in Goheen, 1998).

Glavni naravni gostitelj virusa GFLV je *Vitis* spp., občasno virus GFLV lahko okužuje tudi plevel (Horvath in sod., 1994). Izadpanah in sod. (2003) so z molekularno metodo RT-PCR in s testom ELISA dokazali severno ameriško različico virusa GFLV v prstastem pesjaku (*Cynodon dactylon* L.) iz Irana. Z mehansko inokulacijo so virus GFLV prenesli na rastlino prstati pesjak in iz prstastega pesjaka na testno rastlino navadne metlike (*Chenopodium quinoa*).

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 (Cory in Hewitt 1968; Lazar in sod., 1990). S semeni se prenaša v *C. amaranticolor*, *C. quinoa* in *Glycine max* (Dias, 1963; Brückbauer in Rüdel, 1961, Cory in Hewitt 1968).

2.3.6.3 Omejevanje širjenja okužbe

Najpomembnejši način omejevanja širjenja okužbe je testiranje trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov in posledično uporaba neokuženega sadilnega materiala. Zdrav sadilni

material, ki ni okužen s škodljivimi virusi, dobimo z zdravstveno selekcijo. Virus v rastlinskem materialu določimo z indeksiranjem na določene sorte vinske trte, serološkim testom ELISA ali z molekularnimi testi, nato pa se zdrav material posadi v neokuženo 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). Razmnoževanje meristema je učinkovito, saj virusom, ki navadno poselijo vsa tkiva okužene rastline, ne uspe dovolj hitro preiti v celice meristema. Celice v rastnih meristemih se delijo hitreje, kot je hitrost potovanja virusov iz okuženih v novo nastajajoče neokužene celice. Dodatno v njih nastajajo snovi, ki močno zavirajo oblikovanje virusnih delcev. Iz koščkov meristemov lahko zato ob pomoči tehnik gojenja na umetnih gojiščih vzgojimo nove zdrave rastline. Pri termoterapevtskih metodah očiščevanja virusov iz rastlin uporabljamo učinek visoke temperature. Temperatura in dolžina termoterapije sta različni za različne viruse in sorte vinske trte (Vršič in Lešnik, 2001).

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 ekološkega cikla nematodno – virusnega kompleksa 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 uhajanje kemičnih sredstev v podtalnico (Pearson in Goheen, 1998; Urek in Hrzič, 1998).

Navzkrižno varstvo z drugimi virusi se je tudi izkazalo za učinkovito pri omejevanju širjenja okužbe virusa GFLV. Huss in sod. so leta 1989 naredili poskuse navzkrižnega varstva s serološko sorodnima virusoma GFLV in ArMV. Najprej so rastline vrste *Chenopodium quinoa* okužili z virusom ArMV in nato še z virusom GFLV. Dokazali so, da okužba z virusom ArMV zmanjša ali celo zaustavi sintezo plaščnega proteina in podvojevanje RNA virusa GFLV (Huss in sod., 1989).

Nekatere sorte *Vitis vinifera* in nekatere divje vrste iz rodov *Vitis* in *Muscadinia* so vzgojene kot odporne podlage na GFLV in njegovega prenašalca *X. index*. Uporabljajo jih za vzgojo novih odpornih podlag (Pearson in Goheen, 1998). Rastline *Muscadinia rotundifolia* se na objedanje korenin s strani ogorčic odzovejo s hipersenzitivnim odgovorom. Takšen odgovor lahko prepreči širjenje virusa GFLV v sosednje celice, vendar se virusa pogosto ne morejo popolnoma znebiti (Staud in Weischer, 1992, cit. po Andret – Link, 2004a).

Novejša možnost omejevanja širjenja okužbe pa je uporaba gensko spremenjenih rastlin vinske trte, odpornih na GFLV, ki imajo vnesen gen za plaščni protein genotipske variante F13. Gensko spremenjene rastline vinske trte z izraženim plaščnim proteinom virusa GFLV so manj občutljive na okužbo z virusom GFLV. Obstaja možnost, da bi prišlo do rekombinacije med genom za plaščni protein, ki je vstavljen v genom gensko spremenjene vinske trte in genom za plaščni protein virusov, ki so prisotni v okolju kamor bi naj transgeno rastlino vinske trte posadili, zato so primerjali raznolikost gena za plaščni protein virusov GFLV izoliranih iz gensko spremenjenih in nespremenjenih trsov, ki so jih gojili tri leta v istem vinogradu. Ugotovili so, da ni prišlo do spremembe populacij virusov v okolju na račun gensko spremenjene vinske trte z izraženim plaščnim proteinom virusa GFLV (Vigne in sod., 2004a). Študije so pokazale, da gensko spremenjene vinske trte, odporne na GFLV, ki imajo vnesen gen za plaščni protein genotipske variante F13, ne povzročijo povečanega števila rekombinant virusa GFLV ali nastanka bolj škodljivih variant virusa z rekombinacijami v primerjavi z mešanimi okužbami v gensko nespremenjenih trsih. 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).

2.3.7 Genska variabilnost virusa GFLV

Populacije rastlinskih virusov so genetsko heterogene. Potomci, ki se genetsko razlikujejo od svojih staršev se imenujejo mutanti ali genotipske variante ali navidezne vrste (quasispecies). Genetsko spreminjanje populacije skozi čas imenujemo evolucija virusa (Garcia – Arenal in sod., 2003).

RNA virusi so genetsko variabilni predvsem zaradi manjše natančnosti podvojevanja in neučinkovitih oz. odsotnih popravljalnih mehanizmov (Andret – Link in sod., 2004a). Vplivajo lahko tudi kratki generacijski časi, velika hitrost podvojevanja in posledično velika populacija virusov v okuženem organizmu (Moya in sod., 2001; Jerman in Štern, 1999). Virus GFLV ima teoretično velik potencial za genetske variacije, saj okužuje vinsko trto, ki je trajnica in se lahko v rastlini obdrži dlje časa. Posamezna rastlina lahko hkrati gosti večje število genotipskih variant istega virusa (Vigne in sod., 2004b).

Do zdaj opisani dve glavni genetski spremembi virusov sta mutacija (sprememba virusnega genetskega materiala) in rekombinacija (izmenjava genetskega materiala med dvema sorodnima virusoma ali genotipskima variantama) (Garcia – Arenal in sod., 2003).

Z metodami IC-RT-PCR, RFLP in določevanjem nukleotidnega zaporedja gena 2C so Naraghi – Arani in sod. (2001) preučevali genetsko variabilnost 14 izolatov GFLV iz vinogradov v Kaliforniji. Dokazali so prisotnost več genotipskih variant GFLV v posameznih vzorcih. Genotipske variante virusa GFLV so se v nukleotidnem zaporedju gena 2C razlikujejo za 11 – 13 %, v aminokislinskem zaporedju pa za 4 – 9 %. V okviru

iste študije so izbrane izolate GFLV z mehansko inokulacijo prenesli na testne rastline *Chenopodium quinoa*. Ker se z vsako naslednjo mehansko inokulacijo poveča selekcijski pritisk, so se v novem gostitelju obdržale le na novega gostitelja najbolj prilagojene genotipske variante (Naraghi – Arani in sod., 2001). Vigne in sod (2004a,b) so z analizo gena za plaščni protein 2C v izolatih iz gensko spremenjenih in nespremenjenih trsov iz vinograda v Franciji dokazali, da 55% vseh izolatov vsebuje eno genotipsko varianto virusa GFLV, pri ostalih izolatih so na podlagi kompleksnejših restrikcijskih vzorcev dobljenih z metodo RFLP sklepali, da jih vsebujejo več. Z določanjem nukleotidnega zaporedja 93 genotipskih variant so ugotovili, da je variabilnost zaporedij 2C gena na nukleotidnem nivoju znašala 0,2 do 13,8 %, na aminokislinskem nivoju pa 0,2 do 6,9 %. V genu za plaščni protein virusa GFLV se odraža genetska stabilnost (Belin in sod., 1999).

Plaščni protein pomembno sodeluje pri širjenju virusa med celicami in na daljše razdalje ter pri interakciji virusa z gostiteljsko rastlino in ogorčico (Andret – Link in sod., 2004b).

Vigne in sod. so leta 2005 v nadaljnjih raziskavah ugotovili, da je poleg že znane rekombinacije na RNA2 znotraj gena 2C prišlo do rekombinacije tudi znotraj gena 2A. Z analizo nukleotidnih zaporedij so odkrili, da na RNA2 velikost gena 2A v primerjavi z genom 2B in 2C najbolj variira (765 – 774 nukleotidov ali 255 – 258 aminokislin) s podobnostjo 85 – 91 % na aminokislinskem nivoju.

Pompe – Novak in sod. so leta 2005 raziskovali biotično raznolikost GFLV na treh genih 2A 2B in 2C. Z metodo IC-RT-PCR ter RFLP so dobili veliko število restrikcijskih vzorcev (največ na genu 2C in najmanj pri genu 2B), iz česar so sklepali na veliko število genotipskih variant GFLV v naravnih populacijah. Okužba posameznega trsa z več genotipskimi variantami GFLV omogoča naravne rekombinacije med njimi. V nadaljevanju raziskav so leta 2006 ocenjevali genetsko raznolikost virusa GFLV znotraj RNA2 devetih različnih izolatov virusa iz rastlin vinske trte sorte Volovnik v Sloveniji. Uporabili so metodo IC-RT-PCR-RFLP, ki ji je sledilo kloniranje in določanje nukleotidnega zaporedja. Analiza nukleotidnih zaporedij je pokazala več genotipskih variant v štirih od devetih izolatov virusa GFLV. Velikost gena 2A je v nasprotju z genom 2B in 2C močno variirala. Ugotovili so tudi, da je znotraj gena 2A prišlo do rekombinacije na mestu med 220- in 225 nukleotidom v treh od devetih izolatov. To je prva objava rekombinacije na N – terminalu proteina kodiranega s strani RNA2 virusa GFLV.

S kasnejšimi raziskavami so odkrili rekombinacije znotraj RNA2 med dvema različnima nepovirusoma iz skupine A (Vigne in sod., 2008) in tremi različnimi nepovirusi iz skupine A (Merkuria in sod., 2009).

Vigne in sod. so leta 2008 z določanjem nukleotidnega razmerja in SISCAN analizo odkrili več medvrstnih rekombinacij znotraj RNA2 med genotipsko varianto GHu virusa GFLV in

genotipsko varianto Ta virusa ArMV. Medvrstne rekombinacije so odkrili na 5' nekodirajoči regiji, 2A^{HP} ter 2B^{MP} genih, ne pa tudi na 2C^{CP} genu in 3' nekodirajoči regiji. Mekuria in sod. so leta 2009 v štirih sortah vinske trte v vinogradu v vzhodnem Washingtonu ugotovili, da se RNA2 prisotnih izolatov virusa GFLV razlikuje 1 % - 15 %. Filogenetska raznolikost izolatov z domnevnimi rekombinacijami na 2A^{HP} in 2B^{MP} kaže na to, da njihova genomska RNA2 izvira iz znotrajvrstnih in medvrstnih rekombinacij med tremi sorodnimi nepovirusi iz skupine A, in sicer, GFLV, GDefV in ArMV. Rezultati študije so torej potrdili, da znotraj RNA2 najbolj sorodnih nepovirusov skupine A lahko prihaja do rekombinacijskih dogodkov.

2.4 VPLIV KLIME IN VREMENA NA RAZVOJ VINSKE TRTE

Na razvoj vinske trte pomembno vplivajo agroekološke razmere okolja v katerem raste. Glavni dejavniki klime kraja so toplota, svetloba, padavine in vetrovi. Toplota vpliva predvsem na rast, razvoj in rodnost vinske trte. Od rastne faze vinske trte je odvisno, koliko toplote potrebuje. Vinska trta začne brsteti spomladi, ko srednja dnevna temperatura doseže 10 – 12 °C. Za cvetenje in oblikovanje jagod je najbolj primerna temperatura 25 – 32 °C. Poleg dnevnih in nočnih nihanj temperature so za vinsko trto pomembne tudi srednje mesečne temperature ter morebitni pojavi prvih jesenskih in zadnjih spomladanskih mrazov, pa tudi vsota temperatur med rastno dobo (seštevek vseh srednjih dnevnih temperatur od začetka brstenja do zorenja grozdja). Če v posameznih fazah temperature padejo pod določeno mejo, to negativno vpliva na vinsko trto. Tako so temperature pod 10 do 12 °C v času poganjanja listov, pod 14 °C med cvetenjem in pod 14 – 16 °C med zorenjem neugodne za rast in razvoj vinske trte. Prav tako lahko na rast in razvoj vinske trte neugodno vplivajo visoke temperature, saj lahko na vinski trti povzročijo ožige na listih, mladikah in jagodah predvsem takrat, ko v tleh primanjkuje vode. Poškodovani in rumeni listi odpadejo in zaradi zmanjšanja listne površine se upočasni dozorevanje jagod. Temperature pod ničlo lahko poškodujejo tkivo vinske trte zaradi zmrzovanja vode v ledene kristalčke, ki povzročajo propadanje celične protoplazme. Spomladi lahko zaradi temperature pod ničlo zmrznejo mladi zeleni poganjki in cvetovi, jeseni pa nizke temperature poškoduje listje in jagode. Trajanje sončne svetlobe je posebno pomembno med rastno dobo, saj omogoča asimilacijo v listju. Padavine so izredno pomemben dejavnik še posebej v času od začetka rasti do zorenja. Na vinsko trto med rastno sezono lahko vpliva tudi veter, ki lahko lomi mladike in povzroča škodo (Vršič in Lešnik, 2005; Colnarič in sod., 1985).

2.5 METODE ODKRIVANJA VIRUSNIH OKUŽB

Metode, ki se uporabljajo za dokazovanje prisotnosti virusa v rastlinskem materialu, temeljijo na infektivnosti, fizikalnih in seroloških lastnostih in lastnostih nukleinskih kislin virusa.

2.5.1 Metode, ki temeljijo na infektivnosti virusa

Na infektivnosti virusa temelji diagnostična metoda, pri kateri virus prenesemo na testne rastline. Testne rastline v standardiziranih pogojih razvijejo značilna bolezenska znamenja in se imenujejo indikatorske rastline. Pri tej metodi lahko pride do latentnih okužb, pri katerih se bolezenska znamenja sploh ne razvijejo, pride lahko tudi do okužbe z več različnimi virusi hkrati itd. (Horvath, 1993). Ločimo teste na zelnatih rastlinah in indeksiranje (Colnarič in sod., 1985).

Indeksiranje pomeni cepljenje cepičev preučevanega trsa na določene sorte vinske trte, ki se značilno in stalno odzovejo na določeno virusno okužbo. Iz rodu *Vitis* se na okužbo z virusom GFLV najhitreje in najbolj tipično odzove vrsta *Vitis rupestris* sorte St. George. Po 3-4 tednih po inokulaciji s cepljenjem se na listih vrste *Vitis rupestris* sorte St. George pojavijo znamenja prehodne narave, kot so kloroze v obliki pik, lis in črt, včasih pa so prisotne tudi lokalne nekroze tkiv. Po 2-3 mesecih po inokulaciji pa se običajno razvijejo kronična bolezenska znamenja, kot so zmanjšana rast, rahle deformacije listov ali izrazita nazobčanost listov, ki so prisotna v vegetativni sezoni (Martelli in sod., 2001).

Na infektivnosti virusa pa temelji tudi dokazovanje virusov s pomočjo zelnatih testnih rastlin. Načelo odkrivanja virusa s temi testi je v tem, da se mehanično prenosljivi virusi prenesejo na rastlino, ki značilno in sistemično reagira na okužbo (Colnarič in sod., 1985). Za dokazovanje prisotnosti virusa GFLV se uporabljajo rastline: *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Cucumis sativus* in *Phaesus vulgaris*. Naštete testne rastline po inokulaciji kažejo bolezenska znamenja, večinoma različna razbarvanja listov (Martelli in sod., 2001).

2.5.2 Metode, ki temeljijo na seroloških značilnostih virusa

Metode, ki temeljijo na seroloških lastnostih virusa so serološki testi. Ti temeljijo na vezavi protitelesa s plaščnim proteinom virusa. Serološke teste delimo na: precipitacijske teste v tekočem mediju (precipitacija, aglutinacija), imunodifuzijske teste (precipitacije v gelu), serološke teste na trdnih nosilcih (ELISA, radioimunska metoda, imunofluorescenčna metoda), teste z uporabo imunskega pivnika (immunoblotting) in IEM (imunska elektronska mikroskopija) (Van Regenmortel in Dubs, 1993).

2.5.2.1 Encimoimunska metoda ELISA

ELISA je bila prvič opisana kot test za določanje rastlinskih virusov leta 1977 (Clark in Adams, 1977). Od takrat naprej je najpogosteje uporabljena metoda za dokazovanje virusov v rastlinskem materialu, živalskih prenašalcih in semenih. V rastlinskem tkivu so lahko vir antigenov poganjki, korenine, listi ali floem poganjka, najpogosteje se uporabljata zadnja dva naštetata. Reagenti so lahko poliklonska ali monoklonska protitelesa (Huss in sod., 1986; Huss in sod., 1987). Test odlikuje relativno dobra občutljivost, saj v 1 ml vzorca lahko zaznamo že 1 ng virusnega antigena. Zaradi tega in gospodarne porabe reagentov je test ELISA zamenjal številne druge serološke teste, ki se uporabljajo v rastlinski virologiji. S testom ELISA lahko testiramo veliko število vzorcev v kratkem času na kvalitativen ali semikvantitativen način (Van Regenmortel in Dubs, 1993). Reakcije testa ELISA temeljijo na enostavnem dodajanju in inkubaciji reagentov (Crowther, 1998).

Protitelesa, ki se uporabljajo pri testu ELISA so proteini, ki so proizvedeni v živalih kot odgovor na vnesene antigene. Ker se protitelesa vedno vežejo na ustrezne antigene, lahko z njimi zaznamo določene antigene in obratno (Crowther, 1998).

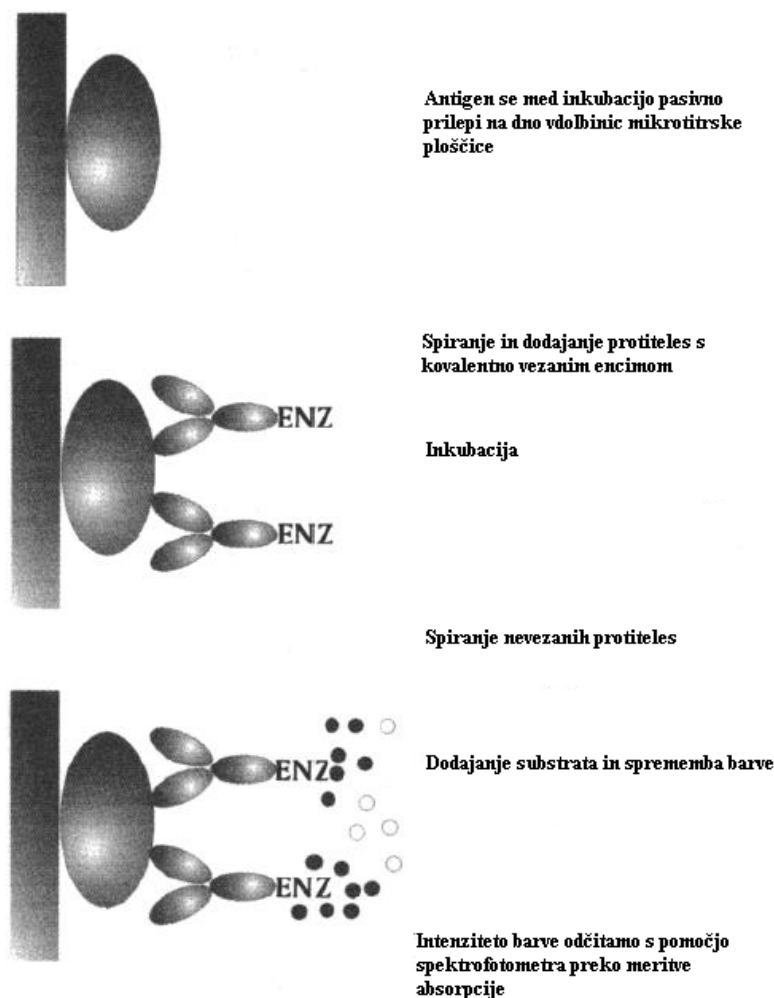
Prednosti testa ELISA: preprosta metoda (reagenti so dodani v majhnih količinah, spiranje loči vezane in proste reagente, enostavna pasivna adsorpcija proteinov na plastiko); spremembo barve zaznamo z očesom in spektrofotometri, spektrofotometrične rezultate lahko obdelamo statistično, metodo lahko izvedemo v nekaj urah, spektrofotometri izmerijo 96 luknjic v 5 sekundah; dostopni reagenti; obstajajo že pripravljeni kiti; občutljiva, prilagodljiva metoda; dokaj poceni, standardizirana, varna in dostopna metoda (Crowther, 1998).

Test ELISA se izvaja na trdnih nosilcih, mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. Po vsaki fazi dodajanja reagentov je zelo pomembno izpiranje, s katerim odstranimo nevezane snovi. Včasih je po adsorpciji prve plasti reagentov koristna uporaba pufru za blokiranje, ki prekrije preostala prosta vezavna mesta v vdolbinicah in tako prepreči nespecifično vezavo preostalih reagentov (Van Regenmortel in Dubs, 1993). Najpogosteje se uporabljajo mikrotitrskie ploščice, ki vsebujejo 96 vdolbinic (5 mm globoke, 8 mm premera, 12 x 8 format) (Crowther, 1998).

Ločimo direktne in indirektne metode ELISA, ki se razlikujejo v načinu zaznavanja kompleksa antigen – protitelo, vendar so končni rezultati enaki. Pri obeh metodah lahko antigen vežemo na trdno površino ali na predhodno vezana specifična protitelesa (Van Regenmortel in Dubs, 1993).

2.5.2.1.1 Neposredna metoda ELISA

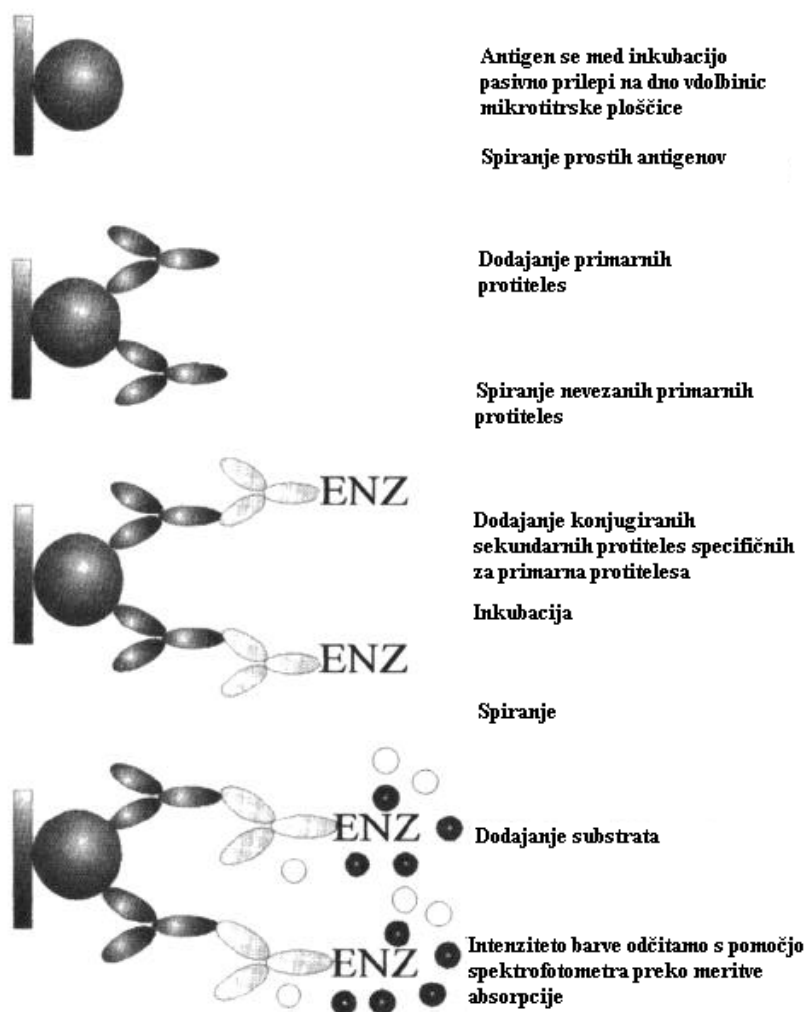
Po inkubaciji in lepljenju antigenov v vdolbinice mikrotitrne ploščice sledi spiranje in dodajanje protiteles s kovalentno vezanim encimom, ki prepoznajo antigen. Po inkubaciji sledi dodajanje substrata, ki zaradi encimske aktivnosti spremeni barvo. Večja je količina encima, hitreje se substrat obarva (spremeni barvo) (Slika 3). Intenziteto barve odčitamo s pomočjo spektrofotometra preko meritve absorpcije oz. transmitance (Crowther, 1998).



Slika 3: Direktna metoda ELISA (Crowther, 1998)

2.5.2.1.2 Posredna metoda ELISA

Po inkubaciji in lepljenju antigenov v vdolbinice mikrotitrne ploščice in spiranju sledi inkubacija primarnih protiteles specifičnih za ta antigen. Po ponovnem spiranju sledi inkubacija sekundarnih protiteles, encimsko označenih, specifičnih za primarna protitelesa. Sledi spiranje, nato dodajanje substrata, ki zaradi encimske aktivnosti spremeni barvo. Intenziteto barve odčitamo s pomočjo spektrofotometra preko meritve absorpcije oz. transmittance (Slika 4) (Crowther, 1998).



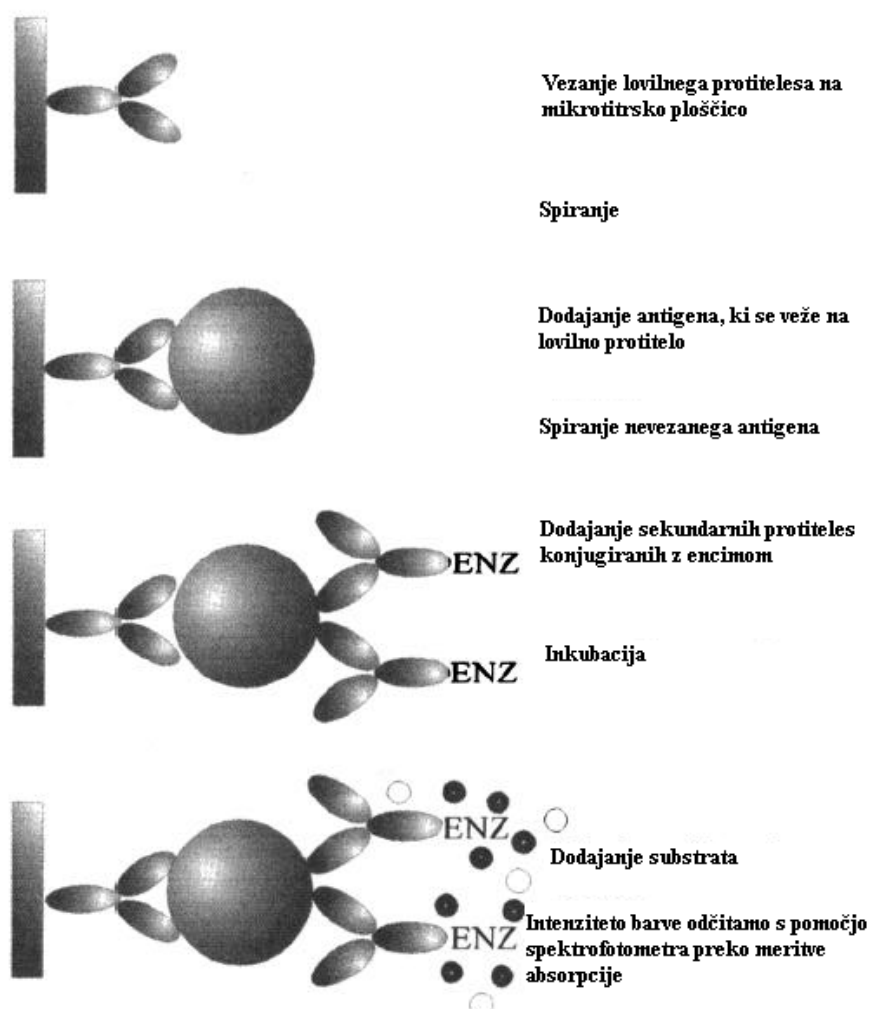
Slika 4: Indirektna metoda ELISA (Crowther, 1998)

2.5.2.1.3 Metoda dvojnega sendviča (Double antibody sandwich ELISA, DAS ELISA)

Je najpogostejše uporabljena metoda za dokazovanje rastlinskih virusov (Garnsey in Cambra, 1993).

Glede na število uporabljenih protiteles ločimo 2 načina metode dvojnega sendviča, posrednega in neposrednega. Postopek je na začetku pri obeh enak. Pri obeh na začetku v vdolbinice dodamo primarna neoznačena protitelesa, na katera se nato lovi antigen, ki ga želimo dokazati. Ta postopek je uporaben predvsem v vzorcih, kjer so antigeni kontaminirani z drugimi proteini ali pa so prisotni v majhnih koncentracijah. Pri metodi dvojnega sendviča mora imeti antigen vsaj 2 antigenski determinanti, da se lahko vežeta nanj vsaj 2 protitelesi (Crowther, 1998).

Pri metodi dvojnega sendviča največkrat uporabljamo dve različni monoklonski protitelesi (IgG), specifični za antigen, ki prepoznata dva različna epitopa – antigenski determinanti na antigenu. Prvo protitelo (lovilno) vežemo neposredno na mikrotitrsko ploščico, drugo (detekcijsko) protitelo pa uporabimo za določanje prisotnosti antigena v vzorcu. Detekcijsko protitelo je lahko neposredno encimsko označeno (neposredni test ELISA), lahko pa uporabimo še sekundarna encimsko označena protitelesa, specifična za težko verigo detekcijskega protitelesa (indirektni test ELISA). Označena protitelesa so lahko tudi poliklonska. Sendvič test ELISA optimiziramo s pomočjo t.i. »ŠAHOVNICE«, pri kateri določamo minimalno koncentracijo protiteles za prekrivanje mikrotitrne ploščice in maksimalno razredčitev konjugata, ki nam po dodatku substrata da še maksimalen signal. Pri tem imamo v sendviču konstantno koncentracijo antigena, ki ga bomo kasneje določali v neznanih vzorcih (Crowther, 1998, Van Regenmortel in Dubs, 1993) (Slika 5).



Slika 5: Direktna metoda dvojnega sendviča (DAS ELISA) (Crowther, 1998)

2.5.2.1.4 Metode ELISA za določanje prisotnosti virusa GFLV

Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja metoda ELISA. Eden izmed problemov določanja virusa GFLV v tkivih rastline vinske trte je, da je detekcija s testom ELISA lahko v nekaterih delih sezone nezanesljiva (Bovey in sod., 1980; Rowhani in sod. 1992). Razlog je predvsem v neenakomerni porazdelitvi virusa po rastlini in sezonskih variacijah koncentracij virusa (Bouyahia in sod., 2003). Za določanje virusa GFLV s testom ELISA je tako pomembno najti najprimernejšo vrsto tkiva vinske trte, kot tudi najprimernejši čas rastne sezone za vzorčenje. Okuženo tkivo, ki poda najvišje izmerjene optične gostote in v katerem lahko virus v določenem delu sezone vsako leto izmerimo, je primerno za določanje virusa GFLV s testom ELISA (Rowhani in sod., 1992).

Huss in sod. (1986) so klasični medij, ki se uporablja za ekstrakcijo nepovirusov, ki je toksičen zaradi nikotina, nadomestili s pufrom PBS.

Walter in Etienne (1987) sta iz rezultatov sklepala, da je najprimernejši čas za testiranje tkiv vinske trte s testom ELISA začetek rastne sezone, ko tkiva aktivno rastejo ali ko rastlina cveti.

Za učinkovito uporabo testa ELISA za določanje virusa GFLV je potrebno izbrati čim več informacij o vsebnosti virusa v različnih tkivih gostiteljske rastline čez vso leto za določene vinorodne regije.

Bouyahia in sod. (2003) so predlagali več parametrov, na katere moramo biti pozorni pri pripravi vzorcev tkiva vinske trte za ekstrakcijo in nadaljnje testiranje z metodo ELISA: neenakomerna razporeditev virusa GFLV med glavnimi poganjki trsa; gradientno padanje koncentracije virusa v zelenih poganjkih od vrha proti bazi trsa; v olesenelih rozgah je virus bolj koncentriran v bazalnih medčlenkih kot v apikalnih; v listih je virus bolj koncentriran na robovih kot bliže peclju; koncentracija virusa v listih variira skozi rastno sezono, najboljši čas za testiranje je 2 meseca po vzkalitvi brstov; virus je bolj koncentriran v listih, ki kažejo bolezenska znamenja; uporaba večih listov iz iste rastline namesto enega samega za testiranje prepreči napačno negativno reakcijo. Predlagajo naslednjo metodologijo nabiranja materiala za vzorčenje: pri olesenelih delih se naj analizirata dva bazalna medčlenka dveh različnih glavnih poganjkov trsa; pri listih naj se analizirajo najmanj trije robni deli apikalnih listov različnih glavnih poganjkov istega trsa, ki kažejo bolezenska znamenja, vzorči se naj približno 60 dni po brstenju popkov.

2.5.3 Metode, ki temeljijo na morfoloških lastnostih virusa

Elektronska mikroskopija (EM) se uporablja za pridobivanje informacij o morfologiji virusnih delcev. Zgradba nekaterih virusov je tako značilna, da jih po morfoloških posebnostih lahko uvrstimo v določeno družino. Pri tem se uporablja metoda negativnega kontrastiranja. Virusi, ki so prisotni v rastlinskem soku v majhnih koncentracijah, so slabo vidni, zato jih je treba pred opazovanjem pod mikroskopom skoncentrirati. Pri tem je v pomoč imunska elektronska mikroskopija (IEM), ki neposredno povezuje serologijo z elektronsko mikroskopijo. Pri metodi lovljenja virusov na protitelesa (immunosorbent electron microscopy, trapping, ISEM) mrežice prekrijemo s protitelesi, ki jih nato inkubiramo z rastlinskim sokom, v katerem bi radi dokazali prisotnost virusov. Na ta način koncentriramo virusne delce. Na mrežico adsorbirane viruse lahko označimo s protitelesi, kar imenujemo dekoracija. Z uporabo specifičnih protiteles lahko ločujemo morfološko enake viruse, s protitelesi dekorirane viruse pa zlahka ločimo od nedekoriranih (Van Regenmortel in Dubs, 1993; Mavrič in Ravnika, 1998).

Mnogi rastlinski virusi v rastlinah izzovejo znotrajcelične spremembe ali pa akumulirajo virusne delce v velikih kristalih, ki so vidni tudi pod svetlobnim mikroskopom. Vidni so tudi vključki, ki se značilno pojavljajo v gostiteljski celici pri okužbah z določenimi virusi (Edwardson in sod., 1993).

2.5.4 Metode, ki temeljijo na lastnostih nukleinskih kislin

Izjemen razvoj diagnostičnih metod molekularne biologije v zadnjih desetletjih je odprl nove možnosti pri diagnostiki rastlinskih virusov.

Čeprav se za določanje rastlinskih virusov največ uporabljajo serološke metode, imajo določene pomanjkljivosti. Določanje poteka na podlagi virusnega plaščnega proteina, ki predstavlja le 10 % celotnega genoma virusa, preostalega dela genoma pa serološke metode ne upoštevajo (Gould in Symons, 1983).

Za razliko od seroloških metod, lahko z metodami, ki temeljijo na lastnostih nukleinskih kislin določamo viruse na podlagi katerega koli dela virusnega genoma (Naidu in Hughes, 2003).

Danes se večinoma uporablja različne molekularne tehnike, ki omogočajo določanje virusne variabilnosti na nukleotidnem nivoju.

Z izvedbo molekularnih metod je običajno potrebna predhodna osamitev nukleinskih kislin. Pri RNA genomu se mora RNA prepisati v bolj stabilno cDNA s pomočjo reverzne transkriptaze (Poljak, 1998). Komplementarne DNA (cDNA), se pogosto uporabljajo za detekcijo virusov v rastlinskih ekstraktih (Sambrook in sod., 1989). Z molekularno metodo določanja nukleotidnega zaporedja dobimo največ podatkov o virusnem genomu in neposredno dokažemo nukleinske kisline. Ta metoda je še vedno zamudna, draga in tehnično zahtevna in se ne uporablja rutinsko. Rutinske metode, ki se uporabljajo razdelimo v dve skupini: hibridizacijske metode (hibridizacija po Southernu, hibridizacija po Northernu, fluorescentna in situ hibridizacija ali FISH, dot – blot hibridizacija, mikromreže) in metode pomnoževanja delcev nukleinskih kislin (verižna reakcija s polimerazo – PCR in PCR v realnem času) (Poljak, 1998).

Danes se za določanje virusne variabilnosti na nukleotidnem nivoju pogosto uporablja metoda določevanja nukleotidnega zaporedja in sicer analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (Restriction fragment length polymorphism, RFLP). RFLP temelji na uporabi ustreznih restrikcijskih encimov, ki prepoznajo kratka zaporedja DNA, kamor se vežejo in prekinejo verigi. Z elektroforezo nato dobimo razlike v velikosti fragmentov, ki odražajo razlike v nukleotidnem zaporedju. Genetsko variabilnost lahko ocenimo še z metodami kot so fingerprinting z ribonukleazo T1, analiza konformacijskega

polimorfizma enoverižnih DNA (Single-strand conformation polymorphism, SSCP), ter nekatere hibridizacijske metode (Garcia – Arenal in sod., 2003).

Osman in Rowhani (2006) sta razvila hitro in enostavno ekstrakcijsko tehniko za določanje virusov, bakterij in fitoplazem z metodama RT-PCR in RT-PCR v realnem času (TaqMan PCR). Rastlinski sok okuženih listov, pecljev ali žilnega kambija sta prenesla na 2 tipa membran in jih uporabila za metodo RT-PCR. Metoda je uporabna za določanje RNA virusov, fitoplazem in bakterije *X. fastidiosa*, metoda deluje tudi pri lesnih rastlinah kot so vinska trta in sadna drevesa. Zaradi enostavnosti metode lahko z njo pripravimo veliko število vzorcev za testiranje s PCR. TaqMan PCR je zelo občutljiva, zanesljiva in hitra metoda, uporabna predvsem v primerih, ko gre za kvantitativno analizo podatkov.

Metoda, ki sta jo razvila Osman in Rowhani (2006), ima ampikon za pomnoževanje na $2C^{CP}$ genu RNA2 virusa GFLV. $2C^{CP}$ gen virusa GFLV je vrstno zelo variabilen, zato so v novejših raziskavah iskali primernejše regije za razvoj novih metod (Pompe – Novak in sod., 2007; Vigne in sod., 2009). Novejša TaqMan RT-qPCR metoda, ki je bila razvita za detekcijo in kvantifikacijo virusa GFLV, ima ampikon za pomnoževanje na $2A^{HP}$ genu RNA2 virusa GFLV. Metoda omogoča hitro, občutljivo in zanesljivo določanje in kvantifikacijo različnih genotipov virusa GFLV iz različnih geografskih območij. RT-qPCR je bila ovrednotena s testiranjem različnih tkiv rastlin vinske trte (sveži listi, floem poganjka). Dokazali so, da je metoda uporabna za rutinsko določanje in kvantifikacijo virusa GFLV, tudi tam, kjer virus s testom ELISA zaradi prenizke koncentracije ni določljiv. (neobjavljeni podatki NIB)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VINOGRADI

3.1.1 Opis vinogradov

Za raziskavo smo uporabili 64 trsov 5 različnih sort iz 8 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, privatnih vinogradih v Dutovljah in Vrhopolju, vinogradu v Krajni vasi ter v Ampelografskem vrtu v Kromberku (Priloga A1).

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. Predvsem so kazali sledeča bolezenska znamenja: bifurkacije na členku, kratke medčlenke, dvojne členke, zaraslost pogankov, ploščata stebila, redko pa tudi grmast videz trsa.

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 vrste vinske trte zbrane iz celotne Vipavske doline. Zaradi presejevanja trsov so trsi, ki smo jih vzorčili mlajši od prvotno posajenih. Danes je vinograd v Kromberku namenjen raznim 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 Refošk. Vinograd je bil posajen z namenom izbrati ustrezne elite za klonsko selekcijo in odbiro zdravih cepljenk ter obdržati stare tipe sorte Refošk (Tomažič, 1999). V vinogradu v Komnu smo opazovali okužene in zdrave trse sorte Refošk. Okuženi trsi so redko imeli nagubane liste in bifurkacije na členku.

Kolekcijska vinograda v Malinkovcih pri Komnu je bil posajen leta 1998. V njem smo nabrali vzorce potomk starih matičnih trt iz vinograda v Krajni vasi. V Malinkovcih smo opazovali trse sorte Refošk. Opazili smo osipavanje jagod, redkejšje grozde, suhe jagode ali pa sploh ni bilo pridelka.

Vinograd v Dutovljah in vinogradi v Vrhpolju so v lasti lokalnih vinogradnikov ter služijo za pridelavo grozdja. Vinograd v Dutovljah je tipičen predselekcijski vinograd (Vojvoda, 2005). V vinogradu v Dutovljah smo pri opazovanih trsih sorte Refošk 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 sledeče bolezenske znake: kloroze medžilnih prostorov v obliki lis, kratke medčlenke, dvojne členke. Pri trsih sorte Župlanka smo opazili pahljačavost listov in kratke medčlenke.

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).

3.1.2 Nabiranje rastlinskega materiala

Mlade poganjke vseh 64 trsov iz osmih različnih lokacij smo vzorčili 4 – krat skozi sezono (junij, julij, avgust in september 2008). Januarja 2009 smo vzorčili floem poganjka 36 rastlin. Pri šestih rastlinah iz treh različnih lokacij smo junija, julija, avgusta in septembra vzorčili tudi druge dele rastline (mladi listi, stari listi, vitice, grozd/cvet, floemsko tkivo, korenine) pri štirih pa korenine tudi januarja. Za izbor trsov smo se odločili na podlagi opazovanj bolezenskih znamenj od leta 2004 naprej, ko so pri večini trsov opazili bolezenska znamenja, ki jih pripisujejo okužbi z GFLV, ter rezultatov testa ELISA na prisotnost GFLV (Vojvoda, 2005). Na podlagi teh predhodnih raziskav smo v našo raziskavo skozi rastno sezono zajeli 54 z virusom GFLV okuženih trsov in 10, z virusom GFLV, neokuženih trsov, izven rastne sezone pa 31 okuženih in 5 z virusom GFLV neokuženih trsov.

3.2 ANALIZA VZORCEV

3.2.1 Homogenizacija rastlinskega materiala za test ELISA

Rozge smo najprej s skalpelom previdno olupili, da smo odstranili olesenele dele. Nato smo v ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba) natehtali 500 mg nastrganega floemskega tkiva posameznega vzorca. Rastlinski material smo homogenizirali v 5 ml ekstrakcijskega pufra (Preglednica 1) s pomočjo homogenizatorja (Homex Bioreba). Korenine smo najprej s skalpelom narezali na tanke kolobarje, nato zatehtali 500 mg pripravljenega koreninskega materiala v ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba) in ga homogenizirali v 5 ml ekstrakcijskega pufra. Mladih listov, starih listov, vitic in grozdja, smo v ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba) zatehtali po 1 g in jih homogenizirali v 10 ml ekstrakcijskega pufra.

Preglednica 1: Sestava ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (pH 8,2):

TRIS	264 mM
TRIS-HCl	236 mM
NaCl	137 mM
PVP K25	2 %
PEG 6000	2 mM
Tween 20	0.05 %

3.2.2 DAS ELISA

Uporabili smo neposredno metodo dvojnega sendviča (double antibody sandwich ELISA, DAS ELISA) (Clarks in Adams, 1977). Pri tej metodi smo na mikrotitrne ploščice v posamezne vdolbinice nanesti tudi negativno in pozitivno kontrolo ter ekstrakcijski pufer. Vse vzorce smo na ploščico nanašali v dveh ponovitvah.

Test DAS ELISA smo uporabili za dokazovanje in relativno kvantifikacijo virusa GFLV. Uporabili smo primarna protitelesa proti GFLV in sekundarna protitelesa konjugirana z alkalno fosfatazo (Bioreba). Kot negativno kontrolo smo uporabili ekstrakt zdravih vzorcev: Rup8 in Rup5 ter ekstrakcijski pufer. Kot pozitivne kontrole pa smo uporabili ekstrakte okuženih vzorcev: Ref DU 3/13, Vol 2/55(2007), Vol 2/47(2007), Vol 2/52 (2008) in Laški rizling 5/33(2008).

V vdolbinice mikrotitrskih ploščic (Greiner) smo odpipetirali po 200 µl primarnih protiteles proti virusu GFLV, razredčenih v karbonatnem pufru (Preglednica 2) v razmerju 1 : 1000. Ploščice smo pokrili in inkubirali 4 ure na 30 °C v pečici ter nato 4-krat, na vsakih 5 minut, sprali s pufrom za izpiranje.

V vdolbinice na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali po 195 μ l v ekstrakcijskem pufru homogeniziranega rastlinskega materiala. Ploščice smo pokrite inkubirali čez noč v hladilniku pri 4 °C in nato 5-krat sprali s pufrom za izpiranje (Preglednica 2) (2-krat zapored, ostalih 3-krat na 5 minut). Po izpiranju smo v vdolbinice odpipetirali po 190 μ l protiteles proti virusu GFLV konjugiranih z alkalno fosfatazo (Bioreba), razredčenih v konjugatnem pufru (Preglednica 2) v razmerju 1 : 1000. Nato smo pokrite ploščice 5 ur inkubirali pri 30 °C. Po končani inkubaciji smo ploščice 4-krat sprali s pufrom za izpiranje.

V vdolbinice smo nato odpipetirali po 200 μ l p-nitrofenilfosfata s pH = 9,8 (Sigma 104-105 (5 mg tabletki) s koncentracijo 1 mg/ml v substratnem pufru. Ploščice smo inkubirali na sobni temperaturi v temi in nato po 30 minutah, 1 uri, 2 urah in 18 urah spektrofotometrično izmerili optično gostoto (OD) pri 405 nm. Uporabili smo čitalec mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in program BioLinx 2.20.

Pri okuženih rastlinah obstaja možnost pojava inhibicije reakcije antigen – protitelo, ki se zmanjša, če vzorec bolj redčimo. Nizke redčitve rastlinskega soka lahko vsebujejo velike količine polifenolov (predvsem oleseneli deli rastlin), ki virusne delce zlepijo v agregate, kar pri testu predstavlja motnjo. V poskusu smo redčili junijske vzorce Vol2/55 in RefDU 2/18 v mešanici zdravih junijskih in julijskih vzorcev (RefDU 2/77, RefDU 2/55, RefDU 9/80, RefDU 10/1, Ref26 6/5, RefV1 11/93 in RefDU 1/1) v razmerju 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10⁻⁴, 1:10⁻⁵.

Preglednica 2: Sestava pufrov za test ELISA:

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

3.2.3 Obdelava podatkov testa ELISA

Optično gostoto smo po dodajanju substrata merili v časovnih intervalih: 30 minut, 1 ura, 2 uri in 18 ur.

Za vsak vzorec smo iz ponovitev izračunali povprečna vrednost odčitkov. Za vsako ploščico smo narisali grafikon iz spektrofotometričnih odčitkov vzorcev. Iz grafikonov smo na podlagi fotometričnih vrednosti vzorcev določili mejo med pozitivnimi (okuženimi) in negativnimi (zdravimi) vzorci. Kot pozitivno smo šteli več kot 2 - kratno vrednost optične gostote negativne kontrole in kot negativno manj kot 1,5 – kratno vrednost optične gostote negativne kontrole. Če je bila vrednost optične gostote po 2 h inkubacije med 1.5 in 2 kratno vrednostjo negativne kontrole smo jo določili kot možno pozitivno z oznako (+?). Ta način določanja meje med pozitivnimi in negativnimi vzorci se uporablja tudi v rutinskem testiranju.

V grafih smo 2 – kratno vrednost negativne kontrole prikazali s puščico na ordinatni osi. Podatke smo obdelali z računalniškim programom Excel (Microsoft).

Prag določljivosti (2 – kratna spektrofotometrična vrednost negativne kontrole) je vrednost, izmerjena s testom ELISA, ki smo jo določili kot mejo med pozitivnimi in negativnimi vzorci. Vrednosti, ki so večje od praga določljivosti smo smatrali kot pozitivne, manjše vrednosti pa kot negativne.

ELISA je semikvantitativna metoda, pri kateri spektrofotometrični odčitki niso vedno primerljivi z dejansko koncentracijo virusa v vzorcu predvsem zaradi možnosti pojava inhibicije reakcije antigen – protitelo. Kadar pa inhibicije reakcije antigen-protitelo ne opazimo (tako kot v našem primeru – glej rezultate 4.1.1) pa so spektrofotometrični odčitki primerljivi z dejanskimi koncentracijami virusa in zato lahko govorimo o manjših in večjih koncentracijah virusa GFLV v analiziranih vzorcih.

4 REZULTATI

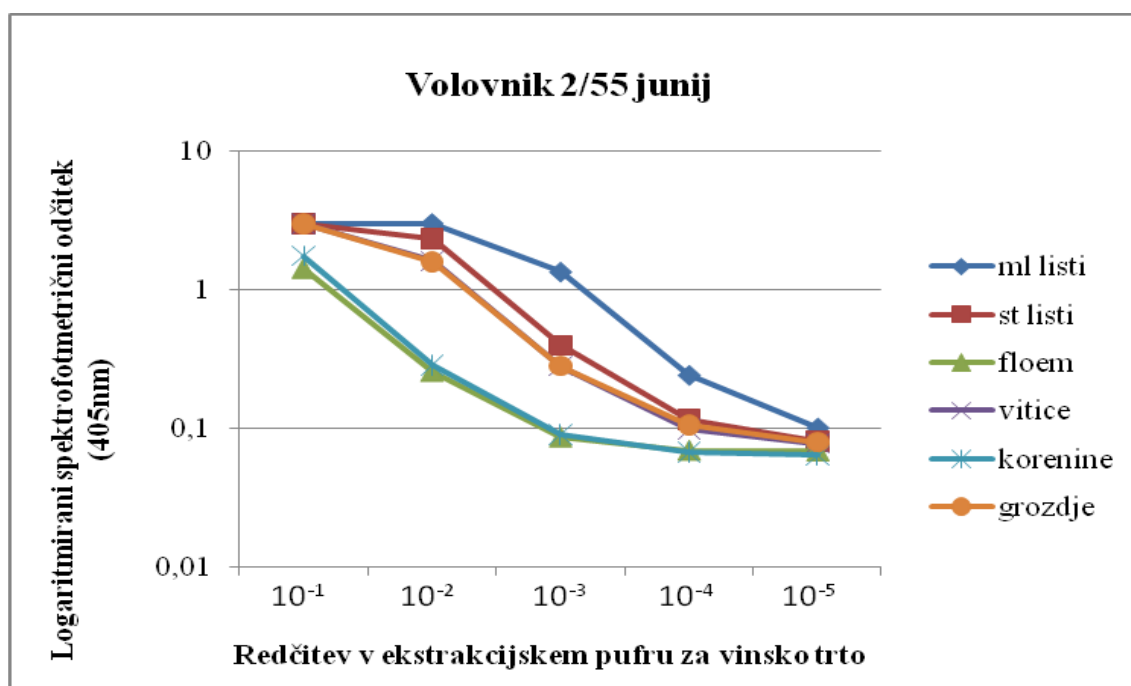
4.1 Test ELISA

Serološka metoda ELISA je bila uporabljena za določanje virusa GFLV v različnih delih (mladi in stari listi, vitice, cvet/grozd, floemsko tkivo ter korenine) 6 rastlin vinske trte (*Vitis vinifera* L.) sorte Refošk (4) in Volovnik (2) iz treh različnih lokacij na Krasu (Komen, Dutovlje) in ene lokacije iz Vipavski dolini (Lože). Vzorčili smo jih vsak mesec skozi rastno sezono (junij do september 2008) in izven rastne sezone januarja 2009. Januarja nismo testirali floema in korenin obeh trsov iz Dutovelj, septembra pa nismo vzorčili korenin trsa Refošk DU 2/19.

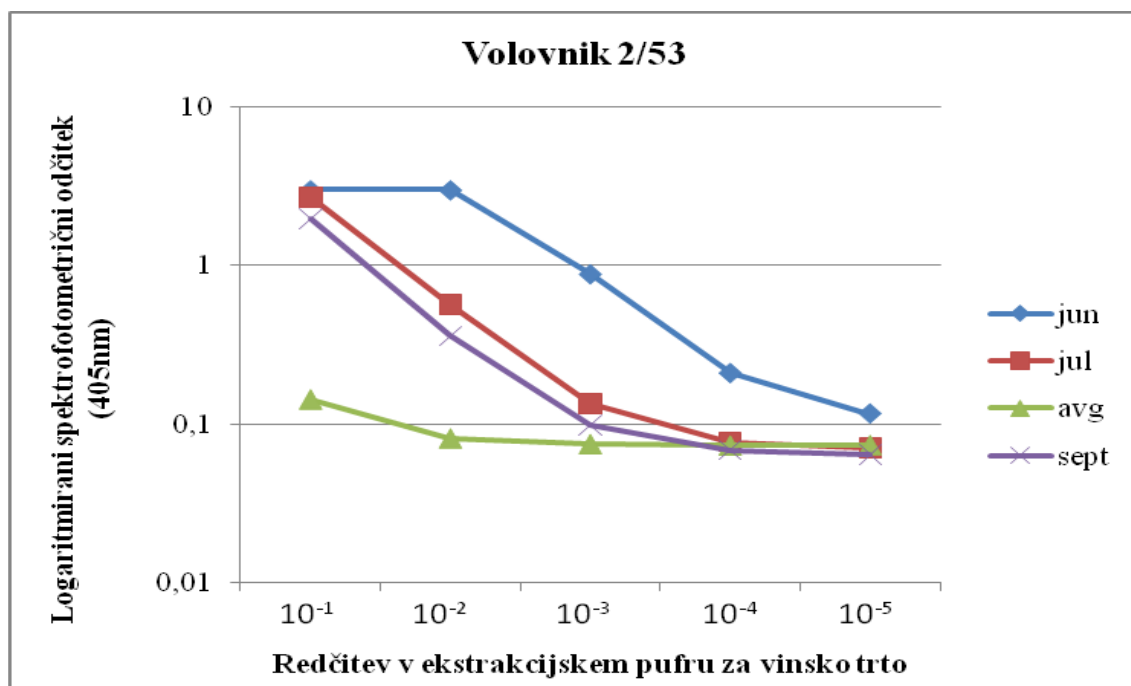
Da bi ugotovili, ali je spreminjanje količine virusa skozi sezono sortno specifično, smo testirali mlade poganjke (mlade liste, stebelne vršičke in vitice) 64 rastlin (*Vitis vinifera* L.) 5 sort: Refošk, Volovnik, Malvazija, Laški rizling in Župlanka iz 8 različnih lokacij v Vipavski dolini (Lože, Vrhpolje 1, Vrhpolje 2, Kromberk) in na Krasu (Komen, Dutovlje, Malinkovci, Krajna vas). Testirali smo jih vsak mesec skozi rastno sezono (od junija do septembra 2008). Nastrgano floemsko tkivo 36 rastlin smo testirali tudi izven rastne sezone v januarju 2009. Večina rastlin je kazala izrazita bolezenska znamenja okužbe (različne tipe rumenenja listov in/ali nepravilnosti internodijev in/ali zmanjšanje pridelka), medtem ko je sorta Refošk iz Komna le občasno kazala posamezne bifurkacije nodijev (Priloga A3).

4.1.1 Preverjanje inhibicije reakcije antigen – protitelo

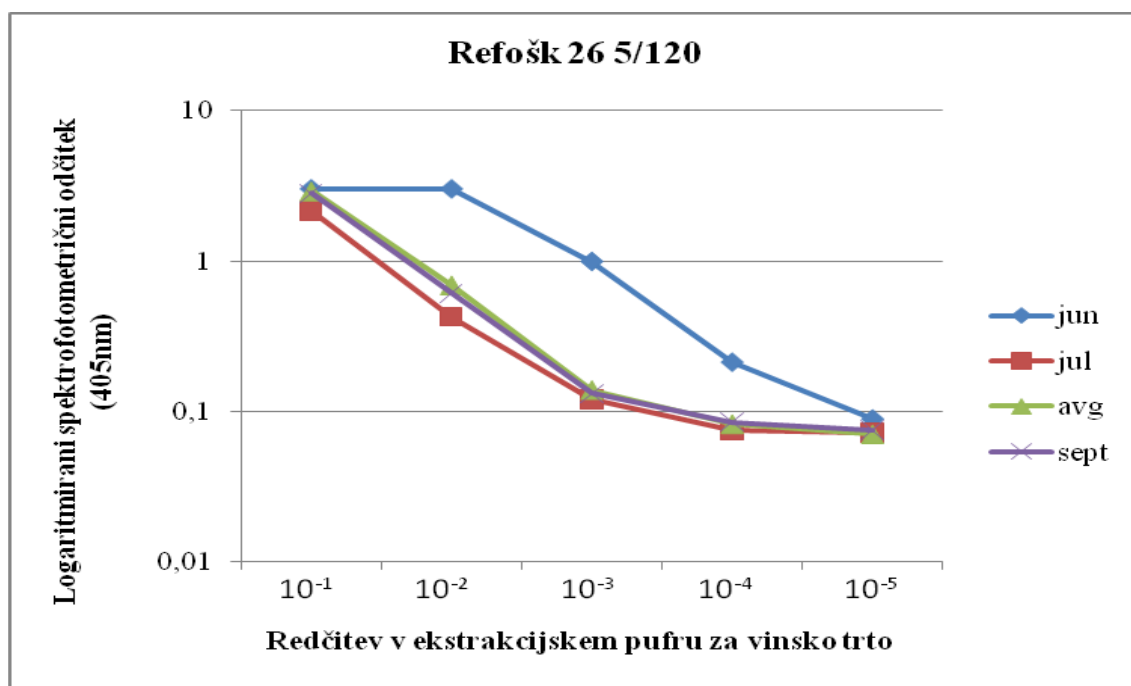
Pri določanju virusa GFLV s testom ELISA nismo zaznali inhibicije, v vseh primerih smo opazili sorazmerno padanje logaritma spektrofotometričnih vrednosti z redčenjem vzorca v ekstrakcijskem pufru. V primerih junijskih vzorcev mladih listov se pri redčitvah $1:10$ in $1:10^2$ vrednosti niso spremenile, kar pa ni bila posledica inhibicije, ampak zasičenosti merilnega sistema (izmerili smo najvišje možne spektrofotometrične vrednosti). (Slike 6-8)



Slika 6: Grafični prikaz logaritmiranih spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri različnih delih trsa Volovnik 2/55 iz lokacije Lože junija 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd). Vzorce smo v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto redčili v razmerjih: $1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$.



Slika 7: Grafični prikaz logaritmiranih spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri mladih poganjkih trsa Volovnik 2/53 iz lokacije Lože skozi rastno sezono 2008. Vzorce smo v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto redčili v razmerjih: $1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$.

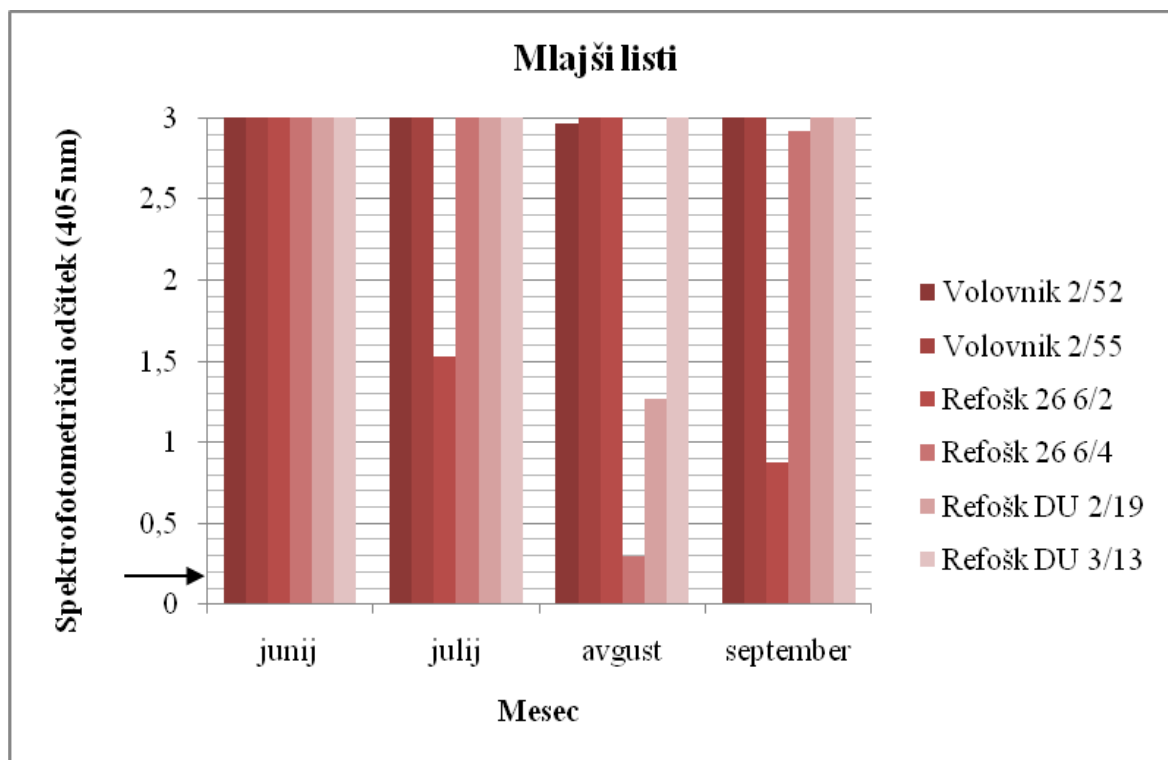


Slika 8: Grafični prikaz logaritmiranih spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri mladih poganjkih trsa Refošk 26 5/120 iz lokacije Komen skozi rastno sezono 2008. Vzorec smo v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto redčili v razmerjih: $1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$.

4.1.2 Prisotnost virusa GFLV v različnih delih rastlin vinske trte skozi rastno sezono

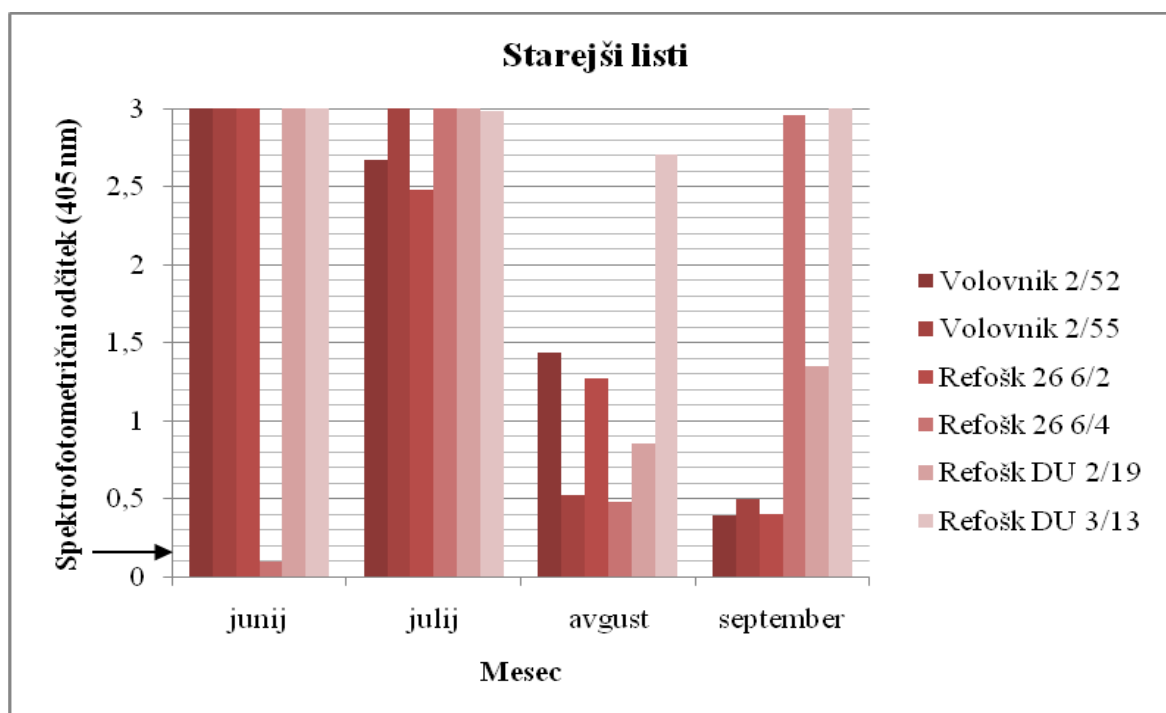
4.1.2.1 Prisotnost virusa GFLV v posameznih organih vinske trte skozi rastno sezono 2008 in januarja 2009

Koncentracije virusa, ki smo jih dobili pri testiranju mlajših listov junija so bile pri vseh šestih rastlinah vinske trte visoke. Pri rastlini Refošk 26 6/2 so julija vrednosti nekoliko padle, se avgusta ponovno povišale in septembra padle pod julijske vrednosti. Pri rastlinah Refošk 26 6/4 in Refošk DU 2/19 so se koncentracije virusa avgusta znižale, medtem ko so bile v preostalem delu sezone visoke. Pri obeh rastlinah sorte Volovnik in pri rastlini Refošk DU 3/13 pa so bile koncentracije virusa skozi celo rastno sezono visoke. Pri vseh vzorcih smo lahko v vseh časovnih točkah določili prisotnost virusa GFLV (Slika 9).



Slika 9: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri mlajših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole.

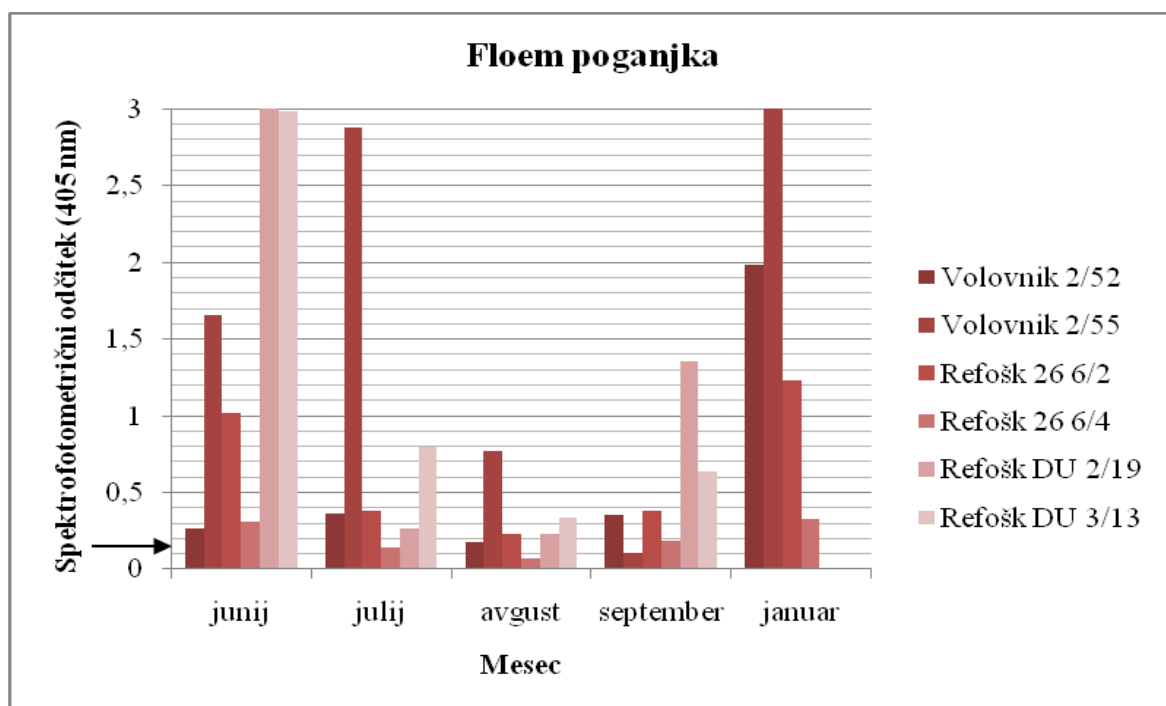
Junija so bile koncentracije virusa GFLV, ki smo jih dobili pri testiranju starejših listov visoke, le v rastlini Refošk 26 6/4 virusa nismo mogli določiti. Julija so bile vse izmerjene koncentracije virusa visoke, avgusta pa so se pri vseh rastlinah zelo znižale, a kljub temu ostale nad pragom določljivosti. Septembra so se koncentracije virusa pri rastlini Refošk 26 6/4 in obeh rastlinah sorte Refošk iz Dutovelj spet zvišale, pri obeh rastlinah sorte Volovnik in rastlini Refošk 26 6/2 pa so se vrednosti še dodatno znižale (Slika 10).



Slika 10: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri starejših listih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost junijskega vzorca Refošk 26 6/4 tudi po dveh urah inkubacije ni presegla praga določljivosti.

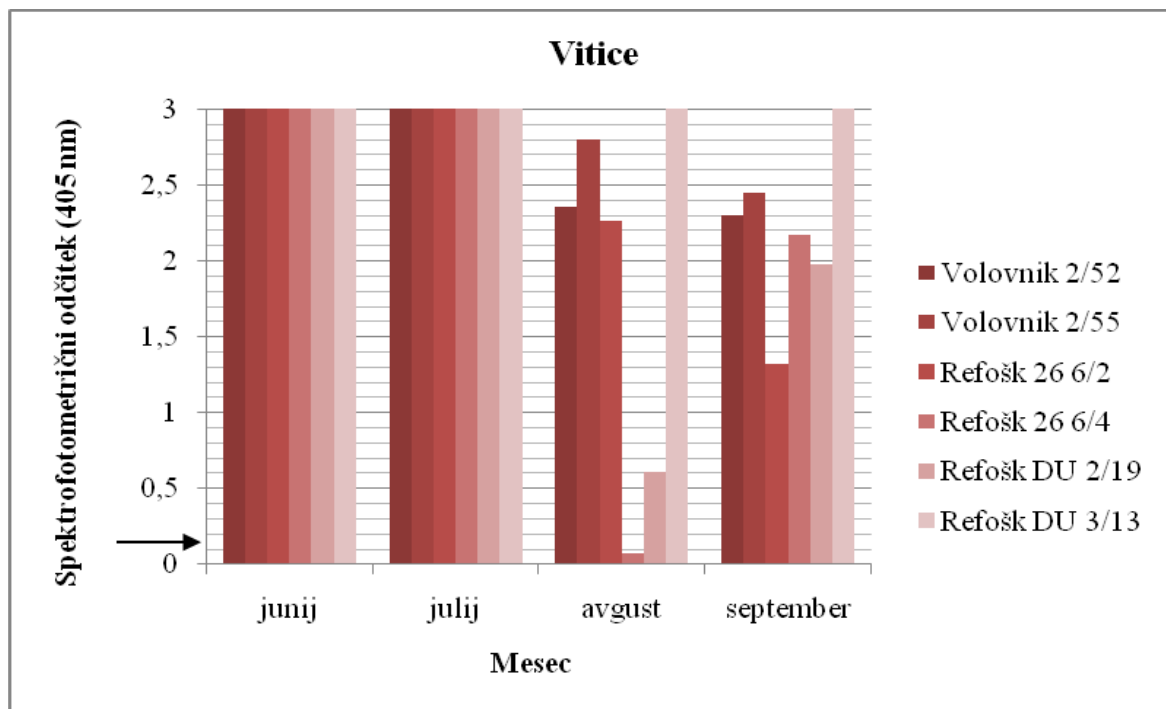
Junija so bile koncentracije virusa v floemu obeh rastlin sorte Volovnik iz Lož in pri obeh rastlinah sorte Refošk iz Komna nižje kot v rastlinah sorte Refošk iz Dutovelj, vendar nad pragom določljivosti. Julija so vrednosti v obeh rastlinah sorte Volovnik iz Lož narasle, v ostalih rastlinah so se znižale. V rastlini Refošk 26 6/4 so bile vrednosti julija pri odčitavanju po 1 uri pod pragom določljivosti, pri odčitavanju po 2 urah pa so presegle prag določljivosti. Pri istem vzorcu avgusta vrednosti tudi pod dveh urah inkubacije niso presegle meje določljivosti. Avgusta so bile tudi pri vseh ostalih rastlinah vrednosti nižje kot smo jih izmerili julija. Septembra so v vseh rastlinah, razen v rastlini Volovnik 2/55, kjer so se vrednosti znižale, vrednosti narasle, najbolj na zadnji lokaciji pri rastlinah sorte Refošk (Slika 11).

Floem poganjka smo testirali pri štirih rastlinah tudi izven rastne sezone januarja, ko so bile vrednosti v rastlinah sorte Volovnik iz Lož visoke, v rastlinah sorte Refošk iz Komna pa nižje. Na splošno pa so bile januarja spektrofotometrične vrednosti višje kot tiste, ki smo jih dobili s testiranjem floema poganjka v rastni sezoni (Slika 11).



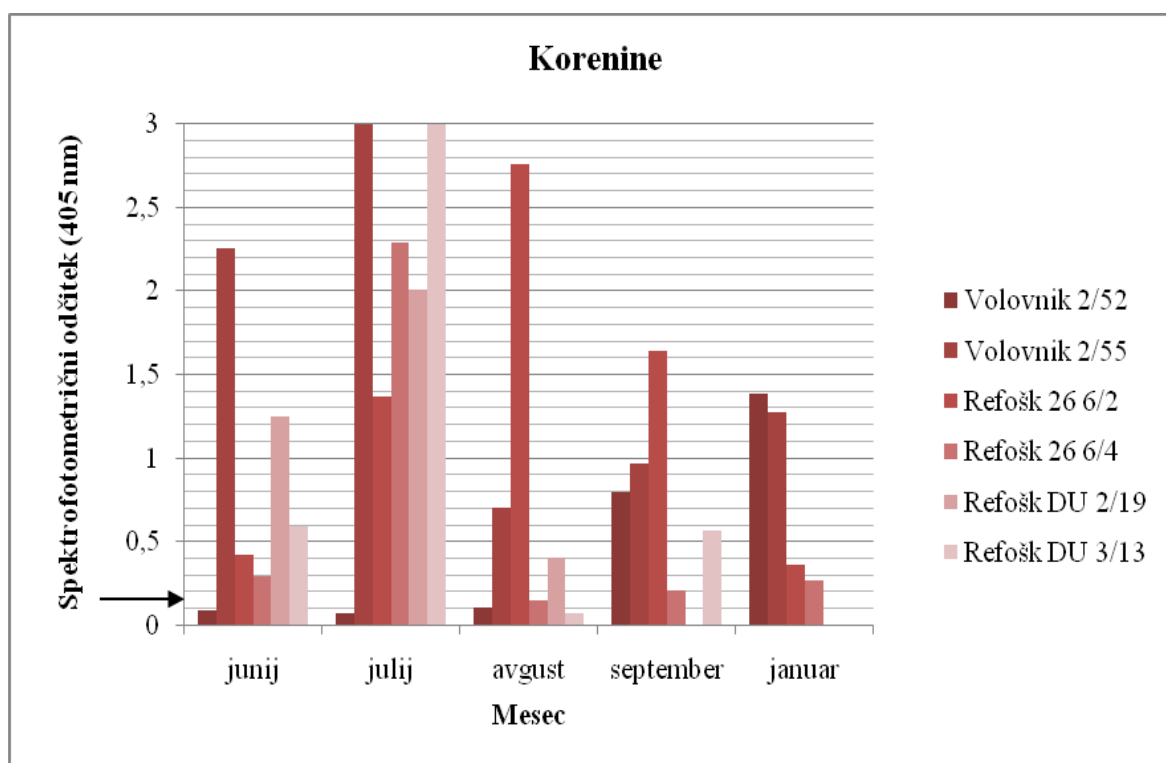
Slika 11: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri floemu poganjka šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008 ter januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrični vrednosti avgustovskega vzorca Refošk 26 6/4 in septembrskega vzorca Volovnik 2/55 tudi po dveh urah inkubacije nista presegli praga določljivosti, medtem ko je julijski vzorec Refošk 26 6/4 po 2 urah inkubacije ravno presegel prag določljivosti.

Koncentracije virusa GFLV, ki smo jih dobili pri testiranju vitic na začetku rastne sezone junija in julija so bile visoke pri vseh testiranih rastlinah, avgusta pa so pri nekaterih padle. Pri rastlini Refošk 26 6/4 vrednost avgusta tudi po dveh urah inkubacije ni presegla meje določljivosti. Septembra so se vrednosti spet povišale, vendar so bile nižje kot v začetku rastne sezone (Slika 12).



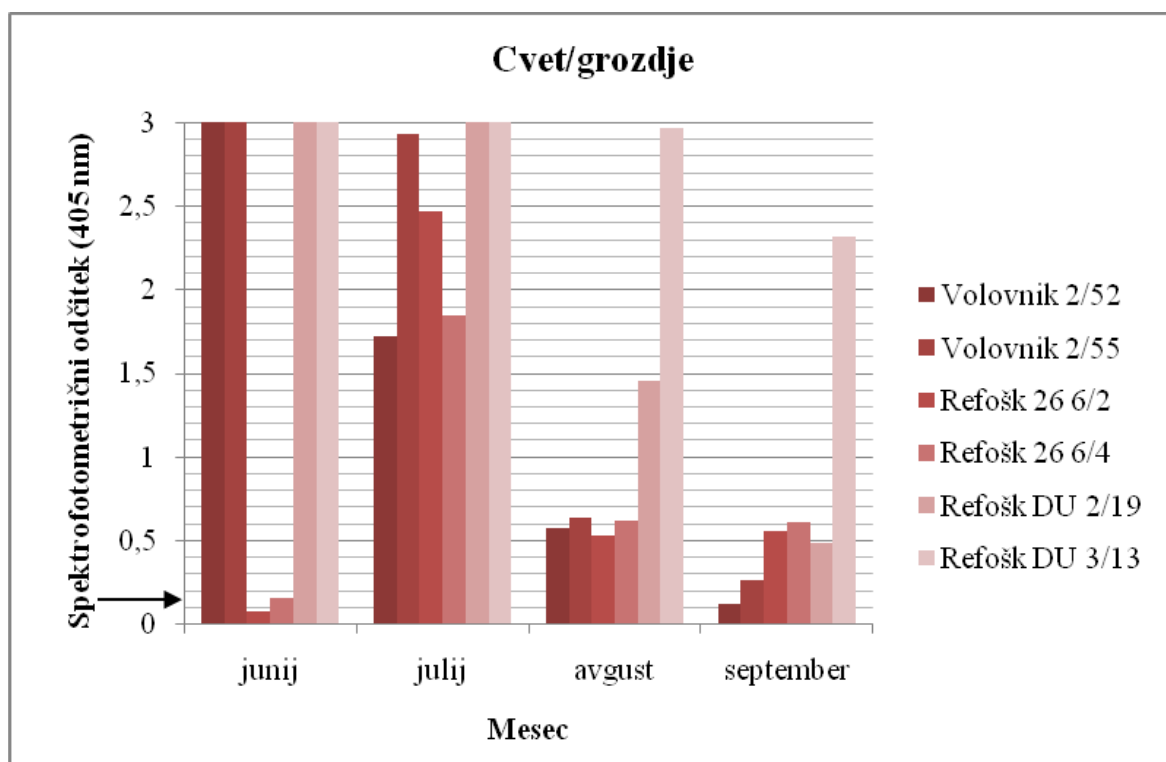
Slika 12: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri viticah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost avgustovskega vzorca Refošk 26 6/4 tudi po dveh urah inkubacije ni presegla praga določljivosti.

Koncentracije virusa GFLV, ki smo jih pridobili skozi rastno sezono v koreninah so bile za posamezne rastline zelo različne. V splošnem smo najvišje vrednosti virusa v koreninah zaznali julija pri večini vzorcev, najnižje pa avgusta v najbolj vročem delu leta, ko so vrednosti v nekaterih primerih padle pod mejo določljivosti. Vrednosti so večinoma proti koncu rastne sezone spet nekoliko narasle. Izjema je bila rastlina Refošk 26 6/2, ki je sredi največje vročine (avgusta), ohranila visoke vrednosti virusa v koreninah, njegova koncentracija pa je proti koncu sezone padala. Pri rastlini Volovnik 2/52 je bil virus pod mejo določljivosti od junija, do avgusta, septembra in januarja so vrednosti virusa presegle mejo določljivosti. Izven rastne sezone smo testirali prisotnost virusa v koreninah pri 4 trtah in pri vseh je bila količina virusa nad mejo določljivosti (Slika 13).



Slika 13: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri koreninah šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008 ter januarja 2009. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti junijskega, julijskega in avgustovskega vzorca Volovnik 2/52 in avgustovskega vzorca Refošk DU 2/19 tudi po dveh urah inkubacije niso presegle praga določljivosti, medtem ko je avgustovski vzorec Refošk 26 6/4 po 2 urah inkubacije ravno presegel prag določljivosti.

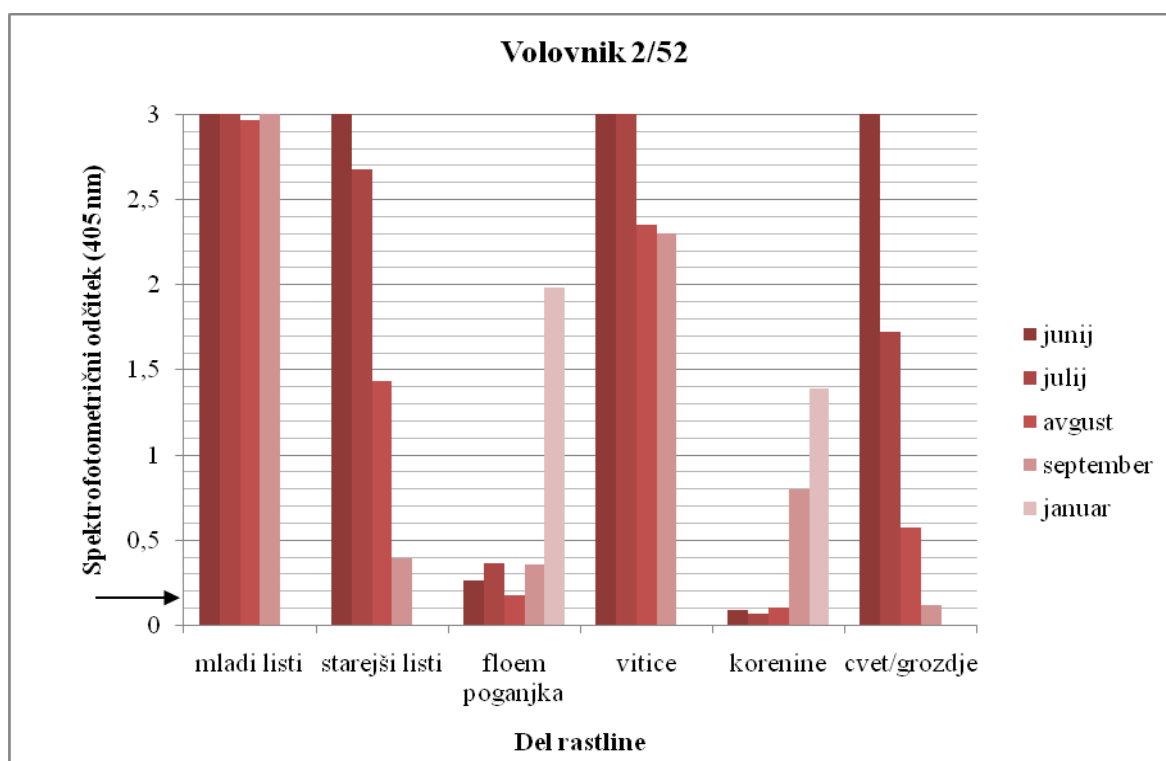
Junija smo v obeh rastlinah sorte Volovnik iz Lož in obeh rastlinah sorte Refošk iz Dutovelj v grozdih določili visoke koncentracije virusa. Prav tako smo visoke koncentracije virusa določili tudi julija pri obeh rastlinah sorte Refošk iz Dutovelj, ki sta proti koncu sezone kazali počasen upad koncentracije virusa, ki pa so bile v primerjavi z ostalimi trsi najvišje. Pri obeh rastlinah sorte Volovnik so za razliko od rastlin sorte Refošk iz Dutovelj koncentracije virusa proti koncu rastne sezone hitreje padale in so septembra, po 2 urah inkubacije komaj presegle mejo določljivosti. Pri rastlinah sorte Refošk iz Komna pa je bila slika popolnoma drugačna, saj so bile koncentracije virusa junija po 2 urah inkubacije na pragu določljivosti. Julija so v istih rastlinah vrednosti narasle in nato so avgusta in septembra spet padle, a ostale nad pragom določljivosti (Slika 14).



Slika 14: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri grozdih šestih rastlin vinske trte (sort Refošk in Volovnik iz treh različnih lokacij na Krasu) skozi rastno sezono 2008. Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti junijskega vzorca Refošk 26 6/2 tudi po dveh urah inkubacije niso presegle meje določljivosti, medtem ko sta junijski vzorec Refošk 26 6/4 in septembrski vzorec Volovnik 2/52 po 2 urah inkubacije ravno presegla prag določljivosti.

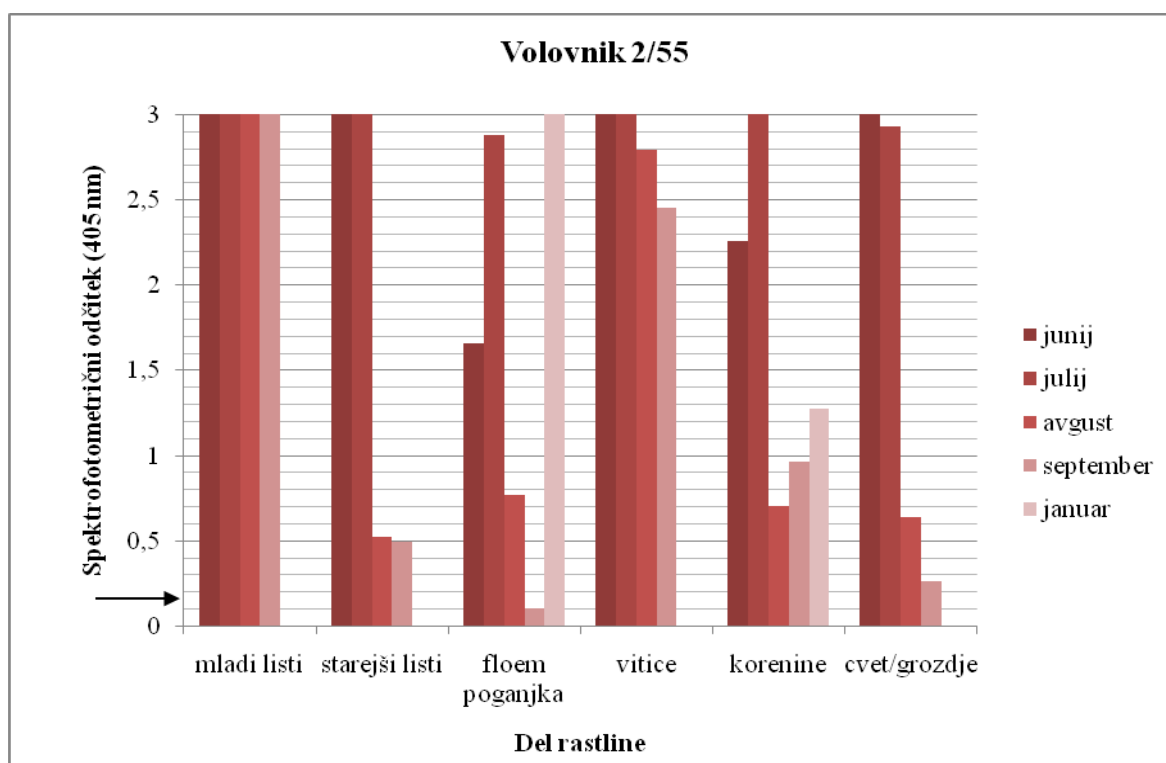
4.1.2.2 Razporeditev virusa po različnih delih posameznih rastlin vinske trte skozi rastno sezono 2008 in januarja 2009

Pri trsu Volovnik 2/52 iz Lož so bile najvišje koncentracije virusa izmerjene v mladih listih skozi celotno rastno sezono. Pri viticah in še močneje pri starejših listih in grozdju smo opazili padanje izmerjenih vrednosti skozi rastno sezono. Pri vzorcih floema in korenin pa smo določili bistveno višje spektrofotometrične vrednosti izven rastne sezone (januar 2009) kot znotraj nje (Slika 15).



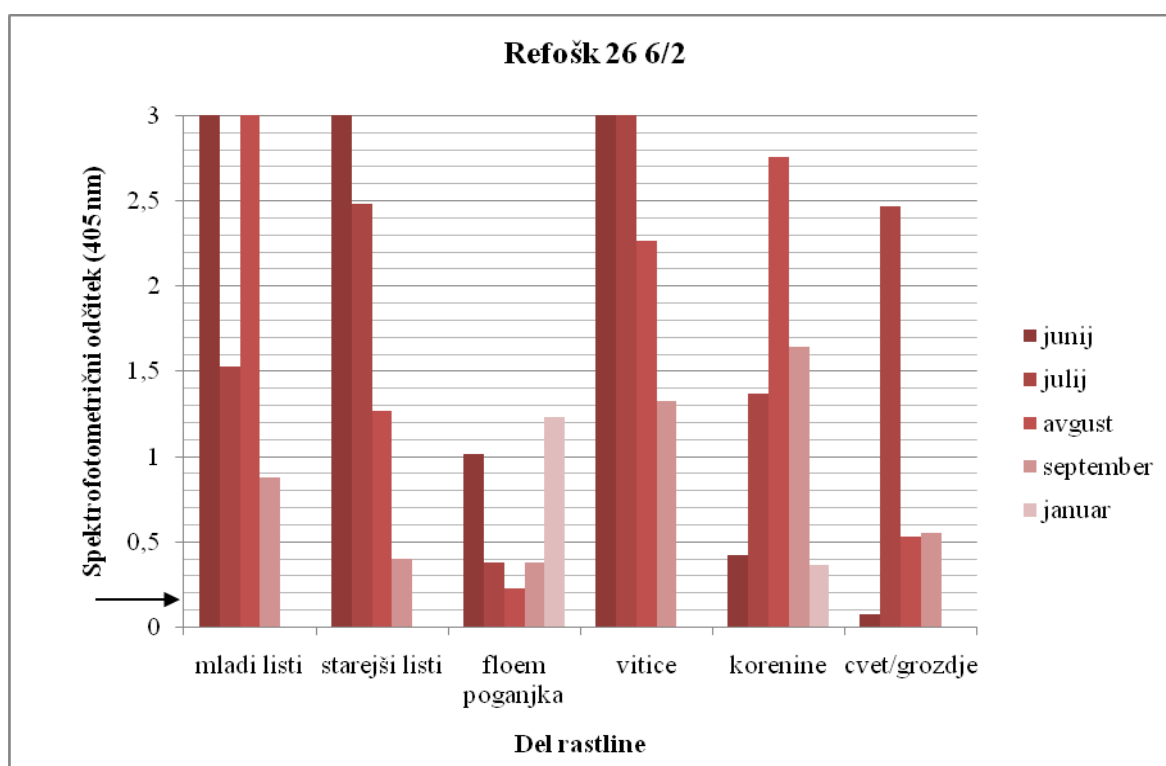
Slika 15: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih vzorca Volovnik 2/52 iz lokacije Lože skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost junijskega, julijskega in avgustovskega vzorca korenin tudi po 2 urah inkubacije ni presegla praga določljivosti, medtem ko je septembrski vzorec grozdja po 2 urah inkubacije ravno presegel prag določljivosti.

Pri trsu Volovnik 2/55 iz Lož smo, skozi vso rastno sezono v mladih listih določili visoke koncentracije virusa. V starejših listih smo visoke vrednosti določili junija in julija, medtem ko so avgusta in septembra izrazito padle. V floemu poganjka smo izmerili najvišje možne spektrofotometrične vrednosti znotraj rastne sezone meseca julija in so proti koncu sezone padale, tako da so bile septembra že pod mejo določljivosti tudi po 2 urah inkubacije, januarja izven rastne sezone pa so vrednosti spet zelo narasle, presegle so celo julijske vrednosti. V viticah smo na začetku sezone določili visoke koncentracije virusa, ki so skozi sezono rahlo padale. V koreninah smo visoke vrednosti izmerili na začetku sezone, avgusta so padle in konec sezone ter izven rastne sezone spet nekoliko narasle. V cvetu/grozdju smo izmerili visoke spektrofotometrične vrednosti predvsem na začetku rastne sezone, ko so trte cvetele in so plodovi šele začeli nastajati, nato pa so z večanjem jagod tudi vrednosti virusa konec rastne sezone padle (Slika 16).



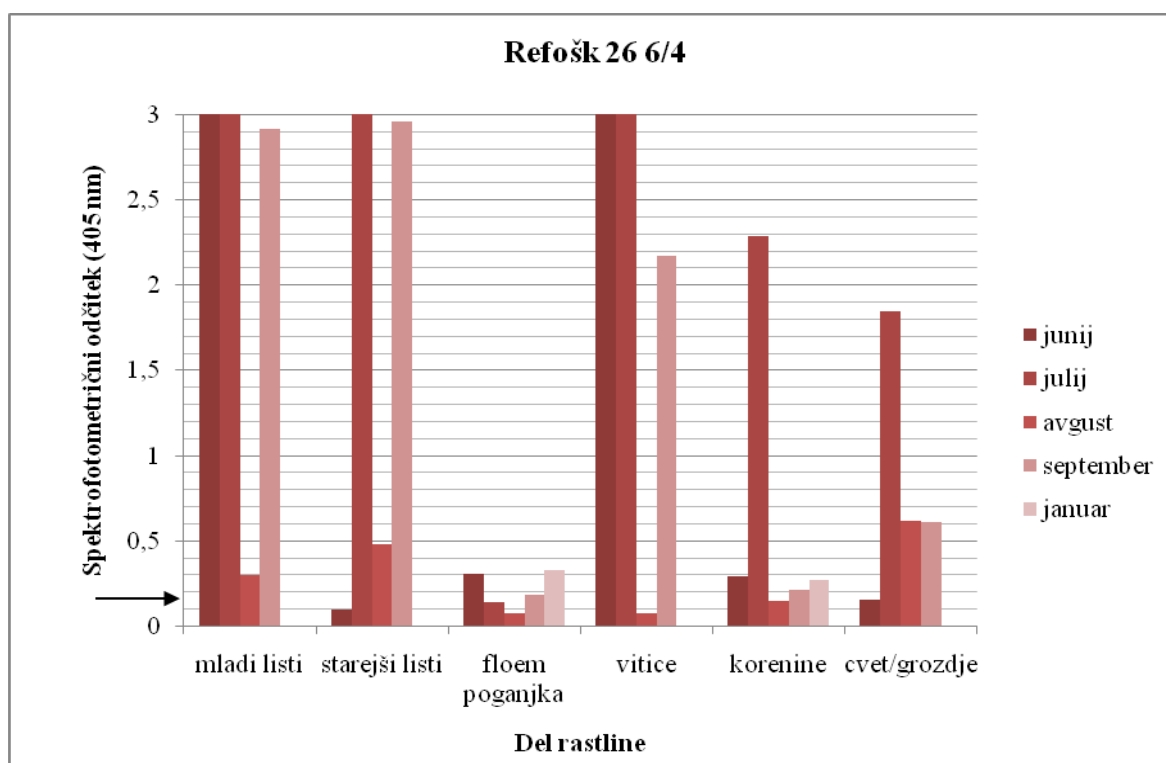
Slika 16: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih vzorca Volovnik 2/55 iz lokacije Lože skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost septembrskega vzorca floema tudi po 2 urah inkubacije ni presegla praga določljivosti.

Pri testiranju različnih delov trsa Refošk 26 6/2 iz Komna smo visoke spektrofotometrične vrednosti izmerili v začetku rastne sezone v mladih listih, viticah in tudi v starejših listih, pri katerih so vrednosti kasneje skozi sezono postopoma padale, najizraziteje pri starih listih, vendar nikoli niso padle pod mejo določljivosti. Presenetljivo visoke so bile vrednosti v mladih listih avgusta. V floemu, kjer so bile koncentracije virusa nižje v primerjavi z drugimi rastlinskimi organi, smo opazili trend padanja vrednosti do sredine rastne sezone in nato spet naraščanje konec in izven rastne sezone. V koreninah pa se je bilo ravno nasprotno, do sredine rastne sezone je koncentracija virusa naraščala in nato spet padla. V cvetu (junija) virusa nismo mogli določiti, niti po 2 urah inkubacije, medtem ko so bile vrednosti v času zelenih jagod zelo visoke in so hkrati z dozorevanjem in rastjo jagod kasneje v sezoni padle (Slika 17).



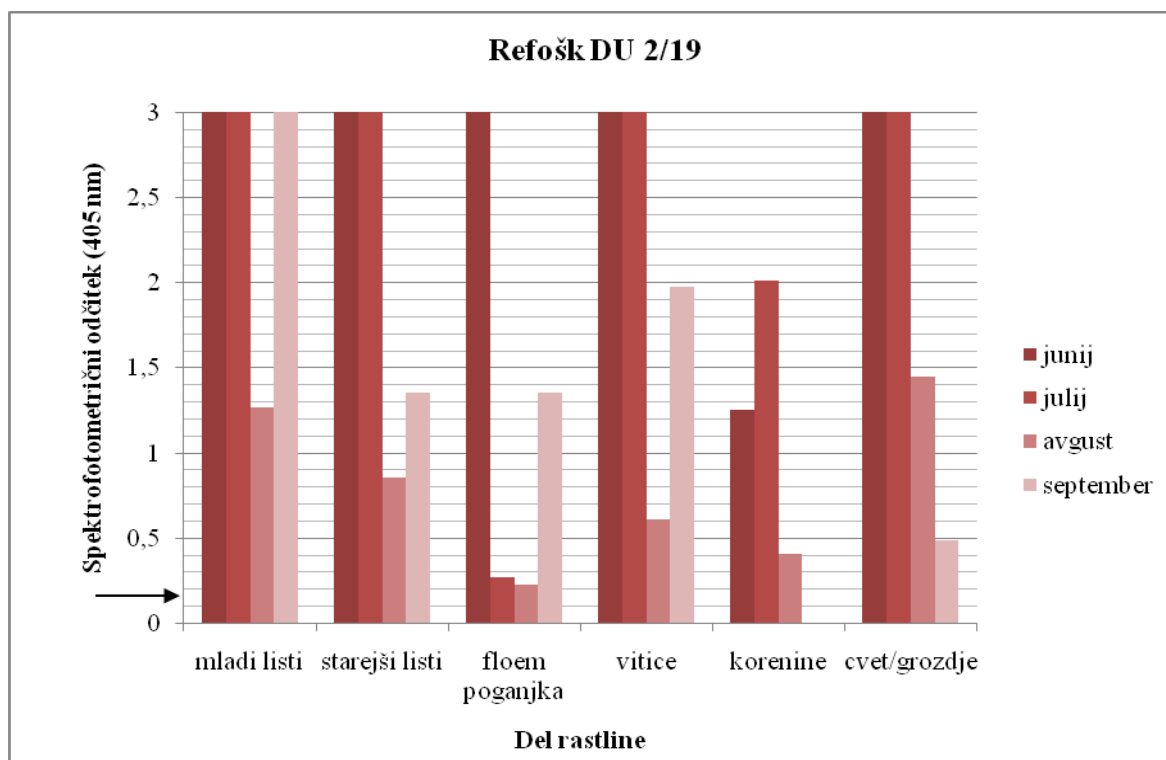
Slika 17: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih trsa Refošk 26 6/2 iz lokacije Komen skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrična vrednost junijskega vzorca grozdja tudi po 2 urah inkubacije ni presegla praga določljivosti.

V trsu Refošk 26 6/4 iz Komna se kažejo izrazite razlike v koncentraciji virusa GFLV skozi sezono, saj so avgusta v vseh delih rastline koncentracije virusa padle v primerjavi s prejšnjim mesecem, v dveh primerih celo pod prag določljivosti. Kot najzanesljivejši material za določanje virusa je se izkazal material mladih listov in vitic v začetku sezone, medtem ko so pri starejših listih vrednosti skozi sezono zelo nihale, saj junija tudi po 2 urah inkubacije niso presegle meje določljivosti, medtem ko so bile julija in septembra zelo visoke. V floemu poganjka so bile izmerjene vrednosti skozi vso rastno sezono na meji določljivosti, sredi rastne sezone pa so padle pod mejo določljivosti. Trend padanja vrednosti sredi rastne sezone pa se je skladal s trendom pri drugem trsu iz iste lokacije (Refošk 26 6/2). Tudi pri koreninah so bile vrednosti skozi sezono zelo nizke, z izjemo julija, ko je količina virusa nekoliko narasla. Pri grozdju smo opazili enak trend kot pri trsu Refošk 26 6/2, le z nižjimi vrednostmi (Slika 18).



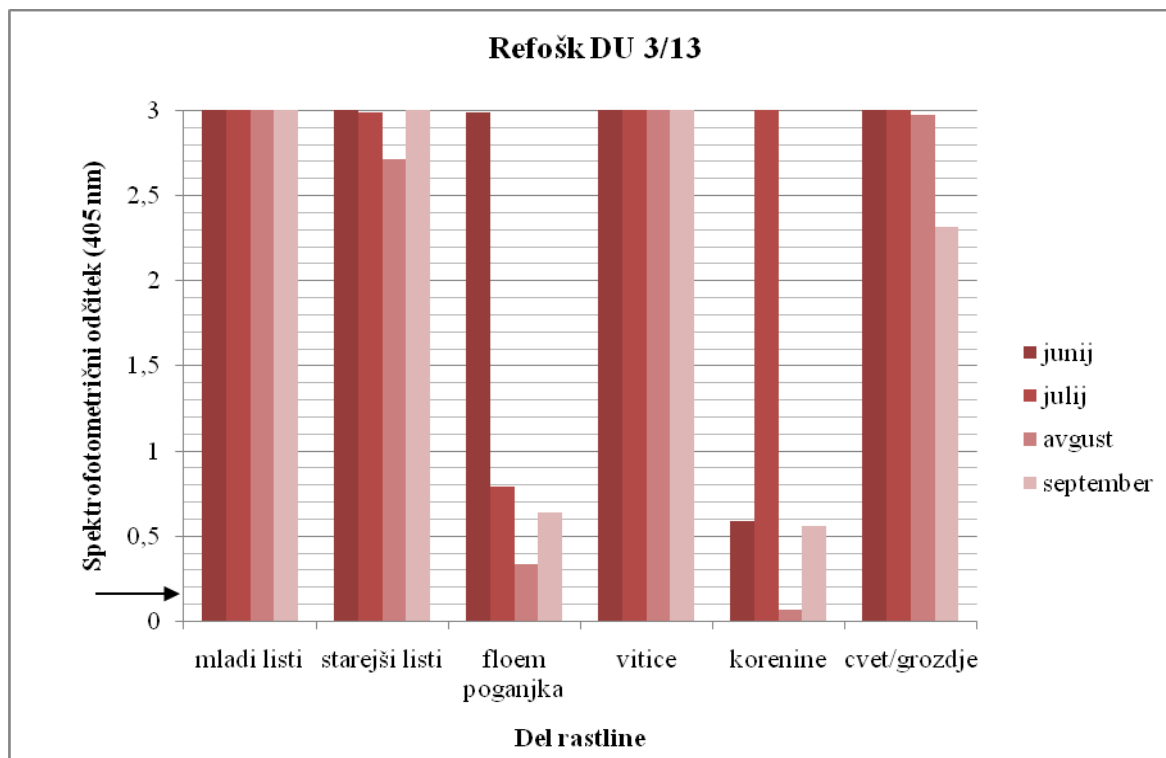
Slika 18: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih vzorca Refošk 26 6/4 iz lokacije Komen skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd) in januarja 2009 (floem poganjka in korenine). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti junijskega vzorca starejših listov, avgustovskega vzorca floema poganjka in avgustovskega vzorca vitic tudi po 2 urah inkubacije niso presegle praga določljivosti, medtem ko so vrednosti julijskega vzorca floema poganjka, avgustovskega vzorca korenin in junijskega vzorca grozdja po 2 urah inkubacije ravno presegli prag določljivosti.

Pri trsu Refošk DU 2/19 iz Dutovelj smo dobili višje koncentracije virusa kot pri trsih iste sorte iz Komna. V vseh vzorcih smo lahko v vseh časovnih točkah določili virus GFLV. Visoke vrednosti so bile določene junija in julija pri testiranju mladih listov, starejših listov, vitic in grozdja, ter junija v floemu. V floemu so vrednosti sredi sezone padle na prag določljivosti. Trend padca vrednosti avgusta in rast vrednosti proti koncu sezone se je pokazal tudi pri ostalih delih rastlin. Vrednost ob koncu sezone ni narasla le pri grozdju, kar se sklada z rezultati pri ostalih trsih. Korenine smo testirali le prve tri mesece rastne sezone (junij, julij, avgust), najvišje vrednosti smo dobili julija, najnižje pa avgusta (Slika 19).



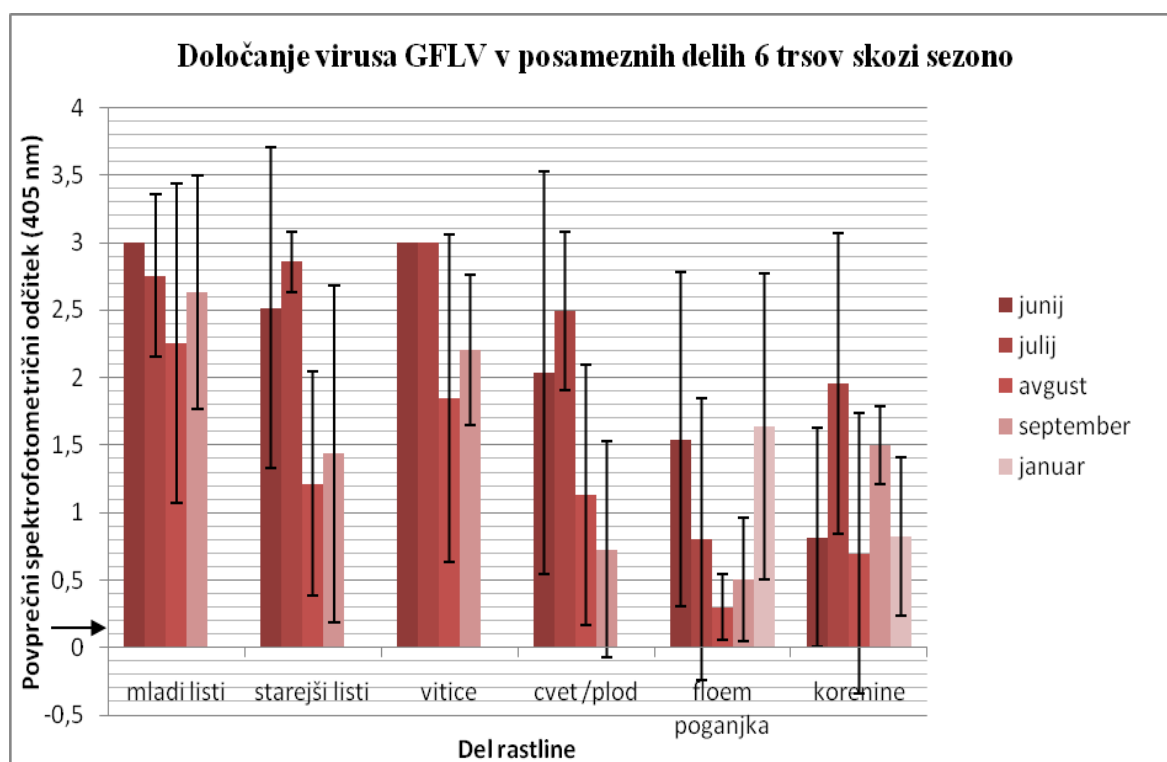
Slika 19: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri različnih delih trsa Refošk DU 2/19 iz lokacije Dutovlje skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd). Puščica prikazuje dvakratno vrednost izmerjene negativne kontrole. Korenine in floem nista bila vzorčena septembra in januarja, medtem ko korenine niso bile vzorčene tudi septembra.

V mladih listih, starih listih, viticah in grozdju rastline Refošk DU 3/13 iz Dutovelj smo določili visoke koncentracije virusa skozi celo rastno sezono. Visoke vrednosti smo določili tudi v floemu poganjka junija in v koreninah julija. Pri floemu poganjka so izmerjene vrednosti v kasnejših mesecih močno padle, najbolj avgusta, vendar so presegle mejo določljivosti. Nasprotno pa avgustovske vrednosti vzorca korenin, tudi po 2 urah inkubacije, meje določljivosti niso presegle. V grozdju se je kljub zelo visoki koncentraciji virusa kazal rahli trend padanja vrednosti proti koncu rastne sezone (Slika 20).



Slika 20: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, v različnih delih trsa Refošk DU 3/13 iz lokacije Dutovlje skozi rastno sezono 2008 (mlajši listi, starejši listi, floem poganjka, vitice, korenine in grozd). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Spektrofotometrične vrednosti avgustovskega vzorca korenin tudi po 2 urah inkubacije niso presegle praga določljivosti. Korenine in floem nista bila vzorčena januarja.

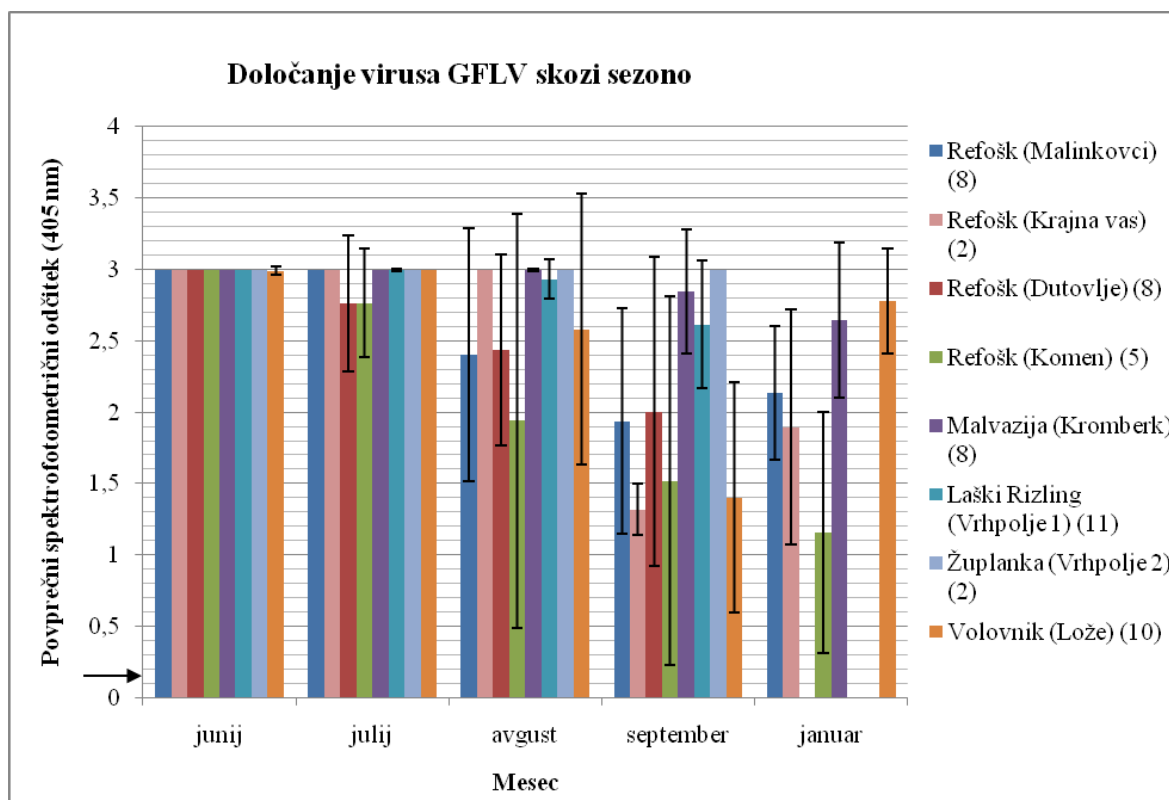
V povprečju smo pri šestih trsih dveh različnih sort iz treh različnih lokacij na Krasu in v Vipavski dolini dobili najvišje in med vzorci najbolj ponovljive koncentracije virusa pri testiranju vitic ter mlajših in starejših listov. Vrednosti v teh delih rastlin so skozi rastno sezono padale ali pa so se povečevale razlike (standardne deviacije) med vzorci. Bolj spremenljive vrednosti smo dobili pri ekstraktih iz grozdja. Tudi pri vzorcih korenin in floema poganjka so bile vrednosti med vzorci zelo raznolike. Pri testiranju floema smo dobili 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 21).



Slika 21: Grafični prikaz povprečnih vrednosti spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi deviacijami za virus GFLV, 1 uro 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.

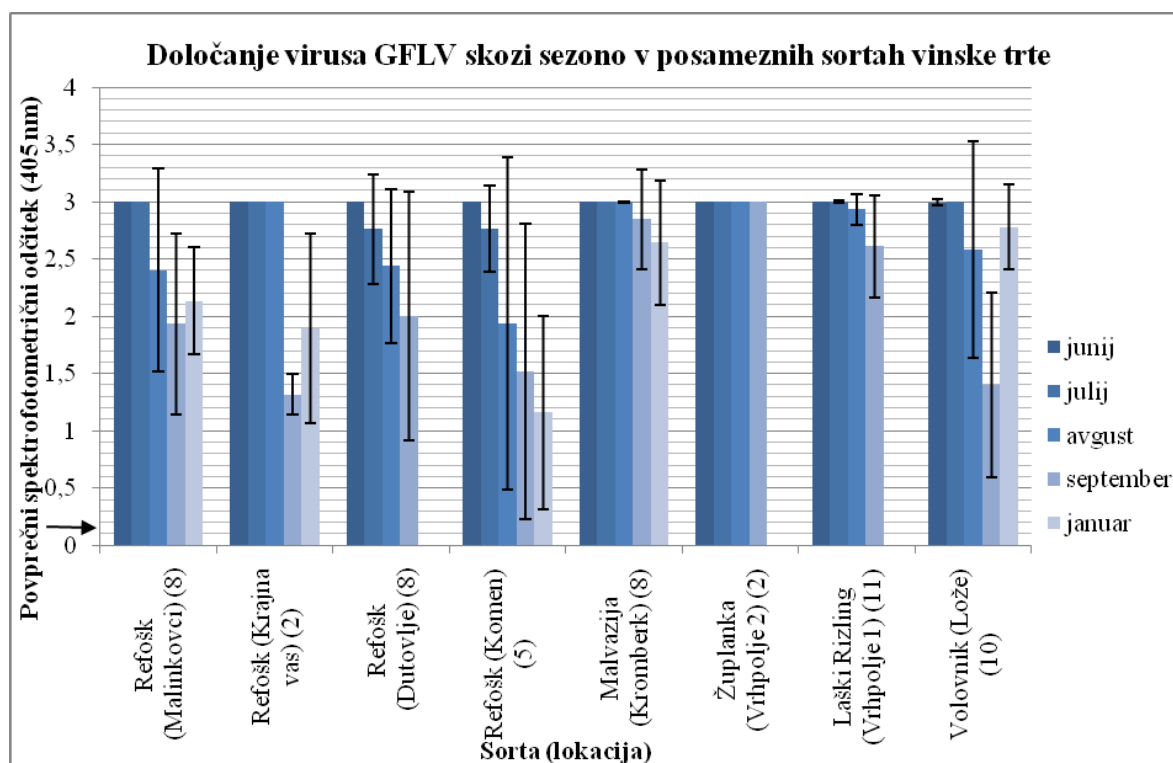
4.1.3 Spreminjanje količine virusa v mladih delih rastline skozi rastno sezono in v olesenelih rozgah zunaj rastne sezone

V mladih, aktivnorastočih delih rastlin smo pri vseh petih sortah vinske trte na vseh osmih lokacijah izmerili najvišje povprečne spektrofotometrične vrednosti junija. Julija so bila odstopanja med posameznimi vzorci nekoliko večja, vendar so bile izmerjene spektrofotometrične vrednosti še vedno visoke. Avgusta smo zasledili upadanje izmerjenih vrednosti na vseh lokacijah, razen pri rastlinah sorte Župlanka v Vrhpolju 2. Pri rastlinah sorte Malvazija v Kromberku in rastlinah sorte Laški Rizling v Vrhpolju 1 so vrednosti padle zelo malo, najbolj pa so vrednosti padle pri rastlinah sorte Refošk iz Komna. Septembra se je padanje vrednosti nadaljevalo z izjemo rastlin sorte Župlanka iz Vrhpolja 2. Pri vzorčenju olesenelih rozg januarja smo pri rastlinah sorte Malvazija iz Kromberka in rastlinah sorte Refošk iz Komna izmerili nižje spektrofotometrične vrednosti kot pri vzorčenjih skozi rastno sezono, a še zmeraj dovolj visoke za določitev virusa. Pri rastlinah sorte Refošk iz Malinkovcev in Krajne vasi smo januarja izmerili višje spektrofotometrične vrednosti kot septembra, a vrednosti niso presegle junijskih, julijskih in avgustovskih. Pri rastlinah sorte Volovnik so bile vrednosti, ki smo jih izmerili januarja višje kot proti koncu rastne sezone (avgusta in septembra) v zelenih delih rastline, a nižje kot junija in julija. Rastlin sorte Refošk iz Dutovelj in rastlin sorte Laški rizling ter rastlin sorte Župlanka iz Vrhpolja januarja nismo testirali (Slika 22).



Slika 22: Grafični prikaz povprečnih vrednosti spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi deviacijami za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri petih različnih sortah vinske trte iz osmih lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi deli rastline) in januarja 2009 (olesenele rozge). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. V Dutovljah in Vrhopolju zimskih dormantnih poganjkov nismo testirali. V oklepajih so navedene lokacije in število testiranih trsov posamezne sorte.

Z izjemo sorte Župlanka, vse sorte kažejo trend padanja koncentracije virusa skozi rastno sezono. Najmanjša odstopanja izmerjenih vrednosti od mesečnega povprečja smo zabeležili pri rastlinah sort Župlanka, Malvazija in Laški rizling, kjer so bile vrednosti skozi vso rastno sezono zelo visoke. Največje razlike med posameznimi trsi so se kazale pri sorti Refoš, od katerih so bile največje v Komnu. Pri rastlinah sorte Volovnik iz Lož smo opazili visoke koncentracije virusa v vzorcih, analiziranih januarja (Slika 23).



Slika 23: Grafični prikaz povprečnih vrednosti spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA s standardnimi deviacijami za virus GFLV, 1 uro po dodatku substrata, pri petih različnih sortah vinske trte iz osmih lokacij na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono 2008 (mladi deli rastline) in januarja 2009 (olesenele rozge). Puščica prikazuje dvakratno vrednost negativne kontrole. Številke v oklepajih pomenijo število testiranih trsov posamezne sorte in lokacije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja serološka imunoencimska metoda ELISA. Dobre lastnosti te metode so, da je poceni, hitra in dokaj občutljiva. Eden izmed problemov določanja virusa GFLV v tkivih rastline vinske trte je, da je določanje s testom ELISA lahko v nekaterih delih sezone nezanesljivo (Bovey in sod., 1980; Rowhani in sod. 1992). Razlog je predvsem v neenakomerni porazdelitvi virusa po rastlini in sezonskih spremembah virusnih koncentracij (Bouyahia in sod., 2003). Za določanje virusa GFLV s testom ELISA je tako pomembno najti najprimernejše tkivo vinske trte, kot tudi najprimernejši čas rastne sezone za vzorčenje, pri katerem dobimo najvišje izmerjene spektrofotometrične vrednosti (Rowhani in sod., 1992).

ELISA je semikvantitativna metoda, pri kateri spektrofotometrični odčitki niso vedno primerljivi z dejansko koncentracijo virusa v vzorcu predvsem zaradi možnosti pojava inhibicije reakcije antigen – protitelo. Da bi izključili možnost inhibicije, smo izbrane vzorce redčili v ekstrakcijskem pufru za vinsko trto (Walter in Etienne, 1987) ter ugotovili, da pri njih ni prihajalo do inhibicije, zato smo lahko nizke spektrofotometrične vrednosti pripisali nizki vsebnosti virusa, visoke pa visoki vsebnosti virusa (Slike 6-8).

Prisotnost virusa GFLV smo dokazali pri vseh 54 trtah, kjer je bil virus že predhodno dokazan s testom ELISA, medtem ko virusa nismo določili v 10 trtah, ki so bile na podlagi predhodnih raziskav določene kot z virusom GFLV neokužene trte, kar dokazuje, da je naša metoda dobro in pričakovano delovala.

5.1.1 Razporeditev virusa GFLV po rastlini

S testom ELISA smo prisotnost virusa GFLV dokazali v vseh testiranih delih vinske trte: mladih in starejših listih, floemu, viticah, koreninah, cvetu in grozdju skozi vso rastno sezono (Slika 21), pri čemer smo najvišje spektrofotometrične vrednosti izmerili junija v mladih poganjkih (mladi listi in vitice). V mladih listih in viticah smo skozi vso rastno sezono določili visoke spektrofotometrične vrednosti, kar se ujema z rezultati predhodnih raziskav (Walter in Etienne, 1987; Rowhani in sod., 1992; Bouyahia in sod., 2003). Iz tega lahko sklepamo, da so zelena hitro rastoča tkiva najbolj primeren rastlinski material za dokazovanje virusa GFLV s testom ELISA (Slika 9).

Tudi starejši listi so se izkazali kot dober rastlinski material za dokazovanje virusa GFLV s testom ELISA skozi vso rastno sezono, kljub nekoliko nižjim vsebnostim virusa kot v mladih poganjkih. Virus nismo mogli dokazati le v starejših listih in viticah trsa Refošk

26 6/4 meseca junija (Slika 10, Slika 18), pri čemer sklepamo, da je šlo za napako pri vzorčenju, saj omenjena trs stoji ob zdravem trsu s katerim imata zelo prepređene rozge in smo posledično verjetno vzorčili napačni, zdravi trs.

V mladih listih, viticah, starejših listih in floemu smo zaznali manjši ali večji padec količine virusa sredi rastne sezone (avgusta) (Slika 21).

Manjši padec količine virusa proti koncu rastne sezone pri viticah bi lahko pripisali njihovi olesenitvi, medtem ko smo v začetku rastne sezone vzorčili še zelene, neolesenele vitice. Ko vitica zadane ob kak predmet, se spiralasto ovije in oleseni. Če pa pri svojem razvoju ne najde opore, ostane zelena dokler se končno ne posuši in odpade (Colnarič in sod., 1985) (Slika 12).

V floemu je med rastno sezono količina virusa izrazito padla, v nekaterih primerih tudi pod mejo določljivosti. Tako je bila znotraj rastne sezone veliko nižja kot v zelenih, aktivno rastočih delih rastlin. Povišanje vsebnosti virusa v floemu med avgustom in septembrom nakazuje na ponovno rast koncentracije virusa v floemu proti koncu rastne sezone, z najvišjimi vrednostmi izven (januarja) ter v začetku (junija) rastne sezone (Slika 11).

Ta opažanja nam morda orisujejo prerazporejanje virusa po rastlini. V pomladnih mesecih so koncentracije virusa v aktivno rastočih delih rastlin, kjer so ugodni pogoji za hitro pomnoževanje virusa, največje. V jesenskih mesecih so koncentracije virusa največje v olesenelih poganjkih, kjer virus najverjetneje prezimi.

Velika nihanja količine virusa v floemu med rastno sezono in izven nje se ne ujemajo z opažanji iz leta 1992, ko so Rowhani in sod. pri testiranju floema poganjka skozi rastno sezono dobili konstantne in zanesljive rezultate. Zato v nasprotju z Rowhani in sod. (1992), za določanje virusa GFLV, na podlagi naših rezultatov, odsvetujemo vzorčenje floemskega tkiva med rastno sezono ter priporočamo njegovo vzorčenje izven rastne sezone (Slika 11).

Pri vseh testiranih delih vinske trte, z izjemo v grozdju, smo avgusta izmerili najnižje spektrofotometrične vrednosti (Slika 21). Rowhani in sod. (1992) so si nizke vrednosti avgusta razlagali z neugodnimi vplivi visokih temperatur in pomanjkanjem padavin, ki naj bi vplivale na zmanjšanje podvojevanja virusa GFLV. Povprečne mesečne temperature so bile junija in julija v primerjavi z avgustom na Biljah in Godnjah primerljive brez večjih razlik (Bilje: junij 21,2 °C, julij 22,5 °C in avgust 22,3 °C; Godnje: junij 19,8 °C, julij 21,1 °C in avgust 21,1 °C) (Priloga A2). Večje razlike pa smo med julijem in avgustom opazili v količini padavin in v trajanju sončnega obsevanja na obeh merilnih postajah. Avgusta je bila v primerjavi z julijem na obeh lokacijah izmerjena manjša količina padavin ob daljšem sončnem obsevanju. Julija je bilo na Biljah izmerjenih 245,3 mm padavin, na Godnjah pa

171, 3 mm, trajanje sončnega obsevanja je bilo na Biljah 292,7 ur in na Godnjah 294,3 ur. Na Biljah so avgusta izmerili 72,9 mm padavin, sončno obsevanje je trajalo 323,8 ur, na Godnjah je bilo izmerjenih 149,3 mm padavin in 330,1 ur sončnega obsevanja. Podatki kažejo na to, da bi lahko daljše trajanje sončnega sevanja in pomanjkanje padavin v avgustu negativno vplivalo na podvojevanje virusa GFLV v rastlinah, temperature pa v našem primeru ne kažejo večjega vpliva na pomnoževanje virusa (Priloga A2).

Pri rastlinah sorte Refošk iz Komna junija v cvetovih nismo določili virusa, medtem ko je bila njegova vsebnost visoka pri ostalih štirih trtah. Za ta pojav nimamo obrazložitve. Cvetovi so začeli po oploditvi kmalu rasti v zelene plodove jagod. Najzanesljivejše in visoke spektrofotometrične vrednosti smo v grozdu izmerili julija, medtem ko so avgusta in septembra vrednosti padale. Ta trend bi lahko pripisali aktivnemu namnoževanju virusa v zelenih jagodah in nato prenehanju namnoževanja v času dozorevanja. Pri tem bi količina virusa v jagodi lahko ostala enaka, vendar ker sta se velikost in teža jagode povečali, se je količina virusa v enaki količini testiranega materiala (številčno je bilo v zatehti manj jagod) sorazmerno zmanjšala.

Jagoda je od zunaj obdana s kožico, ki je sestavljena iz povrhnjice in kutikule, znotraj pa so meso in pečke. Meso sestavljajo okrogle parenhimske celice, ki imajo tanko citoplazmo in se delijo tangencialno (Colnarič in sod., 1985). Pri zrelih jagodah v analizo nikoli nismo zajeli pečk, medtem ko smo jih pri manjših zelenih jagodah zajeli skoraj vedno. Pri vzorčenju grozdja bi bilo torej zanimivo ločiti še kožico, meso in pečke ter testirati vsak del grozda posebej ter tako določiti razporeditev virusa GFLV v samem grozdu. Z našimi rezultati smo potrdili opazovanja iz leta 1992, ko so Rowhani in sod. zasledili najvišje spektrofotometrične vrednosti virusa v nezrelih jagodah na začetku rastne sezone (Slika 14).

Na podzemnem delu trsa se razvijejo tri vrste korenin: gornje, srednje ali stranske in spodnje ali glavne korenine. Koreninski sistem rastlin sestavljajo stare in mlade korenine. Trs vse življenje razvija mnogo mladih koreninic, hkrati pa naravno odmira del korenin, ki je odslužil. Mlade koreninice, ki ne odmrejo, dobijo sekundarno strukturo in se pokrijejo s plutasto plastjo. Med ksilemom in floemom nastaja nepretrgana plast meristemskih celic ali kambij, tako se v lesu vsako leto naredi en prstan in korenine se debelijo. Kljub temu, da količine virusa v koreninah skozi sezono niso bile ponovljive in primerljive med posameznimi trsi, smo najvišje spektrofotometrične vrednosti v koreninah določili julija in septembra, najnižje pa avgusta. Razlog za veliko variiranje izmerjenih vrednosti bi bil lahko v tem, da je nabiranje korenin težavno (suha zemlja, težko dostopne korenine), še posebej težko dostopne so mlade korenine. Posledično smo vzorčili različne tipe korenin, pri čemer je bila homogenizacija pri starejših, olesenelih koreninah zahtevnejša in verjetno manj učinkovita kot pri mladih. Prav tako pa je mogoče, da so vsebnosti virusa v različnih

tipih korenin različne, vendar nimamo informacije, katere in koliko testiranih korenin je bilo mladih oziroma olesenelih in zato tega ne moremo dokazati.

5.1.2 Določanje prisotnosti virusa GFLV

Na vseh osmih lokacijah, kjer smo določali virus v mladih poganjkih skozi rastno sezono, smo najvišje povprečne spektrofotometrične vrednosti z minimalnimi odstopanji med vzorci, ne glede na sorto trsa, izmerili v začetku rastne sezone (junija) (Slika 22), kar potrjuje ugotovitve predhodnih raziskav (Rowhani in sod., 1992). Ker so bile junija izmerjene povprečne spektrofotometrične vrednosti povsod najvišje, julija pa še vedno zelo visoke (Slika 22), lahko izključimo negativen vpliv okolja (spomladanske pozebe, ...) na vsebnost virusa v začetku rastne sezone.

Razlog za večji ali manjši padec količine virusa v mladih poganjkih proti koncu rastne sezone bi lahko bil v staranju obstoječih poganjkov in vedno redkejšem nastajanju novih mladih poganjkov, ki kot kaže, favorizirajo virusno namnoževanje, večinoma zalistnikov brez vitic, ter daljšem sončnem obsevanju in nižji količini padavin (Priloga A2).

Velike ali majhne znotraj-sortne razlike v količini virusa, bi bile lahko posledica: prisotnosti ogorčic v zemlji, različnega izvora in lastnosti genotipov posameznih trsov, prisotnosti različnih genotipov virusa GFLV ali kombinacije okužb z različnimi virusi oz različni istega virusa ter lokacije s specifično mikroklimo in podlago.

Majhne razlike v količini virusa med sortami: Župlanka, Malvazija in Laški rizling bi bile lahko posledica obnavljanja naštetih sort z nastajanjem novih mladih poganjkov skozi celo rastno sezono (Slika 23). Saj v nasprotju z njimi, pri sorti Refošk iz vseh treh lokacij in pri sorti Volovnik proti koncu rastne sezone skoraj nismo našli mlajših listov.

Hipoteza o vplivu ogorčic, prisotnih v vinogradih s sortami Župlanka, Malvazija in Laški rizling (Kromberk in Vrhpolje 1,2), na stimulacijo obnove trsa s stalnim objedanjem korenin, ne stoji na trdnih temeljih, saj smo pri trsih sorte Refošk iz Dutovelj, kjer so ogorčice tudi prisotne, zaznali velike razlike v vsebnosti virusa med posameznimi trsi proti koncu rastne sezone (slika 23).

Kot kaže tudi izvor in lastnost genotipov trsov, kot tudi genotipov virusa GFLV nima vpliva na razlike v količini virusa med trtami znotraj iste sorte, saj smo pri sorti Refošk iz Komna opazili velike razlike med trsi, kljub temu, da so potomke iste matične rastline in so posledično okužene z istimi različni virusa GFLV (Blas, 2006), ki se zaradi odsotnosti prenašalca, do sedaj niso spremenili (Vojvoda, 2005). Po drugi strani pa je genetska raznolikost virusa GFLV med trsi sort Malvazija, Župlanka in Laški rizling zelo velika (Vojvoda, 2005), rastline pa kljub temu ne kažejo večjih razlik v količini virusa.

Manjše količine virusa v trsih sorte Refošk iz Komna kot v trsih iste sorte iz drugih lokacij si razlagamo z manj agresivnimi virusnimi genotipi, s katerimi so ti trsi okuženi (Slika 23, Priloga A3).

Težko bi zagotovo trdili, da ima lokacija s svojo podlago in vremensko sliko bistven vpliv na količino virusa v trsih iste sorte, kljub temu, da smo opazili, da so imeli trsi iz Vipavske doline (Kromberk in Vrhpolje 1,2) večje koncentracije virusa in zato manjša nihanja proti koncu sezone, kot trsi iz Krasa (Malinkovci, Krajna vas, Komen, Dutovlje). Vendar so trsi sorte Volovnik iz Lož (Vipavska dolina), kazali ravno nasprotno, zelo velika nihanja v količini virusa. O vplivu mikroklima pa nimamo podatkov.

Splošne povezave med različnimi bolezenskimi znamenji na posameznih trsih in nihanjem količine virusa v mladih poganjkih med sezono, ni bilo opaziti. Volovnik je bila edina sorta, pri kateri smo zaznali očitno povečanje količine virusa v floemu izven rastne sezone v primerjavi s količino v mladih poganjkih med rastno sezono. To bi lahko povezali z izrazitejšimi bolezenskimi znamenji, ki jih rastline sorte Volovnik kažejo na steblih, v primerjavi z drugimi sortami, medtem ko imajo liste brez bolezenskih znamenj.

5.2 SKLEPI

V vseh testiranih delih z virusom GFLV okuženih rastlin smo, s testom ELISA, v vseh delih sezone dokazali prisotnost virusa GFLV, v večini analiziranih vzorcev. V 12,4 % vseh analiziranih vzorcev virusa nismo mogli dokazati.

Najvišje koncentracije virusa smo izmerili v začetku sezone v mladih listih, viticah, starejših listih in nezrelem zelenem grozdju, 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 dober material za določanje virusa GFLV izven rastne sezone.

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

Količina virusa v mladih poganjkih posameznih trsov skozi sezono je najverjetneje odvisna od sorte ter kombinacije različkov virusa GFLV, ni pa odvisna od prisotnosti ogorčic v zemlji vinograda ter različnih genotipov trsov iste sorte. Možno je tudi, da lokacija in mikroklima posameznega trsa tudi vplivata na količino virusa v rastlini.

Klimatske razmere v okolju, predvsem manjša količina padavin in daljše sončno obsevanje, pozitivno korelirajo z manjšo količino virusa GFLV sredi rastne sezone. Ne moremo trditi ali gre za neposreden vpliv na namnoževanje virusa ali za posreden vpliv preko zmanjšane rasti mladih poganjkov v tem obdobju.

Sklepamo, da je povečana količina virusa izven rastne sezone, v floemu trsov sorte Volovnik direktno povezana z izrazitimi bolezenskimi znamenji, ki jih ta sorta kaže na steblu poganjka.

6 POVZETEK

Virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) povzroča bolezen imenovano kužno izrojevanje vinske trte, katere posledice so zmanjšanje pridelka in njegove kakovosti, ter tudi propad trsov. Je eden ekonomsko najpomembnejših virusov, ki okužuje vinsko trto. Ime je dobil po enem od bolezenskih znamenj, ki jih lahko povzroča na listih t.i. pahljačasti listi imajo široko odprte peceljne sinuse in nenormalno, skoraj vzporedno razporeditev žil, kar daje listu pahljačasto obliko. Virus se prenaša preko okuženega sadilnega materiala ter s talno ogorčico (*Xiphinema index*). Načini preprečevanja okužbe so zatiranje talnih ogorčic, sajenje zdravih podlag in cepičev ali uporaba transgenih vinskih trt, ki vsebujejo zapis za plaščni protein GFLV. Za določanje virusa GFLV se v največji meri uporablja serološka imunoencimska metoda ELISA. Eden izmed problemov te metode je določanje virusa GFLV v tkivih vinske trte, ki je lahko v nekaterih delih sezone nezanesljivo. Razlog je predvsem v neenakomerni porazdelitvi virusa po rastlini in sezonskih spremembah koncentracije virusa, pri čemer lahko te padejo pod prag določljivosti testa ELISA.

Cilj diplomskega dela je bil najti najprimernejše tkivo vinske trte, kot tudi najprimernejši čas sezone za določanje virusa GFLV v tkivih vinske trte s testom ELISA ter določiti prisotnost in razporeditev virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) v različnih delih rastline (mladi, starejši listi, vitice, floem poganjka, korenine, grozd) na 6 izbranih trsih vinske trte (*Vitis vinifera* L.) na treh različnih lokacijah na Krasu in v Vipavski dolini skozi rastno sezono.

Ugotovili smo, da zelena hitrorastoča tkiva v začetku rastne sezone (mladi listi, starejši listi, vitice ter zelene jagode) vsebujejo največje koncentracije virusa GFLV in so zato najprimernejši rastlinski material za njegovo določanje. Floem poganjka je dober material za določanje virusa GFLV izven rastne sezone.

Da bi ugotovili, ali je spreminjanje količine virusa skozi sezono sortno specifično, smo testirali mlade poganjke (mlade liste, stebelne vršičke in vitice) 54 rastlin (*Vitis vinifera* L.) petih sort: Refošk, Volovnik, Malvazija, Laški rizling in Župlanka iz osmih različnih lokacij v Vipavski dolini: Lože, Vrhpolje 1 in Vrhpolje 2, Kromberk; in na Krasu: Komen, Dutovlje, Malinkovci, Krajna vas. Testirali smo jih vsak mesec skozi rastno sezono (od junija do septembra 2008). Nastrgano floemsko tkivo 36 rastlin smo testirali tudi izven rastne sezone v januarju 2009. Dodatno smo uporabili 10 trsov, ki so bili na podlagi predhodnih raziskav določeni kot z virusom GFLV neokuženi trsi, kot negativno kontrolo. Opazili smo sezonsko spreminjanje koncentracija virusa v rastlini: spomladi je koncentracija virusa največja v mladih poganjkih kjer se aktivno namnožuje, medtem ko je jeseni največja koncentracija virusa v dormantnih rozgih, kjer prezimi.

Količina virusa v mladih poganjkih posameznih trsov skozi sezono je bila najverjetneje odvisna od sorte ter različkov virusa GFLV, ne pa tudi od prisotnosti ogorčic v zemlji vinograda ter različnih genotipov trt iste sorte.

Klimatske razmere v okolju, predvsem manjša količina padavin in daljše sončno obsevanje, pozitivno korelirajo z manjšo količino virusa GFLV sredi rastne sezone.

Pri trsih sorte Volovnik iz Lož smo opazili povečano količino virusa GFLV izven rastne sezone v dormantnih rozgah. Sklepamo na direktno povezavo med količino virusa GFLV in izrazitostjo bolezenskih znamenj, ki jih ta sorta kaže na stebelu poganjka, medtem ko ima liste brez bolezenskih znamenj.

7 VIRI

- 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: 12-22
- 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
- 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
- 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.
- 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 the Grapevine (ICVG), 12-17 September, 2003, Locorotondo (Bari), Italy: extended abstracts. Locorotondo, University of Bari: 204-205
- Bovey R., Gartel W., Hewitt W.B., Martelli G.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus – like diseases of grapevines. Colour atlas of symptoms. Lausanne, Editions Payot: 181 str.
- Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483
- Colnarič J. 1980. Vinogradništvo. Ljubljana, Kmečki glas: 270 str.
- Colnarič J., Gregorič J., Hrček L., Korošec – Koruza Z. 1985. Posebno vinogradništvo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 399 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>
- Credi R. 1997. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. *Plant Disease*, 81: 1288-1292
- Crowther J.R. 1998. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). V: Molecular biomethods handbook. Walker J.M., Rapley R.(ed.) Humana Press: 595-617

- Das S., 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
- 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
- Dias, 1963; Brückbauer in Rüdel, 1961. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists.
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385>
- Edwardson J.R., Christie R.G., Purcifull D.E., Petersen M.A. 1993. Inclusions in diagnosing plant virus diseases. V: *Diagnosis of plant virus diseases*. Matthews R.E.F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 101-128
- 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.
- Frantz E.J., Walker M.A. 1995. Correlating ELISA values with the growth and yield components of GFLV infected grapevines. *Vitis*, 34(2): 131-132
- 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., Cambra M., Capote N., Jelkmann W., Kundu J., Laval V., Martelli G.P., Minafra A., Petrovic N., Pfeiffer P., Pompe – Novak M., Ravelonandro M., Saldarelli P., Stussi – Garaud C., Vigne E., Zagrai I. 2007. Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insight into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *Journal of Plant Pathology*, 89 (1): 5-12
- Gaire F., Schmitt 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: 25-36
- Garcia – Arenal F., Fraile A., Malpica J.M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6: 225-232
- Garnsey S.M., Cambra M. 1993. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). V: *Graft – transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Martelli G.P. (ed.). Rome (Italy), FAO: 140-152
- Gould A.R. and Symons R.H. 1983. A molecular biological approach to relationships among viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 21: 179–199

- Hewitt W.B., Martelli G., Dias H.F., Taylor R.H. 1970. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=28>: 6 str.
- Hewitt W.B., Raski D.J., Goheen A.C.. 1985. Nematode vector of soil – borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* 48: 586-595 Cit. po: 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
- Horvath J. 1993. Host plants in diagnosis. V: *Diagnosis of plant virus diseases*. Matthews R.E.F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 15-48
- Horvath J., Tobias I., Hunyadi K., 1994. New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus. *Horticultural Science* 26: 31-32
- Hrček L., Korošec – Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte: ilustrirani prikaz trsnega izbora za Slovenijo. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 191 str.
- 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
- 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: 178-188
- Jerman I., Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, Študentska založba: 129 str.
- 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
- Kurstak E. 1981. *Handbook of plant virus infections comparative diagnosis*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier: 943 str.
- 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
- Lazar in sod., 1990. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385>
- Maček J. 1986. Posebna fitopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Martelli G.P. 1993. Rugose wood complex. V: *Graft – transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Martelli G.P. (ed.). Rome (Italy), FAO: 45-53

- Martelli G.P. 2003. Grapevine virology highlights 200-2003. V: 14th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus – like Diseases of the Grapevine (ICVG), 12-17 September, 2003, Locorotondo (Bari), Italy: extended abstracts. Locorotondo, University of Bari: 3-10
- Martelli G. P., Savino V. 1990. Fanleaf degeneration. V: Compendium Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. Compendium of grape diseases. 4th ed. St. Paul, The American Phytopathological Society Press: 48–49
- Martelli G.P., Walter B., Pinck L. 2001. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385> : 15 str.
- Mavrič I., Ravnikar M. 1998 Uporaba imunske elektronske mikroskopije v rastlinski virologiji. V: Zbornik posveta kmetijstvo in okolje. Bled, 12. in 13. marec 1998. Rečnik M., Verbič J. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 331-336
- 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
- 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. 1970. Descriptions of plant viruses. Arabis mosaic virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=16> : 6 str.
- Murant A.F. 1985. Descriptions of plant viruses. Arabis mosaic virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=16> : 6 str.
- Naidu R.A., Hughes J.D.A. 2003. Methods for the detection of plant viral diseases in plant virology in sub - Saharan Africa. *Proceedings of plant virology*, IITA, Ibadan, Nigeria. Hughes J.D.A., Odu B.(eds.): 233-260
- Naraghi – Arani P. 2000. Analysis of the genomic complexity of grapevine fanleaf nepovirus by PCR and PFLP and the relation of this complexity to symptomatology. Thesis. Davis, University of California: 187 str.
- Naraghi – Arani P., Daubert S., Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82: 1792-1795
- Nolasco G., Santos C., Petrovic N., Teixeira Santos M., Cortez I., Fonseca F., Boben J., Nazare Pereira A.M., Sequeira O. 2006. Rupestris stem pitting associated virus isolates are composed by mixture of genomic variants which share a highly conserved coat protein. *Archives of Virology*, 151: 83-96
- O'Bannon J.H., Inserra R.N. 1990. Nematode vectors – transmission of plant viruses. *Nematology Circular* št. 178

- Osman F., Rowhani A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR(TaqMan). *Journal of Virological Methods* 133(2), 130-136.
- Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. *Compendium of grape diseases*. 4th ed. St. Paul, The American Phytopathological Society Press: 93 str.
- Petrovič N., Boben J., Ravnikar M. 2004. Laboratorijsko testiranje trsnih rumenic v Sloveniji kaže na splošno prisotnost rumenice tipa počrnelosti lesa. *Acta Agriculturae Slovenica*, 83-2: 313-322
- 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 M., 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
- Poljak M. 1998. Molekularno dokazovanje virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142
- Pompe – Novak M., Korošec – Koruza Z., Tomažič I., Klarič M., Vojvoda J., Blas M., Ravnikar M., Fuchs M., Petrovič N. 2005. Biotična raznovrstnost virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). 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: 239-243
- Quacquarelli A., Gallitelli D., Savino V., Martelli G.P. 1976. Properties of grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 32: 349-360
- Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., Meredith C.P. 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant disease*, 67: 335-339
- Rečnik M. 1998. Oskrba vinograda. *Seminarska naloga*. Šentjur, Kmetijska in gospodinjstva šola Šentjur: 27 str.
- Ritzenthaler C. 2005. Resistance to plant viruses: Old issue, new answers? *Current Opinion in Biotechnology* 2005, 16: 118-122
- Ritzenthaler C., Laporte C., Gaire F., Dunoyer P., Schmitt C., Duval S., Piequet A., Loudes A.M., Rohfritsch O., Stussi – Garaud C., Pfeiffer P. 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum- derived membranes. *Journal of Virology*, 76, 17: 8808-8819
- Ritzenthaler C., Schmitt A.C., Michler P., Stussi – Garaud C., Pinck L. 1995. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules in vivo. *Molecular Plant - Microbe Interactions*. American Phytopathological Society, 8, 3: 379-387
- 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: 2357-2365

- 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*, 31:35-44
- Rowhani A. 2002. Laboratory testing for grapevine diseases. Grape growing. By Ed Weber, UC Cooperative Extension Deborah Golino.
- 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., 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 Cit. po: 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
- Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. 1999. Handbook of plant virus diseases. Boca Raton (Florida), CRC Press: 553 str.
- 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.
- Tomažič I. 2002. Raziskava povzročitelja bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (*Vitis* sp.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 81 str.
- Urek G., Hržič A. 1998. Ogorčice – nevidni zajedalci rastlin, fitonematologija. Ljubljana, samozaložba: 240 str.
- Urek G., 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
- Van Regenmortel M.H.V., Dubs M.C. 1993. Serological procedures. V: Diagnosis of plant virus diseases. Matthews R.E.F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 159-214
- Van Regenmortel M. H. W., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., Mc Geoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (ur.). 2000. Virus taxonomy. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academica Press: 697-701.
- 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 naturally occurring recombinant isolate of Grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology*, 150: 2241-2255

- 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: 165-179
- 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: 1771-1776
- 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., Lešnik M. 2005. Vinogradništvo. 2. Natis. Ljubljana, Kmečki glas: 360 str.
- Walter B., Etienne L. 1987. Detection of the grapevine fanleaf virus away from the period of vegetation. *Journal of Phytopathology*, 120: 355-364

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Maji Ravnikar za vse nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Moja zahvala velja Urški Čepin in doc. dr. Maruši Pompe Novak, ki sta si vedno vzeli čas in mi pomagali pri izvedbi in izdelavi diplomske naloge.

Hvala vsem iz Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri terenskem in laboratorijskem delu diplomske naloge.

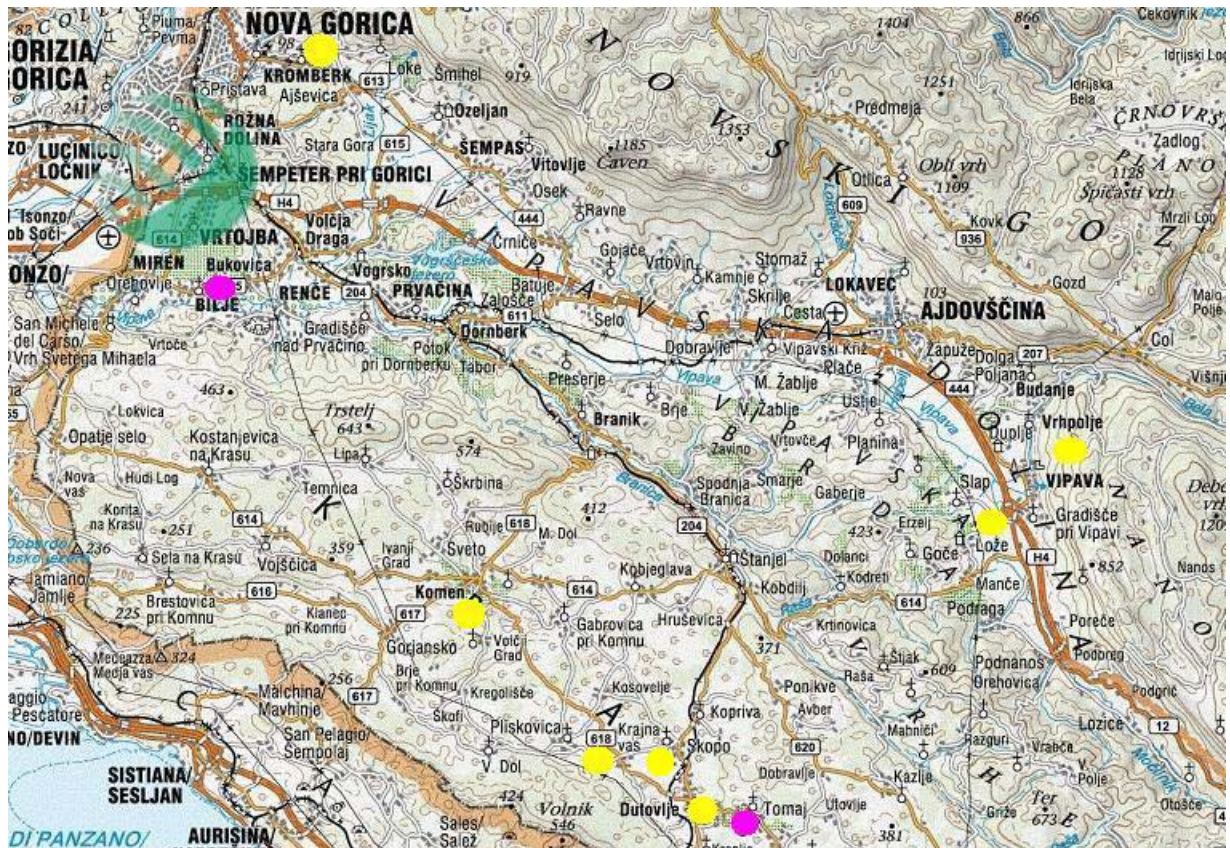
Članicama komisije se zahvaljujem za hiter pregled diplomske naloge ter uporabne nasvete.

Hvala mami in domačim za podporo in spodbudo v času študija.

Hvala prijateljem, ki so mi vedno stali ob strani in verjeli vame.

PRILOGE

Priloga A 1: Geografski prikaz lokacij vzorčenja vinske trte. Lokacije so označene z rumenimi pikami, medtem ko sta vremenski postaji Bilje in Godnje označeni z roza pikami (Vir: Ministrstvo za okolje in prostor – Agencija republike Slovenije za okolje)



Priloga A 2: Povprečni mesečni vremenski podatki za glavno meteorološko postajo Bilje in klimatološko postajo Godnje od januarja 2008 do januarja 2009. (Vir: meteo.si, ARSO 2010)

	zemljepisna dolžina	zemljepisna širina	višina (m)	januar 2008			februar 2008			marec 2008			april 2008		
				povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)
Bilje	13,6	45,9	55	5,3	121,2	76,6	4,9	44,7	147,3	7,7	106,5	113,6	11,7	150,6	160,7
Godnje	13,8	45,8	320	4,9	129,5	73,7	4,1	44,8	159,9	6,4	111	112,9	10,3	197,7	154,4

	zemljepisna dolžina	zemljepisna širina	višina (m)	maj 2008			junij 2008			julij 2008			avgust 2008		
				povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)
Bilje	13,6	45,9	55	17,6	90,6	244,8	21,2	89,3	229,9	22,5	245,3	292,7	22,3	72,9	323,8
Godnje	13,8	45,8	320	16,1	60,1	245,2	19,8	81,9	241,4	21,1	171,3	294,3	21,1	149,3	330,1

	zemljepisna dolžina	zemljepisna širina	višina (m)	september 2008			oktober 2008			november 2008			december 2008			januar 2009		
				povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)	povp. T (°C)	količina padavin (mm)	trajanje sončnega obsevanja (h)
Bilje	13,6	45,9	55	16,5	70,6	199,3	13,4	124,1	150,5	8,5	193,7	94,9	4,8	291,4	102,1	3,6	86,5	115,5
Godnje	13,8	45,8	320	15,4	38,9	192,7	12,8	81,5	144,1	7,8	168,2	92,4	3,8	248,2	96,4	2,4	76,1	123,7

Priloga A 3: Povprečni spektrofotometrični odčitki testa ELISA za virus GFLV v posameznih trsih vseh sort pri odčitavanju po 1 uri in 2 urah. Znak (/) pomeni, da trte nismo vzorčili. Z vijolično barvo so pobarvani razdelki s spektrofotometričnimi odčitki večjimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole, z zeleno barvo pa razdelki s spektrofotometričnimi odčitki manjšimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole.

lokacija	trs	prisotnost GFLV	junij		julij		avgust		september		januar	
			1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h
Lože	Volovnik 2/45	+	3	3	3	3	2,9955	3	1,48	3	2,9865	2,984
	Volovnik 2/46	+	3	3	3	3	3	3	1,086	2,5975	3	3
	Volovnik 2/47	+	2,9165	3	3	3	3	3	1,4355	3	3	3
	Volovnik 2/49	+	3	3	3	3	3	3	0,2885	0,618	3	3
	Volovnik 2/50	+	3	3	3	3	3	3	2,6175	3	3	3
	Volovnik 2/51	+	3	3	3	3	1,705	3	0,401	0,9	2,403	3
	Volovnik 2/52	+	3	3	3	3	3	3	0,818	1,9015	1,987	2,986
	Volovnik 2/53	+	3	3	3	3	0,1375	0,233	1,2905	3	3	3
	Volovnik 2/54	+	3	3	3	3	2,97	3	2,483	3	2,4155	3
	Volovnik 2/55	+	3	3	3	3	3	3	2,126	3	3	3
Komen	Refošk 26 5/120	+	3	3	2,856	3	3	3	2,3175	3	2,3	3
	Refošk 26 5/122	+	3	3	3	2,982	2,9835	3	/	/	/	/
	Refošk 26 6/1	-	0,08	0,0865	0,071	0,0775	0,067	0,0775	0,0705	0,0755	0,0615	0,0645
	Refošk 26 6/2	+	3	3	2,2055	3	3	3	0,595	1,4835	1,2345	2,7485
	Refošk 26 6/3	-	0,0675	0,0705	0,0795	0,09	/	/	/	/	0,0625	0,0645
	Refošk 26 6/4	+	3	3	3	3	0,5655	1,151	2,9025	3	0,3315	0,675
	Refošk 26 6/5	-	0,0745	0,078	0,0895	0,1065	0,0635	0,072	0,073	0,0785	0,0655	0,0665
	Refošk 26 6/6	+	3	3	/	/	0,1505	0,2605	0,2515	0,5435	0,771	1,659
Malinkovci	Refošk 26 6/7	-	0,08	0,0855	0,072	0,081	0,069	0,083	/	/	0,0615	0,062
	Refošk KE 1 10/2	+	3	3	3	3	0,876	1,8255	2,124	3	2,346	3
	Refošk KE 3 10/1	+	3	3	3	3	2,8195	3	3	3	1,949	3
	Refošk KO 1 11/88	+	3	3	3	3	3	3	0,9435	2,2405	2,1335	3
	Refošk KV 20 11/10	+	3	3	3	3	0,881	1,828	0,961	2,3045	1,9935	2,953
	Refošk KV 20 11/12	+	3	3	3	3	2,6765	3	2,913	3	1,8855	3

Krsmanović, S. Razporeditev in določanje virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) skozi sezono.
Dipl.delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2010

lokacija	trs	prisotnost GFLV	junij		julij		avgust		september		januar	
			1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h
Malinkovci	Refošk KV 22 11/21	+	3	3	3	3	1,791	3	1,7025	3	2,517	3
	Refošk KZ 6 11/67	+	3	3	3	3	3	3	2,474	3	2,977	2,98
	Refošk KZ 10 11/82	+	3	3	3	3	3	3	2,5955	3	1,7305	3
	Refošk V 1 11/93	-	0,081	0,0925	0,083	0,0955	0,0715	0,0785	0,0685	0,0755	0,0655	0,068
Krajna vas	Refošk KV 20/1	+	3	3	3	3	3	3	1,192	2,642	2,4795	3
	Refošk KV 20/2	+	3	3	3	3	3	3	1,444	3	1,3125	2,982
Dutovlje	Refošk DU 1/1	-	0,0725	0,08	0,0825	0,096	0,074	0,102	0,0715	0,0765	/	/
	Refošk DU 1/20	+	3	3	3	3	2,968	3	2,2095	3	/	/
	Refošk DU 2/18	+	3	3	3	3	3	3	2,689	3	/	/
	Refošk DU 2/19	+	3	3	3	3	2,3465	3	1,665	3	/	/
	Refošk DU 2/20	+	3	3	2,3785	3	1,5005	3	0,42	0,9115	/	/
	Refošk DU 2/25	-	0,0745	0,086	0,073	0,0835	0,0775	0,102	0,0725	0,0815	/	/
	Refošk DU 2/77(-1)	-	0,079	0,0875	0,0785	0,091	0,075	0,101	0,0725	0,077	/	/
	Refošk DU 2b/6	+	3	3	1,7095	3	1,451	3	0,365	0,803	/	/
	Refošk DU ¾	+	3	3	3	3	2,2325	3	2,8115	3	/	/
	Refošk DU 3/13	+	3	3	3	3	3	2,9795	3	3	/	/
	Refošk DU 4/3	+	3	3	3	3	3	3	2,8655	3	/	/
	Refošk DU 9/80(-1)	-	0,0785	0,0835	0,069	0,075	0,0655	0,0735	0,071	0,0765	/	/
	Refošk DU 10/1	-	0,0765	0,0845	0,076	0,0845	0,0815	0,119	0,07	0,074	/	/
Vrhoplje 1	Laški Rizling 4/28	+	3	3	3	3	3	3	2,2615	3	/	/
	Laški Rizling 4/29	+	3	3	3	3	2,975	3	2,3725	3	/	/
	Laški Rizling 4/30	+	3	3	3	2,9635	3	2,937	1,923	3	/	/
	Laški Rizling 5/31	+	3	3	3	2,997	3	3	3	3	/	/
	Laški Rizling 5/32	+	3	3	3	3	3	3	2,906	3	/	/

Krsmanović, S. Razporeditev in določanje virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) skozi sezono. Dipl.delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2010

[illegible]

Priloga A 4: Povprečni spektrofotometrični odčitki testa ELISA za virus GFLV v posameznih delih trsov sort Volovnik iz Lož in Refošk iz Dutovelj in Komna pri odčitavanju po 1 uri in 2 urah. Znak (/) pomeni, da trte nismo vzorčili. Z vijolično barvo so pobarvani razdelki s spektrofotometričnimi odčitki večjimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole, z zeleno barvo pa razdelki s spektrofotometričnimi odčitki manjšimi od 2-kratne vrednosti negativne kontrole.

lokacija	trs	prisotnost GFLV	junij		julij		avgust		september		januar	
			1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h
Lože	Volovnik 2/52 mlajši listi	+	3	3	3	3	2,97	3	3	3	/	/
	Volovnik 2/52 starejši listi	+	3	3	2,675	3	1,4335	3	0,396	0,897	/	/
	Volovnik 2/52 floem poganjka	+	0,2635	0,5135	0,364	0,6245	0,176	0,316	0,3545	0,7805	1,987	2,986
	Volovnik 2/52 vitice	+	3	3	3	3	2,352	3	2,2985	3	/	/
	Volovnik 2/52 korenine	+	0,0865	0,105	0,0675	0,0735	0,1065	0,1585	0,7955	1,892	1,3885	2,9495
	Volovnik 2/52 grozdje/cvet	+	3	3	1,724	2,9285	0,5725	1,221	0,122	0,2065	/	/
	Volovnik 2/55 mlajši listi	+	3	3	3	3	3	3	3	3	/	/
	Volovnik 2/55 starejši listi	+	3	3	3	3	0,525	1,127	0,4935	1,147	/	/
	Volovnik 2/55 floem poganjka	+	1,655	3	2,882	3	0,7665	1,6715	0,1025	0,161	3	3
	Volovnik 2/55 vitice	+	3	3	3	3	2,797	3	2,451	3	/	/
	Volovnik 2/55 korenine	+	2,256	3	3	3	0,703	1,485	0,968	2,3385	1,274	2,5945
	Volovnik 2/55 grozdje/cvet	+	3	3	2,932	3	0,641	1,349	0,2625	0,5505	/	/
Komen	Refošk 26 6/2 mlajši listi	+	3	3	1,53	2,7255	3	3	0,877	2,1235	/	/
	Refošk 26 6/2 starejši listi	+	3	3	2,4845	3	1,271	2,7325	0,404	0,932	/	/
	Refošk 26 6/2 floem poganjka	+	1,018	2,156	0,3775	0,6455	0,2305	0,447	0,3815	0,862	1,2345	2,7485
	Refošk 26 6/2 vitice	+	3	3	3	2,9835	2,2635	2,9815	1,3225	2,828	/	/
	Refošk 26 6/2 korenine	+	0,425	0,8385	1,3685	2,534	2,755	3	1,6445	3	0,363	0,7405
	Refošk 26 6/2 grozdje/cvet	+	0,078	0,103	2,4675	3	0,528	1,1525	0,5555	1,3005	/	/
	Refošk 26 6/4 mlajši listi	+	3	3	3	3	0,299	0,633	2,9155	3	/	/
	Refošk 26 6/4 starejši listi	+	0,0945	0,135	3	3	0,4825	1,031	2,963	3	/	/
	Refošk 26 6/4 floem poganjka	+	0,3085	0,595	0,137	0,2025	0,073	0,083	0,187	0,366	0,3315	0,675
	Refošk 26 6/4 vitice	+	3	3	3	3	0,0735	0,0805	2,1745	3	/	/
	Refošk 26 6/4 korenine	+	0,291	0,555	2,2895	3	0,1465	0,2685	0,21	0,429	0,2695	0,5435
	Refošk 26 6/4 grozdje/cvet	+	0,152	0,2655	1,846	3	0,616	1,381	0,609	1,4255	/	/

Krsmanović, S. Razporeditev in določanje virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) skozi sezono.
Dipl.delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2010

lokacija	trs	prisotnost GFLV	junij		julij		avgust		september		januar	
			1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h
Dutovlje	Refošk DU 2/19 mlajši listi	+	3	3	3	3	1,2695	2,977	3	2,964	/	/
	Refošk DU 2/19 starejši listi	+	3	3	3	3	0,8535	1,935	1,3535	2,9775	/	/
	Refošk DU 2/19 floem poganjka	+	3	3	0,269	0,4435	0,2265	0,4665	1,3565	2,9185	/	/
	Refošk DU 2/19 vitice	+	3	3	3	3	0,612	1,39	1,978	3	/	/
	Refošk DU 2/19 korenine	+	1,251	2,6555	2,0095	3	0,407	0,922	/	/	/	/
	Refošk DU 2/19 grozdje/cvet	+	3	3	3	3	1,4515	3	0,4865	1,1225	/	/
	Refošk DU 3/13 mlajši listi	+	3	3	3	3	3	3	3	3	/	/
	Refošk DU 3/13 starejši listi	+	3	3	2,987	3	2,711	3	3	3	/	/
	Refošk DU 3/13 floem poganjka	+	2,99	3	0,7925	1,432	0,332	0,7125	0,641	1,501	/	/
	Refošk DU 3/13 vitice	+	3	3	3	3	3	3	3	3	/	/
	Refošk DU 3/13 korenine	+	0,5875	1,131	3	3	0,0705	0,0815	0,562	1,31	/	/
	Refošk DU 3/13 grozdje/cvet	+	3	3	3	3	2,971	3	2,315	3	/	/