

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Leonida BALAŽIC

**KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE VIRUSA
PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV) Z METODO PCR V
REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF GRAPEVINE
FANLEAF VIRUS (GFLV) WITH REAL-TIME PCR**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije z dne 17. 6. 2009 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Maja Ravnikar in za recenzenta prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Maja Ravnikar

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Maja Ravnikar
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Leonida Balažic 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.

Leonida Balažic

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 578.85/.86:577.2.08:632.3:634.8(043)=163.6
KG virusi/virus pahljačavosti listov vinske trte/GFLV/vinska trta/bolezni vinske trte/izolacija virusne RNA/PCR v realnem času/PCR-RČ/relativna kvantifikacija
AV BALAŽIC, Leonida
SA RAVNIKAR, Maja (mentorica)/ AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2010
IN KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV) Z METODO PCR V REALNEM ČASU
TD diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 56 str., 10 pregl., 13 sl., 5 pril., 83 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Virus pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) povzroča bolezen, imenovano kužno izrojevanje vinske trte, ki se kaže na vinski trti z različnimi bolezenskimi znamenji in je odgovorna za zmanjšanje količine in kakovosti letnega pridelka. Standardna metoda za določanje virusa GFLV je DAS-ELISA, ki pa v primeru nizke koncentracije virusa ni vedno dovolj občutljiva. Zaradi tega je prišlo do razvoja občutljivejših molekularnih metod kot sta: metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času (PCR-RČ). V okviru diplomske naloge smo za določanje virusa GFLV uporabili molekularno metodo RT-PCR-RČ, s katero smo kvalitativno in kvantitativno določali virus GFLV v različnih vzorcih vinske trte. Rastlinski material vinske trte smo najprej homogenizirali in iz njih izolirali RNA, ki smo jo nato prepisali v cDNA in pomnoževali s PCR-RČ. Ugotovili smo, da je homogenizacija s sistemom Bioreba priložnejša in primernejša za preprečevanje navzkrižne okužbe med vzorci kot homogenizacija s sistemom TissueLyser. Pri primerjavi različnih načinov izolacije virusne RNA smo ugotovili, da je izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit učinkovitejša v primerjavi z izolacijo virusne RNA z lovljenjem virusov na protitelesa (IC) in s sproščanjem virusov po testu ELISA (post-ELISA virus release). Dokazali smo, da je metoda RT-PCR-RČ občutljivejša in hitrejša kot metoda DAS-ELISA, kar je izredno pomembno pri diagnostičnem delu. Pri izolaciji RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit se je pufer RLC z dodanim PVP po pričakovanjih izkazal za učinkovitejšega kot ekstrakcijski pufer za vinsko trto, ki se običajno uporablja za homogenizacijo rastlinskega materiala pri določanju virusa GFLV z metodo DAS-ELISA. Z metodo RT-PCR-RČ nam je uspelo relativno kvantificirati virus GFLV v floemskem tkivu različnih vzorcih vinske trte v različnih mesecih rastne sezone. Določanje virusa GFLV je v zgodnjem poletnem času bolj zanesljivo kot v zimskem času.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 578.85/.86:577.2.08:632.3:634.8(043)=163.6
CX viruses/grapevine fanleaf virus/GFLV/grapevine/grapevine diseases/isolation of viral RNA/real-time PCR/relative quantification
AU BALAŽIC, Leonida
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/AVGUŠTIN Gorazd (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana. Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2010
TI QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV) WITH REAL-TIME PCR
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 56 p., 10 tab., 13 fig., 5 ann., 83 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Grapevine fanleaf virus (GFLV) is the causal agent of grapevine fanleaf degeneration disease, which shows different symptoms on infected grapevines and it is responsible for lower yield and fruit quality. The conventional diagnostic assay for GFLV detection is DAS-ELISA, which in the case of low concentration of virus is not always enough sensitive. Hence molecular methods of higher sensitivity have been developed, such as polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. In our research the molecular method real-time RT-PCR was used for GFLV detection, suitable for qualitative and quantitative determination of GFLV in different samples of infected grapevines. Collected samples of grapevines were first homogenized, then RNA was extracted, transcribed to cDNA and amplified with real-time PCR. Our observations showed that homogenisation with Bioreba system was more convenient and suitable according to prevention of contamination between samples as homogenisation with TissueLyser system. In addition, RNA isolation with RNeasy Plant Mini Kit was more effective than isolation of viral RNA with post-ELISA virus release and Immunocapture (IC). We demonstrated that real time RT-PCR is more sensitive and faster than DAS-ELISA, which is very important for diagnostic work. Isolation of RNA with RNeasy Plant Mini Kit was more effective when used with RLC extraction buffer, containing additional PVP, as expected than with extraction buffer for homogenisation of grapevine material for GFLV detection with DAS-ELISA. Furthermore, real-time RT-PCR was also successfully used in relative quantification of GFLV in phloem samples of different grapevines during the season. Detection of GFLV was more reliable in early summer than in winter time.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VIRUSI, KI POVZROČAJO NAJVEČ ŠKODE NA VINSKI TRTI	3
2.2 KUŽNO IZROJEVANJE VINSKE TRTE	4
2.3 VIRUS GFLV	7
2.3.1 Splošne značilnosti virusa GFLV	7
2.3.2 Organizacija genoma in izražanje genov	8
2.3.3 Genetska variabilnost GFLV	9
2.3.4 Kontrola in omejevanje širjenja okužbe z GFLV	11
2.4 METODE ZA DOLOČANJE VIRUSA GFLV V RASTLINSKEM MATERIALU	13
2.5 IZOLACIJA RNA IZ OKUŽENEGA RASTLINSKEGA MATERIALA	14
2.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	16
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 VINOGRADI IN RASTLINSKI MATERIAL	20
3.2 ANALIZA VZORCEV	21
3.2.1 Homogenizacija rastlinskega materiala.....	21
3.2.1.1 Homogenizacija rastlinskega materiala za ekstrakte za test ELISA.....	21
3.2.1.2 Homogenizacija rastlinskega materiala za ekstrakte v pufri RLC.....	22
3.2.2 Redčenje okuženega rastlinskega materiala v zdravem rastlinskem materialu	22
3.2.3 Test DAS- ELISA	22
3.2.3.1 Obdelava podatkov testa DAS-ELISA	24
3.2.4 Izolacija RNA.....	24

3.2.4.1	Lovljenje virusov na protitelesa (Immunocapture, IC)	24
3.2.4.2	Sprostitev virusov po testu ELISA (post-ELISA virus release)	25
3.2.4.3	Izolacija RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit	25
3.2.5	RT-PCR v realnem času (RT-PCR-RČ).....	26
3.2.5.1	Enostopenjski RT-PCR-RČ	27
3.2.5.2	Dvostopenjski RT-PCR -RČ	27
3.2.5.3	Kontrole in razmere RT-PCR-RČ	28
3.2.5.4	Analiza rezultatov RT-PCR-RČ	28
4	REZULTATI.....	30
4.1	UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČANJE TEORETIČNE KONCENTRACIJE VIRUSA GFLV	30
4.2	PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI DVEH RAZLIČNIH METOD HOMOGENIZACIJE RASTLINSKEGA MATERIALA.....	31
4.3	IZOLACIJA RNA	33
4.3.1	Primerjava izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in z lovljenjem virusov na protitelesa (IC)	33
4.3.2	Primerjava izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in s sprostivjo virusov po testu ELISA	34
4.4	PRIMERJAVA METOD DAS-ELISA IN RT-PCR-RČ	36
4.4.1	Primerjava občutljivosti metod DAS-ELISA in RT-PCR-RČ	36
4.4.2	Primerjava izolacije RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit v primeru uporabe ekstraktov za test ELISA in ekstraktov v pufru RLC	37
4.5	DOLOČITEV VIRUSA GFLV V TKIVU VINSKE TRTE Z RT-PCR-RČ.....	38
4.5.1	Določitev virusa GFLV v floemskem tkivu vinske trte skozi sezono	38
4.5.2	Primerjava koncentracije virusa GFLV v listih (v rastni sezoni) in v floemskem tkivu (izven rastne sezone) vinske trte	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	41
5.1	RAZPRAVA.....	41
5.1.1	Homogenizacija rastlinskega materiala.....	41
5.1.2	Izolacija RNA.....	42
5.1.3	Primerjava različnih metod izolacije virusne RNA.....	43
5.1.4	Primerjava metod DAS-ELISA in RT-PCR-RČ	43
5.1.5	Določitev virusa GFLV v tkivu vinske trte z RT-PCR-RČ	44
5.2	SKLEPI.....	47
6	POVZETEK.....	48
7	VIRI	50
ZAHVALA		
PRILOGE.....		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam vzorcev vinske trte iz vinogradov na Krasu (Dutovlje, Komen, Malinkovci in Tomaj) in v Vipavski dolini (Lože).	20
Preglednica 2: Seznam vzorcev vinske trte iz rastlinjaka na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) v Ljubljani.....	21
Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev virusa GFLV z metodo RT-PCR-RČ.....	26
Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev kontrolnega gena COX z metodo RT-PCR-RČ.	26
Preglednica 5: Podatki za umeritveno krivuljo izolata GFLV F13.....	30
Preglednica 6: Rezultati RT-PCR-RČ za določanje gena COX v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 in homogenizirali s sistemom TissueLyser (T) in Bioreba (B).	32
Preglednica 7: Rezultati RT-PCR-RČ za določanje virusa GFLV v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 in homogenizirali s sistemom TissueLyser (T) in Bioreba (B).	32
Preglednica 8: Primerjava izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in z lovljenjem virusov na protitelesa (IC).	34
Preglednica 9: Primerjava občutljivosti metod DAS-ELISA in RT-PCR-RČ.....	36
Preglednica 10: Teoretična koncentracija virusa GFLV v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 (rastna sezona) in v floemskem tkivu vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo ga vzorčili januarja 2009 (izven rastne sezone)..	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Zraslost poganjkov na vinski trti, okuženi z GFLV.	5
Slika 2: Bolezenska znamenja na listih vinske trte.	6
Slika 3: Redkejši grozdi pri vinski trti, okuženi z GFLV.	6
Slika 4: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditev genov na RNA1 in RNA2 (Andret-Link in sod., 2004a).	8
Slika 5: Princip PCR-RČ s fluorogeno molekulo SYBR Green I (Arya in sod., 2005: 212).	16
Slika 6: Princip PCR-RČ s dvojno označeno oligonukleotidno TaqMan sondo (Arya in sod., 2005: 210).	17
Slika 7: Graf pomnoževanja tarčne molekule z metodo PCR-RČ (Arya in sod., 2005: 211).	18
Slika 8: Umeritvena krivulja, izrisana iz rezultatov redčitev RNA izolata GFLV F13.	31
Slika 9: Primerjave izolacije virusne RNA s sprostitevjo virusov po testu ELISA in s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz listov različnih vzorcev vinske trte, vzorčenih julija 2009.	35
Slika 10: Grafični prikaz teoretične koncentracije virusa GFLV v ekstraktih listov za test ELISA in ekstraktih listov v pufru RLC različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili septembra 2008 in testirali z metodo RT-PCR-RČ.	37
Slika 11: Grafični prikaz relativne količine virusne RNA (R) v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte skozi rastno sezono 2008 (junij, julij, avgust in september) in izven rastne sezone 2009 (januar).	39
Slika 12: Primerjava učinkovitosti različnih metod izolacije virusne RNA iz tkiva vinske trte.	43
Slika 13: Grafični prikaz količine virusa GFLV, določenega z DAS-ELISA, v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte skozi rastno sezono 2008 (junij, julij, avgust in september) in izven rastne sezone 2009 (januar) (Čepin in sod., 2009).	45

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Primerjava izolacije virusne RNA s sprostivijo virusov po testu ELISA in s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz listov različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili julija 2009 in testirali z enostopenjskim RT-PCR-RČ.
- Priloga B:** Izolacija RNA iz ekstraktov listov različnih vzorcev vinske trte za test ELISA, ki smo jih vzorčili septembra 2008 in testirali z enostopenjskim RT-PCR-RČ.
- Priloga C:** Izolacija RNA iz ekstraktov listov v pufri RLC različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili septembra 2008 in testirali z enostopenjskim RT-PCR-RČ.
- Priloga D:** Relativna kvantifikacija virusa GFLV v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili skozi rastno sezono 2008 in izven rastne sezone 2009.
- Priloga E:** Teoretična koncentracija virusa GFLV v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 (rastna sezona) in v floemskem tkivu vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo ga vzorčili januarja 2009 (izven rastne sezone).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ArMV	virus mozaika repnjaka (<i>Arabidopsis mosaic virus</i>)
bdH ₂ O	deionizirana voda
BMMV	virus blagega mozaika ječmena (<i>Barley mild mosaic virus</i>)
BNYW	virus nekrotičnega rumenenja listnih žil pese (<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>)
BYMV	virus rumenega mozaika ječmena (<i>Barley yellow mosaic virus</i>)
cDNA	komplementarna DNA
COX	citokrom oksidaza
CP	plaščni protein (coat protein)
Ct	cikel, pri katerem ΔR_n preseže določen prag (threshold cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleotid
DAS-ELISA	metoda dvojnega sendviča ELISA (double antibody sandwich ELISA)
DASI-ELISA	indirektna DAS-ELISA (indirect DAS-ELISA)
DB	direktna vezava (direct binding)
E	učinkovitost pomnoževanja v reakciji PCR-RČ
ELISA	encimsko imunosorpcijski test (enzyme linked immunosorbent assay)
FAM	6-karboksifluorescin
GFkV	flek virus (<i>Grapevine fleck virus</i>)
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte (<i>Grapevine fanleaf virus</i>)
FP	začetni oligonukleotid (forward primer)
RP	začetni oligonukleotid (reverse primer)
GLRaV	virus zvijanja listov vinske trte (<i>Grapevine leafroll associated virus</i>)
GVA	virus vinske trte A (<i>Grapevine virus A</i>)
GVB	virus vinske trte B (<i>Grapevine virus B</i>)
GRGV	<i>Grapevine red gloe virus</i>
GVCC	kompleks razbarvanja žil vinske trte (<i>grapevine vein-clearing complex</i>)
IC	lovljenje virusa na protitelesa (immunocapture)
MGB	molekula, ki se veže na DNA (minor groove binder)
MP	gibalni protein (movement protein)
ORF	odprt bralni okvir (open reading frame)
OD	optična gostota (optical density)
NTC	kontrola navzkrižne okužbe reakcijske mešanice (no template control)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PCR-RČ	PCR v realnem času (real-time PCR)
PPV	virus »šarke« (<i>Plum pox virus</i>)
PVY	krompirjev virus Y (<i>Potato virus Y</i>)
R	relativna količina virusne RNA
R ²	koeficient linearne regresije

RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
RSPaV	virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus)
RT	obratno prepisovanje (reverse transcription)
RW	bolezen razbrazdanja lesa vinske trte (rugose wood)
S	naklon umeritvene krivulje
TAMRA	6-karboksi-tetra-metilrodamin
Taq	polimeraza iz organizma <i>Thermophilus aquaticus</i>
ToMV	virus mozaika paradižnika (Tomato mosaic virus)
ToRSV	virus obročkaste pegavosti paradižnika (Tomato ringspot virus)
ΔRn	sprememba v signalu fluorescence

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) spada v rod *Nepovirus* in povzroča bolezen, imenovano kužno izrojevanje vinske trte, ki je danes razširjena po celem svetu. Ta bolezen lahko močno zmanjša letni pridelek vinske trte, lahko pa povzroči tudi popolno izgubo letnega pridelka. Produktivna življenjska doba z GFLV okuženih vinogradov se zmanjša, pridelek pa lahko upade do 80 %. Za določanje virusa GFLV je bilo do sedaj uporabljenih več različnih metod, ki temeljijo na različnih lastnosti virusa.

Standardna metoda za določanje virusa GFLV je metoda dvojnega sendviča ELISA (DAS-ELISA), ki pa v primeru nizke koncentracije virusa ni vedno dovolj občutljiva. Znano je, da se količina virusa GFLV spreminja skozi sezono in v nekaterih primerih pade pod mejo določljivosti. Zaradi tega so se razvile občutljivejšje molekularne metode kot sta: metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času (PCR-RČ). Opisanih je več metod PCR za določanje virusa GFLV, vendar so vse primerne le za določanje manjšega števila GFLV izolatov. Metoda RT-PCR-RČ, ki smo jo uporabili v diplomski nalogi, je primerna za določanje večine do zdaj znanih izolatov GFLV. Občutljivost metode RT-PCR-RČ smo primerjali z občutljivostjo metode DAS-ELISA. Poleg tega smo izbrali najučinkovitejšjo metodo za izolacijo virusne RNA iz tkiva vinske trte. Z metodo RT-PCR-RČ smo kvantificirali virus GFLV v tkivu vinske trte.

1.2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela:

- primerjava učinkovitosti homogenizacije rastlinskega materiala vinske trte s sistemoma TissueLyser in Bioreba,
- primerjava učinkovitosti izolacije virusne RNA iz tkiva vinske trte s kompletom RNeasy Plant Mini Kit, z lovljenjem virusov na protitelesa (Immunocapture, IC) in s sprostitvijo virusov po testu ELISA (post-ELISA virus release),
- primerjava občutljivosti metod RT-PCR-RČ in DAS-ELISA,
- primerjava različnih ekstrakcijskih pufrov za izolacijo RNA iz tkiva vinske trte s kompletom RNeasy Plant Mini Kit,
- relativna kvantifikacija virusa GFLV v floemskem tkivu vinske trte skozi sezono (junij, julij, avgust, september in januar),
- primerjava koncentracije virusa GFLV v zelenih listih (junij) in floemskem tkivu (januar) vinske trte.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da:

- bodo različni sistemi homogenizacije rastlinskega materiala vinske trte različno učinkoviti,
- bodo različne metode izolacije virusne RNA iz tkiva vinske trte različno učinkovite,
- bomo dokazali, da je metoda RT-PCR-RČ bolj občutljiva kot metoda DAS-ELISA,
- bodo različni ekstrakcijski pufri različno učinkoviti pri izolaciji RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit,
- bomo z metodo PCR-RČ uspeli relativno kvantificirati virus GFLV v floemskem tkivu vinske trte skozi sezono,
- bo koncentracija virusa GFLV v mladih zelenih listih vinske trte junija večja kot v floemskem tkivu vinske trte januarja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VIRUSI, KI POVZROČAJO NAJVEČ ŠKODE NA VINSKI TRTI

Vinska trta je gojena rastlina, ki uspeva v mnogih državah po svetu. Tako kot vse druge rastline je tudi vinska trta izpostavljena vplivom okolja, boleznim in različnim škodljivcem (Vršič in Lešnik, 2005). Virusne bolezni veljajo za najbolj gospodarsko uničujoče med vsemi boleznimi vinske trte, saj ko je vinska trta enkrat okužena, je ni več mogoče ozdraviti (Šutić in sod., 1999). Virusi, ki okužujejo vinsko trto, se lahko prenašajo na zdrave rastline z vegetativnim razmnoževanjem in s prenašalci (Vršič in Lešnik, 2005; Pearson in Goheen, 1998). Vinsko trto okužuje vsaj 60 do zdaj znanih virusov (Martelli, 2009). Med njimi so najbolj škodljivi virusi iz rodu *Nepovirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Maculavirus*, *Vitivirus* in *Foveavirus* (Fauquet in sod., 2005).

V rod *Nepovirus* spadajo poliedrični virusi, ki se širijo s talnimi ogorčicami (Bovey in sod., 1980). Spadajo v družino *Comoviridae*. Genom nepovirusov je sestavljen iz dveh verig pozitivno polarne enoverižne RNA (RNA1 in RNA 2), nekateri nepovirusi pa lahko poleg genomske RNA vsebujejo še linearno ali krožno satelitno RNA (Fauquet in sod., 2005). Najpomembnejša virusna povzročitelja bolezni, ki spadata med nepoviruse, sta virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) in virus mozaika repnjaka (Arabis mosaic virus, ArMV). GFLV se v naravi prenaša z ogorčico *Xiphinema index*, ArMV pa prenašajo ogorčice *Xiphinema diversicatum*, *Xiphinema coxi* in *Longidorus caespiticolis*. V naravi GFLV okužuje predvsem rastline iz rodu *Vitis* (Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006), medtem ko ArMV lahko okužuje širok krog naravnih gostiteljev (Bovey in sod., 1980). Bolezen, ki jo povzroča GFLV, imenujemo kužno izrojavanje vinske trte (Maček, 1990). Za okužbo z GFLV so značilna številna bolezenska znamenja, med najznačilnejšimi so deformirani listi, rumenenje listov, deformacije poganjkov v obliki dvojnih členkov in skrajšanih medčlenkov ter posledično metlast videz trsa (Pearson in Goheen, 1998). Bolezenska znamenja pri okužbi vinske trte z ArMV so zelo podobna tistim, ki jih povzroča okužba z GFLV (Bovey in sod., 1980).

Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus* uvrščamo v družino *Closteroviridae*. Virusi obeh rodov so dolge nitaste oblike in vsebujejo enojno linearno pozitivno polarno enoverižno RNA. Nekatere viruse prenašajo kaparji različnih vrst in druge žuželke, pogost pa je tudi prenos virusov s cepljenjem trsov (Fauquet in sod., 2005). V omenjeno družino spadajo virusi zvijanja listov vinske trte (Grapevine leafroll associated virus, GLRaV), ki so uvrščeni v rod *Closterovirus* ali *Ampelovirus* (Fauquet in sod., 2005). Vseh devet do sedaj odkritih virusov GLRaV (GLRaV-1 do GLRaV-9) povezujejo z boleznijo zvijanja listov vinske trte (Martelli in sod., 2002; Alkowni in Rowhani, 2003).

Rodova *Vitivirus* in *Foveavirus* spadata v družino *Betaflexiviridae* (Martelli, 2009). Virusi obeh rodov so nitaste oblike. Genom je sestavljen iz enojne linearne pozitivno polarne enoverižne RNA. V rod *Vitivirus* spada virus vinske trte A (Grapevine virus A, GVA) in virus vinske trte B (Grapevine virus B, GVB), v rod *Foveavirus* pa virus razbrazdanja lesa rupestisa (Rupestis stem pitting associated virus, RSPaV). Vsi omenjeni virusi se prenašajo z okuženim sadilnim materialom, GVA in GVB pa prenašajo še kaparji iz rodov *Pseudococcus* in *Planococcus* (Fauquet in sod., 2005). Vse tri viruse povezujejo z boleznijo razbrazdanje lesa (RW) (Martelli, 1993; Nakaune in sod., 2007). Posameznih bolezni RW v naravi zaradi pomanjkanja razlikovalnih bolezenskih znamenj zaenkrat ne moremo uspešno ločevati med seboj (Martelli, 1993).

Rod *Maculavirus* pripada družini *Tymoviridae*. Virusi tega rodu so izometrične oblike in vsebujejo linearno pozitivno polarno enoverižno RNA. V omenjeni rod spadata Grapevine red globe virus (GRGV) in flek virus (Grapevine fleck virus, GFkV), ki sta še poleg drugih virusov iz družine *Tymoviridae* povzročitelja skupine bolezni, imenovane "flek complex". Ti virusi okužujejo le vinsko trto in se nahajajo le v floemu okužene vinske trte (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

2.2 KUŽNO IZROJEVANJE VINSKE TRTE

Bolezen, imenovano kužno izrojevanje vinske trte (Maček, 1990) povzroča virus GFLV in je danes razširjena po celem svetu (Bovey in sod., 1980; Martelli, 1993; Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). V Evropi je bila ta bolezen prisotna že pred prinesenimi ameriški hibridi. Gre za najstarejšo virusno bolezen na vinski trti, ki naj bi bila prisotna na območju Sredozemlja in na bližnjem Vzhodu že od začetka gojenja vinske trte (Pearson in sod., 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Kužno izrojevanje se na vinski trti kaže z različnimi bolezenskimi znamenji, kar je posledica različnih genotipskih variant virusa (Bovey in sod., 1980), različne občutljivosti sort vinske trte (Pearson in Goheen 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006), starosti trsa, pri kateri je prišlo do okužbe in možnih interakcij z drugimi virusi, ki povzročajo podobna bolezenska znamenja (Šutić in sod., 1999).

Na različne sorte vinske trte bolezen različno vpliva. Pri tolerantnih sortah ne vpliva zelo na kakovost pridelka, medtem ko pri občutljivih sortah lahko precej zmanjša letni donos grozdja (lahko za več kot 80 %) in povzroči slabšo kakovost pridelka. Pri občutljivih sortah se močno skrajša tudi življenjska doba trsov, poveča se nezdružljivost cepičev s podlago, sadilni material se težje ukorenini in poveča se občutljivost trsov na podnebne spremembe (Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Bolezenska znamenja se lahko razvijejo na vseh organih vinske trte. Na trsih in poganjkih so lahko vidne različne deformacije kot so kratki medčlenki (internodiji), ki dosežejo kvečjemu polovico dolžine zdravih, dvojni členki oz. nasproti ležeče oko, zraslost poganjkov (slika 1), nenormalna razvejanost, kot so bifurkacije in rast cik-cak (Bovey in sod., 1980, Maček in sod., 1990; Martelli, 1993; Pearson in Goheen, 1998; Šutić in sod., 1999; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Ta bolezenska znamenja niso specifična za kužno izrojevanje, saj jih lahko povzročijo tudi drugi virusi izven rodu *Nepovirus*. Poleg tega pa lahko tudi pri zdravi vinski trti opazimo zraslost poganjkov, dvojne členke in kratke medčlenke (Bovey in sod., 1980). S skrajšanjem medčlenkov se rast močno zmanjša, tako da trsi dobijo grmičast videz, lahko pa spominjajo tudi na brezovo metlo, še posebej, ko odpadejo listi (Maček, 1990). Na okuženih trsih lahko opazimo tudi viličasto razrast (bifurkacijo) (Vršič in Lešnik, 2005) in v primerjavi z zdravimi slabše razvit koreninski sistem (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998; Šutić in sod., 1999).



Slika 1: Zraslost poganjkov na vinski trti, okuženi z GFLV.

Pri okuženih vinskih trtah so na listih opazna številna bolezenska znamenja, ki se kažejo kot deformirani listi, odprti sinusi ob listnem peclju, ostro neenakomerno nazobčani robovi listov (peteršiljavost listov), nesimetrični listi (listni polovici nista enakomerno razviti), kloroze (rumenenje) žil (slika 2), kloroze medžilnih prostorov v obliki rumenih pik, obročev ali lis ter rumenenje listov po celotni površini (slika 2) (Bovey in sod., 1980; Martelli, 1993; Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Pri listih se lahko ob okužbi z GFLV listne žile razporedijo v obliki pahljače (Maček, 1990).



Slika 2: Bolezenska znamenja na listih vinske trte. Levo – rumenenje celotnih listov, desno – rumenenje listnih žil.

Bolezen vpliva tudi na razvoj grozdov, ki so lahko manjši in redkejši (slika 3) kot pri zdravih vinskih trtah (Bovey in sod., 1980; Martelli, 1993; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Pogosto pride po cvetenju do osipa jagod. Na grozdu lahko ostane le tretjina jagod, izmed katerih je nekaj zelo debelih in veliko zelo drobnih, pogosto pa so jagode brez pečk (Maček, 1990; Vršič in Lešnik, 2005). Posledično je letni pridelek manjši in slabše kakovosti (zmanjšana vsebnost sladkorjev v grozdu) (Andret-Link in sod., 2004a) ali pa ga sploh ni (Raski in sod., 1983). Produktivna življenska doba z GFLV okuženih vinogradov se lahko zmanjša s 30-40 let, na 15-20 let (Andret-Link in sod., 2004a).



Slika 3: Redkejši grozdi pri vinski trti, okuženi z GFLV.

2.3 VIRUS GFLV

2.3.1 Splošne značilnosti virusa GFLV

Virus pahljačavosti vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) je eden izmed najpomembnejših virusov, ki okužujejo vinsko trto (Bovey in sod., 1980). Poimenovanje virusa izhaja iz posebne oblike listov okužene vinske trte, ki dajejo videz odprte pahljače. Glavni gostitelj GFLV v naravi so rastline iz rodu *Vitis* (Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). GFLV so v naravi odkrili tudi v rastlinah *Aristolochia clematitis*, *Lagenaria siceraria* in *Cynodon dactylon* (Horvath in sod., 1994, cit. po Izadpanah in sod., 2003; Izadpanah in sod., 2003).

V vinogradih se prenaša GFLV z ektoparazitno ogorčico *Xiphinema index* in okuženim sadilnim materialom (Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Ogorčice *X. index* se hranijo na konicah korenin vinske trte in živijo prosto v tleh. Med hranjenjem ogorčica *X. index* na okuženi trti poleg rastlinskih sokov zaužije tudi virusne delce GFLV, ki se vežejo na specifična mesta v prebavnem traktu ogorčice. Ko se okužena ogorčica hrani na koreninah zdrave trte, se virusni delci sprostijo iz mest v prebavnem traktu in prenesejo v vinsko trto (Urek in Hržič, 1998; Belin in sod., 2001).

Odnos med *X. index* in GFLV je zelo specifičen. Za specifično vezavo in zadrževanje GFLV v prebavilu ogorčice je odgovoren virusni plaščni protein, ki je zapisan na RNA2. Determinante, s katerimi se GFLV veže na specifična mesta v prebavilu ogorčice, so verjetno nameščene na zunanji površini virusne kapside, vendar natančen mehanizem pritrditve še ni znan (Andret-Link in sod., 2004b).

GFLV se s *X. index* prenaša le na krajše razdalje, medtem ko se na daljše razdalje GFLV prenaša z okuženim sadilnim materialom. Širjenje GFLV s sadilnim materialom po svetu se je pospešilo z uporabo ameriških podlag v Evropi, ki so odporne na listno uš. Pred tem se je verjetno GFLV širil predvsem z ogorčicami na omejenih območjih (Pearson in Goheen, 1998).

V laboratoriju lahko GFLV prenesemo z mehansko inokulacijo iz okuženega materiala vinske trte še na nekatere druge zelnate rastline npr. *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gophrena globosa* (Pearson in Goheen, 1998; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

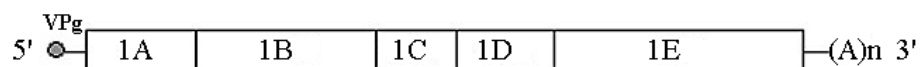
GFLV povezujejo tudi z boleznijo, imenovano kompleks razbarvanja žil vinske trte (grapevine vein-clearing complex, GVCC), ki so jo odkrili na sorti *Chardonnay*. Gre za

bolezen, ki naj bi jo povzročal kompleks treh virusov: GFLV, virusa obročkaste pegavosti paradižnika (Tomato ringspot virus, ToRSV) in virusa GRSPaV. Bolezenska znamenja, ki so značilna za GVCC, so razbarvanje žil (translucent vein-clearing), kloroze in mozaik na listih. Za okužene rastline so značilni tudi kratki medčlenki in rast cik-cak (Lunden in sod., 2010).

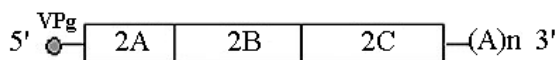
2.3.2 Organizacija genoma in izražanje genov

Genom GFLV je sestavljen iz dveh molekul pozitivno polarne enoverižne RNA, RNA1 in RNA2 (Pinck in sod., 1988), ki vsebujeta vsaka po en odprt bralni okvir (open reading frame, ORF) (Ritzenhalter in sod., 1991; Serghini in sod., 1990). Vsaka izmed obeh genomskih RNA se prepíše v posamezen poliprotein, ki ga nato specifična proteaza, kodirana na RNA1, razcepi v funkcionalne proteine (Andret-Link in sod., 2004b). Obe genomski RNA imata na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), na 3' pa se končata s poliA repom (Pinck in sod., 1988) (slika 4).

RNA 1 (7342 nt)



RNA 2 (3774 nt)



Slika 4: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditev genov na RNA1 in RNA2 (Andret-Link in sod., 2004a).

RNA1 je dolga 7342 nukleotidov. Prepíše se v poliprotein P1 z molekularno maso 253 kDa, ki 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) (Ritzenhalter in sod., 1991; Pinck in sod., 1991).

RNA2 je zgrajena iz 3774 nukleotidov in kodira poliprotein P2 velikosti 122 kDa. P2 s proteolitskim rezanjem razpade na tri funkcionalne proteine: 2A, 2B in 2C (Serghini in sod., 1990). Protein 2A sodeluje pri podvojevanju verige RNA2 skupaj s kompleksom proteinov podvojevanja, ki jih kodira RNA1 (Gaire in sod., 1999). Protein 2B je gibalni

protein (movement protein, MP), ki sodeluje pri tvorbi tubularnih struktur, s katerimi virusni delci prehajajo iz okužene v sosednje neokužene celice (Ritzenhaler in sod., 1995). Protein 2C je plaščni protein (coat protein, CP), ki sestavlja kapsido (Serghini in sod., 1990), poleg tega pa je odgovoren za specifičnost prenosa GFLV z ogorčico *X. index* (Andret-Link in sod., 2004b).

Pri genotipski varianti GFLV F13 so odkrili še dodatno, satelitno RNA, ki ima enako kot RNA1 in RNA2 na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), na 3' koncu pa poliA rep (Pinck in sod., 1988; Fuchs in sod., 1989). Satelitna RNA je dolga 1114 nukleotidov in vsebuje 1 ORF, ki nosi zapis za protein P3 z molekulsko maso 37 kDa (Fuchs in sod., 1989). Protein P3 sodeluje pri podvojevanju satelitne RNA (Hans in sod. 1993).

2.3.3 Genetska variabilnost GFLV

GFLV ima teoretično visok potencial za genetske variacije, ki so posledica dolgega zadrževanja virusa v naravnem gostitelju, nenatančne od RNA-odvisne polimeraze in odsotnosti popravljalnih mehanizmov ter rekombinacijskih dogodkov med različnimi genotipskimi variantami virusa. Vse to omogoča nastanek novih genotipskih variant ali navideznih vrst (quasispecies) (Andret-Link in sod., 2004a). Tako lahko posamezna rastlina hkrati vsebuje več različnih genotipskih variant istega virusa (Naraghi in sod., 2001; Vigne in sod., 2004b; Pompe-Novak in sod., 2007; Liebenberg in sod., 2009), kar je lahko posledica ponavljajočega prenosa posameznih variant z ogorčico *X. index*, dolgotrajne izpostavljenosti vinske trte prenašalcu *X. index* ali prenosa različnih variant GFLV s cepljenjem (Vigne in sod., 2004b).

Med genotipskimi variantami istega virusa ali med sorodnimi virusi v rastlini lahko pride do rekombinacije. Rekombinacija je izmenjava genetskega materiala med procesom podvojevanja (Garcia-Arenal, 2003). Ločimo tri tipe rekombinacije: natančno homologno, nenatančno homologno (aberrant homologous) in nehomologno rekombinacijo. Do homologne rekombinacije pride med dvema verigama RNA z enakim ali podobnim zaporedjem. Pri natančni homologni rekombinaciji se verigi prekrížata na točno določenem homolognem mestu, pri nenatančni homologni pa na drugih mestih, kar privede do nastanka hčerinske verige z delecijami, duplikacijami in insercijami. Slednja je značilna le za rekombinacije RNA. Nehomologna rekombinacija se pojavi med dvema različnima verigama RNA in je zelo redka pri rekombinacijah RNA (Lai, 1992).

Naraghi-Arani in sodelavci (2001) so na podlagi nukleotidnega zaporedja gena 2C dokazali prisotnost različnih genotipskih variant virusa GFLV v posameznih trtah v

kalifornijskih vinogradih, ki so se v nukleotidnem zaporedju gena 2C razlikovale za 11-13 % in v aminokislinskem zaporedju za 4-9 % (Naraghi in sod., 2001).

Na podlagi nukleotidnega zaporedja gena 2C so tudi Liebenberg in sodelavci leta 2009 določili genetsko variabilnost izolatov GFLV iz vinogradov Južne Afrike. Dokazali so, da so si na nukleotidnem nivoju izolati podobni v 86-99 %, na aminokislinskem pa v 94-99 % (Liebenberg in sod., 2009).

Genetsko variabilnost virusa GFLV so preučevali tudi Vigne in sodelavci (2004 a,b), ki so z analizo gena 2C 347 izolatov iz gensko spremenjenih in nespremenjenih trt dokazali, da približno polovica izolatov vsebuje več kot eno genotipsko varianto GFLV. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja 93 genotipskih variant in filogenetsko analizo so ugotovili, da 5 genotipskih variant, ki so jih izolirali iz gensko nespremenjenih trt, izstopa v filogenetskem drevesu. Pri vseh petih so dokazali, da so nastale z rekombinacijo na različnih mestih v kodirajoči regiji gena 2C. Gre za prvo odkritje pojava rekombinacije v kodirajoči regiji pri nepovirusih v naravnem gostitelju ob odsotnosti selekcijskega pritiska, ki ga običajno povzročijo eksperimentalne razmere.

Pri 93 genotipskih variantah so ugotovili, da je variabilnost na nukleotidnem nivoju znašala 0,2-13,8 %, pri aminokislinskem zaporedju pa le 0,2-6,9 %. Za gen 2C je torej značilna precejšnja genetska stabilnost. Odkritje rekombinacije v genu 2C je verjetno povezano s tem, da aminokisliline, ki so potrebne za funkcionalnost plaščnega proteina, niso bile prizadete (Vigne in sod., 2004a,b).

V nadaljnjih raziskavah so Vigne in sodelavci (2005) preučevali biološke lastnosti rekombinantnega izolata A17b, ki je eden izmed petih odkritih rekombinantnih izolatov, in jih primerjali z biološkimi lastnostmi nerekombinantnih izolatov GFLV. Izolat A17b so prenesli iz vinske trte v testno rastlino *Gomphrena globosa* in nato naprej z zaporednimi pasażami v *Chenopodium quinoa*. Na podlagi preučevanja nukleotidnega zaporedja gena 2C rekombinantnega izolata A17b v obdobju petih let, izoliranega iz vinske trte kot iz testnih rastlin, se zaporedje gena 2C ni kaj dosti spremenilo. S tem so potrdili stabilnost gena 2C. Za rekombinantni izolat A17b so dokazali tudi, da se prenaša s cepljenjem in ogorčico *X. index* ter povzroča enaka bolezenska znamenja kot nerekombinantni izolati GFLV. Rekombinantni izolat A17b v primerjavi z nerekombinantnimi izolati GFLV torej ni kazal razlik v bioloških lastnostih.

Pri določitvi nukleotidnega zaporedja celotne kodirajoče regije RNA2 rekombinantnega izolata A17b so ugotovili, da je poleg rekombinacije v genu 2C verjetno prišlo tudi do rekombinacije na območju gena 2A, vendar te niso uspeli dokazati. Z analizo nukleotidnih zaporedij so odkrili, da velikost gena 2A najbolj variira (765-774 nukleotidov in 255-258

aminokislin) glede na gena 2B in 2C. Aminokislinska podobnost je za gen 2A znašala 85-91 %, za gen 2B 98-99 % in za gen 2C 95-96 % (Vigne in sod., 2005).

Pompe-Novak in sodelavci (2007) so ugotavljali genetsko variabilnost GFLV na podlagi celotnega bralnega okvirja (ORF) RNA2 v 9 vzorcih vinske trte, sorte Volovnik. S sekvenčno analizo ORF RNA2 so dokazali, da je bilo v nekaterih vzorcih prisotnih več različnih genotipskih variant GFLV. Variabilnost na nukleotidnem nivoju RNA2 je bila različna in sicer največja pri genu 2A in 2C ter najmanjša pri genu 2B. V treh vzorcih so dokazali rekombinacijo znotraj gena 2A na mestu 220-225 (Pompe-Novak in sod., 2007).

GFLV in ArMV imata podobno organizacijo genoma (Vigne in sod., 2008), vendar sta si serološko različna. Skupaj pogosto povzročata mešano okužbo v vinogradih Srednje Evrope (Bovey in sod., 1980). Vigne in sodelavci (2008) so preučevali pojav rekombinacij med variantama GHu virusa GFLV (GFLV-GHu) in Ta virusa ArMV (ArMV-Ta), ki so ju izolirali iz vinske trte. Rekombinacijo med GHu-GFLV in Ta-ArMV so odkrili na molekuli RNA2 in sicer na nekodirajoči regiji na 5' koncu, genu 2A in 2B, medtem ko do rekombinacije ni prišlo na genu 2C in nekodirajoči regiji na 3' koncu. To kaže na dinamičen odnos med sorodnima virusoma GFLV in ArMV ter različen selekcijski pritisk na nestrukturne in strukturne proteine, ki jih kodira RNA2 (Vigne in sod., 2008). Rekombinacija med različnima vrstama virusa lahko vpliva na evolucijo populacije virusov in lahko vodi do pojava novih virusov in posledično novih bolezni (Worobey in sod., 1999).

Vigne in sodelavci (2009) so v vinogradih, okuženih z GFLV, testirali vinske trte, ki so jih za obdobje 12 let navzkrižno zaščitili z manj virulentnima sevoma GFLV-GHu in ArMV-Ta. Preučevali so genetsko variabilnost populacij virusov na podlagi RNA2 molekule in pojav rekombinacij med izolati virusa GFLV in GFLV-GHu ter med izolati GFLV in ArMV-Ta. Pri ArMV-Ta in GFLV-GHu se v obdobju 12 let nukleotidno zaporedje RNA2 ni kaj dosti spremenilo (0,1-1,1 % za ArMV-Ta in 0,1-1,2 % za GFLV-GHu). Pri izolatih GFLV je variabilnost RNA2 na nukleotidnem nivoju znašala 0,2-13 %. Rekombinacijo so dokazali med izolati GFLV, ne pa tudi med izolati GFLV in GFLV-GHu ter izolati GFLV in ArMV-Ta. Rekombinacije niso zaznali tudi v gensko spremenjenih rastlinah (Vigne in sod., 2004a,b). To je lahko posledica utišanja RNA (Voinnet, 2008), ki je lahko aktivna v obeh tipih rastline, vendar so še potrebne raziskave, da bi to dokazali (Vigne in sod., 2009).

2.3.4 Kontrola in omejevanje širjenja okužbe z GFLV

Za kontrolo in omejevanje širjenja okužbe z GFLV obstajajo različni načini. Eden izmed načinov omejevanja širjenja GFLV je zatiranje ogorčice *X. index*, vendar je to v

obstojećem vinogradu težje izvedljivo (Pearson in Goheen, 1998). Pomembnejša je izbira neokužene površine pred zasaditvijo vinograda in zdravega materiala (Pearson in Goheen, 1998; Andret-Link in sod., 2004a). Pri saditvi vinograda na površino izkrčenega okuženega vinograda, kjer so dokazali prisotnost z GFLV okužene ogorčice, je pomembna vsaj 10-letna doba mirovanja tal, saj lahko z GFLV okužene *X. index* preživijo več let tudi ob odsotnosti gostitelja (Demangeat in sod., 2005). Zatiranje ogorčič je možno z uporabo kemičnih sredstev - nematicidov, ki velikokrat niso najbolj učinkoviti zaradi narave ogorčic (bivanje globoko v tleh) in globine trsnih korenin (Urek in Hržič, 1998) ter tudi z ekološkega stališča niso najbolj sprejemljivi.

Širjenje virusa GFLV lahko omejimo tudi z vzgojo in razširjanjem brezvirusnega (zdravega) sadilnega materiala (Urek in Hržič, 1998). Brezvirusni sadilni material lahko dobimo s toplotno obdelavo (na 38-40 °C najmanj za štiri tedne), z *in vitro* meristemsko kulturo ali s somatsko embriogenezo (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Somatska embriogeneza se je izkazala kot uspešen način omejitve širjenja GFLV, saj je bila učinkovitost pri vzgoji brezvirusnega materiala skoraj 100 % (Gambino in sod., 2009).

Za vzgojo odpornih podlag na GFLV in *X. index* so uporabili nekatere divje vrste iz rodov *Vitis* in *Muscadinia*, ki so odporne na GFLV in njegovega prenašalca, ogorčico *X. index* (Pearson in Goheen, 1998).

Za omejitve širjenja virusa so preučevali tudi možnost navzkrižne zaščite z virusoma GFLV in ArMV. Komar in sodelavci (2008) so primerjali možnost okužbe ter kvaliteto in količino letnega pridelka pri kontrolnih zdravih trtah in pri trtah, okuženih z manj virulentnim sevom GFLV-GHu ali ArMV-Ta. Pri trtah, ki so bile okužene z GFLV-GHu ali ArMV-Ta je bila možnost okužbe veliko manjša kot pri testnih trtah, vendar je bila tudi kvaliteta in količina letnega pridelka teh trt manjša, zaradi česar navzkrižna zaščita ni najbolj uporabna metoda za omejevanje širjenja virusa GFLV (Komar in sod., 2008).

Novejša možnost omejevanja širjenja GFLV je uporaba gensko spremenjenih rastlin vinske trte, odpornih na GFLV. Obstaja že nekaj podlag, odpornih na GFLV, ki imajo v rastlinski genom vstavljen gen za plaščni protein GFLV (Xue in sod., 1999; Vigne in sod., 2004a). Ena izmed nevarnosti uporabe gensko spremenjenih rastlin je možnost rekombinacije med genom za plaščni protein, vstavljenim v rastlinski genom, in RNA virusi, ki so naravno prisotni v vinogradu. Fuchs in sodelavci (2007) so preučevali oceno tveganja uporabe gensko spremenjenih rastlin v naravnem okolju in oceno rekombinacij med genom za plaščni protein, vnesenim v rastlino in virusom, ki okužuje gensko spremenjeno rastlino. Med gensko spremenjenimi trsi, ki so izražali plaščni protein GFLV in so bili okuženi z homolognim ali heterolognim virusom, ni bil odkrit noben rekombinanten virus, čeprav so bile v omenjenih trsih prisotne velike količine transkriptov vnesenega gena. Med 3-letnim trajanjem poskusa ni bilo zaznanega vpliva gensko spremenjenih trsov na populacije

virusov. Gre za prvo raziskavo o uporabi gensko spremenjenih trt pod naravnimi razmerami na različnih lokacijah.

2.4 METODE ZA DOLOČANJE VIRUSA GFLV V RASTLINSKEM MATERIALU

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

Med serološkimi metodami se najpogosteje uporablja neposredni sistem dvojnih protiteles t.i. metoda dvojnega senviča ELISA (double antibody sandwich, DAS-ELISA) (Huss in sod., 1986; Walter in Etienne, 1987; Rowhani in sod., 1992; Čepin in sod., 2009; Liebenberg in sod., 2009), ki je standardna metoda za določanje GFLV (Nolasco, 2003). Zaradi slabe občutljivosti ta metoda za določanje virusa GFLV ni vedno zadovoljiva, saj je njegova koncentracija, v različnih organih vinske trte in v različnem obdobju rastne sezone, različna (Walter in Etienne, 1987; Rowhani, 1992; Bouyahia in sod., 2003; Čepin in sod., 2009). Med serološkimi metodami za določanje GFLV pa poznamo tudi test ImmunoStrip, ki je hitrejši in enostavnejši za interpretacijo kot test DAS-ELISA (Liebenberg in sod., 2009).

Zaradi slabe občutljivosti seroloških metod je prišlo do razvoja molekularnih metod, ki temeljijo na nukleinskih kislinah virusa. Najprej so se za določanje virusa GFLV razvile hibridizacijske metode z radioaktivno ali z dioksigeninom označeno cDNA sondo (Fuchs in sod., 1991; Gemmrich in sod., 1993). Kasneje je prišlo do razvoja RT-PCR, ki se sestoji iz dveh reakcij: reakcije obratnega prepisovanja (reverse transcription, RT) in verižne reakcije s polimerazo (polymerase chain reaction, PCR). Metoda RT-PCR je primerna za določanje rastlinskih virusov, ki so prisotni v nizkih koncentracijah ali so neenakomerno razporejeni v rastlinskem tkivu (Wetzel in sod., 2002), zato je bilo do zdaj razvitih že veliko RT-PCR metod za določanje virusa GFLV v tkivu vinske trte, od katerih večina pomnožuje najboljše preučen 2C gen RNA2 molekule (Rowhani in sod., 1993; Fattouch in sod., 2001; Wetzel in sod., 2002; Buzkan in Walker, 2004; Gambino in sod., 2006; Osman

in Rowhani, 2006; Osman in sod., 2008 Liebenberg in sod., 2009). Zaradi specifičnosti, občutljivosti in mnogostranskosti metoda RT-PCR omogoča rutinsko določevanje GFLV v okuženi vinski trti (Buzkan in Walker, 2004).

V zadnjem času avtorji poročajo o razvoju RT-PCR v realnem času (RT-PCR-RČ) (Osman in Rowhani, 2006; Blahova in Pidra, 2009), ki je hitrejša, bolj specifična in občutljivejša metoda v primerjavi z ostalimi molekularnimi metodami ter omogoča sprotno spremljanje količine PCR produkta (Gachon in sod., 2004).

RT-PCR-RČ so nadgradili z metodo, imenovano low density arrays (LDA), ki omogoča sočasno določanje različnih rastlinskih virusov v vzorcu v eni sami reakciji. V primerjavi z RT-PCR-RČ je metoda LDA hitrejša in cenejša pri določanju različnih rastlinskih virusov (Osman in sod., 2008).

2.5 IZOLACIJA RNA IZ OKUŽENEGA RASTLINSKEGA MATERIALA

Določanje prisotnosti virusov z RT-PCR v rastlinskem materialu je pogosto ovirano oz. onemogočeno zaradi inhibitorjev, ki so prisotni v rastlinskih ekstraktih in inhibirajo aktivnost encimov reakcije RT-PCR (Rowhani in sod., 1995; Osman in Rowhani, 2006). To lahko vpliva na omejitev uporabe RT-PCR zaradi zmanjšane občutljivosti metode (Wetzel in sod., 2002). Za odstranitev inhibitorjev oz. zmanjšanje njihove aktivnosti je zelo pomembna učinkovita metoda izolacije RNA iz rastlinskega materiala. Do danes je razvitih že kar nekaj metod izolacije RNA, ki odstranijo ali vsaj zmanjšajo prisotnost inhibitorjev reakcije RT-PCR.

Ena izmed načinov izolacije RNA je imobilizacija virusov, ki je lahko nespecifična ali specifična. Pri nespecifični vezavi se virusi iz okuženih rastlinskih ekstraktov direktno vežejo na trden nosilec (direct binding, DB), pri specifični pa na specifična protitelesa vezana na nosilec (immunocapture, IC). S spiranjem s pufrom odstranimo inhibitorje, kar omogoča učinkovitejšo določitev virusov z reakcijo RT-PCR. Rowhani in sodelavci (1995) so s primerjanjem občutljivosti DB-RT-PCR in IC-RT-PCR postopkov dokazali, da je IC-RT-PCR občutljivejša metoda za določanje rastlinskih virusov (Rowhani in sod., 1995).

Za izolacijo RNA in uspešno odstranitev inhibitorjev so na voljo tudi komercialni kiti različnih proizvajalcev. MacKenzie in sodelavci (1997) so za izolacijo RNA različnih virusov iz okuženega rastlinskega materiala uporabili nekoliko prilagojen postopek za RNeasy Plant Mini Kit proizvajalca Qiagen. Ta metoda učinkovito odstrani polifenole in druge inhibitorje brez uporabe organskih topil, poleg tega pa je izredno hitra. Osman in sodelavci (2008) so primerjali izolacijo RNA z RNeasy Plant Mini Kit-om (metoda 1), avtomatsko izolacijo RNA z X-Tractor GeneTM (metoda 2) ter 6700 Automated Nucleic

Acid Workstation (metoda 3). Pri slednji so uporabili različno koncentracijo liznega pufru (1x ali 2x). Za najbolj učinkovito metodo se je izkazala metoda 3, pri kateri so uporabili 2x lizni pufer, sledila je metoda 1 in nato metoda 3 z 1x liznim pufrom ter metoda 2, ki je bila najmanj učinkovita.

Harju in sodelavci (2005) so izolirali RNA z metodo sprostitve virusov po testu ELISA (post-ELISA virus release) za določitev virusa nekrotičnega rumenenja listnih žil pese (Beet necrotic yellow vein virus, BNYYV) z RT-PCR-RČ. Uporaba sprostitve virusov po testu ELISA v povezavi z RT-PCR-RČ omogoča potrditev pozitivnih rezultatov testa ELISA brez ponovne priprave vzorcev in celotne izolacije RNA. Čeprav je sprostitve virusov po testu ELISA v primerjavi z izolacijo celokupne RNA z CTAB manj občutljiva, pa je sprostitve virusov po testu ELISA časovno precej manj zamudna kot izolacija RNA s CTAB (Harju in sod., 2005).

Za izolacijo RNA so razvili metodo lovljenja virusne RNA na sondo (RNA oligoprobe capture). Pri tej metodi se virusna RNA veže na specifično sondo, ki je pritrjena na membrano. Po fazi pritrjanja sledi spiranje, pri čemer se vezana virusna RNA sprosti v raztopino. Metoda RNA oligoprobe capture-RT-PCR je v primerjavi z IC-RT-PCR bolj občutljiva in omogoča določanje prisotnosti virusov tudi takrat, ko ne poznamo specifičnih protiteles virusov (Fattouch in sod., 2001).

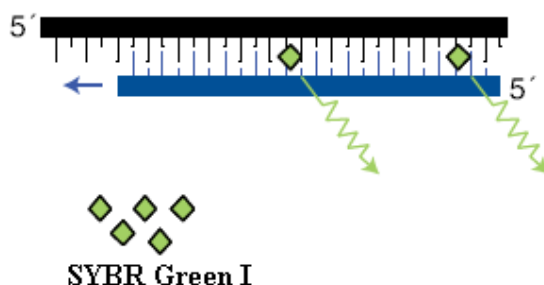
Buzkan in Walker (2004) sta primerjala dve metodi izolacije RNA iz vinske trte, okužene z GFLV in sicer ekstrakcijo s fenolom in kloroformom ter ekstrakcijo s suspenzijo kremenovih delcev. Pri slednji se fenoli iz rastlinskega ekstrakta vežejo na kremenove delce, ki jih odstranimo iz raztopine z dodatkom etanola. Ekstrakcija RNA s fenolom in kloroformom se je izkazala za neučinkovito pri pomnoževanju s PCR, poleg tega pa je pri delu s fenolom in kloroformom potrebna velika previdnost zaradi njihove toksičnosti na zdravje človeka. Za razliko od ekstrakcije s fenolom in kloroformom se je ekstrakcija s suspenzijo kremenovih delcev izkazala za enostavno, časovno nezamudno in uspešno metodo ekstrakcije majhnih količin RNA iz rastlinskega tkiva. Poleg tega je ta metoda tudi cenejša v primerjavi s komercialnimi kiti za ekstrakcijo RNA (Buzkan in Walker, 2004).

Enostavno in hitro izolacijo RNA iz okuženega rastlinskega materiala sta leta 2006 razvila Osman in Rowhani. Pripravljene rastlinske ekstrakte sta nanese na najlonske in FTA[®] membranske diske, ki sta jih posušila pri sobni temperaturi. Diske iz najlonskih membran sta sprala s pufrom GES in jih temperaturno obdelala, da se je sprostila RNA, ki sta jo nato dodala v reakcijsko mešanico za PCR. FTA[®] membranske diske sta sprala z reagentom FTA[®] in pufrom TE, jih posušila in dodala reakcijsko mešanico za PCR. Tak način izolacije RNA se je izkazal za uspešnega pri obeh preučevanih metodah, RT-PCR in RT-PCR-RČ, za določanje patogenih mikroorganizmov v rastlinskem materialu.

2.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

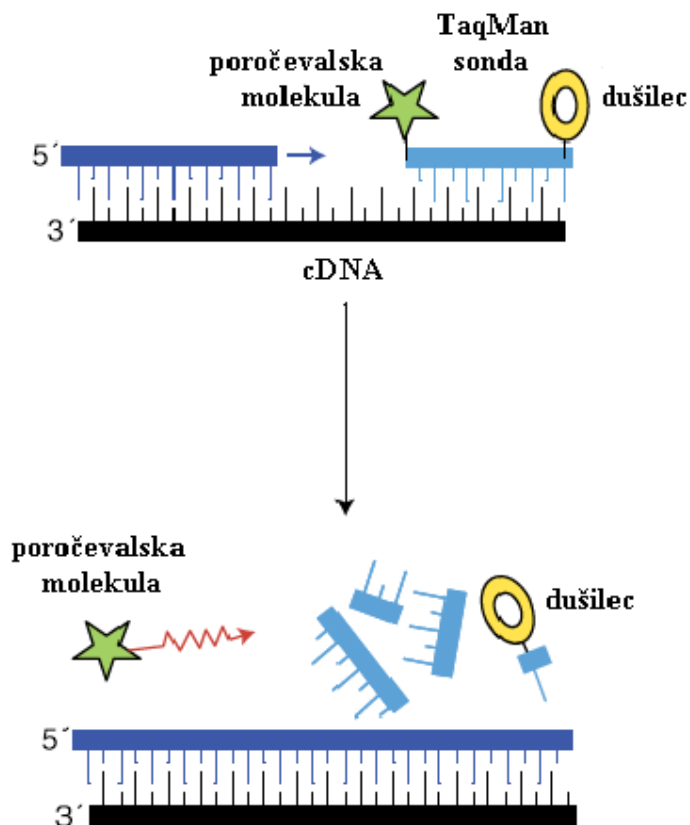
Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (PCR-RČ) predstavlja nadgradnjo klasične metode PCR. Princip PCR-RČ temelji na sprotnem določanju in vizualizaciji pomnoženega odseka nukleinske kisline na podlagi fluorescence (Bustin in sod., 2005). Glede na kemijsko reakcijo ločimo dve skupini molekul za določanje pomnoženega dela nukleinske kisline. Prva skupina molekul so fluorogene molekule (npr. etidijev bromid, SYBR Green I), ki se nespecifično vežejo v dvojno vijačnico DNA, drugo skupino pa predstavljajo oligonukleotidne sonde s fluorescentnim barvilom in dušilcem (npr. TaqMan), ki omogočajo bolj specifično določanje DNA (Arya in sod., 2005).

SYBR Green I se veže v dvojno vijačnico DNA in ob tem močno fluorescira (slika 5). Intenziteta fluorescence je odvisna od količine dsDNA, ki je prisotna v reakciji. Pomanjkljivost SYBR Green I je nespecifična vezava zaradi česar poleg specifičnih produktov zaznamo tudi nespecifične produkte in dimere začetnih oligonukleotidov (Gachon in sod., 2004; Arya in sod., 2005).



Slika 5: Princip PCR-RČ s fluorogeno molekulo SYBR Green I (Arya in sod., 2005: 212).

Med fluorescentnimi oligonukleotidnimi sondami se najpogosteje uporablja TaqMan sonda, ki se specifično veže na tarčno zaporedje (slika 6). TaqMan kemija temelji na 5' → 3' eksonukleazni aktivnosti *Taq* polimeraze, ki se v reakciji PCR uporablja za pomnoževanje odsekov nukleinske kisline. TaqMan sonda ima kovalentno vezani dve fluorescentni barvili. Na 5' koncu je vezana poročevalska molekula (npr. 6-karboksifluorescein: FAM), ki fluorescira, na 3' koncu pa dušilec (npr. 6-karboksi-tetrametilrodamin: TAMRA), ki oddano fluorescenso zaduši. Med podaljševanjem verige DNA s *Taq* polimerazo, ki zaradi svoje eksonukleazne aktivnosti razgradi sondo, pride do ločitve poročevalske molekule od dušilca. Posledica ločitve je nemoteno oddajanje fluorescence poročevalske molekule (Arya in sod., 2005).

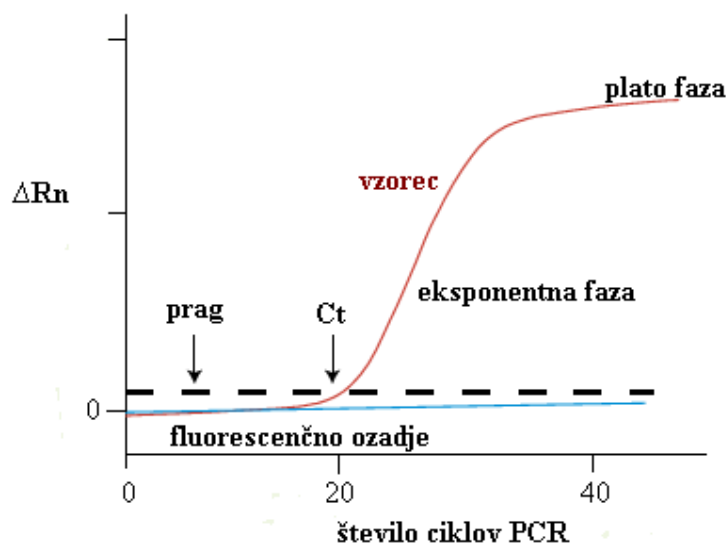


Slika 6: Princip PCR-RČ s dvojno označeno oligonukleotidno TaqMan sondo (Arya in sod., 2005: 210).

Na TaqMan kemiji temeljijo tudi novejšje MGB sonde, ki imajo na 3' koncu namesto dušilca vezano MGB (minor groove binder) molekulo, ki deluje kot dušilec, hkrati pa močno poveča stabilnost vezave sonde na komplementarno verigo oz. tarčno zaporedje DNA. Zaradi tega so MGB sonde krajše in bolj specifične v primerjavi z drugimi sondami in tako zmanjšajo ozadje fluorescence, ki je posledica nespecifične fluorescence (Kutyavin in sod., 2000).

V vsakem ciklu pomnoževanja tarčne molekule s PCR-RČ računalniški program zabeleži jakost fluorescentnega signala (Valasek in Repa, 2005). Krivulja pomnoževanja, ki jo pri tem izriše, predstavlja odvisnost spremembe jakosti fluorescence (ΔR_n) od števila ciklov reakcije PCR (slika 7). ΔR_n je razlika med fluorescenco produkta v katerikoli časovni točki med pomnoževanjem in fluorescenco bazne linije (fluorescenčno ozadje). V prvih ciklih pomnoževanja signal fluorescence produkta ne preseže praga (ang. »threshold«). Prag je določen v linearnem delu krivulje, kjer je najboljša učinkovitost pomnoževanja. Ct vrednost predstavlja število ciklov potrebnih, da fluorescenca doseže prag detekcije (Arya in sod., 2005). Čim več je kopij tarčne molekule na začetku v vzorcu, tem hitreje bo naraščala jakost fluorescence in Ct bo manjši (Bustin in sod., 2005). Pomnoževanje tarčne molekule

poteka učinkovito do plato faze, kjer se reakcija upočasni zaradi zmanjšanja koncentracije začetnih oligonukleotidov in encimov ter kopičenja inhibitorjev reakcije PCR (Mackay, 2004).



Slika 7: Graf pomnoževanja tarčne molekule z metodo PCR-RČ (Arya in sod., 2005: 211).

Metoda PCR-RČ omogoča določevanje količine pomnožene tarčne molekule v vzorcu (kvantitativni PCR-RČ) (Ginzinger, 2002; Arya in sod., 2005). Ločimo dve vrsti kvantifikacije: absolutno in relativno.

Absolutna kvantifikacija omogoča določanje količine tarčne molekule v neznanem vzorcu iz umeritvene (standardne) krivulje (Arya in sod., 2005), ki odraža linearno razmerje med vrednostmi Ct in logaritmskimi vrednostmi teoretičnih koncentracij tarčnega zaporedja standarda (Ginzinger, 2002; Wong in Mendrano, 2005). Umeritvena krivulja se izriše na podlagi redčitev tarčnega zaporedja standarda do stopnje, kjer pride do stohastičnega efekta, kar pomeni, da zaradi zelo nizke koncentracije tarčnega zaporedja dobimo zelo različne vrednosti Ct ali pa virusa ne določimo več. Iz tega sklepamo, da je v reakciji prisotnih 1-10 molekul tarčnega zaporedja virusa. Na podlagi tega se določi teoretična koncentracija tarčnega zaporedja standarda v vseh ostalih redčitvah. Teoretična koncentracija nam pove število tarčnih molekul virusa na reakcijo (Ellison in sod., 2006). Iz umeritvene krivulje lahko dobimo tudi naklon krivulje in koeficient linearne regresije (R^2). R^2 nam pove, kako dobro se meritve prilegajo idealni premici (idealen je 1). Iz naklona krivulje pa lahko določimo učinkovitost pomnoževanja, ki je v idealnih razmerah (ob naklonu krivulje -3,32) 100 %, kar pomeni, da z vsakim ciklom reakcije nastane dvakrat več produkta (Ginzinger, 2002; VanGuilder in sod., 2008). Učinkovitost

pomnoževanja je pogosto manjša, kar moramo upoštevati pri začetne količine tarčne molekule v vzorcu.

Pri relativni kvantifikaciji primerjamo spremembo količine tarčne molekule v neznanem vzorcu s spremembo količine tarčne molekule v referenčnem vzorcu (Livak in sod., 2001). Prednost relativne kvantifikacije v primerjavi z absolutno kvantifikacijo je, da pri relativni kvantifikaciji ne potrebujemo absolutne umeritvene krivulje. Za relativno kvantifikacijo uporabljajo različne matematične modele, na podlagi katerih določimo količino tarčne molekule (Wong in Mendrano, 2005).

Pri rastlinah se metoda PCR-RČ uporablja predvsem za odkrivanje in določanje različnih rastlinskih simbiotov in povzročiteljev bolezni, za ugotavljanje okužbe živilskih proizvodov, za ugotavljanje količine transgenov, vključenih v rastlinski genom in za ugotavljanje izražanja genov. Za zelo razširjeno velja tudi uporaba PCR-RČ v povezavi z mikročipi (Gachon in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VINOGRADI IN RASTLINSKI MATERIAL

Rastlinski material vinske trte (*Vitis vinifera* L.) smo nabrali v vinogradih na različnih lokacijah na Krasu (Dutovlje, Komen, Malinkovci in Tomaj) in v Vipavski dolini (Lože) (preglednica 1). Liste in rozge vinske trte smo vzorčili skozi celo rastno sezono 2008 (junij, julij, avgust in september) in julija 2009, medtem ko smo izven rastne sezone (januar 2009) vzorčili le olesenele rozge. Nekaj rastlinskega materiala (liste) smo nabrali maja 2009 v rastlinjaku na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) (preglednica 2). V raziskavo smo vključili tako z virusom GFLV okužene trse, kot tudi zdrave oz. z virusom GFLV neokužene trse.

Trsi v vinogradih so označeni z kratico sorte, ki ji v nekaterih primerih sledi kratica vinograda ali elita (ime matične rastline), nato pa številka vrste, v kateri se trs nahaja, ter zaporedna številka trsa v tej vrsti (npr. Volovnik 2/52 ali Refošk KV20 11/10).

Preglednica 1: Seznam vzorcev vinske trte iz vinogradov na Krasu (Dutovlje, Komen, Malinkovci in Tomaj) in v Vipavski dolini (Lože).

Oznaka vzorca vinske trte	Sorta vinske trte	Kratica vinograda ali elita	Kraj vinograda	Številka vrste v vinogradu	Številka trsa v vrsti vinograda
Ref DU 2b/54	Refošk	DU	Dutovlje	2b	54
Ref DU 2/19	Refošk	DU	Dutovlje	2	19
Ref DU 3/13	Refošk	DU	Dutovlje	3	13
Ref DUK 1/23	Refošk	DUK	Dutovlje-kapelica	1	23
Ref 9 2/71	Refošk	9	Komen	2	71
Ref 26 6/2	Refošk	26	Komen	6	2
Ref 26 6/4	Refošk	26	Komen	6	4
Ref 56 11/18	Refošk	56	Komen	11	18
Ref KV20 11/10	Refošk	KV20	Malinkovci	11	10
Ref TO 5/8	Refošk	TO	Tomaj	5	8
Vol 2/52	Volovnik		Lože	2	52
Vol 2/54	Volovnik		Lože	2	54
Vol 2/55	Volovnik		Lože	2	55

Preglednica 2: Seznam vzorcev vinske trte iz rastlinjaka na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) v Ljubljani. Ref DU 1/1 (Refošk, Dutovlje, vrsta 1, trs 1), Ref 51 11/69 (Refošk, elita 51, vrsta 11, trs 69), Ref 61 12/68 (Refošk, elita 61, vrsta 12, trs 68) so trsi, ki so bili preneseni iz vinogradov v rastlinjak in imajo enake oznake kot v vinogradih.

Oznaka vzorca vinske trte	Sorta vinske trte
Rebula	Rebula
Ref DU 1/1	Refošk
Ref 51 11/69	Refošk
Ref 61 12/68	Refošk
Vol 10	Volovnik

3.2 ANALIZA VZORCEV

3.2.1 Homogenizacija rastlinskega materiala

3.2.1.1 Homogenizacija rastlinskega materiala za ekstrakte za test ELISA

V ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba, Švica) smo natehtali 0,5 g listov posameznega vzorca vinske trte in jih homogenizirali v 5 ml ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (1:10) s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica). Po enakem postopku smo zatehtali 0,5 g nastrganega floemskega tkiva rozg vinske trte in ga homogenizirali v 7 ml ekstrakcijskega pufra za vinsko trto (1:14). Homogeniziran rastlinski material smo s plastičnimi pasteurjevim pipetami prenesli iz ekstrakcijskih vrečk v mikrocentrifugirke in shranili na -80 °C do uporabe.

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

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

3.2.1.2 Homogenizacija rastlinskega materiala za ekstrakte v pufru RLC

Rastlinski material za ekstrakte v pufru RLC smo homogenizirali na dva načina: s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica) in s homogenizatorjem TissueLyser (Qiagen, ZDA).

Pri prvem načinu homogenizacije smo v ekstrakcijske vrečke z membrano (Bioreba, Švica) natehtali 0,25 g listov posameznega vzorca vinske trte in jih homogenizirali v 2,5 ml modificiranega in segretega pufru RLC (1:10) s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica). Po enakem postopku smo zatehtali 0,25 g nastrganega floemskega tkiva rozg vinske trte in ga homogenizirali v 3,5 ml modificiranega in segretega pufru RLC (1:14). Homogeniziran rastlinski material smo s plastičnimi pasteurjevim pipetami prenesli iz ekstrakcijskih vrečk v mikrocentrifugirke in shranili pri -80 °C do uporabe.

Pri drugem načinu homogenizacije smo v 2 ml mikrocentrifugirke zatehtali 0,1 g listov posameznega vzorca vinske trte in v vsako mikrocentrifugirko dodali sterilno kovinsko kroglico. Na vrhu vsake mikrocentrifugirke smo naredili luknjico s sterilno iglo in jih zamrznili v tekočem dušiku. Zamrznjen rastlinski material smo homogenizirali 1 minuto pri 30 Hz s homogenizatorjem TissueLyser (Qiagen, ZDA). Zmletemu rastlinskemu materialu smo dodali 1 ml modificiranega in segretega pufru RLC (1:10) ter takoj močno zmešali z vibracijskim mešalnikom.

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

3.2.2 Redčenje okuženega rastlinskega materiala v zdravem rastlinskem materialu

Homogenat okuženega rastlinskega materiala, pripravljenega s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica), smo redčili v homogenatu zdravega rastlinskega materiala v razmerju 1:10 do redčitve 10^{-7} .

3.2.3 Test DAS- ELISA

V vdolbinice mikrotitrne ploščice Greiner (Greiner Bio One, Nemčija) smo odpipetirali po 200 µl protiteles proti virusu GFLV (Bioreba, Nemčija), razredčenih v karbonatnem pufru v razmerju 1:1.000. Ploščico smo pokrili in jo inkubirali 4h pri temperaturi 30 °C. Po inkubaciji smo vdolbinice 4-krat sprali s pufrom za izpiranje.

V vdolbinice na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali po 195 µl ekstraktov za test ELISA, med drugim tudi kontrole: pozitivno in negativno kontrolo (homogenat zdravega rastlinskega materiala in ekstrakcijski pufer). Vse vzorce smo nanegli v duplikatu. Ploščico smo inkubirali čez noč pri 4 °C. Po inkubaciji čez noč smo ploščico 5-krat sprali s pufrom za izpiranje.

Po izpiranju smo v vdolbinice odpipetirali po 190 µl protiteles proti virusu GFLV (Bioreba, Nemčija), konjugiranih z alkalno fosfatazo (Loewe Biochemica GmbH, Nemčija), razredčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1:1.000 in inkubirali 5h v pečici pri 30 °C. Po inkubaciji smo ploščico 4-krat sprali s pufrom za izpiranje.

V vdolbinice smo odpipetirali po 200 µl substrata p-nitrofenilfosfat s koncentracijo 1 mg/ml, raztopljenega v substratnem pufru. Plošče smo inkubirali pri sobni temperaturi ter po 30 minutah, 1 uri in 2 urah spektrofotometrično odčitali absorpcijo pri 405 nm. Uporabili smo čitalec mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in program BioLinX 2.20.

Pri testu ELISA smo uporabili naslednje pufre:

Pufer za izpiranje (pH 7,4)

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

Karbonatni pufer (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃ (Merck, Nemčija)	15 mM
NaHCO ₃ (Merck, Nemčija)	35 mM

Substratni pufer (pH 9,8)

Dietanolamin (Sigma, Nemčija)	9,7 %
-------------------------------	-------

Konjugativni pufer (pH 7,4)

TRIS (Sigma, Nemčija)	20 mM
NaCl (Merck, Nemčija)	137 mM
PVP K25 (Fluka, Nemčija)	2 %
Tween 20 (Sigma, Nemčija)	0,05 %
BSA (Sigma, Nemčija)	0,2 %
MgCl ₂ *6H ₂ O (Merck, Nemčija)	1 mM
KCl (Merck, Nemčija)	3 mM

3.2.3.1 Obdelava podatkov testa DAS-ELISA

Podatke smo obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel (Microsoft, ZDA). Za vsak vzorec smo iz ponovitev izračunali povprečno vrednost odčitkov. Za pozitivne smo šteli vzorce, pri katerih je bila absorbcija po eni oz. dveh urah inkubacije 2-krat večja kot absorpcija referenčne negativne kontrole.

3.2.4 Izolacija RNA

Po homogenizaciji smo iz tkiva vinske trte izolirali RNA s tremi različnimi metodami.

3.2.4.1 Lovljenje virusov na protitelesa (Immunocapture, IC)

Virusno RNA smo izolirali iz rastlinskega materiala vinske trte, ki smo ga predhodno homogenizirali v ekstrakcijskem pufri za vinsko trto (ekstrakti za test ELISA). Uporabili smo enake pufre kot pri testu DAS-ELISA.

V vdolbinice mikrotitrne ploščice Nunc Maxi Sorp (Nunc Brand Products, Danska) smo odpipetirali po 100 µl protiteles proti virusu GFLV (Bioreba, Nemčija), razredčenih v karbonatnem pufri v razmerju 1:100. Ploščico smo pokrito inkubirali 3h pri 37 °C in jo po inkubaciji 3-krat sprali s pufrom za izpiranje.

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo odpipetirali po 100 µl ekstrakta za test ELISA, med drugim tudi pozitivno in negativno kontrolo (ekstrakt zdravega rastlinskega materiala in ekstrakcijski pufri). Ploščico smo inkubirali 16h pri 4 °C. Po inkubaciji smo jo 4-krat sprali s pufrom za izpiranje.

Po izpiranju smo v polovico vdolbinic mikrotitrne ploščice nanegli po 10 µl 1 % TritonX-100 (Sigma, Nemčija), v drugo polovico pa po 10 µl bdH₂O brez RNaz (Sigma, Nemčija). Ploščico smo pokrili s folijo in inkubirali 10 min pri 70 °C. Po inkubaciji smo ploščico ohladili na ledu in nato v vdolbinice mikrotitrne ploščice odpipetirali po 90 µl bdH₂O brez RNaz (Sigma, Nemčija) ter jo postavili nazaj na led. Iz vdolbinic mikrotitrne ploščice smo vzorce odpipetirali v mikrocentrifugirke in jih shranili pri -80 °C do uporabe.

3.2.4.2 Sprostitev virusov po testu ELISA (post-ELISA virus release)

Po opravljenem testu DAS-ELISA smo mikrotitsko ploščico sprali (3x5 minut) s pufrom za izpiranje. Po izpiranju smo v polovico vdolbinic mikrotitske ploščice nanegli 50 µl 1 % TritonX-100 (Sigma, Nemčija), v drugo polovico pa po 50 µl bdH₂O brez RNaz (Sigma, Nemčija) in inkubirali 10 min pri 70 °C, da je prišlo do sprostitve virusne RNA iz virusnih delcev, pritrjenih na protitelesa na dnu vdolbinice mikrotitske ploščice. Iz vdolbinic mikrotitske ploščice smo vzorce odpipetirali v mikrocentrifugirke in jih shranili pri -80 °C do uporabe.

3.2.4.3 Izolacija RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit

Za izolacijo RNA smo uporabili komplet RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ZDA). RNA smo izolirali iz rastlinskega materiala, ki smo ga homogenizirali v ekstrakcijskem pufu za vinsko trto (ekstrakti za test ELISA) in iz rastlinskega materiala, homogeniziranega v modificiranem pufu RLC (ekstrakti v pufu RLC) s homogenizatorjem Homex Bioreba (Bioreba, Švica).

Homogeniziran rastlinski material smo prenesli v mikrocentrifugirke in inkubirali 3 minute pri 56 °C, ter centrifugirali 30s pri 10.000 rpm (obradi/min) pri sobni temperaturi (23 °C). Lizat (supernatant) smo prenesli na kolono QIAshredder (nameščeno na mikrocentrifugirki) v dveh korakih po 500 µl in centrifugirali 2 minuti pri 14.000 rpm. Filtrat obeh centrifugiranj smo prenesli v novo 2ml mikrocentrifugirko in dodali polovico volumna absolutnega etanola (Sigma, Nemčija) ter dobro premešali.

Vzorec smo prenesli na kolono RNeasy Mini spin (nameščeno na mikrocentrifugirki) in centrifugirali 20 sekund pri 10.000 rpm. Po centrifugiranju smo zavrgli filtrat (flowthrough) in prestavili kolono na novo zbirno mikrocentrifugirko. Kolono smo spirali tako, da smo dodali 700 µl pufru RW1 in centrifugirali 20 sekund pri 10.000 rpm, zavrgli filtrat, vstavili kolono na isto zbirno mikrocentrifugirko, dodali 500 µl pufru RPE, centrifugirali 20 sekund pri 10.000 rpm, zavrgli filtrat, vstavili kolono na isto zbirno mikrocentrifugirko, ponovno dodali 500 µl pufru RPE, centrifugirali 20 sekund pri 10.000 rpm, zavrgli zbirno mikrocentrifugirko s filtratom vred in prestavili kolono na novo mikrocentrifugirko. Centrifugirali smo še 1 minuto pri 10.000 rpm, da se je filter kolone popolnoma posušil, ter jo prenesli na novo mikrocentrifugirko.

RNA smo iz kolon RNeasy Mini spin sprostiti z zaporednim nanosom vode brez RNaz (Sigma, Nemčija), segrete na 65 °C, tako da smo dodali 30 µl vode, inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto pri 10.000 rpm ter za tem dodali še 30 µl vode

in ponovili postopek. Iz posamezne kolone smo tako dobili 60 µl RNA, ki smo jo shranili pri -80 °C do uporabe.

3.2.5 RT-PCR v realnem času (RT-PCR-RČ)

Metodo RT-PCR v realnem času (RT-PCR-RČ) smo uporabili za kvalitativno in kvantitativno določanje virusa GFLV v različnih vzorcih vinske trte. Po homogenizaciji in izolaciji RNA smo RNA z reverzno transkripcijo (RT) prepisali v cDNA in pomnožili s PCR v realnem času (PCR-RČ). Uporabili smo dve različni tehniki, enostopenjski RT-PCR-RČ (one-step RT-PCR-RČ) in dvostopenjski RT-PCR-RČ (two-steps RT-PCR-RČ). Pri enostopenjskem RT-PCR-RČ je sinteza cDNA potekala skupaj z reakcijo pomnoževanja, medtem ko je pri dvostopenjskem RT-PCR-RČ sinteza cDNA potekala ločeno od reakcije pomnoževanja.

Z metodo RT-PCR-RČ smo pomnoževali fragment virusa GFLV z začetnima oligonukleotidoma GFLV-FP in GFLV-RP ter GFLV-sondo (preglednica 3), ki je bila na 5' koncu označena s poročevalsko molekulo FAM in na 3' koncu z nefluorescirajočo molekulo MGB. Za primerjavo dveh različnih načinov homogenizacije rastlinskega materiala in relativno kvantifikacijo virusa GFLV v floemskem tkivu rozg vinske trte skozi sezono smo z metodo RT-PCR-RČ določili kontrolni gen COX (gen za citokrom oksidazo), ki smo ga pomnoževali z začetnima oligonukleotidoma COX-FP in COX-RP ter COX-sondo, ki je bila na 5' koncu označena s poročevalsko molekulo FAM in na 3' koncu z dušilcem TAMRA (preglednica 4). Kontrolni gen COX je predstavljal kontrolo učinkovitosti izolacije RNA. 10x in 100x redčitve vzorcev RNA smo naredili zato, da smo izključili napačne Ct vrednosti, ki so bile posledica inhibicije reakcije RT-PCR-RČ.

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev virusa GFLV z metodo RT-PCR-RČ.

Ime začetnega oligonukleotida / sonde	Nukleotidno zaporedje (5' – 3')	Položaj glede na referenčno nukleotidno zaporedje RNA2 GFLV izolata F13	Velikost ampikona
GFLV-FP	AGCTGCGGCACTYTTTGC	676–693	128 bp
GFLV-sonda	FAM-TGCTCAARCATAACCACTTG-MGB	759–777	
GFLV-RP	TCATCACTRGTGTGCATACCACTTCCT	779–804	

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi in sonda za določitev kontrolnega gena COX z metodo RT-PCR-RČ.

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

3.2.5.1 Enostopenjski RT-PCR-RČ

Za enostopenjski RT-PCR-RČ smo uporabili komplet RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, ZDA) in AgPath-ID OneStep RT-PCR Kit (Ambion, ZDA). Pred RT-PCR-RČ smo RNA denaturirali 5 minut pri 85 °C ter inkubirali na ledu.

Pri uporabi kompleta RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, ZDA) smo pripravili 8 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 0,5 µl mešanice encimov RNA UltraSense™, 2 µl 5x pufra RNA UltraSense™, 0,9 µl začetnih oligonukleotidov GFLV-FR in GFLV-RP (10 µM), 0,5 µl GFLV-sonde (5 µM), 0,2 µl referenčnega barvila ROX in 3 µl H₂O brez RNaz.

Pri uporabi kompleta AgPath-ID OneStep RT-PCR Kit (Ambion, ZDA) za določanje virusa GFLV, smo pripravili 8 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 5 µl 2x pufra RT-PCR, 0,4 µl 25x mešanice encimov RT-PCR, 0,9 µl začetnih oligonukleotidov GFLV-FR in GFLV-RP (10 µM), 0,5 µl GFLV-sonde (5 µM) in 0,3 µl H₂O brez RNaz. Reakcijska mešanica za določanje rastlinskega gena COX pa je namesto začetnih oligonukleotidov GFLV-FP in GFLV-RP ter GFLV-sonde vsebovala 0,9 µl začetnih oligonukleotidov COX-FR in COX-RP (10 µM) ter 0,8 µl COX-sonde (2,5 µM).

Na optično ploščico (Applied Biosystems, ZDA) smo nanegli po 8 µl pripravljene reakcijske mešanice in v vsako vdolbinico dodali po 2 µl neredčene, 10x redčene ali 100x redčene RNA posameznega vzorca.

3.2.5.2 Dvostopenjski RT-PCR -RČ

Pri dvostopenjskem RT-PCR-RČ smo cDNA sintetizirali ločeno, z uporabo kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ZDA). K 2 µl celokupne RNA smo dodali 2 µl deoksiribonukleotidov (dNTP) in 5 µl 10x koncentrirane raztopine naključnih heksamerov ter denaturirali 5 minut pri 85 °C, po denaturaciji pa 2 minuti inkubirali na ledu. Nato smo dodali 1 µl RNaznega inhibitorja, 5 µl 10x pufra RT, 2,5 µl reverzne transkriptaze MultiScribe in vodo brez RNaz do končnega volumna 50 µl. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 10 minut pri 25 °C, 120 minut pri 37 °C in 5 sekund pri 85 °C.

Za dvostopenjsko reakcijo RT-PCR-RČ za določanje virusa GFLV smo uporabili reakcijsko mešanico TaqMan® (Applied Biosystems, ZDA), ki smo jo pripravili iz 5 µl 2x mešanice Master Mix, ki je vsebovala referenčno barvilo ROX™, 0,7 µl H₂O brez RNaz,

0,9 μ l začetnih oligonukleotidov GFLV-FP in GFLV-RP (10 μ M) in 0,5 μ l GFLV sonde (5 μ M). Reakcijska mešanica za določanje rastlinskega gena COX je namesto začetnih oligonukleotidov GFLV-FP in GFLV-RP ter GFLV-sonde vsebovala 0,9 μ l začetnih oligonukleotidov COX-FR in COX-RP (10 μ M) ter 0,8 μ l COX-sonde (2,5 μ M).

Na optično ploščico (Applied Biosystems, ZDA) smo nanegli po 8 μ l pripravljene reakcijske mešanice in v vsako dodali po 2 μ l neredčene, 10x redčene ali 100x redčene cDNA posameznega vzorca.

3.2.5.3 Kontrole in razmere RT-PCR-RČ

Vsak vzorec smo na ploščico nanegli v dveh ali treh ponovitvah. V dve vdolbinici z reakcijsko mešanico smo namesto vzorca dodali sterilno bdH_2O (Sigma, Nemčija), ki je služila kot kontrola navzkrižne okužbe reakcijske mešanice (no template control, NTC). Potencialno navzkrižno okužbo vzorcev med procesom izolacije RNA smo preverili s testiranjem ekstrakcijskega pufra, ki je prešel cel proces RNA izolacije. Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo, centrifugirali 1 minuto pri 1.000 g in jo vstavili v aparaturo ABIPRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA).

Pomnoževanje nukleotidnega zaporedja je potekalo pri standardnih razmerah:

- 30 min, 48 °C (to stopnjo smo uporabili le pri enostopenjskem RT-PCR-RČ).
- 2 min, 50 °C
- 10 min, 95 °C
- 45 ciklov: - 15s, 95 °C
- 1 min, 60 °C

3.2.5.4 Analiza rezultatov RT-PCR-RČ

Reakcije RT-PCR-RČ smo analizirali s programom SDS 2.3 (Applied Biosystems, ZDA). Program je izrisal graf pomnoževanja produkta PCR, na katerem je bilo na osi x število ciklov PCR, na osi y pa so bile vrednosti fluorescenčnega signala (ΔR_n). V programu smo nastavili avtomatsko bazno linijo, medtem ko smo prag nastavili ročno (dvostopenjska RT-PCR-RČ: 0,065 in enostopenjska RT-PCR-RČ: 0,04 pri 100 nM koncentraciji sonde ter 0,065 pri 250 nM koncentraciji sonde). Na podlagi tega je program za vsako reakcijo posebej izračunal, v katerem ciklu je ΔR_n presegel nastavljeni prag (threshold cycle, Ct). Vrednost Ct je bila obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNA/RNA, zato smo jo lahko uporabimo za izračun začetne količine cDNA oz. RNA določenega amplikona v vzorcu.

Vrednosti Ct smo prenesli v program Microsoft Excel (Microsoft, ZDA), kjer smo izračunali povprečne vrednosti Ct vzorca iz dveh oz. treh ponovitev in razliko vrednosti Ct med dvema zaporednima redčitvama (ΔCt), ki nam je povedala, če je bila prisotna inhibicija pomnoževanja.

Pri določanju teoretične koncentracije virusa smo na podlagi redčitvene vrste izrisali umeritveno krivuljo, kjer smo na os x nanašali logaritemske vrednosti teoretične koncentracije tarčnega zaporedja standarda, na os y pa vrednosti Ct. Iz umeritvene krivulje smo za vsak vzorec odčitali logaritemske vrednosti teoretične koncentracije tarčnega zaporedja in iz enačbe krivulje izračunali teoretično koncentracijo tarčnega zaporedja virusa v določenem vzorcu:

$$\text{Teoretična koncentracija} = 10^{\log(\text{teoretične koncentracije})} \quad \dots (1)$$

Na podlagi vrednosti naklona (slope, S) umeritvene krivulje smo določili učinkovitost pomnoževanja (efficiency, E) tarčnega zaporedja po formuli:

$$E = 10^{(-1/S)} - 1 \quad \dots (2)$$

Iz umeritvene krivulje smo dobili tudi podatke o koeficientu linearne regresije (R^2).

Za relativno kvantifikacijo virusne RNA v posameznem vzorcu, glede na količino virusne RNA v določenem referenčnem vzorcu, smo uporabili formulo, ki temelji na 2 predpostavkah:

- (1) učinkovitost reakcije je 100 % ($E = 10^{[-1/S]} = 2$), kar pomeni, da se v vsakem ciklu PCR tarčno zaporedje podvoji;
- (2) izražanje gena za COX je konstantna pri vseh vzorcih (Pfaffl, 2001; VanGuilder in sod., 2008).

$$R = 2^{-[\Delta Ct_{\text{vzorca}} - \Delta Ct_{\text{reference}}]} \quad \dots (3)$$

$$R = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

R - relativna količina virusne RNA, $\Delta Ct_{\text{vzorca}}$ - razlika vrednosti Ct med tarčnim zaporedjem GFLV in COX v posameznem vzorcu, $\Delta Ct_{\text{reference}}$ - razlika vrednosti Ct med tarčnim zaporedjem GFLV in COX v izbranem referenčnem vzorcu (Pfaffl, 2001).

4 REZULTATI

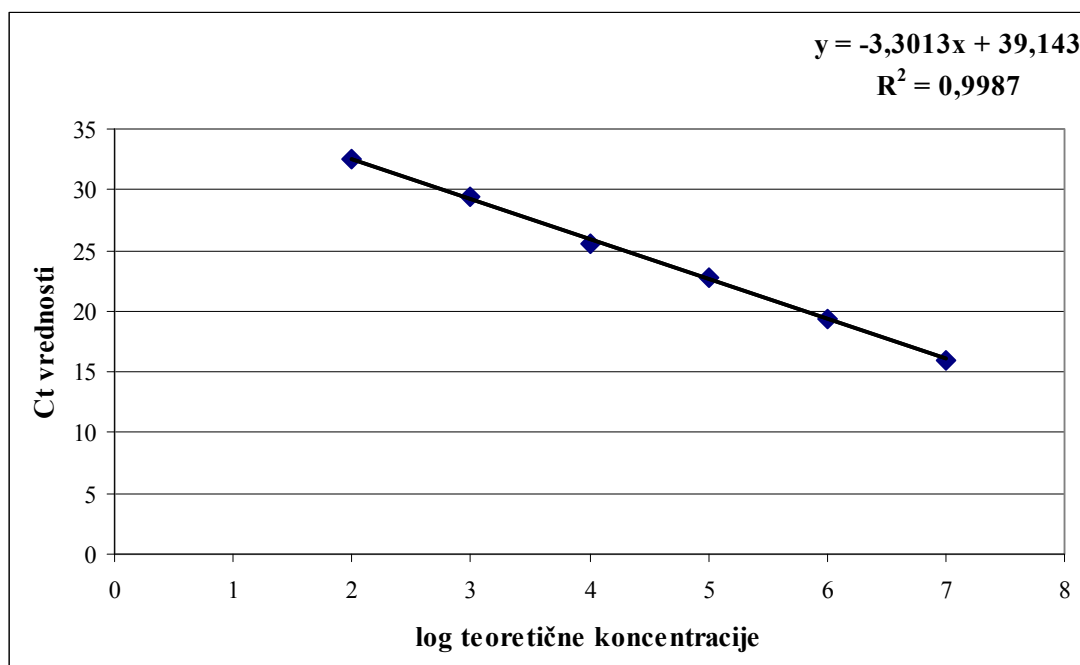
4.1 UMERITVENA KRIVULJA ZA DOLOČANJE TEORETIČNE KONCENTRACIJE VIRUSA GFLV

Za pripravo umeritvene krivulje smo RNA, izolirano iz listov vinske trte (*Vitis vinifera* sp.), okužene z izolatom GFLV F13, zaporedoma redčili v razmerju 1:10 do redčitve 10^{-7} , prepisali v cDNA in pomnožili z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Pri redčitvi 10^{-6} je prišlo do stohastičnega efekta.

Na podlagi naklona umeritvene krivulje ($S = -3,3013$) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja tarčnega zaporedja izolata GFLV F13, ki je znašala 1,009, kar pomeni 100 % učinkovitost. Koeficient linearne regresije (R^2) je znašal 0,9987, kar je pomenilo dobro korelacijo med vrednostmi Ct in količino virusne RNA (slika 8).

Preglednica 5: Podatki za umeritveno krivuljo izolata GFLV F13. ΔCt je razlika povprečnih vrednosti Ct med dvema zaporednima redčitvama. Povprečni Ct smo izračunali iz vrednosti Ct treh ponovitev.

Teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)	Logaritem teoretične koncentracije	Redčitev RNA	Ct	Povprečni Ct	ΔCt
10.000.000	7	neredčena	15,98	16,08	
			16,15		
			16,12		
1.000.000	6	10^{-1}	19,42	19,54	3,45
			19,40		
			19,79		
100.000	5	10^{-2}	22,79	22,83	3,30
			22,93		
			22,78		
10.000	4	10^{-3}	25,54	25,62	2,78
			25,75		
			25,56		
1.000	3	10^{-4}	29,46	29,35	3,74
			29,60		
			29,00		
100	2	10^{-5}	32,52	32,83	3,48
			33,04		
			32,94		
10	1	10^{-6}	39,10	37,39	4,55
			36,76		
			36,31		
1		10^{-7}	negativno		
			negativno		
			negativno		



Slika 8: Umeritvena krivulja, izrisana iz rezultatov redčitev RNA izolata GFLV F13. Vsaka točka na premici predstavlja vrednosti Ct treh ponovitev.

4.2 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI DVEH RAZLIČNIH METOD HOMOGENIZACIJE RASTLINSKEG MATERIALA

Liste vinske trte smo homogenizirali na dva različna načina: s sistemom Bioreba in sistemom TissueLyser. Iz homogeniziranih listov smo nato izolirali RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit, jo prepisali in pomnožili z dvostopenjskim RT-PCR-RČ.

Učinkovitost homogenizacije s sistemom Bioreba je bila zelo primerljiva z učinkovitostjo homogenizacije s sistemom TissueLyser, saj se v učinkovitosti homogenizacije obe metodi (ΔCt (B-T)) razlikujeta le za 0,5 do 1 cikla pri obeh amplikonih, za COX (preglednica 6) in GFLV (preglednica 7).

Za nadaljnje poskuse smo se odločili za homogenizacijo z sistemom Bioreba, saj je enostavnejši in primernejši za preprečevanje navzkrižne okužbe med vzorci vinske trte v primerjavi s homogenizacijo s sistemom TissueLyser.

Preglednica 6: Rezultati RT-PCR-RČ za določanje gena COX v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 in homogenizirali s sistemom TissueLyser (T) in Bioreba (B). Δ Ct COX je razlika povprečnih vrednosti Ct COX med dvema zaporednima redčitvama. Δ Ct (B-T) COX je razlika povprečnih vrednosti Ct COX med B in T. Povprečni Ct COX smo izračunali iz vrednosti Ct COX treh ponovitev.

Vol 2/54							
Homogenizacija	TissueLyser (T)			Bioreba (B)			
Redčitev cDNA	Ct COX	Povprečni Ct COX	Δ Ct COX	Ct COX	Povprečni Ct COX	Δ Ct COX	Δ Ct (B-T) COX
neredčena	16,42	16,33		17,29	17,32		0,99
	16,17			17,28			
	16,40			17,40			
10 ⁻¹	20,03	19,97	3,64	20,77	20,84	3,52	0,87
	19,83			20,86			
	20,05			20,89			
10 ⁻²	23,25	23,32	3,35	24,25	24,28	3,44	0,96
	23,22			24,26			
	23,48			24,34			

Preglednica 7: Rezultati RT-PCR-RČ za določanje virusa GFLV v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 in homogenizirali s sistemom TissueLyser (T) in Bioreba (B). Δ Ct GFLV je razlika povprečnih vrednosti Ct GFLV med dvema zaporednima redčitvama. Δ Ct (B-T) GFLV je razlika povprečnih vrednosti Ct GFLV med B in T. Povprečni Ct GFLV smo izračunali iz vrednosti Ct GFLV treh ponovitev.

Vol 2/54							
Homogenizacija:	TissueLyser (T)			Bioreba (B)			
Redčitev cDNA	Ct GFLV	Povprečni Ct GFLV	Δ Ct GFLV	Ct GFLV	Povprečni Ct GFLV	Δ Ct GFLV	Δ Ct (B-T) GFLV
neredčena	12,92	12,93		13,49	13,42		0,49
	12,87			13,29			
	12,98			13,47			
10 ⁻¹	16,79	16,85	3,93	17,28	17,43	4,01	0,58
	16,87			17,41			
	16,90			17,60			
10 ⁻²	20,40	20,53	3,68	21,17	21,28	3,85	0,75
	20,58			21,32			
	20,61			21,36			
10 ⁻³	24,24	24,32	3,79	25,02	25,19	3,91	0,87
	24,46			25,21			
	24,27			25,34			
10 ⁻⁴	28,15	28,17	3,85	28,64	28,73	3,55	0,56
	28,19			28,72			
	28,18			28,85			

4.3 IZOLACIJA RNA

4.3.1 Primerjava izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in z lovljenjem virusov na protitelesa (IC)

Za primerjavo izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in z lovljenjem virusov na protitelesa (IC) smo uporabili liste okuženega (Vol 10) in zdravih vzorcev vinske trte (Ref mix je sestavljen iz listov zdravih vzorcev vinske trte Ref DU 1/1, Ref 51 11/69, Ref 61 12/68), pri čemer smo homogenat listov okuženega vzorca vinske trte redčili v homogenatu listov zdravih vzorcev vinske trte ter iz posameznih redčin izolirali RNA. Le-to smo nato prepisali in pomnožili z enostopenjskim RT-PCR-RČ.

Pri izolaciji virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit se je ekstrahiralo več virusne RNA kot pri lovljenju virusov na protitelesa (IC). Pri dodatku vode brez RNaz za sprostitve virusne RNA pri metodi IC smo virus GFLV določili do redčitve 10^{-3} , pri dodatku 1 % TritonX-100 pa do redčitve 10^{-4} . Pri virusni RNA, ki smo jo izolirali s kompletom RNeasy Plant Mini Kit, smo zaznali virus GFLV do redčitve 10^{-5} , vendar smo pri neredčenem vzorcu zaznali inhibicijo (preglednica 8).

Preglednica 8: Primerjava izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in z lovljenjem virusov na protitelesa (IC). Liste smo vzorčili maja 2009 v rastlinjaku (NIB).

Vol 10 (+) v Ref mix (-)			
Redčitev (okužen : neokužen ^a)	RT-PCR-RČ (Ct) ^b		
	Rneasy ^c	IC (TritonX-100) ^d	IC (H₂O) ^e
1 : 0	+ (17,13)	+ (19,66)	+ (19,67)
1 : 10	+ (18,72)	+ (22,98)	+ (24,07)
1 : 100	+ (21,84)	+ (25,98)	+ (25,77)
1 : 1.000	+ (25,11)	+ (30,48)	+ (29,60)
1 : 10.000	+ (29,11)	+ (34,12)	-
1 : 100.000	+ (32,60)	-	-
1 : 1.000.000	-	-	-
1 : 10.000.000	-	-	-
0 : 1	-	-	-

^a Homogenat listov vzorca vinske trte, okužen z GFLV (Vol 10) in redčen v homogenatu listov zdravih vzorcev vinske trte (Ref mix).

^b Ct pridobljen z enostopenjskim RT-PCR-RČ in podan kot povprečna vrednost Ct treh ponovitev.

^c Izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit.

^d Izolacija virusne RNA z lovljenjem virusov na protitelesa (IC), pri čemer smo za sprostitvev virusne RNA uporabili 1 % TritonX-100.

^e Izolacija virusne RNA z lovljenjem virusov na protitelesa (IC), pri čemer smo za sprostitvev virusne RNA uporabili vodo brez RNaz.

- Virus ni bil določen.

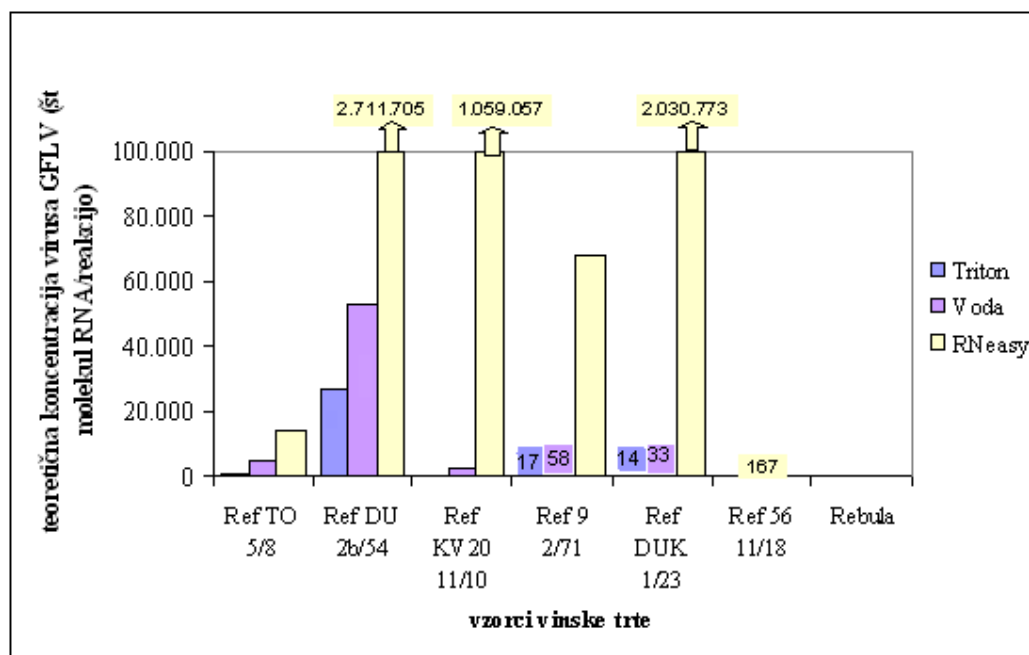
4.3.2 Primerjava izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in s sprostitvijo virusov po testu ELISA

Virusno RNA iz listov različnih vzorcev vinske trte smo izolirali z dvema različnima metodama, kompletom RNeasy Plant Mini Kit in sprostitvijo virusov po testu ELISA. Po izolaciji smo virusno RNA prepisali in pomnožili z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Celotna tabela rezultatov je priložena (priloga A).

Pri primerjavi izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in s sprostitvijo virusov po testu ELISA iz listov različnih vzorcev vinske trte smo kot primeren rezultat izbrali 10x redčitev RNA, saj je pri neredčenem vzorcu RNA v veliko primerih prišlo do inhibicije reakcije. Rebula je zdrav vzorec, ki dokazuje, da pri nobeni izolaciji ni prišlo do navzkrižne okužbe, medtem ko je Ref 56 11/18 vzorec z mejno, zelo nizko koncentracijo

virusa, ki smo jo uspeli zaznati le, ko smo RNA izolirali s kompletom RNeasy Plant Mini Kit.

Pri izolaciji virusne RNA z kompletom RNeasy Plant Mini Kit je bila ugotovljena koncentracija virusa GFLV v listih različnih vzorcev vinske trte od 3 do 60.000x večja kot pri izolaciji virusne RNA s sprostivjo virusov po testu ELISA, kar pomeni, da se je pri izolaciji s kompletom RNeasy Plant Mini Kit ekstrahiralo več virusne RNA. Pri dodatku vode v luknjice mikrotitrne ploščice pri sprostitvi virusov po testu ELISA je bila ugotovljena koncentracija virusa GFLV od 2 do 4 x večja kot pri dodatku 1 % TritonaX-100. TritonX-100 najverjetneje inhibira encime reakcije pomnoževanja. (slika 9, priloga A).



Slika 9: Primerjave izolacije virusne RNA s sprostivjo virusov po testu ELISA in s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz listov različnih vzorcev vinske trte, vzorčenih julija 2009. Triton – izolacija virusne RNA s sprostivjo virusov po testu ELISA, pri čemer smo uporabili 1 % TritonX-100. Voda - izolacija virusne RNA s sprostivjo virusov po testu ELISA, pri čemer smo uporabili vodo brez RNaz. RNeasy – izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit. Rebula je negativna kontrola.

4.4 PRIMERJAVA METOD DAS-ELISA IN RT-PCR-RČ

4.4.1 Primerjava občutljivosti metod DAS-ELISA in RT-PCR-RČ

Z metodo DAS-ELISA smo zaznali prisotnost virusa GFLV do redčitve 1:100, medtem ko z metodo RT-PCR-RČ do redčitve 1:100.000 (preglednica 9), kar kaže na to, da je metoda RT-PCR-RČ 1.000x občutljivejša od metode DAS-ELISA.

Preglednica 9: Primerjava občutljivosti metod DAS-ELISA in RT-PCR-RČ. Liste smo vzorčili maja 2009 v rastlinjaku (NIB).

Vol 10 (+) v Ref mix (-)		
Redčitev (okužen : neokužen ^a)	DAS-ELISA (OD) ^b	RT-PCR-RČ (Ct) ^c
1 : 0	+ (3,00)	+ (17,13)
1 : 10	+ (3,00)	+ (18,72)
1 : 100	+ (0,49)	+ (21,84)
1 : 1.000	-	+ (25,11)
1 : 10.000	-	+ (29,11)
1 : 100.000	-	+ (32,60)
1 : 1.000.000	-	-
1 : 10.000.000	-	-
0 : 1	-	-

^a Homogenat listov vzorca vinske trte, okužen z GFLV (Vol 10) in redčen v homogenatu listov zdravih vzorcev vinske trte (Ref mix).

^b OD (optična gostota) izmerjena po 2h inkubacije v ELISA substratnem pufru. Rezultat je pozitiven, ko je vrednost OD > 0,13 (2x vrednost negativne kontrole).

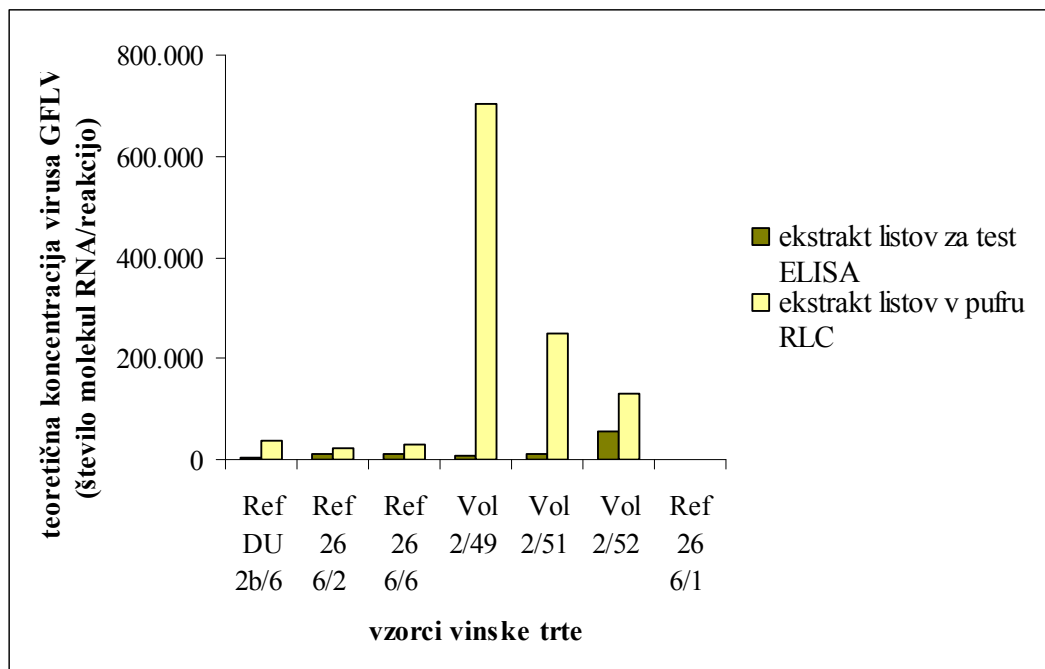
^c Ct dobljena z enostopenjskim RT-PCR-RČ in podana kot povprečna vrednost Ct vzorca iz treh ponovitev.
- Virus ni bil določen.

4.4.2 Primerjava izolacije RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit v primeru uporabe ekstraktov za test ELISA in ekstraktov v pufru RLC

S kompletom RNeasy Plant Mini Kit smo RNA izolirali iz ekstraktov listov za test ELISA in iz ekstraktov listov v pufru RLC, ki smo jo prepisali in pomnožili z enostopenjskim RT-PCR-RČ.

Kot primeren rezultat smo izbrali 10x redčitev RNA, saj je pri neredčenem vzorcu RNA v veliko primerih prišlo do inhibicije reakcije. Celotna tabela rezultatov in izračunov je priložena (priloga B in C).

Pri listih različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili v vinogradih, se je pufer RLC izkazal za mnogo boljšega, kar pomeni, da se je pri ekstraktih v pufru RLC izoliralo več RNA (slika 10). Vzorec Ref 26 6/1 ni bil okužen z virusom GFLV, kar je bilo predhodno dokazano s testom DAS-ELISA (Vojvoda, 2005). Z metodo RT-PCR-RČ smo potrdili, da vzorec Ref 26 6/1 ni bil okužen z virusom GFLV. Tako smo dokazali, da ekstrakcijski pufri niso bili navzkrižno okuženi.



Slika 10: Grafični prikaz teoretične koncentracije virusa GFLV v ekstraktih listov za test ELISA in ekstraktih listov v pufru RLC različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili septembra 2008 in testirali z metodo RT-PCR-RČ.

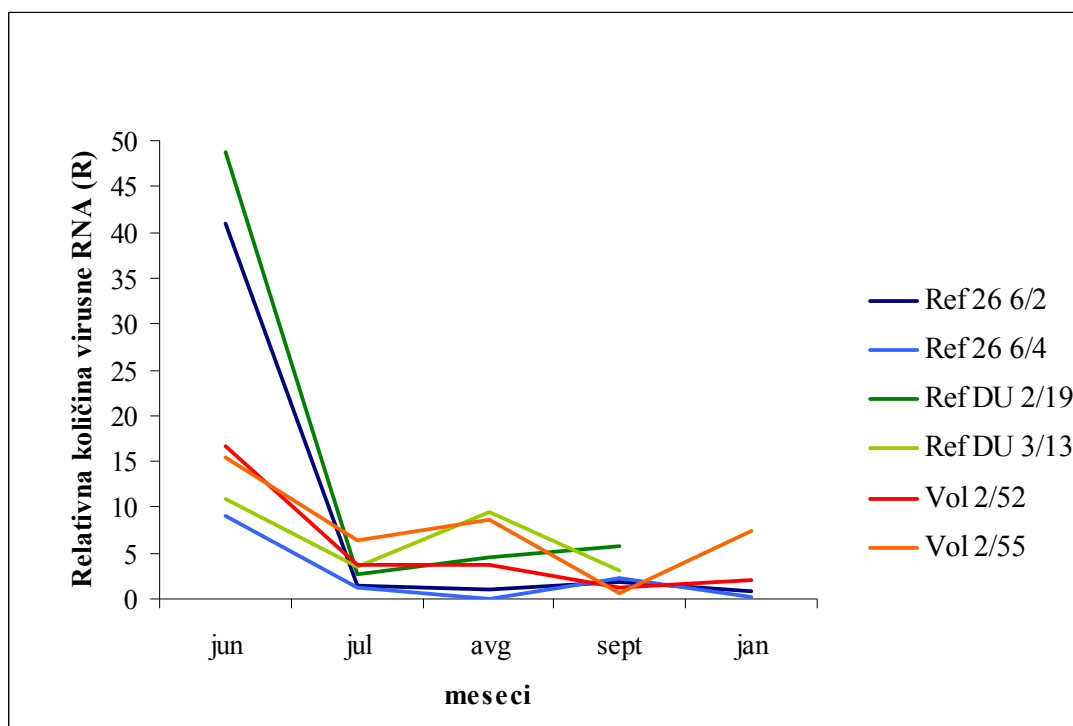
4.5 DOLOČITEV VIRUSA GFLV V TKIVU VINSKE TRTE Z RT-PCR-RČ

4.5.1 Določitev virusa GFLV v floemskem tkivu vinske trte skozi sezono

Z enostopenjskim RT-PCR-RČ smo v floemskem tkivu izbranih vzorcev vinske trte določili virus GFLV v različnih mesecih sezone. Celotna tabela rezultatov in izračunov je priložena (priloga D).

Glede na rezultate reakcije RT-PCR-RČ smo se odločili za 100x redčitev RNA, saj je bil pri tej redčitvi učinek inhibicije reakcije odpravljen.

Na podlagi izračunov relativne količine virusne RNA (R) lahko ocenimo, da je v floemskem tkivu pri vseh vzorcih vinske trte največ virusne RNA bilo prisotne na začetku rastne sezone (junij), medtem ko je najmanj virusne RNA v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte bilo prisotne v drugih delih rastne sezone (julij, avgust, september) ter izven rastne sezone (januar) (slika 11).



Slika 11: Grafični prikaz relativne količine virusne RNA (R) v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte skozi rastno sezono 2008 (junij, julij, avgust in september) in izven rastne sezone 2009 (januar). Vzorca Ref DU 2/19 in DU 3/13 januarja nista bila testirana.

4.5.2 Primerjava koncentracije virusa GFLV v listih (v rastni sezoni) in floemskem tkivu (izven rastne sezone) vinske trte

Rastlinski material vinske trte, okužen z GFLV, ki smo ga vzorčili junija in januarja, smo homogenizirali s sistemom TissueLyser. Iz homogeniziranega rastlinskega materiala smo nato izolirali RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit, jo prepisali in pomnožili z dvostopenjskim RT-PCR-RČ.

V mladih zelenih listih vinske trte, vzorčenih junija, je bila koncentracija virusa GFLV precej višja (približno 100x) kot v nastrganem floemskem tkivu dormantnih poganjkov vinske trte, vzorčenih januarja (preglednica 10). Iz ΔC_t (priloga E) je razvidno, da ni bilo inhibicije pomnoževanja neglede na to, ali je bila RNA izolirana iz listov ali iz floemskega tkiva dormantnih poganjkov. Kljub temu pa smo po izračunu povprečne teoretične koncentracije vseh redčitev opazili do 4x odstopanja med redčitvami, kar pripisujemo vplivu različnih učinkovitosti med reakcijami posameznih vzorcev, predvsem med

vzorcem, uporabljenim za umeritveno krivuljo in vzorci, za katere smo na podlagi umeritvene krivulje računali teoretične koncentracije virusa.

Preglednica 10: Teoretična koncentracija virusa GFLV v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 (rastna sezona) in v floemskem tkivu vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo ga vzorčili januarja 2009 (izven rastne sezone). Prikazane so povprečne vrednosti teoretičnih koncentracij, izračunane iz treh ponovitev.

Redčitev RNA	Povprečna teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)	
	Listi - junij	Floem - januar
neredčena	87.382.317	1.293.193
10^{-1}	5.646.847	84.324
10^{-2}	435.168	5.439
10^{-3}	30.917	310
10^{-4}	2.105	18

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Za določanje virusa GFLV smo uporabili molekularno metodo RT-PCR-RČ. Z metodo RT-PCR-RČ smo kvalitativno in kvantitativno določili virus GFLV v tkivu vinske trte. Rastlinski material vinske trte smo najprej homogenizirali in iz njih izolirali RNA, ki smo jo nato prepisali in pomnoževali z RT-PCR-RČ.

Metoda RT-PCR-RČ je izredno občutljiva metoda, zato moramo biti med samim eksperimentalnim delom zelo natančni, da preprečimo navzkrižno okužbo med vzorci. Za preprečitev navzkrižne okužbe smo uporabljali sterilne pripomočke, nastavke s filtri za pipete in rokavice, ki smo jih pogosto menjevali. Pomemben je tudi izbor učinkovite metode za izolacijo RNA iz tkiva vinske trte, saj so v rastlinskem materialu pogosti inhibitorji reakcije RT-PCR, kar lahko zmanjša občutljivost same metode. Napačne Ct vrednosti, ki so posledica inhibicije RT-PCR-RČ reakcije, smo spremljali tako, da smo RNA redčili 10x in 100x, pri čemer so se inhibitorji razredčili in niso imeli več negativnega učinka na reakcijo.

5.1.1 Homogenizacija rastlinskega materiala

Primerjali smo dva načina homogenizacije: sistem Tissuelyser in sistem Bioreba, z namenom, da najdemo način, kjer ne bi bila potrebna uporaba tekočega dušika. Le ta je zelo nepraktična in lahko predstavlja vir navzkrižnih okužb, ki so bile pogoste pri homogenizaciji s sistemom Tissuelyser, kjer smo za ohranitev vzorcev potopili mikrocentrifugirke z vzorci v tekoči dušik. Predvidevamo, da je bil problem v luknjicah na pokrovčkih mikrocentrifugirk, ki so potrebne za izenačitev pritiska ob potopitvi mikrocentrifugirke v tekoči dušik, pri čemer je verjetno prihajalo do manjšega prenosa rastlinskega materiala med vzorci. Prav tako je sistem, kjer je potrebno vzorce shranjevati v mikrocentrifugirke (TissueLyser) veliko manj praktičen kot sistem shranjevanja v vrečke (Bioreba). Po učinkovitosti se je homogenizacija z sistemom Bioreba izkazala za zelo primerljivo s sistemom Tissuelyser, kar je veljalo za oba testirana amplikona za COX (preglednica 6) in GFLV (preglednica 7), zato smo se pri nadaljnjih poskusih odločili za uporabo homogenizacije s sistemom Bioreba, ki je priročnejši in primernejši z vidika navzkrižnih okužb med vzorci.

Pri opisanem poskusu je šlo za preliminarni rezultat, zato smo testirali le en vzorec. V nadaljevanju bi bilo smiselno izbrati in testirati večje število vzorcev.

5.1.2 Izolacija RNA

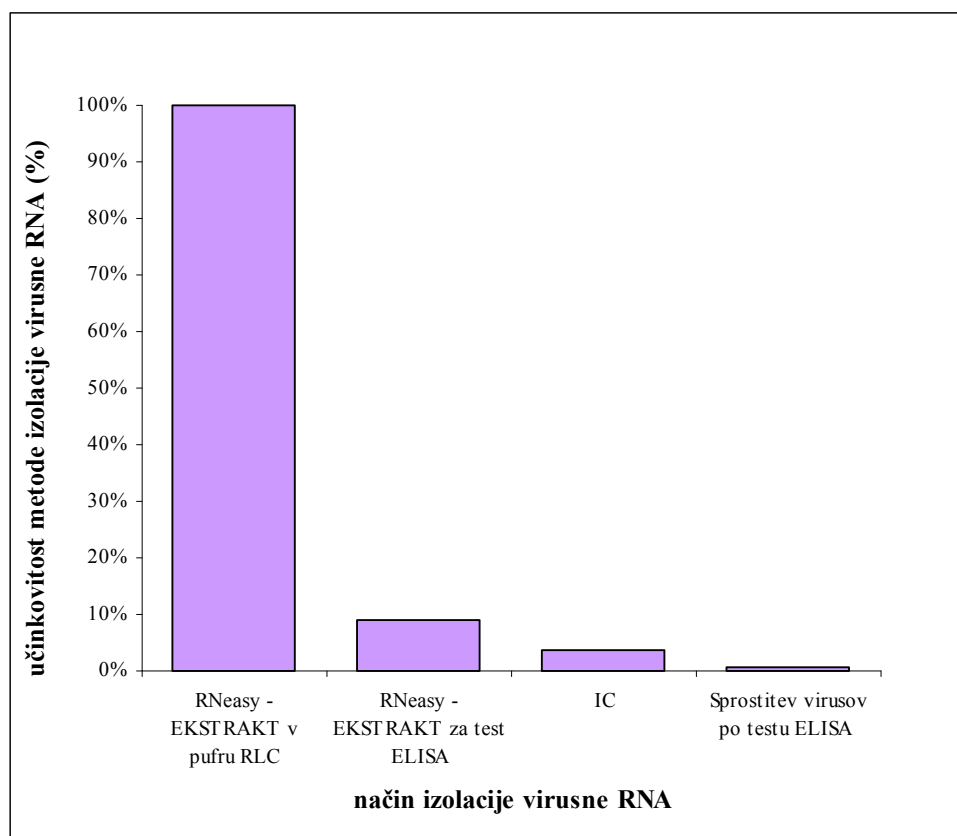
Učinkovitost izolacije RNA je zelo pomembna pri določanju rastlinskih virusov z RT-PCR-RČ, saj lahko s primerno metodo izolacije odstranimo ali vsaj zmanjšamo prisotnost inhibitorjev v rastlinskem materialu, ki lahko ovirajo reakcijo RT-PCR-RČ. Za izolacijo RNA (vključno z virusno) smo uporabili komplet RNeasy Plant Mini Kit, za izolacijo pretežno virusne RNA pa lovljenje virusov na protitelesa (IC) in sprostitvev virusov po testu ELISA (post-ELISA virus release).

Pri primerjavi izolacije virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in z IC, pri čemer smo uporabili homogenat listov okuženega vzorca vinske trte, različno redčenega v homogenatu listov zdravih vzorcev vinske trte, smo določili 10-100x razliko v prid izolaciji virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (preglednica 8). Virusno RNA iz listov vinske trte smo izolirali tudi s sprostitvijo virusov po testu ELISA ter jo primerjali z izolacijo virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit. Slednja se je izkazala za učinkovitejšo, saj smo z njo izolirali od 3 do 60.000x več virusne RNA iz listov vinske trte (slika 9). Razlog bi lahko bil v tem, da z metodama IC in s sprostitvijo virusov po testu ELISA zajamemo le viruse, ki so se s svojim proteinskim plaščem prijeli na protitelesa, površina luknjic, obdana s protitelesi, pa je zelo omejena v primerjavi z volumnom tkiva, iz katerega smo izolirali virusno RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit. Prav tako zajamemo le RNA, ki je bila zaprta v virusni proteinski plašč, tako v primeru razpada virusa zaradi kakršnihkoli razlogov, ne bi dobili virusne RNA, saj bi se posamezne podenote proteinskega plašča vezale na protitelesa brez RNA. V vsakem primeru se je izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit izkazala za veliko učinkovitejšo kot z IC in s sprostitvijo virusov po testu ELISA, kar so potrdili tudi pri določanju krompirjevega virusa Y (Potato virus, PVY) (Kogovšek in sod., 2008).

Izolacija virusne RNA z IC se je izkazala za učinkovitejšo kot izolacija virusne RNA s sprostitvijo virusov po testu ELISA (slika 12). To si lahko razlagamo na dva načina. Pri metodi IC smo izvedli denaturacijo v 10 μ l tekočine in šele nato dodali ostalih 90 μ l, medtem ko smo pri sprostitvi virusov po testu ELISA izvedli sprostitvev direktno v 50 μ l. Predvidevamo, da se manjša količina tekočine v istem času prej segreje in dlje učinkuje na sprostitvev virusne RNA, ki je zato učinkovitejše. Drug bolj verjeten razlog pa je, da se je med intenzivnimi večkratnimi spiranji, ki so del testa ELISA veliko virusov spralo in smo jih potem s sproščanjem virusov po testu ELISA uspeli manj izolirati kot pri IC.

5.1.3 Primerjava različnih metod izolacije virusne RNA

Za najbolj učinkovito metodo izolacije virusne RNA iz tkiva vinske trte se je izkazala izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz ekstraktov v pufru RLC, sledila je izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz ekstraktov za test ELISA, nato izolacija virusne RNA z IC. Za najmanj učinkovito metodo izolacije virusne RNA pa se je izkazala metoda sprostitve virusov po testu ELISA (slika 12).



Slika 12: Primerjava učinkovitosti različnih metod izolacije virusne RNA iz tkiva vinske trte. Pri IC in sprostitvi virusov po testu ELISA smo uporabili ekstrakte za test ELISA.

5.1.4 Primerjava metod DAS-ELISA in RT-PCR-RČ

Metoda DAS-ELISA je hitra, enostavna in poceni, vendar pa so pri določanju virusa GFLV ugotovili, da je manj občutljiva, zaradi česar je primernejša uporaba bolj občutljivih metod kot je npr. RT-PCR-RČ. Metodi se tudi v osnovi zelo razlikujeta, saj gre pri DAS-

ELISA za določanje virusnega plaščnega proteina, medtem ko gre pri RT-PCR-RČ za določanje virusne RNA.

Občutljivost metode DAS-ELISA smo primerjali z občutljivostjo RT-PCR-RČ. Dokazali smo, da je metoda RT-PCR-RČ 1.000x bolj občutljiva kot metoda DAS-ELISA, saj smo z DAS-ELISA zaznali prisotnost virusa GFLV le do redčitve 1:100, z metodo RT-PCR-RČ pa do redčitve 1:100.000 (preglednica 9). Olmos in sodelavci (2005) prav tako poročajo o 1.000x večji občutljivosti RT-PCR-RČ v primerjavi z indirektno metodo dvojnega sendviča (DASI)-ELISA pri določanju virusa »šarke« (Plum pox virus, PPV), medtem ko Boonham in sodelavci (2000) poročajo o 100x do 10.000x večji občutljivosti RT-PCR-RČ v primerjavi s testom ELISA pri določanju različnih virusov krompirja. Tudi pri določanju virusa rumenega mozaika ječmena (Barley yellow mosaic virus, BYMV) in virusa blagega mozaika ječmena (Barley mild mosaic virus, BMMV) (Mumford in sod., 2004) ter kvantitativnem določanju virusa mozaika paradižnika (Tomato mosaic virus, ToMV) (Boben J., 2006) so ugotovili 1.000x večjo občutljivost RT-PCR-RČ v primerjavi s testom DAS-ELISA.

V primerjavi z DAS-ELISA se je RT-PCR-RČ izkazal za hitrejšo metodo, kar je izredno pomembno pri diagnostičnem delu.

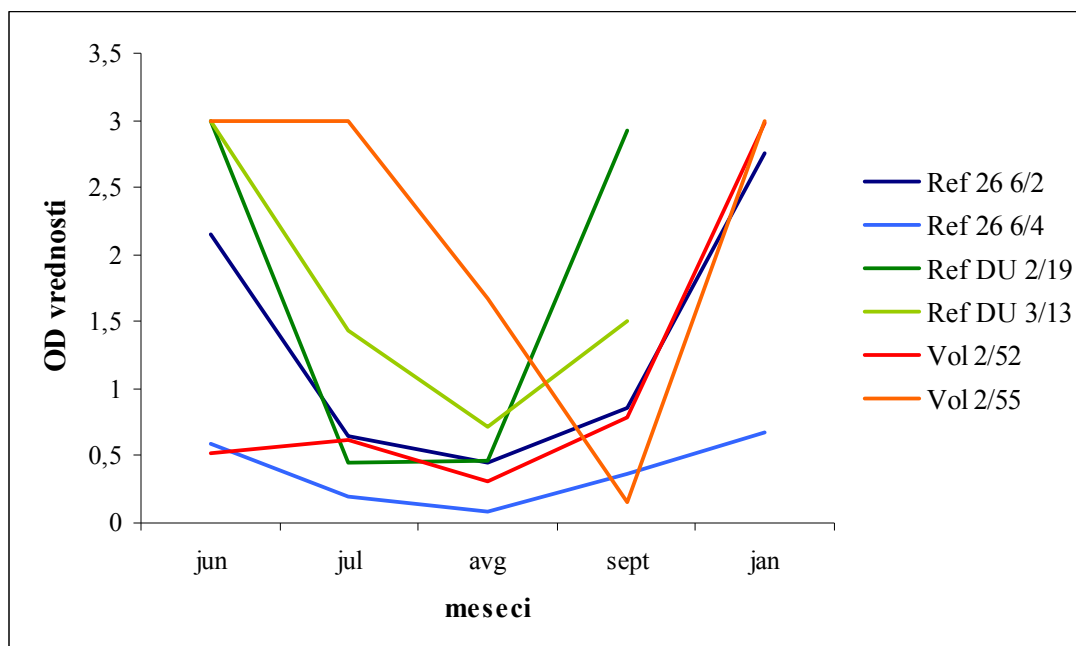
Test DAS-ELISA se uporablja za določanje številnih virusov vinske trte, med drugim tudi za določanje virusa GFLV, zato nas je zanimalo, ali lahko uporabimo ekstrakte za test ELISA tudi za določanje GFLV z RT-PCR-RČ. Tako bi se izognili ponovni homogenizaciji rastlinskega materiala in prihranili čas. Pri primerjavi izolacije RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz ekstraktov listov, pripravljenih s pufrom RLC in iz ekstraktov listov za test ELISA, smo ugotovili, da je izolacija RNA iz ekstraktov listov, pripravljenih s pufrom RLC uspešnejša pri odstranitvi inhibitorjev in od 2 do 90x bolj učinkovita kot izolacija RNA iz ekstraktov listov za test ELISA (slika 10). Zaradi tega je za homogenizacijo rastlinskega materiala za RT-PCR-RČ bolje uporabiti pufer RLC, vendar je tudi pufer za test ELISA dovolj dober v primeru, da je količina virusa nad mejnimi koncentracijami.

5.1.5 Določitev virusa GFLV v tkivu vinske trte z RT-PCR-RČ

Z metodo RT-PCR-RČ smo relativno kvantificirali virus GFLV v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte v različnih mesecih sezone. Iz rezultatov RT-PCR-RČ je razvidno, da je bilo največ virusa v floemskem tkivu vinske trte določenega na začetku rastne sezone (junij), medtem ko je bila koncentracija virusa v drugih delih rastne sezone (julij, avgust, september) ter izven rastne sezone (januar), pri različnih vzorcih vinske trte

manjša (slika 11). Na podlagi predhodnih rezultatov (Rowhani in sod., 1992; Čepin, ustni vir) bi to lahko pripisali dejavnikom: manj padavin, več sončnega obsevanja, razlikam v značilnostih posameznih sort ter različnim genotipom virusa GFLV, ki posamezne trte okužujejo.

Rezultate relativne kvantifikacije z RT-PCR-RČ smo primerjali z rezultati testa DAS-ELISA. S testom DAS-ELISA je bilo največ virusa GFLV v floemskem tkivu vinske trte določenega na začetku rastle sezone (junij) in izven rastle sezone (januar), najmanj pa sredi rastle sezone (avgust in september) (slika 13) (Čepin in sod., 2009). Rezultati obeh metod se skladajo glede največje količine virusa GFLV v floemskem tkivu na začetku sezone (junij) in izrazitega zmanjšanja koncentracije virusa GFLV v floemskem tkivu sredi rastle sezone. Na drugi strani pa se rezultati obeh metod razhajajo na koncu rastle sezone, ko so zaznali povečanje količine virusnega plaščnega proteina s testom DAS-ELISA in še vedno zelo nizko količino virusne RNA z RT-PCR-RČ. To bi lahko pripisali tvorbi plaščnega proteina virusa proti koncu in izven rastle sezone.



Slika 13: Grafični prikaz količine virusa GFLV, določenega z DAS-ELISA, v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte skozi rastle sezono 2008 (junij, julij, avgust in september) in izven rastle sezone 2009 (januar). Prikazani so spektrofotometrični odčitki (OD vrednosti) testa DAS-ELISA, izmerjeni 2 uri po dodatku substratnega pufra. Vzorca Ref DU 2/19 in Ref DU 3/13 januarja nista bila testirana (Čepin in sod., 2009).

Koncentracija GFLV v mladih zelenih listih, vzorčenih junija, je bila približno 100x višja kot v nastrganem floemskem tkivu rozg, ki smo jih vzorčili januarja (preglednica 10), kar nakazuje na to, da je določanje virusa GFLV v zgodnjem poletnem času bolj zanesljivo kot v zimskem času. Do enakih zaključkov so prišli tudi Rowhani in sodelavci (1992) ter Čepin in sodelavci (2009), ki so za določanje virusa GFLV uporabili metodo DAS-ELISA. Pri opisanem poskusu je šlo za preliminarni rezultat, zato smo testirali le en vzorec. V nadaljevanju bi bilo smiselno izbrati in testirati večje število vzorcev.

5.2 SKLEPI

Z uporabo metode RT-PCR-RČ pri določanju virusa GFLV v tkivu vinske trte smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Homogenizacija s sistemom Bioreba je bila po učinkovitosti primerljiva s homogenizacijo s sistemom TissueLyser, vendar je enostavnejša in primernejša za preprečevanje navzkrižne okužbe med vzorci vinske trte.
- Izolacija virusne RNA iz tkiva vinske trte s kompletom RNeasy Plant Mini Kit se je izkazala za učinkovitejšo v primerjavi z izolacijo virusne RNA z metodama IC in sprostivijo virusov po testu ELISA.
- Metoda RT-PCR-RČ je bila 1.000x bolj občutljiva od DAS-ELISA metode.
- Pri izolaciji RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit je bil pufer RLC s PVP učinkovitejši kot ekstrakcijski pufer za vinsko trto, ki se običajno uporablja za homogenizacijo rastlinskega materiala vinske trte pri določanju virusa GFLV z metodo DAS-ELISA.
- Z metodo RT-PCR-RČ nam je uspelo relativno kvantificirati virus GFLV v floemskem tkivu vinske trte v in izven rastne sezone. Največ virusa GFLV smo določili na začetku rastne sezone (junij), med rastno sezono (julij, avgust, september) pa je količina virusne RNA izrazito padla ter ostala na istem nivoju tudi izven rastne sezone (januar).
- Koncentracija virusa GFLV v vinski trti je bila junija (v rastni sezoni) v mladih zelenih listih večja kot v floemskem tkivu rozg januarja (izven rastne sezone).

6 POVZETEK

Virus pahljačavosti vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) povzroča bolezen, imenovano kužno izrojevanje vinske trte (grapevine fanleaf degeneration), ki se lahko kaže na vinski trti kot močno zmanjšanje, v skrajnih primerih pa celo kot popolna izguba letnega pridelka vinske trte. Standardna metoda za določanje virusa GFLV je DAS-ELISA, ki pa v primeru nizke koncentracije virusa ni vedno dovolj občutljiva, zato je priporočljiva uporaba bolj občutljivih molekularnih metod.

Za določanje virusa GFLV smo uporabili molekularno metodo RT-PCR-RČ, s katero smo kvalitativno in kvantitativno določili virus GFLV v različnih vzorcih vinske trte. Nabrani rastlinski material vinske trte smo najprej homogenizirali in iz njih izolirali RNA, ki smo jo nato prepisali in pomnoževali z RT-PCR-RČ.

Pri primerjavi dveh načinov homogenizacije, sistem TissueLyser in sistem Bioreba, se je za priročnejšo in primernejšo z vidika navzkrižne okužbe med vzorci izkazala homogenizacija s sistemom Bioreba, zato smo se pri nadaljnjih poskusih odločili za uporabo homogenizacije s sistemom Bioreba.

Izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit se je v primerjavi z izolacijo virusne RNA z IC in s sproščanjem virusov po testu ELISA izkazala za učinkovitejšo. Pri IC oz. pri sproščanju virusov po testu ELISA smo namreč zajeli le viruse, ki so se s svojim proteinskim plaščem prijeli na protitelesa, in le RNA, ki je bila zaprta v virusni plaščni protein.

Izolacija virusne RNA z IC se je izkazala za učinkovitejšo v primerjavi z izolacijo virusne RNA s sprostivjo virusov po testu ELISA.

Občutljivost metode DAS-ELISA smo primerjali z občutljivostjo RT-PCR-RČ in dokazali, da je metoda RT-PCR-RČ 1.000x občutljivejša od metode DAS-ELISA. V primerjavi z DAS-ELISA se je RT-PCR-RČ izkazal za hitrejšo metodo, kar je izredno pomembno pri diagnostičnem delu.

Pri izolaciji RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit smo primerjali učinkovitost izolacije v primeru, da smo za pripravo homogenata rastlinskega materiala vinske trte uporabili ekstrakcijski pufer za test ELISA ali pufer RLC z dodatkom PVP. Izkazalo se je, da je za homogenizacijo rastlinskega materiala za RT-PCR-RČ bolje uporabiti pufer RLC, vendar je tudi pufer za test ELISA dovolj dober v primeru, da je količina virusa nad mejnimi koncentracijami testa ELISA.

Z metodo RT-PCR-RČ smo relativno kvantificirali virus GFLV v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte v različnih mesecih sezone. Največ virusa smo določili na začetku rastne sezone (junij), medtem ko je bila koncentracija virusa manjša v drugih delih rastne sezone (julij, avgust, september) ter izven nje (januar).

Rezultate relativne kvantifikacije smo primerjali z rezultati testa DAS-ELISA. Rezultati obeh metod se skladajo glede največje količine virusa v floemskem tkivu vinske trte na začetku sezone (junija) in izrazitega zmanjšanja koncentracije virusa GFLV sredi rastne sezone. Na drugi strani pa se rezultati obeh metod razhajajo v koncu rastne sezone, ko so zaznali povečanje količine virusnih proteinov s testom DAS-ELISA, in še vedno zelo nizko količino virusne RNA z RT-PCR-RČ, kar bi lahko bila posledica tvorbe plaščnega proteina virusa.

Pri primerjavi koncentracije virusa GFLV v mladih zelenih listih v rastni sezoni in floemskem tkivu vinske trte izven rastne sezone smo ugotovili, da je določanje virusa GFLV v zgodnjem poletnem času bolj zanesljivo kot v zimskem času.

7 VIRI

- Alkowni R., Rowhani A. 2003. Molecular characterization of grapevine leafroll-associated virus 9, a new closterovirus associated with grapevine leafroll disease complex. V: 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 12-17 September 2003, Locorotondo, Italy: Extended abstracts. Bari, University of Bari: 33-33
- Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 3:183-195
- Andret-Link P., Schmitt-Keichinger C., Demangeat G., Komar V., Fuchs M. 2004b. The specific transmission of grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320, 1: 12-22
- Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5, 2: 209-219
- 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, 1: 161-171
- Blahova L., Pidra M. 2009. Real-time PCR of grapevine fanleaf virus. V: 16th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 31 August-4 September, 2009, Dijon, France: Extended abstracts. *Le Progres Agricole et Viticole*, 126: 83-84
- Boben J. 2006. Kvalitativno in kvantitativno določanje rastlinskih virusov z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 100 str.
- Boonham N., Walsh K., Mumford R.A., Barker I. 2000. Use of multiplex real-time PCR (TaqMan) for the detection of potato viruses. *European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Bulletin*, 30, 3-4: 427-430
- Bouyahia H., Potere O., Boscia D. 2003. Sampling methodology for the detection of grapevine fanleaf virus by ELISA. V: 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 12-17 September 2003, Locorotondo, Italy: Extended abstracts. Bari, University of Bari 204-205
- Bovey R., Gartel W., Hewitt W.B., Martelli G.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like disease of grapevines. *Colour atlas of symptoms*. Lausanne, Editions Payot: 181 str.
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597-601

- Buzkan N., Walker A. 2004. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from grapevine dormant cuttings infected with GFLV. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3, 3: 387-390
- Čepin U., Krsmanovič S., Pompe-Novak M., Ravnikar M. 2009. Distribution of grapevine fanleaf virus (GFLV) in grapevines during the season. V: 16th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 31 August-4 September, 2009, Dijon, France: Extended abstracts. *Le Progres Agricole et Viticole*, 126: 90-91
- Demangeat G., Voison R., Monit J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95, 10: 1151-1156
- Ellison S., English C., Burns M., Keer J., 2006. Routes improving and reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 6, 1, 33
- Fattouch S., M'hirsi S., Acheche H., Marrakchi M., Marzouki N. 2001. RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for detection of grapevine fanleaf virus in Tunisian grapevines. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 3: 235-244
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. 2005. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 1259 str.
- Fuchs M., Pinck M., Serghini M.A., Ravelonandro M., Walter B., L. Pinck. 1989. The nucleotide sequence of satellite RNA in grapevine fanleaf virus, strain F13. *Journal of General Virology*, 70: 955-962
- Fuchs M., Pinck M., Etienne L., Pinck L., Walter B. 1991. Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. *Phytopathology*, 81, 5: 559-565
- Fuchs M., Cambra M., Capote N., Jelkmann W., Kundu J., Laval V., Martelli G.P., Minafra A., Petrovič N., Pfeiffer P., Pompe-Novak M., Ravelonandro M., Saldarelli P., Stussi-Garaud C., Vigne E., Zagari I. 2007. Safety assessment of transgenic plump and grapevines expressing viral coat protein genes: New insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *Journal of Plant Pathology*, 89, 1: 5-12
- Gachon C., Mingam A., Charrier B. 2004. Real-time PCR: What relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55, 402: 1445-1454
- Gaire F., Schmit C., Stussi-Garaud C., Pinck L., Ritzenthaler C. 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, 264, 1: 25-36
- Gambino G., Gribaudo I. 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, 96, 11: 1223-1229
- Gambino G., Di Matteo D., Gribaudo I. 2009. Elimination of grapevine fanleaf virus from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 1: 57-60

- Garcia-Arenal F., Fraile A., Malpica J. M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6, 4: 225-232
- Gemmrich A.R., Link G., Seidel M. 1993. Detection of grapevine fanleaf virus (GFLV) in infected grapevines by nonradioactive nucleic-acid hybridization. *Vitis*, 32, 4: 237-242
- Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 6: 503-512
- Harju V.A., Skelton A., Clover G.R.G., Ratti C., Boonham N., Henry C.M., Mumford R.A. 2005. The use of real-time RT-PCR (TaqMan ®) and post-ELISA virus release for the detection of beet necrotic yellow vein virus types containing RNA5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 123, 1: 73-80
- Hans F., Pinck M., Pinck L. 1993. Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf virus (strain F13). *Biochimie*, 75, 7: 597-603
- Horvath J., Tobias I., Hunyadi K., 1994. New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus. *Horticultural Science*, 26: 31-32. Cit. po: Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Zhang Y.P., Daubert S.D., Rowhani A. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for grapevine fanleaf virus. *Plant Disease*, 87: 1179-1182
- Huss B., Walter B., Etienne L., Van Regenmortel M.H.V. 1986. Grapevine fanleaf virus detection in various grapevine organs using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vitis*, 25, 3: 178-188
- Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Zhang Y.P., Daubert S.D., Rowhani A., 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for grapevine fanleaf virus. *Plant Disease*, 87: 1179-1182
- Kogovšek P., Gow L., Pompe-Novak M., Gruden K., Foster G.D., Boonham N., Ravnikar M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods*, 149, 1: 1-11
- Komar V., Vigne E., Demangeat G., Lemaire O. 2008. Cross-protection as control strategy against grapevine fanleaf virus in naturally infected vineyards. *Plant Disease*, 92, 12: 1689-1694
- Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempchy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28, 2: 655-661
- Lai M.M.C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews*, 56, 1: 61-79
- Liebenberg A., Freeborough M.-J., Visser C.J., Bellstedt D.U., Burger J.T. 2009. Genetic variability within the coat protein gene of grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. *Virus Research*, 142, 1-2: 28-35

- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 25, 4: 402-408
- Lunden S., Meng B., Avery Jr. J., Qiu W. 2010. Association of grapevine fanleaf virus, tomato ringspot virus and grapevine rupestris stem pitting-associated virus with a grapevine vein-clearing complex on var. Chardonnay. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 2: 135-144
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190-212
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S., Green M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81, 2: 222-226
- Maček J. 1990. Posebna fitopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. 2. izd. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Martelli G.P. 1993. Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Martelli G.P. (ed). Rome, FAO: 263 str.
- Martelli G.P., 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> (februar 2010): 15 str.
- Martelli G.P., Arganovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.j., Wisler G.C., Yoshikawa N. 2002. The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*, 147, 10: 2039-2044
- Martelli G.P., Boudon-Padieu E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine. Bibliographic report 1998-2004. Bari, CIHEAM: 279 str.
- Martelli G.P. 2009. Grapevine virology highlights 2006-09. V: 16th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 31 August-4 September, 2009, Dijon, France: Extended abstracts. *Le Progres Agricole et Viticole*, 126: 15-23
- Mumford R., Skelton A., Metcalfe E., Walsh K., Boonham N. 2004. The reliable detection of Barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 117, 2: 153-159
- Nakaune R., Inoue K., Nasu H., Kakogawa K., Nitta H., Imada J., Nakano M. 2008. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of rupestris stem pitting-associated virus. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 2: 156-163
- Naraghi- Arani P., Daubert S., Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82: 1791-1795
- Nolasco G. 2003. Diagnosis: Recent developments and routine implementation. V: 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases

- of Grapevine (ICVG), 12-17 September 2003,. Locorotondo, Italy: Extended abstracts. Bari, University of Bari: 184-187
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128, 1-2: 151-155
- 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
- Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. 2008. Comparison of low density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in the detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 149, 2: 292-299
- Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. *Compendium of grape diseases*. 4th ed. St.Paul, The American Phytopathological Society Press: 93 str.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002-2007
- Pinck L., Fuchs M., Pinck M., Ravelonandro M., Walter B. 1988. A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. *Journal of General Virology*, 69: 233-239
- Pinck M., Reinbolt J., Loudes A.M., Let Ret M., Pinck L. 1991. Primary structure and location of the genome-linked protein (VPg) of grapevine fanleaf nepovirus. *FEBS Letters*, 284, 1:117-119
- Pompe-Novak M., Gutiérrez-Aguirre I., Vojvoda J., Blas M., Tomažič I., Vigne E., Fuchs M., Ravnikar M., Petrovič N. 2007. Genetic variability within RNA2 of grapevine fanleaf virus. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 3: 307-312
- Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., Meredith C.P. 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease*, 67, 3: 335-339
- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M., Pinck L. 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology*, 72: 2357-2365
- Ritzenthaler C., Schmit A.C., Michler P., Strussi-Garaud C., Pinck L. 1995. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules *In Vivo*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 3: 379-387
- Rowhani A., Walker M.A., Rokni S. 1992. Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. *Vitis*, 31, 1: 35-44
- Rowhani A., Chay C., Golino D.A., Falk B.W. 1993. Development of a polymerase reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83, 7: 749-753
- Rowhani A., Manigas M.A., Lile L.S., Daubert S.D., Golino D.A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85, 3: 347-352

- 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
- Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. 1999. *Handbook of plant virus diseases*. Boca Raton, CRC Press: 553 str.
- Urek G., Hržič A. 1998. *Ogorčice – nevidni zajedavci rastlin: fitonematologija*. Ljubljana, samozaložba: 240 str.
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159
- VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, 5: 619-626
- Vigne E., Komar V., Fuchs M. 2004a. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research*, 13, 2: 165-179
- Vigne E., Bergdoll M., Guyader S., Fuchs M. 2004b. Population structure and genetic variability within isolates of grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: Evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, 85: 2435-2445
- Vigne E., Demangeat G., Komar V., Fuchs M. 2005. Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology*, 150, 11: 2241-2255
- Vigne E., Marmonier A., Fuchs M. 2008. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of grapevine fanleaf virus and arabis mosaic virus. *Archives of Virology*, 153, 9: 1771-1776
- Vigne E., Marmonier A., Komar V., Lemaire O., Fuchs M. 2009. Genetic structure and variability of virus populations in cross-protected grapevines superinfected by Grapevine fanleaf virus. *Virus Research*, 144, 1-2: 154-162
- Voinnet O. 2008. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: A touch of robustness and versatility. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 4: 464-470
- Vojvoda J. 2005. Raznolikost izbranih genov virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). *Diplomsko delo*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, 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, 4 : 355-364
- Wetzel T., Jardak R., Meunier L., Ghorbel A., Reustle G.M., Krczal G. 2002. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, 101, 1-2: 63-69
- Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR form RNA quantification. *Biotechniques*, 39, 1: 75-85

- Worobey M., Holmes C.E. 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80, 10: 2535-2543
- Xue B., Ling K.S., Reid C.L., Krastanova M., Sekiya M., Momol E.A., Sule S., Mozsar J., Gonsalves D., Burr T. 1999. Transformation of five grape rootstocks with plant virus genes and a virE gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 35:, 3: 226-231

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Maji Ravnikar za odlično mentorstvo in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Hvala tudi dr. Maruši Pompe Novak za nasvete in natančen pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre delovni mentorici Urški Čepin za pomoč pri opravljanju praktičnega dela, za opravljene meritve z metodo RT-PCR-RČ, za številne nasvete ob nastajanju diplomske naloge in temeljite popravke ter dopolnitve diplomske naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Gorazdu Avguštinu za recenzijo diplomske naloge.

Celotnemu osebju Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo NIB se zahvaljujem za prijaznost in prijetno delovno vzdušje v laboratoriju.

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem, ki so mi stali ob strani vsa leta študija in mi polepšali marsikateri trenutek.

Najlepša zahvala gre staršema, ki sta mi omogočila študij in mi stala ob strani v dobrih in slabih trenutkih. Hvala vama za vso podporo in optimizem, ki sta mi ga vlivala skozi študij.

PRILOGE

Priloga A: Primerjava izolacije virusne RNA s sprostitvijo virusov po testu ELISA in s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz listov različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili julija 2009 in testirali z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Povprečni Ct smo izračunali iz vrednosti Ct dveh ponovitev.

Sprostitev virusov po testu ELISA (50 ul 1 % Triton X-100) ^a					
Vzorec vinske trte	Ct	Povprečni Ct	Preračunana log konc. glede na umeritveno krivuljo	Teoretična koncentracija (antilog)	Povprečna teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)
Ref TO 5/8	29,03	29,16	3,06	1.155	1.063
	29,28		2,99	970	
Ref DU 2b/54	24,66	24,52	4,39	24.353	27.041
	24,38		4,47	29.728	
Ref KV20 11/10	29,41	29,73	2,95	888	728
	30,05		2,75	567	
Ref 9 2/71	39,59	36,88	-0,13	1	16
	34,17		1,51	32	
Ref DUK 1/23	35,70	35,36	1,04	11	14
	35,02		1,25	18	
Ref 56 11/18	negativno				
	negativno				
Rebula	negativno				
	negativno				
Sprostitev virusov po testu ELISA (50 ul vode) ^b					
Ref TO 5/8	26,98	27,03	3,68	4.820	4.686
	27,07		3,66	4.551	
Ref DU 2b/54	23,56	23,56	4,72	52.670	52.670
	negativno				
Ref KV20 11/10	28,02	28,04	3,37	2.340	2.307
	28,06		3,36	2.274	
Ref 9 2/71	32,96	33,40	1,87	75	57
	33,84		1,61	40	
Ref DUK 1/23	34,07	34,15	1,54	34	32
	34,24		1,49	31	
Ref 56 11/18	negativno				
	negativno				
Rebula	negativno				
	negativno				

^a Izolacija virusne RNA s sprostitvijo virusov po testu ELISA, pri čemer smo za sprostitve virusne RNA uporabili 1 % TritonX-100.

^b Izolacija virusne RNA s sprostitvijo virusov po testu ELISA, pri čemer smo za sprostitve virusne RNA uporabili vodo brez RNaz.

se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A: Primerjava izolacije virusne RNA s sprostitvijo virusov po testu ELISA in s kompletom RNeasy Plant Mini Kit iz ekstraktov listov različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili julija 2009 in testirali z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Povprečni Ct smo izračunali iz vrednosti Ct dveh ponovitev.

Rneasy ^c					
Vzorec vinske trte	Ct	Povprečni Ct	Preračunana log konc. glede na umeritveno krivuljo	Teoretična koncentracija (antilog)	Povprečna teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)
Ref TO 5/8	25,30	25,45	4,19	15.552	14.126
	25,60		4,10	12.700	
Ref DU 2b/54	17,94	17,91	6,42	2.643.873	2.711.705
	17,87		6,44	2.779.536	
Ref KV20 11/10	18,95	19,29	6,12	1.306.546	1.059.057
	19,63		5,91	811.569	
Ref 9 2/71	23,35	23,20	4,79	60.998	67.891
	23,05		4,87	74.785	
Ref DUK 1/23	18,37	18,32	6,29	1.956.936	2.030.773
	18,27		6,32	2.104.609	
Ref 56 11/18	31,83	31,81	2,22	164	166
	31,79		2,23	169	
Rebula	negativno				
	negativno				

^c Izolacija virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit.

Priloga B: Izolacija RNA iz ekstraktov listov različnih vzorcev vinske trte za test ELISA, ki smo jih vzorčili septembra 2008 in testirali z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Povprečni Ct smo izračunali iz vrednosti Ct treh ponovitev.

EKSTRAKT LISTOV za test ELISA					
Vzorec vinske trte	Ct	Povprečni Ct	Preračunana log konc. glede na umeritveno krivuljo	Teoretična koncentracija (antilog)	Povprečna teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)
Ref DU 2b/6	26,79	26,88	3,74	5.511	5.175
	26,97		3,69	4.876	
	26,89		3,71	5.139	
Ref 26 6/2	25,56	25,64	4,11	12.996	12.353
	25,74		4,06	11.495	
	25,61		4,10	12.570	
Ref 26 6/6	25,76	25,83	4,05	11.335	10.813
	25,89		4,01	10.347	
	25,83		4,03	10.756	
Vol 2/49	26,23	26,28	3,91	8.160	7.892
	26,27		3,90	7.913	
	26,33		3,88	7.604	
Vol 2/51	25,50	25,57	4,13	13.555	12.957
	25,57		4,11	12.935	
	25,63		4,09	12.380	
Vol 2/52	23,39	23,50	4,77	59.106	54.968
	23,56		4,72	52.667	
	23,54		4,73	53.129	
Ref 26 6/1	negativno				
	negativno				
	negativno				

Priloga C: Izolacija RNA iz ekstraktov listov v pufru RLC različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili septembra 2008 in testirali z enostopenjskim RT-PCR-RČ. Povprečni Ct smo izračunali iz vrednosti Ct treh ponovitev.

EKSTRAKT LISTOV v pufru RLC					
Vzorec vinske trte	Ct	Povprečni Ct	Preračunana log konc. glede na umeritveno krivuljo	Teoretična koncentracija (antilog)	Povprečna teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)
Ref DU 2b/6	24,12	24,00	4,55	35.415	38.773
	23,89		4,62	41.848	
	23,98		4,59	39.057	
Ref 26 6/2	24,63	24,76	4,40	24.953	22.740
	24,76		4,36	22.797	
	24,91		4,31	20.470	
Ref 26 6/6	24,47	24,44	4,44	27.753	28.352
	24,39		4,47	29.491	
	24,47		4,44	27.812	
Vol 2/49	19,84	19,84	5,85	702.760	704.476
	19,79		5,86	728.179	
	19,88		5,83	682.489	
Vol 2/51	21,27	21,34	5,41	259.690	247.641
	21,32		5,40	250.521	
	21,43		5,37	232.711	
Vol 2/52	22,22	22,27	5,13	133.630	128.836
	22,28		5,11	128.050	
	22,32		5,10	124.829	
Ref 26 6/1	negativno				
	negativno				
	negativno				

Priloga D: Relativna kvantifikacija virusa GFLV v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili skozi rastno sezono 2008 in izven rastne sezone 2009. Δ Ct COX je razlika vrednosti Ct COX med dvema zaporednima redčitvama. Δ Ct GFLV je razlika vrednosti Ct GFLV med dvema zaporednima redčitvama. E pomeni učinkovitost pomnoževanja, R pa relativno količino virusne RNA.

VZOREC mesec redčitev	Ct COX	Δ Ct COX	E	Ct GFLV	Δ Ct GFLV	E	R
Ref 26 6/2 6 10	20,89	2,84	2,25	20,85	3,74	1,85	61,56
Ref 26 6/2 6 100	23,73			24,59			40,92
Ref 26 6/2 7 10	20,05	2,98	2,16	25,49	3,26	2,03	1,38
Ref 26 6/2 7 100	23,03			28,75			1,41
Ref 26 6/2 8 10	19,70	3,16	2,07	25,61	3,47	1,94	1,00
Ref 26 6/2 8 100	22,87			29,08			1,00
Ref 26 6/2 9 10	18,88	3,27	2,02	23,82	3,69	1,87	1,96
Ref 26 6/2 9 100	22,15			27,51			1,81
Ref 26 6/2 1 10	18,85	3,09	2,11	24,96	3,57	1,91	0,87
Ref 26 6/2 1 100	21,94			28,53			0,77
Ref 26 6/4 6 10	22,10	2,57	2,45	24,63	3,10	2,10	10,45
Ref 26 6/4 6 100	24,67			27,72			8,96
Ref 26 6/4 7 10	23,05	2,64	2,39	28,46	3,05	2,13	1,42
Ref 26 6/4 7 100	25,70			31,50			1,33
Ref 26 6/4 8 10	21,95	2,75	2,31	35,35	1,90	3,36	0,01
Ref 26 6/4 8 100	24,70			37,25			0,01
Ref 26 6/4 9 10	21,28	2,70	2,35	25,66	3,35	1,99	2,87
Ref 26 6/4 9 100	23,98			29,01			2,26
Ref 26 6/4 1 10	19,72	3,08	2,11	28,77	3,02	2,14	0,11
Ref 26 6/4 1 100	22,80			31,79			0,15
Ref DU 2/19 6 10	18,67	3,13	2,09	18,85	3,56	1,91	52,98
Ref DU 2/19 6 100	21,80			22,41			48,67
Ref DU 2/19 7 10	22,52	2,59	2,44	26,75	3,12	2,09	3,21
Ref DU 2/19 7 100	25,11			29,87			2,74
Ref DU 2/19 8 10	21,00	2,85	2,24	24,61	3,32	2,00	4,94
Ref DU 2/19 8 100	23,86			27,93			4,43
Ref DU 2/19 9 10	18,79	3,16	2,07	21,57	4,04	1,77	8,70
Ref DU 2/19 9 100	21,95			25,61			5,86
Ref DU 3/13 6 10	20,97	2,73	2,32	22,95	3,51	1,93	15,20
Ref DU 3/13 6 100	23,70			26,46			10,94
Ref DU 3/13 7 10	19,26	3,22	2,04	23,48	3,39	1,97	3,22
Ref DU 3/13 7 100	22,48			26,87			3,53
Ref DU 3/13 8 10	21,22	2,73	2,32	23,71	3,23	2,04	10,68
Ref DU 3/13 8 100	23,96			26,94			9,38
Ref DU 3/13 9 10	20,35	2,88	2,22	24,38	3,43	1,96	3,69
Ref DU 3/13 9-100	23,24			27,81			3,13
Vol 2/52 6 10	20,02	2,94	2,19	21,99	3,14	2,08	15,36
Vol 2/52 6 100	22,97			25,13			16,61

se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga D: Relativna kvantifikacija virusa GFLV v floemskem tkivu različnih vzorcev vinske trte, ki smo jih vzorčili skozi rastno sezono 2008 in izven rastne sezone 2009. Δ Ct COX je razlika vrednosti Ct COX med dvema zaporednima redčitvama. Δ Ct GFLV je razlika vrednosti Ct GFLV med dvema zaporednima redčitvama. E pomeni učinkovitost pomnoževanja, R pa relativno količino virusne RNA.

VZOREC mesec redčitev	Ct COX	Δ Ct COX	E	Ct GFLV	Δ Ct GFLV	E	R
Vol 2/52 7 10	19,82	3,15	2,08	23,77	3,54	1,92	3,87
Vol 2/52 7 100	22,97			27,31			3,66
Vol 2/52 8 10	21,11	3,06	2,12	25,25	3,25	2,03	3,41
Vol 2/52 8 100	24,18			28,50			3,71
Vol 2/52 9 10	20,39	3,12	2,09	26,30	3,24	2,03	1,00
Vol 2/52 9 100	23,51			29,54			1,13
Vol 2/52 1 10	18,12	3,38	1,98	23,55	3,17	2,07	1,40
Vol 2/52 1 100	21,50			26,72			2,00
Vol 2/55 6 10	18,71	3,19	2,06	20,66	3,52	1,93	15,56
Vol 2/55 6 100	21,91			24,18			15,40
Vol 2/55 7 10	20,33	3,03	2,14	23,11	3,82	1,83	8,74
Vol 2/55 7 100	23,37			26,93			6,28
Vol 2/55 8 10	21,67	2,97	2,17	24,36	3,38	1,98	9,27
Vol 2/55 8 100	24,64			27,74			8,64
Vol 2/55 9 10	22,17	2,75	2,31	28,34	3,30	2,01	0,84
Vol 2/55 9 100	24,92			31,64			0,71
Vol 2/55 1 10	17,82	3,53	1,92	21,55	3,11	2,10	4,51
Vol 2/55 1 100	21,34			24,67			7,43

REFERENČNI VZOREC Ref 2/6 8		
redčitev	Ct COX	Δ Ct COX
10 ⁻¹	19,70	
10 ⁻²	22,87	3,16
redčitev	Ct GFLV	Δ Ct GFLV
10 ⁻¹	25,61	
10 ⁻²	29,08	3,47

Priloga E: Teoretična koncentracija virusa GFLV v listih vzorca vinske trte (Vol 2/54), ki smo jih vzorčili junija 2008 (rastna sezona) in v floemskem tkivu vinske trte (Vol 2/54), ki smo ga vzorčili januarja 2009 (izven rastne sezone). ΔCt je razlika povprečnih vrednosti Ct med dvema zaporednima redčitvama. Povprečni Ct smo izračunali iz vrednosti Ct treh ponovitev.

Vol 2/54 – LISTI (junij 2008)						
Redčitev cDNA	Ct	Povprečni Ct	ΔCt	Preračunana log konc. glede na umeritveno krivuljo	Teoretična koncentracija (antilog)	Povprečna teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)
neredčena	12,92	12,93		7,94	87.517.872	87.382.317
	12,87			7,96	90.674.134	
	12,98			7,92	83.954.946	
10 ⁻¹	16,79	16,85	3,93	6,77	5.900.437	5.646.847
	16,87			6,75	5.579.597	
	16,90			6,74	5.460.506	
10 ⁻²	20,40	20,53	3,68	5,68	474.928	435.168
	20,58			5,62	419.743	
	20,61			5,61	410.833	
10 ⁻³	24,24	24,32	3,79	4,51	32.603	30.917
	24,46			4,45	28.067	
	24,27			4,51	32.082	
10 ⁻⁴	28,15	28,17	3,85	3,33	2.144	2.105
	28,19			3,32	2.083	
	28,18			3,32	2.088	
Vol 2/54 - FLOEM (januar 2009)						
Redčitev cDNA	Ct	Povprečni Ct	ΔCt	Preračunana log konc. glede na umeritveno krivuljo	Teoretična koncentracija (antilog)	Povprečna teoretična koncentracija (št. molekul virusne RNA/reakcijo)
neredčena	18,99	18,97		6,11	1.276.240	1.293.193
	18,92			6,13	1.334.031	
	18,99			6,10	1.269.306	
10 ⁻¹	22,72	22,89	3,92	4,97	94.209	84.324
	22,92			4,91	81.945	
	23,01			4,89	76.818	
10 ⁻²	26,78	26,81	3,93	3,75	5.572	5.439
	26,87			3,72	5.220	
	26,79			3,74	5.524	
10 ⁻³	31,08	30,93	4,12	2,44	277	310
	30,98			2,47	296	
	30,72			2,55	356	
10 ⁻⁴	34,62	35,02	4,09	1,37	23	18
	34,96			1,27	18	
	35,48			1,11	13	