

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

MARJANCA BLAS

**GENSKA RAZNOLIKOST VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV
VINSKE TRTE IN OPIS BOLEZENSKIH ZNAMENJ NA OKUŽENIH
RASTLINAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENETIC DIVERSITY OF GRAPEVINE
FANLEAF VIRUS AND SYMPTOMS DESCRIPTION OF INFECTED
PLANTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

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

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 29.8.2005 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Maja Ravnikar, za somentorico dr. Maruša Pompe Novak in za recenzentko prof. dr. Tatjana Avšič Županc.

Mentorica: prof. dr. Maja Ravnikar

Somentorica: dr. Maruša Pompe Novak

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič Županc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Maja Ravnikar

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo
in biotehnologijo

Članica: dr. Maruša Pompe Novak

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo
in biotehnologijo

Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marjanca Blas

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.5:632.3:634.8(043)=863
KG	virusi/virus pahljačavosti listov vinske trte/GFLV/vinska trta/bolezni vinske trte/ bolezenska znamenja/ELISA/nukleotidna zaporedja
AV	BLAS, Marjanca
SA	RAVNIKAR, Maja (mentor)/POMPE NOVAK, Maruša (somentor)/AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	GENSKA RAZNOLIKOST VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE IN OPIS BOLEZENSKIH ZNAMENJ NA OKUŽENIH RASTLINAH
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 104 str., 20 pregl., 31 sl., 1 pril., 85 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Virus pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) povzroča bolezen imenovano kužno izrojevanje vinske trte in je odgovorna za zmanjšanje pridelka in njegove kakovosti, ter tudi propad trsov. GFLV se prenaša s talno ogorčico <i>Xiphinema index</i> , ter z uporabo okuženega sadilnega materiala. Klasični način omejevanja širjenja virusa temelji na uporabi neokuženega sadilnega materiala in na zatiranju ogorčic. Novejša možnost, ki je še vedno v fazi raziskav, je uporaba gensko spremenjene vinske trte, odporne na okužbo z virusom GFLV. Za gojenje take vinske trte v vinogradih je potrebna predhodna ocena tveganja, ki zajema analizo genske variabilnosti virusa GFLV in možnost rekombinacij med genotipskimi variantami virusa GFLV, ki so prisotne v naravi. Z dosedanjimi raziskavami so ocenjevali variabilnost virusnih genov, ki se nahajajo na RNA2: 2A (produkt tega gena najverjetneje sodeluje pri podvajanju RNA2), 2B (gen za gibalni protein) in 2C (gen za plašni protein). Ugotovili so, da je gen 2A bolj variabilen kot gen 2B ter da sta oba manj variabilna kot gen 2C. V okviru naše raziskave smo s testom ELISA testirali trse različnih sort in lokacij Primorske na prisotnost 10 najpogostejše prisotnih virusov pri vinski trti. Ugotovili smo, da je izmed vseh trsov, ki so okuženi z GFLV, dve tretjini takih, ki poleg GFLV vsebujejo še enega ali več drugih virusov. Na izbranih trsih različnih sort smo nato skozi rastno sezono opazovali bolezenska znamenja in iskali morebitne povezave med genotipskimi variantami GFLV ter izražanjem določenih bolezenskih znamenj. Slednje povezave nismo potrdili na nobenem izmed opazovanih trsov, smo pa ugotovili, da različne sorte vinske trte, okužene samo z GFLV izražajo različna bolezenska znamenja. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja RNA2 nekaterih genotipskih variant GFLV in njihovo analizo smo potrdili prisotnost več genotipskih variant virusa znotraj ene rastline. Z analizo nukleotidnih zaporedij in primerjavo rezultatov dobljenih z analizo RFLP iz predhodnih raziskav smo potrdili tudi da je uporaba encima StyI pri analizi RFLP za gen 2A in 2C ustrezna in zelo dobro opiše nukleotidno variabilnost na nivoju teh dveh genov, za gen 2B pa je uporaba StyI neustrezna.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC UDC 578.5:632.3:634.8(043)=863

CX viruses/grapevine fanleaf virus/GFLV/grapevine/grepevine diseases/symptoms/
ELISA/nucleotide sequences

AU BLAS, Marjanca

AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/POMPE NOVAK, Maruša (co-advisor)/AVŠIČ
ŽUPANC, Tatjana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2006

TI GENETIC DIVERSITY OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS AND SYMPTOMS
DESCRIPTION OF INFECTED PLANTS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XIV, 104 p., 20 tab., 31 fig., 1 ann., 85 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Grapevine fanleaf virus (GFLV) is the causal agent of disease named grapevine fanleaf degeneration that causes progressive decline of infected vines, lower yield and low fruit quality. The virus is spread by its nematode vector *Xiphinema index* and through the use of infected planting material. Classical strategies to prevent spread of the disease are use of healthy planting material and control of nematode vector. One of the new possibilities that is still in the phase of research is the introduction of transgenic grapevines, resistant to GFLV. Before the release of transgenic grapevines the environmental risks assessment must be done. Till now there have been studies based on estimating the genetic variability of all three genes located on viral RNA2: gene 2A (the product of this gene probably takes part in RNA2 replication), gene 2B (movement protein gene) and gene 2C (coat protein gene). They estimated that gene 2A is more variable than gene 2B and that both genes are less variable than gene 2C. In our study we tested with ELISA grapevine samples of different cultivars collected in different locations of region Primorska for the presence of 10 most commonly present viruses in grapevine. We found out that among all samples which contained GFLV, two thirds of them were beside GFLV infected also with one or more other viruses. Furthermore we observed symptoms on selected grapevines infected with GFLV and try to find the connection between different genotypic variants of virus GFLV and expressing defined symptoms. We didnt confirm the latter connection, but we ascertain that different cultivars of grapevine infected only with GFLV express different symptoms. We also determined nucleotide sequence of the RNA2 of some genotypic variants of virus GFLV and confirm the presence of more than one genotypic variants of GFLV in one plant. Nucleotide sequence analysis and comparison with previous data from RFLP analysis confirmed suitability of use of restriction enzyme StyI in RFLP analysis and gave a good estimation of genetic variability for genes 2A and 2C, but not for 2B.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE	1
1.1.1 Namen dela.....	1
1.1.2 Hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREGLED BOLEZNI VINSKE TRTE	3
2.2 VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE	4
2.2.1 Rod <i>Nepovirus</i>	4
2.2.2 Rodova <i>Closterovirus</i> in <i>Ampelovirus</i>	5
2.2.3 Rod <i>Vitivirus</i> in <i>Foveavirus</i>	6
2.2.4 Rod <i>Maculavirus</i>	7
2.3 VIRUS GFLV	8
2.3.1 Splošne značilnosti virusa GFLV	8
2.3.2 Zgradba in ekspresija genov virusa.....	8
2.3.3 Podvojevanje virusa in širjenje med celicami.....	10
2.3.4 Prenos virusa v vinogradu in širjenje okužbe.....	11
2.3.4.1 Prenos virusa z ogorčicami.....	11
2.3.4.2 Prenos virusa s sadilnim materialom	13
2.3.4.3 Omejevanje širjenja okužbe	13
2.3.5 Bolezenska znamenja	15
2.4 GENSKA VARIABILNOST RNA VIRUSOV	17
2.4.1 Genska variabilnost GFLV.....	20
2.5 METODE ODKRIVANJA VIRUSNIH OKUŽB.....	21
2.5.1 Metode, ki temeljijo na infektivnosti virusa.....	21
2.5.2 Metode, ki temeljijo na seroloških lastnostih virusa	22
2.5.3 Metode, ki temeljijo na morfoloških lastnostih virusa.....	23
2.5.4 Metode, ki temeljijo na lastnostih nukleinskih kislin.....	23
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 VINOGRADI	25
3.1.1 Opis vinogradov.....	25
3.1.2 Nabiranje rastlinskega materiala.....	26

3.1.3	Popisovanje bolezenskih znamenj in fenofaz	26
3.1.3.1	Obdelava podatkov dobljenih s popisovanjem bolezenskih znamenj ..	27
3.2	ANALIZA VZORCEV	27
3.2.1	Homogenizacija rastlinskega materiala za test ELISA.....	27
3.2.2	Test ELISA.....	27
3.2.2.1	DAS ELISA.....	28
3.2.2.2	Neposredni test ELISA (indirect PTA ELISA)	29
3.2.2.3	Obdelava podatkov testa ELISA	29
3.2.3	Verižna reakcija s polimerazo s postopnim zniževanjem temperature naleganja začetnih oligonukleotidov (Touchdown PCR).....	31
3.2.3.1	Gelska elektroforeza.....	32
3.2.4	Izolacija fragmenta iz gela (po navodilih proizvajalca Promega).....	33
3.2.5	Ligacija v pGEM-T Easy vektor (povzeto po navodilih proizvajalca Promega)	33
3.2.6	Transformacija celic.....	34
3.2.7	Izolacija plazmidov (po navodilih proizvajalca Promega)	35
3.2.7.1	Gelska elektroforeza izoliranih plazmidov	36
3.2.8	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	36
3.2.8.1	Gelska elektroforeza	37
3.2.9	Vgnezdna verižna reakcija s polimerazo (Nested PCR).....	37
3.2.9.1	Gelska elektroforeza in ocenjevanje količine DNA v vzorcih	38
3.2.9.2	Izolacija fragmenta iz gela (po navodilih proizvajalca Promega)	38
3.2.9.3	Rezanje DNA z encimoma StyI in EcoRI (povzeto po Vigne s sod., 2003).....	38
3.2.9.2.1	Gelska elektroforeza	39
3.2.9.3	Obdelava rezultatov analize RFLP	39
3.2.10	Določanje nukleotidnega zaporedja.....	40
3.2.10.1	Obdelava nukleotidnih zaporedij.....	41
4	REZULTATI.....	42
4.1	TEST ELISA	42
4.2	RESTRIKCIJSKI TIPI GENA 2C PO REZANJU Z ENCIMOMA StyI IN EcoRI.....	52
4.3	POPISOVANJE BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN FENOFAZ	55
4.3.1	Različne sorte vinske trte in bolezenska znamenja	70
4.3.2	Različne genotipske variante virusa GFLV in bolezenska znamenja...	73
4.4	DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	76
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	89
5.1	RAZPRAVA.....	89
5.1.1	Test ELISA.....	89
5.1.2	Bolezenska znamenja, fenofaze in genotipske variante GFLV	89

5.1.3	Variabilnost GFLV v vzorcih trsov sorte volovnik iz vinograda v Ložah.....	92
5.1.4	Določanje nukleotidnih zaporedij	93
5.2	SKLEPI.....	95
6	POVZETEK.....	97
7	VIRI	99
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Ložah z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005.....	44
Preglednica 2: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Komnu z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005.....	46
Preglednica 3: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Dutovljah z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005.....	47
Preglednica 4: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Vrhpolju z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005.....	48
Preglednica 5: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Kromberku z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005.....	49
Preglednica 6: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Malinkovcih z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli le januarja 2005.....	49
Preglednica 7: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Kromberku z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli le januarja 2005.....	50
Preglednica 8: Velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi pri vzorcih sorte volovnik iz vinograda v Ložah po rezanju gena 2C z encimoma StyI in EcoRI.....	54
Preglednica 9: Vzorci vinske trte iz vinograda v Ložah z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A).....	56
Preglednica 10: Vzorci vinske trte iz vinograda v Ložah z bolezenskimi znamenji vidnimi v rastni sezoni 2005.....	58
Preglednica 11: Vzorci vinske trte iz vinograda v Komnu z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A).....	60
Preglednica 12: Vzorci vinske trte iz vinograda v Komnu z bolezenskimi znamenji vidnimi v rastni sezoni 2005.....	61
Preglednica 13: Vzorci vinske trte iz vinograda v Dutovljah z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A).....	62
Preglednica 14: Vzorci vinske trte iz vinograda v Dutovljah z bolezenskimi znamenji vidnimi v rastni sezoni 2005.....	62
Preglednica 15: Vzorci vinske trte iz vinograda v Vrhpolju z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A).....	63

Preglednica 16: Vzorci vinske trte iz vinograda v Vrhopolju z bolezenskimi znamenji vidnimi v sezoni 2005.....	63
Preglednica 17: Vzorci vinske trte iz vinograda v Kromberku z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A).....	64
Preglednica 18: Vzorci vinske trte iz vinograda v Kromberku z bolezenskimi znamenji vidnimi v rastni sezoni 2005.....	65
Preglednica 19: Seznam vzorcev, pri katerih smo določili nukleotidno zaporedje RNA2 GFLV (med začetnima oligonukleotidoma 2AF in EV00N1) ter restrikcijski tipi treh genov, ki smo jih potrdili s simulacijo rezanja z encimom StyI.	79
Preglednica 20: Odstotki ujemanja v nukleotidnih zaporedjih vseh 28 RNA2 GFLV izoliranih iz več rastlin sorte volovnik.....	81

KAZALO SLIK

Slika 1: Virus GLRaV (Tzeng in sod., 1999).....	5
Slika 2: Virusni delci GFLV (Martelli in sod., 2001)	8
Slika 3: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditve genov na RNA1, RNA2 in RNA3 (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).	9
Slika 4: Shematski prikaz podvojevanja, znotrajceličnega in medceličnega gibanja GFLV. (Andret - Link in sod., 2004).....	11
Slika 5: <i>Xiphinema index</i> (<i>Xiphinema</i> spp., 1998)	12
Slika 6: Primer grafičnega prikaza spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV 60 minut po dodatku substrata v juniju 2005.....	30
Slika 7: Primer grafičnega prikaza spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFkV 60 minut po dodatku substrata v januarju 2005.....	30
Slika 8: Primer grafičnega prikaza spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFkV po 18 urah po dodatku substrata v januarju 2005.....	31
Slika 9: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na matrično cDNA med verižno reakcijo s polimerazo.....	32
Slika 10: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na matrično DNA med vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo..	38
Slika 11: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na fragment (virusna RNA2), ki je vključen v plazmid pGEMT Easy.....	41
Slika 12: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV 60 minut po dodatku substrata v januarju 2005.....	43
Slika 13: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV 60 minut po dodatku substrata v juniju 2005.	43
Slika 14: Okuženost testiranih trsov samo z virusom GFLV ali z GFLV in hkrati še drugimi virusi.	50
Slika 15: Okuženost 101 trsov, ki so bili poleg z GFLV okuženi še z enim ali več različnimi virusi ter 41 trsov ki so bili okuženi le z GFLV.....	51
Slika 16: Prikaz vseh 42 kontrolnih rastlin, ki so bile bodisi zdrave ali pa okužene z drugimi virusi in ne z GFLV..	52
Slika 17: Shematski prikaz restriksijskih tipov pri rezanju gena 2C z encimom StyI.	53
Slika 18: Shematski prikaz restriksijskih tipov pri rezanju gena 2C z encimom EcoRI.....	54
Slika 19: Grafični prikaz števila trsov, ki so izražali določena bolezenska znamenja in so bili zdravi, okuženi le z GFLV, ali poleg z GFLV še z enim ali več drugimi virusi, ali pa so vsebovali druge viruse, kot GFkV ali kombinacijo GFkV in GLRaV-3.	67
Slika 20: Bolezenska znamenja na listih vinske trte.....	67
Slika 21: Bolezenska znamenja v obliki rumenjenja listov vinske trte.	68
Slika 22: Bolezenska znamenja na poganjkih vinske trte.....	68
Slika 23: Bolezenska znamenja na poganjkih in lesu vinske trte.....	68
Slika 24: Bolezenska znamenja na stebli in poganjkih vinske trte.....	69

Slika 25: Bolezenska znamenja na poganjkih in grozdih vinske trte.	69
Slika 26: Bolezenska znamenja v obliki zvijanja in rdečenja listov vinske trte.	69
Slika 27: Grafični prikaz (dendrogram) razvrstitve vzorcev v 6 skupin glede na izražanje podobnih bolezenskih znamenj.	75
Slika 28: Grafični prikaz bolezenskih znamenj ali njihovih kombinacij, ki prevladujejo v posamezni skupini, kamor so razvrščeni trsi, na podlagi izražanja podobnih bolezenskih znamenj.	76
Slika 29: Fotografija elektroforetskega gela z izoliranimi plazmidi.	77
Slika 30: Fotografija elektroforetskega gela s fragmenti željenih velikosti, ki smo jih dobili pri pomnoževanju insertov v izoliranih plazmidih s PCR reakcijo in uporabo začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo zelo blizu mesta insercije.	78
Slika 31: Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2 izoliranih iz rastline volovnik 2/54	82

KAZALO PRILOG

Priloga A: Fenološki razvojni stadiji vinske trte po sistemu, ki sta ga razvila K.W.Eichorn
in D.H.Lorenz

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ArMV	virus mozaika repnjaka (arabis mosaic virus)
BN	rumenica tipa počrnelosti lesa (bois noir)
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumin)
CB	bolezen plutavosti lesa (corky bark)
CCMV	cowpea chlorotic mottle virusu
CP	plaščni protein (coat protein)
DAS ELISA	metoda dvojnega sendviča ELISA (double antibody sandwich ELISA)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotidi
EcoRI	restrikcijski encim
EcoRV	restrikcijski encim
ELISA	encimsko imunosorpcijski test (enzyme linked immunosorbent assay)
EV00N1	začetni oligonukleotid
EV00N3	začetni oligonukleotid
FD	zlata trsna rumenica (flavescence doree)
FISH	fluorescentna in-situ hibridizacija
GFkV	grapevine fleck virus
GFLV 1fw	začetni oligonukleotid
GFLV 1rv	začetni oligonukleotid
GFLV 2AF	začetni oligonukleotid
GFLV 2AR	začetni oligonukleotid
GFLV 2BF	začetni oligonukleotid
GFLV 2BR	začetni oligonukleotid
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte (grapevine fanleaf virus)
GLRaV	virus zvijanja listov vinske trte (grapevine leafroll associated virus)
GVA	virus vinske trte A (grapevine virus A)
GVB	virus vinske trte B (grapevine virus B)
GYSVd-1	viroid rumenih madežev vinske trte (grapevine yellow speckle viroid-1)
IC	lovljenje virusa na protitelesa (immunocapture)
IEM	imunska elektronska mikroskopija
ISEM	immunosorbent electron microscopy
KSG	razbrazdanje lesa tipa kober (kober stem grooving)
LNSG	razbrazdanje lesa tipa LN-33 (LN-33 stem grooving)
MP	gibalni protein (movement protein)
ORF	odprt bralni okvir (open reading frame)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
pGEMT fwd	začetni oligonukleotid
pGEMT rev	začetni oligonukleotid
PTA ELISA	plate trapped antigen ELISA

RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
RNA	ribonukleinska kislina
RSPaV	virus razbrazdanja lesa rupestrisa (rupestris stem pitting associated virus)
RT	reverzna transkripcija
RW	bolezen razbrazdanja lesa vinske trte (rugose wood)
SSCP	polimorfizem konformacije enojne verige
StyI	restrikcijski encim
Taq	polimeraza iz organizma <i>Thermophilus aquaticus</i>
TMV	virus mozaika tobaka

1 UVOD

Virus pahljačavosti listov vinske trte ali Grapevine fanleaf virus (GFLV) povzroča bolezen, imenovano kužno izrojevanje vinske trte, ki je razširjena v vseh večjih vinorodnih regijah po vsem svetu. Letni pridelek grozdja se zaradi okužbe z GFLV lahko zmanjša tudi za 80 %, zelo občutljivim sortam vinske trte pa se lahko občutno zmanjša tudi življenska doba. Virus se prenaša s talno ogorčico (*Xiphinema index*), ki se hrani na koreninah vinske trte in preko okuženega sadilnega materiala. Načini preprečevanja okužbe so testiranje trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov, uporaba neokuženega sadilnega materiala ter tudi zatiranje prenašalcev. Novejša možnost je uporaba gensko spremenjene vinske trte, ki vsebuje zapis za plašni protein GFLV (gen 2C). V predhodnih raziskavah so raziskovali biološko raznovrstnost GFLV na nivoju nukleinskih kislin na treh genih 2A, 2B in 2C, katerih zapisi se nahajajo na RNA2. Dokazali so, da obstaja v naravnih populacijah večje število genotipskih variant virusa. S primerjavo rezultatov RFLP analize genov 2A, 2B in 2C so ugotovili, da je gen 2A (protein 2A verjetno sodeluje pri podvojevanju RNA2) bolj variabilen kot gen 2B (gibalni protein) in da je izmed treh genov najbolj variabilen gen 2C. Podatki o raznolikosti genoma GFLV so osnova za sklepanje na pogostost mutacij in rekombinacij med različki virusa v naravi, ter osnova za oceno nevarnosti pri uporabi gensko spremenjenih rastlin zaradi interakcije med naravnimi populacijami GFLV in vnesenim genom za plašni protein.

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

1.1.1 Namen dela

Namen dela je popisovanje bolezenskih znamenj na izbranih trsih vinske trte ter iskanje morebitnih povezav med genotipskimi variantami virusa GFLV in bolezenskimi znamenji. Predhodne raziskave so potrdile, da je v eni rastlini lahko prisotnih ena ali več genotipskih variant virusa (Klarić, 2004; Vojvoda, 2005). Nas pa je zanimalo tudi, ali število genotipskih variant vpliva na izražanje določenih bolezenskih znamenj.

Na serološkem nivoju smo s testom ELISA nameravali ugotoviti ali so izbrani trsi poleg z GFLV okuženi še z drugimi virusi.

Na nivoju nukleinskih kislin pa smo želeli določiti nukleotidno zaporedje nekaterih genotipskih variant virusa GFLV in s tem še bolj natančno analizirati biološko raznovrstnost virusa. Preveriti pa smo želeli tudi pomen izbranih encimov pri analizi RFLP za določitev genotipskih variant virusa GFLV.

1.1.2 Hipoteze

Predvidevamo, da se na različnih sortah vinske trte (*Vitis vinifera*) po okužbi z virusom GFLV izrazijo različna bolezenska znamenja.

Pričakujemo mešane okužbe izbranih trsov, kar pomeni, da so nekateri trsi okuženi ne le z GFLV, ampak še z drugimi virusi.

Z določanjem nukleotidnega zaporedja pričakujemo potrditev več genotipskih variant GFLV na isti sorti vinske trte.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREGLED BOLEZNI VINSKE TRTE

Podobno kakor druge rastline tudi vinsko trto napadajo številne bolezni in škodljivci, ki nenehno ogrožajo količino in kakovost pridelka. Vinska trta sodi med zelo občutljive rastline (Colnarič, 1980).

Med žive povzročitelje bolezni ali biotske faktorje, ki napadajo vinsko trto, štejemo glive, bakterije, fitoplazme, viruse in škodljivce (žuželke, pršice, ogorčice itd.). V teh primerih je bolezen rezultat interakcij med občutljivim gostiteljem in živim patogenim organizmom. Na vinski trti se lahko pojavijo tudi nepravilnosti ali tako imenovane nebiotske bolezni, ki so posledica neravnotežja hranil, okoljskega stresa ali kemične toksičnosti (Pearson in Goheen, 1998).

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

Bolezni bakterijskega izvora so morda najmanj številčne izmed bolezni trte. Velja omeniti bakterijski ožig mladik vinske trte (*Xanthomonas ampelina* Pagan.) in bakterijski rak koreninskega vratu trte (*Agrobacterium tumefaciens* Smith) (Vršič in Lešnik, 2005). Bolezeni imenovane trsne rumenice pa povzročajo fitoplazme različnih tipov, od katerih sta najpomembnejša zlata trsna rumenica (Flavescence doree, FD) in rumenica tipa počrnelosti lesa (Bois noir, BN) (Petrovič in sod., 2004).

Vinsko trto okužuje vsaj 55 do zdaj znanih virusov (Martelli, 2003). Najbolj škodljivi med njimi spadajo v rodove *Nepovirus*, *Closterovirus*, *Vitivirus*, *Foveavirus* in *Maculavirus* (Fauquet in sod., 2005).

Vinska trta gosti tudi veliko škodljivcev, vendar so le redki izrazito škodljivi. Največ je žuželk (npr. škržati, sovke, kaparji, uši itd.), manj pa pršic in ogorčic. Škodljivci objedajo ali izsesavajo nad- ali podzemne organe trte ter s tem povzročajo neposredno škodo na rastlini. O posredni škodi govorimo kadar so škodljivci prenašalci glivičnih, virusnih in fitoplazemskih bolezni (Vršič in Lešnik, 2005).

2.2 VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE

2.2.1 Rod *Nepovirus*

Rod *Nepovirus* zajema poliedrične viruse, ki se širijo s talnimi ogorčicami. Ti dve lastnosti sta zaznamovali tudi poimenovanje rodu (NEmatodi, POLiedrični virusi). Spadajo v družino *Comoviridae* (Bovey in sod., 1980). Razširjeni so predvsem v zmerno toplih območjih. Lahko okužujejo le eno rastlinsko vrsto lahko pa širok krog rastlinskih vrst, odvisno od virusa (Fauquet in sod., 2005).

Ogorčice sprejmejo virus, ko se prisesajo na korenine okuženega trsa. Ko se okužene ogorčice hranijo na zdravih trsih prenašajo viruse po vinogradu v obliki koncentričnih krogov. Ostanki korenin po krčenju vinograda lahko ostanejo kužni več let (Bovey in sod., 1980).

Genom nepovirusov je sestavljen iz dveh verig linearne pozitivno polarne enoverižne RNA (RNA1 in RNA2). Poleg teh lahko nekateri nepovirusi vsebujejo še linearno ali krožno satelitsko RNA (Fauquet in sod., 2005).

Najbolj značilno bolezensko znamenje okužbe z nepovirusi so obročkaste kloroze na listih, ki se običajno pojavijo spomladi. Pogoste so tudi druge oblike kloroz, vidne kot razbarvanje listov v obliki lis ali točk (Fauquet in sod., 2005; Kurstak, 1981). Mnoge divje rastline ob okužbi z nepovirusi ne razvijejo bolezenskih znamenj, kar kaže na zmožnost prilagoditve rastline na virus. Pojav in vrsta bolezenskih znamenj je odvisna od vrste rastline in virusa, od letnega časa ter mnogih drugih dejavnikov (Kurstak, 1981).

Najpomembnejša virusna povzročitelja bolezni, ki spadata med nepoviruse sta virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) in virus mozaika repnjaka (Arabidopsis mosaic virus, ArMV).

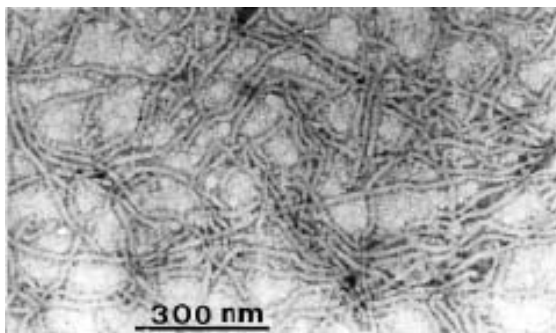
GFLV je ekonomsko najbolj pomemben nepovirus. V naravi okužuje le rastline iz rodu *Vitis*. Bolezen, ki jo povzroča, imenujemo kužno izrojevanje vinske trte (Maček, 1986). Ta lahko zmanjša letni pridelek grozdja tudi za 80 % (Pearson in Goheen, 1998). V naravi se prenaša z ogorčico *Xiphinema index*. Za okužbo z GFLV je opisana vrsta bolezenskih znamenj, med najznačilnejšimi so: deformacije listov, ki lahko dobijo izgled pahljačavosti ali celo peteršiljavosti, rumenenja različnih oblik medžilnih prostorov listov, deformacije poganjkov v obliki krajšanja medčlenkov in dvojnih členkov ter posledično grmast ali metlast izgled trsa.

ArMV je serološko soroden GFLV. Za razliko od GFLV okužuje širok krog naravnih gostiteljev. Prenašajo ga ogorčice *Xiphinema diversicatum*, *Xiphinema coxi* in *Longidorus*

caespiticola. Bolezenska znamenja na okuženi trti so zelo podobna tistim, ki jih kaže okužba z GFLV (Bovey in sod., 1980). Pogoste so kloroze listov v obliki mozaikov, pik ali lis, včasih se pojavijo tudi nekroze (Murant, 1985).

2.2.2 Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus*

Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus* uvrščamo v družino *Closteroviridae*. Virusi obeh rodov imajo dolge nitaste delce in se v največji meri nahajajo v floemu okuženih rastlin. Genom je sestavljen iz enojne linearne pozitivno polarne enoverižne RNA. Nekatere viruse prenašajo kaparji različnih vrst. Pogost 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) (slika 1). Obstajajo številni serološko ločljivi tipi, ki so jih poimenovali tip 1, 2, 3 itd. do 9. GLRaV-2 spada v rod *Closterovirus*, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6 in GLRaV-8 pa v rod *Ampelovirus* (Fauquet in sod., 2005). Ekonomsko najpomembnejša in tudi najbolj razširjena sta GLRaV-1 in GLRaV-3 (Seftc in sod., 2000).



Slika 1: Virus GLRaV (Tzeng in sod., 1999)

Bolezen zvijanja listov vinske trte (grapevine leafroll) je razširjena povsod po svetu, kjer uspeva vinska trta. Prizadene lahko vse sorte in podlage, vendar bolezenska znamenja niso nujno očitna pri vseh (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998). Bolezenska znamenja so najbolj jasno vidna pri rdečih sortah vinske trte (Bovey in sod., 1980). Spomladi se bolne rastline ne ločijo bistveno od zdravih, poleti pa se na okuženih listih rdečih oziroma temnih sort pojavijo rdeče pike. Rdečenje se kasneje razširi po celotni površini lista, vendar glavne žile ostanejo zelene. Pozno poleti in jeseni je značilno zvijanje listov. Posledica bolezni je tudi zakasnjeno in neenakomerno dozorevanje jagod. Grozdi so običajno manjši, oblika grozdov in posameznih jagod pa ostane primerljiva z zdravimi trtami (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998). Pri belih sortah se bolezenska znamenja razlikujejo od rdečih sort le po tem, da listi ne pordečijo temveč porumenijo. Zaznavanje bolezni zvijanja listov je tako pri belih sortah težavnejša (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998).

Vseh devet dosedaj odkritih virusov GLRaV (GLRaV-1 do GLRaV-9) povezujejo z boleznijo zvijanja listov vinske trte (Martelli in sod., 2002; Alkowni in Rowhani, 2003). Vendar pa natančen povzročitelj bolezni ostaja nepojasnen, saj so pri trtah z znamenji bolezni zvijanja listov pogosto odkrili še virus vinske trte A (Grapevine virus A, GVA) in virus vinske trte B (Grapevine virus B, GVB) ter tudi izometrične virusne delce (Šutić in sod., 1999).

2.2.3 Rod *Vitivirus* in *Foveavirus*

Rodova *Vitivirus* in *Foveavirus* spadata v družino *Flexiviridae*. Virusi obeh rodov so nitaste oblike, dolgi približno 800 nm. Njihov genom predstavlja enojna linearna pozitivno polarna enoverižna RNA. V rod *Vitivirus* uvrščamo virus vinske trte A (Grapevine virus A, GVA) in virus vinske trte B (Grapevine virus B, GVB), v rod *Foveavirus* pa virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV). Vsi trije omenjeni virusi se prenašajo z okuženim sadilnim materialom, GVA in GVB dodatno še s kaparji iz rodov *Pseudococcus* in *Planococcus*. Prenášalec GVA je tudi veliki trtni kapar *Neopulvinaria innumerabilis* (Fauquet in sod., 2005). Vse tri viruse povezujejo z razbrazdanjem lesa na vinski trti.

Bolezen razbrazdanja lesa vinske trte (Rugose wood, RW) vključuje skupino bolezni, ki se prenašajo s cepljenjem. RW se na trsih izrazi s tvorbo jamic in brazd ali drugih nepravilnosti na lesu žlahtnega dela trsa, podlage ali na obeh. Glede na to, na kateri izmed treh indikatorskih rastlin se po cepljenju okuženega trsa pokažejo bolezenska znamenja, ločimo: razbrazdanje lesa tipa kober (Kober stem grooving, KSG), razbrazdanje lesa tipa LN-33 (LN-33 stem grooving, LNSG), bolezen plutavosti lesa (Corky bark, CB) ter razbrazdanje na rupestrisu (Rupestris stem pitting, RSP). Indikatorske rastline pa so: Kober 5BB (*Vitis berlandieri* Planch. X. *V. Riparia* Michx.), LN-33 (Courderc 1613 X Thompson Seedless) in *Vitis Rupestris* St. George (*Vitis Rupestris* Scheele St. George) (Martelli, 1993; Minafra, 2000).

Virus GVA verjetno povzroča KSG (Garau in sod., 1994; Credi, 1997), za katero so značilne brazde na lesu indikatorskih rastlin kober 5BB (Meng in sod., 1999).

Virus GVB skušajo povezati z boleznijo plutavosti lesa (Corky bark, CB), domnevajo pa tudi, da verjetno ni edini povzročitelj te bolezni (Minafra, 2000). Indikatorja za CB sta LN-33 in *V. Rupestris* St. George. Listi bolnih trsov pri CB se jeseni zvijajo, rdečijo in rumenijo ter lahko ostanejo dlje časa pritrjeni, medtem ko pri zdravih trsih že davno odpadejo. Rdečenje listov pri rdečih sortah se pri CB razlikuje od bolezni zvijanja listov vinske trte po tem, da rdečijo tudi glavne žile. Značilne so brazde različnih dolžin na lesu pod skorjo. Pri zelo občutljivem LN-33 se lahko internodiji rozg zadebelijo, kar je posledica plutastega razrasta skorje, ki vzdolžno popoka. Pod skorjo se pojavijo globoke

brazde in luknjice. Indikatorji LN-33 kmalu po okužbi pogosto propadejo (Martelli, 1993; Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980). Virus GVB so preučevali tudi Shi in sodelavci (2004) v Avstraliji, vendar na nobenem od 232 trsov okuženih z GVB niso našli znamenj bolezni CB. Prav tako niso zaznali bolezenskih znamenj na biološkem indikatorju LN33. Tudi oni so zaključili, da je CB kompleksna bolezen, ki jo povzroča mešanica virusov.

Razbrazdanje na rupestrisu (*Rupestris stem pitting*, RSP) kaže značilna bolezenska znamenja na indikatorju *V. Rupestris*. Na njegovem lesu se pojavijo izrazite majhne jamice. Bolezen lahko povzroča tudi počasnejšo rast žlahtne trte, zato so po nekaj letih bolni trsi opazno manjši od zdravih. Listi bolnih trsov ne rdečijo kot pri CB ali bolezni zvijanja listov vinske trte (Pearson in Goheen, 1998). Pri trsih z bolezenskimi znamenji RSP so običajno odkrili virus RSPaV, vendar ni nujno, da vsi trsi okuženi z RSPaV izražajo znamenja omenjene bolezni (Nolasco in sod., 2006; Tomažič, 2002).

Posameznih bolezni RW v naravi zaradi pomanjkanja razlikovalnih bolezenskih znamenj zaenkrat ne moremo uspešno ločevati med seboj (Martelli, 1993). Poleg tega veliko sort in podlag v naravi kljub okužbi z omenjenimi virusi ne kaže značilnih bolezenskih znamenj. Pri vseh treh virusih, GVA, GVB in RSPaV, so znotraj posamezne vrste nedavno odkrili tudi številne različne genotipske variante (Goszczynski in Jooste, 2003; Shi in sod., 2004; Nolasco in sod., 2006).

2.2.4 Rod *Maculavirus*

Nedavno še neuvrščeni virus Grapevine fleck virus (GFkV) danes pripada rodu *Maculavirus* in družini *Tymoviridae*. Je izometrične oblike ter vsebuje enojno linearno pozitivno polarno enoverižno RNA. Okužuje le vinsko trto, nahaja pa se izključno v floemu okuženih gostiteljev. Vektor GFkV zaenkrat ni znan, večinoma pa se prenaša z okuženim razmnoževalnim rastlinskim materialom (Fauquet in sod., 2005). GFkV je na vinski trti običajno latenten, z izjemo *V. Rupestris*, pri katerem na mladih listih povzroča rahlo prosojne pike ali lise (Fauquet in sod., 2005; Martelli, 1993). Listi z večjim številom madežev se lahko nagubajo in zvijajo navzgor. Madeži v dolžino merijo od 1 do 3 mm (Martelli, 1993; Pearson in Goheen, 1998). Pri indeksiranju na *V. Rupestris* se bolezenska znamenja, ki jih povzroča GFkV, pogosto zamenjujejo s tistimi, ki jih povzroča GFLV, sploh če je indikator okužen z obema virusoma (Bovey in sod., Martelli, 1993).

2.3 VIRUS GFLV

2.3.1 Splošne značilnosti virusa GFLV

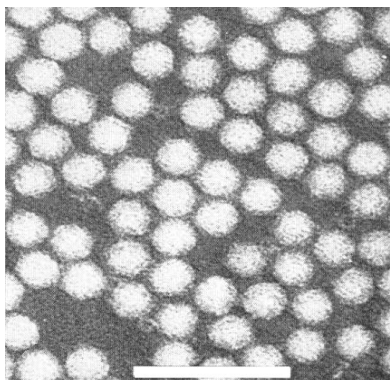
Virus pahljačavosti vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) je eden najpomembnejših virusov, ki okužuje vinsko trto (Bovey in sod., 1980). Bolezen, ki jo povzroča, se imenuje kužno izrojevanje vinske trte (Maček, 1986). To je najstarejša znana bolezen vinske trte (*Vitis vinifera*). Bolezenska znamenja, kot so široko odprti sinusi ob listnem pecelju in nenormalna, skoraj vzporedna razporejenost glavnih žil, ki daje videz odprte pahljače, so prispevala k poimenovanju virusa (Pearson in Goheen, 1998). Prvi evropski opisi bolezní so stari vsaj 200 let. V herbarijih, ki so nastali pred začetkom uporabe hibridnih ameriških podlag odpornih na vinsko uš, so našli liste trte z značilnimi bolezenskimi znamenji, ki jih pripisujemo GFLV. Danes je GFLV razširjen v vseh večjih vinorodnih regijah po vsem svetu (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980).

Glavni gostitelj GFLV v naravi so rastline iz rodu *Vitis*. Prizadene lahko vse žlahtne trte in podlage ter križance. Z mehansko inokulacijo ga lahko prenesemo še na nekatere zelne rastline. V vinogradih se prenaša z okuženim sadilnim materialom in ogorčico *Xiphinema index* (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980; Hewitt in sod., 1970).

Zaradi okužbe z GFLV so letne izgube pridelka grozdja lahko zmerne ali zelo visoke, tudi do 80 %. To je odvisno od virulence virusnega izolata, občutljivosti sorte trte in okoljskih dejavnikov (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980).

2.3.2 Zgradba in ekspresija genov virusa

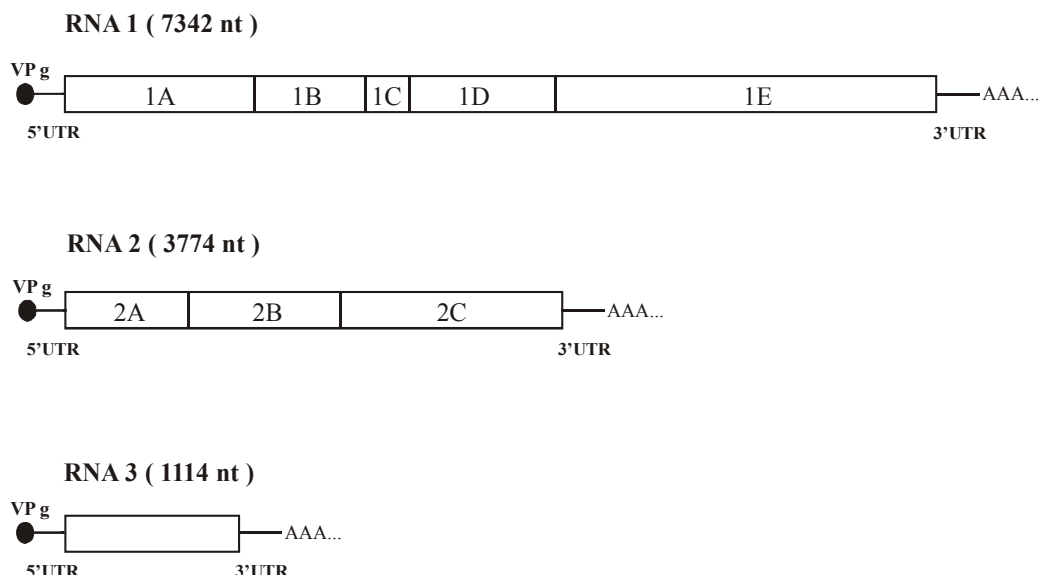
Virusni delci GFLV so izometrične oblike s premerom približno 28 nm in niso obdani z membrano (Pinck in sod., 1988) (slika 2). Kapsida je sestavljena iz 60 strukturnih enot oz. polipeptidov z molekulsko maso 56 kDa (Fauquet in sod., 2005; Serghini in sod., 1990).



Slika 2: Virusni delci GFLV. Merska skala na sliki predstavlja 100 nm (Martelli in sod., 2001).

Genom virusa je sestavljen iz dveh verig linearne pozitivno polarne enoverižne RNA, RNA1 in RNA2. Pri genotipski varianti F13, izolirani v Franciji, so odkrili še dodatno, satelitsko RNA – RNA3. Vse tri RNA imajo na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), na 3' koncu pa se zaključijo s poliA repom (Pinck in sod., 1988; Fuchs in sod., 1989) (slika 3). Posamezna veriga RNA je vključena v ločen izometričen virion (Serghini in sod., 1990).

RNA1, RNA2 in RNA3 vsebujejo po en odprt bralni okvir (ORF), ki ga obdajata nekodirajoči regiji (Fuchs in sod., 1989; Serghini in sod., 1990; Ritzenthaler in sod., 1991). Vsaka izmed verig se prepiše v posamezen poliprotein, ki ga nato specifična virusna proteaza, kodirana na RNA1 razcepi v funkcionalne proteine (Viry in sod., 1993).



Slika 3: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditve genov na RNA1, RNA2 in RNA3. Z UTR so označena nekodirajoča zaporedja (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).

RNA1 je dolga 7342 nukleotidov in kodira poliprotein P1 z molekulsko maso 253 kDa. P1 se razcepi v funkcionalne proteine: 1A (proteazni kofaktor), 1B (NTP vezavni protein, ki deluje kot helikaza), 1C (VPg), 1D (cisteinska proteaza) in 1E (od RNA odvisna RNA polimeraza) (Ritzenthaler in sod., 1991; Pinck in sod., 1991). Na RNA1 je zapis za vse proteine, ki so potrebni za podvojevanje GFLV (Ritzenthaler in sod., 1991).

Viry in sod. (1993) so *in vitro* sintetizirali RNA1 in RNA2 ter ju vnesli v testno rastlino *Chenopodium quinoa*. Ugotovili so, da se lahko RNA1 v celicah podvaja neodvisno od RNA2, vendar slednjo nujno potrebuje za širjenje po rastlini. Nasprotno se RNA2 ob odsotnosti RNA1 ne more pomnoževati.

RNA2 je dolga 3774 nukleotidov. Prepiše se v 122 kDa velik poliprotein P2, ki s proteolitskim rezanjem razpade na proteine: 2A, 2B in 2C (Serghini in sod., 1990). Protein 2A sodeluje pri podvojevanju verige RNA2. Protein 2A je nujen za podvojevanje RNA2, ni pa zadosten, saj za to potrebuje še prisotnost RNA1 (Gaire in sod., 1999). Protein 2B je gibalni protein (movement protein, MP). Sodeluje pri širjenju virusa iz okužene v sosednje neokužene celice. Vpleten je pri tvorbi tubularnih struktur, s katerimi virusni delci prehajajo iz ene celice v drugo (Ritzenthaler in sod., 1995). Protein 2C je plaščni protein (coat protein, CP) z molekulsko maso 56 kDa, ki gradi virusno kapsido (Serghini in sod., 1990). Prisotnost RNA ni pogoj za pravilno sestavljanje virusne kapside, saj nastala kapsida lahko vsebuje virusno RNA ali pa tudi ne (Belin in sod., 1999). CP je poleg vloge gradnika kapside odgovoren tudi za specifičnost prenosa GFLV z ogorčico (Andret - Link in sod., 2004b).

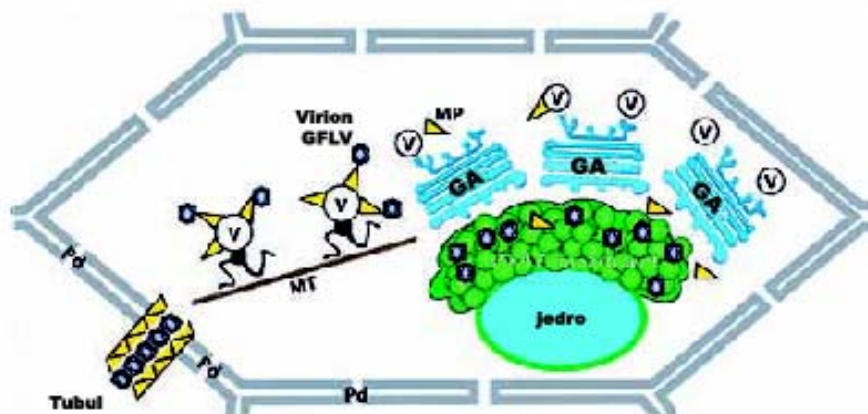
RNA3 genotipske različice GFLV F13 je zgrajena iz 1114 nukleotidov. Na njej je zapis za protein P3 z molekulsko maso 37 kDa, ki je hidrofilne in bazične narave (Fuchs in sod., 1989). P3 naj bi bil odgovoren za podvojevanje RNA3. Poleg tega RNA3 za lastno podvojevanje in nastanek kapside potrebuje še prisotnost RNA1 in RNA2 (Hans in sod., 1993; Andret-Link in sod., 2004a; Fuchs in sod., 1989).

2.3.3 Podvojevanje virusa in širjenje med celicami

Veliko rastlinskih virusov s pozitivno polarno enoverižno RNA pri svojem podvojevanju povzročijo spremembe in reorganizacijo endomembranskega sistema znotraj gostiteljske celice. Poleg obsežnih morfoloških sprememb endoplazmatskih retiklov (ER) povzročijo tudi njihovo premestitev v perinuklearni prostor. Podoben mehanizem pri svojem podvojevanju uporablja tudi GFLV (Ritzenthaler in sod., 2002).

Po vstopu v rastlinsko celico virus GFLV najprej odvrže kapsido in v citoplazmo sprostí verigi RNA. Tam se prične prepis v poliproteina P1 in P2. P1 je verjetno odgovoren za oblikovanje tako imenovanega virusnega podvojevalnega razdelka v bližini jedra rastlinske celice. Tvorijo ga intracelularne membrane oz. membranski vezikli, ki izvirajo iz ER. Na membranskih veziklih poteka podvojevanje genomske RNA (slika 4). Novo nastale RNA so na račun intracelularnih membran zaščitene pred razgradnjo s strani gostiteljskih RNaz (Andret - Link in sod., 2004a; Ritzenthaler in sod., 2002).

Ker je protein 2A potreben za replikacijo RNA2, domnevajo, da je domena 2A na nastajajočem poliproteinu tista, ki privede kompleks P2-RNA2 do mesta replikacije (Gaire in sod., 1999). Znotraj virusnega razdelka se zaradi procesiranja poliproteinov P1 in P2 s proteazo 1D akumulirajo funkcionalni virusni proteini. Izjema je gibalni protein 2B, ki se po nastanku naglo prenese na celično periferijo (Ritzenthaler in sod., 2002).



Slika 4: Shematski prikaz podvojevanja, znotrajceličnega in medceličnega gibanja GFLV. Oznake: GA – Golgijev aparat, V – vezikli iz GA, MT – mikrotubuli, MP – gibalni protein, Pd – plazmodezma (Andret - Link in sod., 2004)

Zgodnje faze gibanja GFLV lahko razdelimo na znotrajcelično gibanje z objedrnega mesta podvojevanja RNA in sestavljanja novih virusov do roba celic ter na medcelično gibanje virusov preko celične stene v sosednje celice (Andret - Link in sod., 2004a) (slika 4).

Domnevajo, da se gibalni protein 2B skupaj s plaščnim proteinom 2C ali že sestavljenimi virusnimi delci prenese do roba celice na površini veziklov, ki izvirajo iz Golgijevega aparata (GA). Pri transportu verjetno pomagajo tudi gostiteljski mikrotubuli, ki usmerjajo vezikle GA (Ritzenthaler in sod., 1995; Laporte in sod., 2003). GA se nahajajo v neposredni bližini virusnega podvojevalnega razdelka (Ritzenthaler in sod., 2002). Ko so gibalni proteini 2B locirani v bližini plazmodezem, por v celični steni, se pričnejo združevati v tubule. Ti imajo bazalni del zasidran v celični steni, konci pa štrlijo v citoplazmo. Tubuli rastejo le na bazalnem delu znotraj celične stene, kamor se dodajajo nove enote 2B, kar omogoča prodor tubulov v citoplazmo sosednje celice (Andret - Link in sod., 2004a; Laporte in sod., 2003). Preko tubularnih struktur se na novo nastali virusni delci prenašajo v sosednje neokužene celice, kar vodi v sistemsko okužbo (Gaire in sod., 1999).

2.3.4 Prenos virusa v vinogradu in širjenje okužbe

2.3.4.1 Prenos virusa z ogorčicami

GFLV se v naravi prenaša iz okuženih rastlin na zdrave z ektoparazitsko ogorčico *Xiphinema index*, iz družine *Longidoridae*. Za razliko od drugih nematodnih prenašalcev *X. index* prenaša le GFLV (Hewitt in sod., 1958, cit. po Andret - Link 2004a; Raski in sod., 1983, cit. po Andret - Link 2004).

Ogorčica *X. index* je s prostim očesom komajda vidna in v dolžino meri približno 3,5 mm (Urek in Hržič, 1998) (slika 5).



Slika 5: *Xiphinema index* (*Xiphinema* spp., 1998).

Cohn in sodelavci so leta 1970 objavili, da je prenašalec GFLV tudi ogorčica *Xiphinema italiae*, česar pa kasnejše raziskave niso nikoli potrdile. Vsekakor je v naravi ogorčica *X. index* daleč bolj uspešen prenašalec od ogorčice *X. italiae* (Andret - Link in sod., 2004b).

Ogorčice se hranijo na koreninskih laskih vinske trte in živijo prosto v tleh (Belin in sod., 2001; Urek in Hržič, 1998). Njihova prehranjevalna naprava je sestavljena iz dolgega cevastega bodala (odontostileta), ki ga uporabljajo za vbadanje in izsesavanje tkiva mladih korenin (Urek in Hržič, 1998). Na mestu vboda se v korenini razvije zadebelitev, v kateri so vidne povečane, večjedrne celice z gosto citoplazmo (Belin in sod., 2001).

Ogorčica *X. index* med hranjenjem na okuženi trti poleg rastlinskih sokov zaužije tudi viruse GFLV, ki se vežejo na specifična mesta na kutikuli, ta pa obdaja notranjost požiralnika. Ko se okužena ogorčica hrani na koreninah zdrave trte, se skupaj z izločki iz požiralnih žlez preko odontostileta v rastlinsko tkivo prenesejo tudi virusi GFLV. Izločki iz požiralnih žlez so nujni za prebavo rastlinske celične vsebine, ki jo ogorčice vsesajo, ko je ta primerno obdelana (Urek in Hržič, 1998).

X. index je edini prenašalec GFLV v naravi in verjetno je ravno zato odnos med njima ter prenos med rastlinami tako visokospecifičen. Dokazali so, da je za specifično vezavo in zadrževanje GFLV v prebavilu ogorčice odgovoren virusni plašni protein. Determinante s katerimi se GFLV veže na kutikulo v prebavilu ogorčice *X. index*, so verjetno nameščene na zunanji površini virusne kapside. Natančen mehanizem pritrdjevanja še ni poznan (Andret - Link in sod., 2004b). GFLV se ne podvaja znotraj ogorčice in tudi ne vpliva na njeno razmnoževanje (Das in Raski, 1969, cit. po Demangeat, 2005).

Demangeat in sod. (2005) so s svojo raziskavo pokazali, da ostanejo ogorčice virulentne v zemlji brez gostiteljskih rastlin tudi po 4 letih. Vzorce zemlje z ogorčicami so hranili pri temperaturah 4 ° ter 20 °C in po 4 letih so ogorčice *X. index* preživele in uspele zadržati virus. Domnevajo, da v neugodnih razmerah, npr. v odsotnosti gostiteljskih rastlin, ogorčice preidejo v fazo mirovanja, ko se ne razmnožujejo in hranijo ter posledično ne sproščajo virusov.

Zanimivo je tudi, da virulentne ogorčice *X. index*, ki so jih hranili na rastlinah, v katerih se GFLV ne razmnožuje, sprostijo virus in po 12 tednih postanejo nevirulentne (Taylor in Brown, 1997, cit. po Demangeat, 2005).

Ogorčice širijo virus po vinogradu s hitrostjo 1,3–1,5 m na leto (Pearson in Goheen, 1998). Bolezenska znamenja okužbe z GFLV se značilno pojavljajo v zaplatah ali koncentričnih krogih velikih od nekaj kvadratnih metrov, do nekaj hektarov (Kurstak, 1981).

2.3.4.2 Prenos virusa s sadilnim materialom

Širjenje GFLV z ogorčico je omejeno na krajše razdalje, saj je maksimalna hitrost širjenja okužbe le 1,5 m na leto. Virus se na daljše razdalje prenaša z okuženim sadilnim materialom. Skupaj z virusom se na tak način lahko širi tudi njegov prenašalec, ogorčica *X. index* (Pearson in Goheen, 1998). Za to vrsto prenosa je značilna razpršena porazdelitev obolelih trsov v vinogradu (Kurstak, 1981). Obsežno širjenje GFLV s sadilnim materialom po svetu se je pospešilo po letu 1800. Takrat so namreč v Evropi pričeli z uporabo na trtno uš odpornih ameriških podlag. Do tedaj se je virus v Evropi verjetno širil predvsem z ogorčicami le znotraj omejenih območij (Pearson in Goheen, 1998).

Virus GFLV se ne prenaša s semeni (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980) in razen trte nima drugih naravnih rastlinskih gostiteljev. Njegov naravni rezervoar tako predstavljajo rastline rodu *Vitis* oziroma njihove z GFLV okužene korenine. Virus se namreč lahko ohrani v koreninah, ki ostanejo v zemlji viabilne še nekaj let po odstranitvi matičnega trsa. Ob prisotnosti ogorčice *X. index* se okuženost tal še dodatno podaljšuje (Pearson in Goheen, 1998).

2.3.4.3 Omejevanje širjenja okužbe

Med nepogrešljive načine omejevanja širjenja virusa GFLV spada testiranje trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov in posledično uporaba zdravega sadilnega materiala. Namen zdravstvene selekcije je pridobivanje klonov, ki niso okuženi s škodljivimi virusi, z indeksiranjem na določene sorte vinske trte, serološkim testom ELISA ali celo molekularnimi testi (Tomažič, 1999; Pravilnik, 2005). Zdrav sadilni material lahko pridobimo tudi s termoterapijo in s tkivno kulturo meristema (Blažina, 1992).

Eden izmed načinov omejevanja širjenja GFLV je tudi zatiranje prenašalca, ogorčice *X. index*. To je v že obstoječem vinogradu težko izvedljivo. Pomembnejša je priprava tal pred vzpostavitev vinograda. Seveda je najbolj priporočljiva nasaditev vinograda na površino, na kateri predhodno niso gojili vinske trte. Če sadimo vinograd na površino, kjer je prisotna samo ogorčica *X. index* brez GFLV ali obratno, bomo že z zasaditvijo zdravih trsov dosegli izkoreninjenje virusa (Pearson in Goheen, 1998; Andret - Link in sod., 2004a). Če pa sadimo vinograd na površino izkrcenega starega vinograda, kjer smo dokazali z GFLV okužene ogorčice, potem je najprimernejša predhodna doba mirovanja tal, ki jo nekateri ocenjujejo celo na 10 let (Vuitenez, 1969 cit. po Andret-Link in sod., 2004a; Maček, 1986).

Možna je tudi uporaba kemičnih sredstev za zatiranje ogorčic – nematocidov, ki so pogosto neučinkoviti zaradi slabega prodiranja v globlje plasti tal. Povrh vsega so običajno neselektivni ter tako strupeni tudi za ostale organizme v tleh. Problem predstavlja tudi uhajanje nematocidov v podtalnico (Pearson in Goheen, 1998; Urek in Hržič, 1998). Pred izkrcenjem vinograda je alternativa tudi premaz trte z neselektivnim herbicidom, ki uniči korenine, ki predstavljajo rezervoar virusa in vir hrane za ogorčico (Vršič in Lešnik, 2005).

V okviru omejevanja okužbe so pomembne tudi nekatere sorte vinske trte in nekatere divje vrste iz rodov *Vitis* in *Muscadinia*, ki so odporne na GFLV in na njegovega prenašalca, ogorčico *X. index*. Te so že uporabili za vzgojo novih odpornih podlag (Pearson in Goheen, 1998).

Preučevali so tudi možnost navzkrižne zaščite s serološko sorodnima virusoma GFLV in ArMV. Huss in sod. (1989) so okužili rastline vrste *Chenopodium quinoa* najprej z virusom ArMV in nato še z GFLV ter dokazali, da okužba z ArMV zmanjša ali celo zaustavi sintezo plaščnega proteina in podvojevanje RNA GFLV. Podobno so pokazali, da okužba z manj virulentim sevom GFLV zaščiti rastlino pred okužbo z zelo virulentim sevom istega virusa. Žal je strategija uspešna le v eksperimentalnih pogojih, v praksi pa se je izkazala za slabo uporabno (Huss in sod., 1989).

Novejša možnost je uporaba gensko spremenjenih rastlin vinske trte, odpornih na GFLV. Danes že obstaja nekaj podlag, odpornih na GFLV, ki imajo v rastlinski genom vnesen gen za plaščni protein GFLV. Ker obstaja teoretična možnost, da bi prišlo do rekombinacije med plaščnim proteinom GFLV, ki se izrazi v transgenih vinskih trtah, in virusi, ki so naravno prisotni v vinogradu, potekajo študije, ki bodo osvetlile dejanski pomen in tveganja povezana s pojavom rekombinacij.

2.3.5 Bolezenska znamenja

Vinska trta se na okužbo z virusom GFLV odzove z zelo različnimi bolezenskimi znamenji. To je posledica razlik v občutljivosti različnih sort vinske trte, različnih genotipskih variant virusa (Bovey in sod., 1980, Šutić in sod., 1999, Martelli in sod., 2001), starosti trsa, pri kateri pride do okužbe z GFLV, možnih interakcij z drugimi virusi (Šutić in sod., 1999) ter tudi vplivov okolja (Bovey in sod., 1980; Blažina, 1992). Vse to verjetno doprinaša k temu, da se opisi bolezni med različnimi avtorji razlikujejo.

Različne sorte se na okužbo z GFLV različno odzovejo. Pri tolerantnih sortah okužba ne povzroča pojava bolezenskih znamenj in ne kaže vpliva na kakovost pridelka. Pri zelo občutljivih sortah pa lahko kužno izrojevanje vinske trte zmanjša letni pridelek grozdja tudi za 80 %. Poleg tega se življenska doba trsov močno skrajša, poveča se nezdružljivost cepičev s podlago, sadilni material se težje ukorenini in poveča se občutljivost trsov na podnebne spremembe (Pearson in Goheen, 1998).

Kužno izrojevanje vinske trte povzroča bolezenska znamenja na vseh organih vinske trte (Šutić in sod., 1999). Bolezenska znamenja so opisana na listih, poganjkih, viticah, socvetjih, grozdih, steblih in lesu ter kot spremembe izgleda trsa.

Na listih se bolezenska znamenja izražajo kot deformirani listi, široko odprti sinusi ob listnem peclju, pogosto v kombinaciji z nenormalno oz. vzporedno razporeditvijo glavnih žil (pahljačavost listov), nesimetrični listi (listni polovici nista enakomerno razviti), nepravilna nazobčanost robov, kloroze žil (rumenenje žil), kloroze ali rumenenje medžilnih prostorov v obliki pik, obročkov, črt ali lis ali kot rumenenje celotne površine lista (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980; Hewit in sod., 1970). Opisan je tudi pojav, ko pride do presevnega rumenenja na omejenem območju vzdolž žil (obžilno rumenenje) (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980; Hewit in sod., 1970; Maček, 1986). Listi z obžilnim rumenenjem redko kažejo še druge vrste deformiranosti (Pearson in Goheen, 1998).

Stranski sinusi ali zareze so lahko poglobljeni in dajejo videz peteršiljavosti lista ali pa sinusi skoraj izginejo, kar oblikuje zaobljene liste (Blažina, 1992; Šutić in sod., 1999). Listi so lahko nagubani ali se zvijajo (Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993). Velikost listov je lahko zmanjšana na 1/3 do 1/4 normalnih (Maček, 1986). Listi so včasih krhki in lomljivi, njihova površina pa hrapava (Šutić in sod., 1999). Pojav razbarvanja medžilnih prostorov listov v različnih oblikah se običajno pojavi zgodaj spomladi, poleti pa nekatere vrste razbarvanja izginejo, tako da listi pobledijo in odpadejo ali pa jih prerastejo zeleni listi in so zato manj opazni (Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993; Martelli in sod., 2001). Za obžilno rumenenje poročajo, da se pojavlja pozno poleti, običajno na omejenem številu listov (Pearson in Goheen, 1998). Szychowski in sod. (1995) pa so dokazali tudi, da

se obžilno rumenenje razvije le na trsih, ki so hkrati okuženi z GFLV in viroidom rumenih madežev vinske trte (Grapevine yellow speckle viroid-1, GYSVd-1) (Naraghi - Arani, 2000).

Na poganjkih so opazili različne deformiranosti kot nenormalno razvejanje poganjkov v obliki bifurkacij na členku (viličasta rast), dvojni členki oz. nasproti ležeča očesa, medčlenki različnih dolžin oz. kratki medčlenki, zraslost poganjkov in cikcakasto rast (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993; Martelli in sod., 2001). Kratki medčlenki dosežejo kvečjemu polovico dolžine zdravih in so najpogostejši med 8. in 12. členkom (Maček, 1986). Kadar so medčlenki ekstremno skrajšani, se členki združijo v dvojne (Maček, 1986; Šutić in sod., 1999). Poganjki lahko rumenijo (Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993; Martelli in sod., 2001), kar je včasih opazno tudi pri viticah (Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993). Za okužbo z GFLV so značilna še ploščata stebila (Martelli in sod., 2001).

Bovey opozarja, da so dvojni členki, kratki medčlenki in zraslost poganjkov pogosto vidni pri zdravih rastlinah vinske trte. Pri nekaterih sortah vinske trte, na primer rizlingu in pinotu, namreč pojav dvojnih členkov in kratkih medčlenkov štejejo med sortne značilnosti (Bovey in sod., 1980).

Z GFLV okuženi trsi včasih oblikujejo več socvetij kot zdravi, vendar je cvetenje lahko moteno (Maček, 1986), cvetni nastavki pa so pogosto manjši (Blažina, 1992). Enako kot listi, poganjki in vitice lahko rumenijo tudi socvetja (Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993).

Grozdi so manjštevilični in manjši z drobnimi jagodami, ki so dostikrat brez semen. Jagode zorijo neenakomerno in so lahko neenakomerno tudi obarvane (Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993; Bovey in sod., 1980; Šutić in sod., 1999). Pogost pojav je osipanje jagod, do katerega lahko pride takoj po cvetenju. Na grozdu lahko ostane le tretjina jagod, med njimi pa je nekaj zelo debelih in veliko izrazito drobnih (Maček, 1986; Vršič in Lešnik, 2005). Pridelek je posledično majhen in slabe kakovosti (nižja vsebnost sladkorja v grozdju) (Blažina, 1992; Martelli in sod., 2001) ali ga celo sploh ni (Pearson in Goheen, 1998). Produktivna življenska doba z GFLV okuženih vinogradov se občutno zmanjša s 30–40 let ali več na 15–20 let (Andret - Link in sod., 2004a). Osipanje jagod in majhne jagode sta pogosta pojava, ki pa nista vedno posledica okužbe z virusom. Vzrok so lahko neugodne vremenske razmere med cvetenjem (Tomažič, 1999).

Hewitt in sodelavci (1970) so poročali, da virus GFLV povzroča tudi razbrazdanje lesa vinske trte, vendar kasneje tega nihče ni uspel potrditi.

Okuženi trsi imajo v primerjavi z zdravimi slabše razvit koreninski sistem (Bovey in sod., 1980; Šutić in sod., 1999). Cepiči iz okuženih trsov so težje združljivi s podlago, prav tako se podlage iz okuženega materiala težje ukoreninijo (Martelli in sod., 2001; Šutić in sod., 1999; Pearson in Goheen, 1998).

Zelo izrazito bolezensko znamenje je tudi grmast ali metlast videz trsa. Zaradi močnega skrajševanja medčlenkov ter njihove cikcakaste razporeditve je rast mladice manjša in trsi dobijo grmast videz. Če k tem bolezenskim znamenjem prištejemo še viličasto rast poganjkov, je trs lahko podoben brezovi metli, še posebej ko odpadejo listi (Maček, 1986).

Kužno izrojevanje vinske trte se izraziteje pojavlja pri belih sortah. Na splošno se bolezenska znamenja te bolezni pojavljajo največkrat skupno, zato posameznih nenormalnosti, ugotovljenih vizualno na trsih, ni mogoče šteti kot zanesljivo znamenje okužbe z GFLV (Blažina, 1992).

Ob prerezu olesenelih poganjkov okuženega trsa so pod mikroskopom opazne znotrajcelične prečke ali trabakule. Te radialne pregrade prečijo lumen epidermalnih, parenhimskih, floemskih in ksilemskih celic. Zgrajene so iz pektinskega jedra, ki ga obdajata celuloza in skorja iz lignina, suberina ali kutina, odvisno od vrste tkiva, v katerem se nahajajo (Pearson in Goheen, 1998). Prisotnost trabakul je uporabno znamenje za diagnostične namene, vendar njihova odsotnost ne izključuje okužbe z GFLV (Bovey in sod., 1980).

Nekatera bolezenska znamenja virusnih okužb so zelo podobna raznim fiziološkim motnjam v razvoju vinske trte ali poškodbam zaradi ekoloških in kemičnih povzročiteljev. Znamenja virusnih bolezni najpogosteje zamenjujejo z znamenji, ki se na trti pojavijo ob pomanjkanju mikroelementov (Mg, B, Zn) in makrohranil, ob poškodbah s herbicidi, pesticidi ali pri nestrokovni uporabi hormonov. Virusno okužbo pogosto pripisujejo poškodbam, ki so posledica vremenskih dejavnikov, npr. pozeb, suš in sončnih ožganin. Do zamenjave kužnega izrojevanja vinske trte lahko pride tudi z okužbami, ki jih povzročajo drugi virusi ali kombinacija virusov, glive, fitoplazme, bakterije in nekateri insekti. Podobna bolezenska znamenja lahko nastanejo tudi kot posledica genetskih napak v genomu vinske trte (Bovey in sod., 1980; Vršič in Lešnik, 2005). Da na podlagi opazovanja bolezenskih znamenj ne moremo z gotovostjo trditi, ali gre za določeno virusno okužbo, pripomore še dejstvo, da se bolezenska znamenja iz leta v leto ali celo med rastno sezono pogosto izražajo različno značilno (Vršič in Lešnik, 2005).

2.4 GENSKA VARIABILNOST RNA VIRUSOV

Populacije rastlinskih virusov so genetsko heterogene. Kot pri vseh živih bitjih so rezultat razmnoževanja posamezniki, ki se genetsko razlikujejo od svojih staršev. Taki potomci se

imenujejo mutanti ali genotipske variante ali navidezne vrste (quasispecies). Genetska struktura populacije se s časom spreminja, kar imenujemo evolucija virusa (Garcia - Arenal in sod., 2003).

Virusi z RNA se hitro spreminjajo oz. so genetsko variabilni predvsem zaradi manjše natančnosti podvojevanja in neučinkovitih popravljivih mehanizmov ali njihove odsotnosti. Pripomorejo tudi kratki generacijski časi, velika hitrost podvojevanja in posledično velika populacija virusov v okuženem organizmu (Moya in sod., 2000; Jerman in Štern, 1999). Najpogostejši genetski spremembi pri virusih sta mutacija (sprememba virusnega genetskega materiala) in rekombinacija (izmenjava genetskega materiala med dvema sorodnima virusoma ali genotipskima variantama).

Mutacije v neki populaciji so primarni vir variabilnosti. Nastanejo zaradi insercije, delecije ali substitucije nukleotidov. O verjetnosti za utrditev mutacije odloča zlasti njen fenotipski učinek, ki bodisi zvišuje zmogljivost organizma (ugoden oz. pozitiven učinek), jo ohranja (nevtralna mutacija) ali jo zmanjšuje (neugodna oz. negativna mutacija) (Jerman in Štern, 1999: 55). Neznani deleži negativnih mutacij (imajo lahko učinek na aminokislinsko sestavo) je fenotipsko neugodnih, nekatere npr. onemogočijo razmnoževanje virusa. Te mutacije se v nadaljevanju s selekcijo izločijo iz populacije, kar pomeni nižjo pogostost opaženih sprememb. Ta pa se razlikuje od ocenjene hitrosti mutacij. Omenjena trditev velja za pogoje, ko selekcijski pritisk ni izrazito okrepljen (Jerman in Štern, 1999: 55; Drake in sod., 1998).

Hitrost mutacij je pri virusih z DNA in evkariontskih celicah ocenjena na 10^{-8} do 10^{-11} nukleotidnih zamenjav na mesto v enem podvojevalnem ciklu, pri RNA virusih pa na 10^{-3} do 10^{-6} nukleotidnih zamenjav (Koren in Avšič - Županc, 1998: 37). Pri rastlinskem RNA virusu mozaika tobaka (TMV) so na podlagi preučevanja gibalnega proteina hitrost mutacij ocenili na 1 nukleotidno zamenjavo na genom pri vsaki podvojitvi. 69 % mutacij so predstavljale insercije in delecije, večkrat celo treh ali več baz, substitucij pa je bilo le 31 %, kar je ravno obratno kot poročajo za viruse z DNA. Tretjina vseh mutantov je vsebovala več kot eno mutacijo (multiple mutante), kar kaže na to, da je večina mutacij v virusu TMV – kot verjetno tudi v ostalih rastlinskih virusih z RNA – neadaptivne narave (Malpica in sod., 2002). Ugotovitev podpira predvidevanja, da je velika hitrost mutacij virusov z RNA prej posledica težnje po čimhitrejši replikaciji kemijsko nestabilnega genoma RNA kot pa evolucijska strategija virusov (Drake in sod., 1999).

Rekombinacija je izmenjava genetskega materiala med procesom podvojevanja in se pojavi v rastlini, če je ta okužena z dvema ali več sorodnimi virusi oziroma genotipskimi variantami istega virusa. Ločimo tri osnovne tipe rekombinacij RNA: natančno homologno, nenatančno homologno (aberrant homologous) in nehomologno rekombinacijo. Obe homologni rekombinaciji se pojavita med dvema verigama RNA z

enakim ali sorodnim zaporedjem. Pri prvi pride do prekrižanja verig na natančno homolognem mestu, pri nenatančni homologni rekombinaciji pa tudi na drugih mestih, kar privede do nastanka hčerinske verige z duplikacijami, delecijami ali insercijami. Nehomologna rekombinacija poteče med dvema različnima ali nesorodnima verigama RNA (Lai, 1992). Nagy in Bujarski (1995) sta opozorila na dejstvo, da lahko že zelo kratko homologno zaporedje 5 do 15 nukleotidov med dvema nepodobnima RNA molekulama privede do rekombinacije. Ta ugotovitev zamegli mejo ločevanja med homolognimi in nehomolognimi rekombinacijami RNA (Masuta, 2002).

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

Dokazano je bilo, da se rekombinacija pojavlja tudi med virusi, ki okužujejo gensko spremenjeno rastlino, in v rastlino vstavljenim virusnim genom. Prvič je bil ta pojav opisan pri virusu Cowpea chlorotic mottle (CCMV). Virusna mutanta z nepopolnim genom za plašni protein je z rekombinacijo v gensko spremenjeni rastlini z vstavljenim genom za plašni protein ponovno pridobila funkcionalen gen (Borja in sod., 1999).

Pomembno je tudi zavedanje, da veliko število rekombinacij nastalih v eksperimentalnih pogojih niso realen odsev rekombinacij v naravi. Te so dokaj redke (Masuta, 2002; Lai, 1992). Rekombinacije RNA so za rastlinske viruse zagotovo pomemben mehanizem evolucije in prilagoditve na novo okolje. Po drugi strani pa imajo rekombinacije RNA v naravi verjetno pomembno vlogo pri popravljanju mutacij, ki so nastale zaradi nenatačnosti virusne replikaze (Masuta, 2002; Lai, 1992). To pa ne pomeni, da rekombinacije v osnovi ustvarijo funkcionalne molekule RNA brez napak, ki jih povzroči replikaza, saj ni nujno, da ravno mesta napak izzovejo rekombinacijo. Vsekakor pa z rekombinacijami nastane več molekul RNA, izmed katerih je s selekcijo izbrana funkcionalna RNA (Lai, 1992). Verjetno virusi z RNA uporabljajo mehanizem rekombinacije do stopnje, ki je potrebna za preživetje (Masuta, 2002).

Rekombinantni virusi lahko kažejo podobne ali spremenjene biološke lastnosti kot virusi, iz katerih so nastali. Poveča se lahko patogenost ali krog gostiteljev in spremeni se lahko učinkovitost ali specifičnost prenosa z vektorjem (Aaziz in Tepfer, 1999).

2.4.1 Genska variabilnost GFLV

GFLV ima teoretično velik potencial za genetske variacije. Trditev podpirajo dejstva, da GFLV okužuje vinsko trto, ki je trajnica in se zato virus v njej zadržuje dlje časa, da je polimeraza nenatančna ter da so odsotni popravljalni mehanizmi (Andret - Link in sod., 2004a). Vse to omogoča kopičenje mutacij in nastanek novih genotipskih variant. Posamezna rastlina pa tako lahko hkrati gosti večje število genotipskih variant istega virusa (Vigne in sod., 2004b).

Naraghi - Arani in sod. (2001) so z metodama IC-RT-PCR-RFLP in določanjem nukleotidnega zaporedja gena 2C preučevali genetsko variabilnost 14 izolatov GFLV iz 8 kalifornijskih vinogradov. Dokazali so, da je v posameznih vzorcih prisotnih več genotipskih variant GFLV, ki se v nukleotidnem zaporedju 2C gena razlikujejo za 11–13 %, v aminokislinskem zaporedju pa za 4–9 %.

Izbrane izolate GFLV so z mehansko inokulacijo prenesli tudi na testne rastline *Chenopodium quinoa* ter po pojavu bolezenskih znamenj z ekstraktom rastline okužili novo zdravo rastlino *C. quinoa*. Pasaže so večkrat ponovili in ugotovili, da se prvotni kompleksni restrikcijski vzorec po drugem prenosu spremeni oz. poenostavi in ostane nespremenjen pri nadaljnjih pasažah. Določeni restrikcijski fragmenti so se izgubili, pojavili pa so se nekateri novi. Ker pasaže povečajo selekcijski pritisk, so se v novem gostitelju obdržale le najbolj prilagojene genotipske variante. Domnevajo, da so nove genotipske variante prisotne tudi v izvornem ekstraktu vinske trte, vednar so bile zaradi nizkih koncentracij nezaznavne. Genotipske variante, ki so z zaporednimi prenosi med testnimi rastlinami izginile, pa naj bi bile na novo okolje manj prilagojene (Naraghi - Arani, 2000; Naraghi - Arani in sod., 2001).

Vigne in sodelavci (2004a,b) so prav tako preučevali gensko variabilnost virusa GFLV. Z analizo gena 2C 347 izolatov iz gensko spremenjenih in nespremenjenih trt so dokazali, da slaba polovica izolatov vsebuje več kot eno genotipsko varianto virusa. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja 93 genotipskih variant in filogenetsko analizo so ugotovili, da pet genotipskih variant izstopa znotraj svoje filogenetske skupine. Pri vseh petih, ki so jih izolirali iz gensko nespremenjenih trt, so z računalniškim programom pokazali, da so nastale z rekombinacijo na različnih mestih v kodirajoči regiji plaščnega proteina. To je pravzaprav prvo odkritje pojava rekombinacije v kodirajoči regiji pri nepovirusih v naravi ob odsotnosti selekcijskega pritiska, ki ga običajno ustvarijo eksperimentalni pogoji. Da je bil selekcijski pritisk res neznaten potrjuje tudi dejstvo, da so bile vse gensko nespremenjene in večina gensko spremenjenih trt občutljivih na okužbo z GFLV.

Čeprav so pri 93 genotipskih variantah na nukleotidnem nivoju ugotovili 0,2–13,8 % variabilnost pa je po prevodu v aminokislinska zaporedja variabilnost znašala 0,2–6,9 %. V

genu za plaščni protein se torej odraža precejšna genska stabilnost. Plaščni protein ima namreč pomembno vlogo pri interakciji virusa s prenašalcem in pri širjenju virusa iz celice v celico, zato so verjetno tudi zahteve po natančni strukturi in stabilnosti proteina precej velike. Tako je tudi odkritje rekombinant v genu 2C verjetno povezano z dejstvom da aminokisline, ki so ključne za funkcionalnost plaščnega proteina, niso bile prizadete.

V nadaljnjih raziskavah so Vigne in sodelavci leta 2005 eno izmed petih odkritih rekombinant, imenovano A17b, izolirali s prenosom iz trte v testno rastlino *Gomphrena globosa* in naprej z zaporednimi pasažami v rastlino *C. quinoa*. Določili so nukleotidno zaporedje celotne kodirajoče regije RNA2 in nepričakovano ugotovili, da je poleg že znane rekombinacije znotraj gena 2C (na mestu 2234–2264) do te verjetno prišlo tudi znotraj gena 2A (na mestu 826–837). Izvornih genetskih variant žal niso uspeli izolirati, saj je 2A del rekombinante A17b precej različen od znanih GFLV izolatov.

Z analizo nukleotidnih zaporedij so odkrili, da glede na gena 2B in 2C velikost gena 2A najbolj variira (765–774 nukleotidov ali 255–258 aminokislin) s podobnostjo 85–91 % na aminokislinskem nivoju. Aminokislinska podobnost za gen 2B znaša 98–99 % in za 2C 95–96 %. Rezultati so v skladu s podatki znanimi za soroden virus ArMV.

Raziskave nukleotidnega zaporedja gena 2C rekombinante A17b v obdobju petih let, izolirane tako iz vinske trte kot tudi testnih rastlin, so pokazale, da se gen 2C ni opazno spremenil. S tem so potrdili domnevno stabilnost gena 2C. Za rekombinantni izolat A17b so dokazali, da je normalno prenosljiv s cepljenjem kot tudi z ogorčico *X. index* ter da je kazal enaka bolezenska znamenja, kot nerekombinantni GFLV izolati. Z drugimi besedami, rekombinanta A17b ni kazala razlik v bioloških lastnostih v primerjavi z nerekombinantnimi GFLV (Vigne in sod., 2005).

2.5 METODE ODKRIVANJA VIRUSNIH OKUŽB

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

2.5.1 Metode, ki temeljijo na infektivnosti virusa

Diagnostična metoda, ki temelji na infektivnosti virusa, je prenos virusa na testne rastline. Testne rastline, ki v standardiziranih pogojih razvijejo značilna bolezenska znamenja kot odgovor na okužbo z določenim virusom, se imenujejo tudi indikatorske rastline. Metoda ima žal številne pomanjkljivosti, kot so latentne okužbe, pri katerih se bolezenska znamenja sploh ne razvijejo, okužbe z več različnimi virusi hkrati itd. (Horvath, 1993: 16). Ločimo teste na zelatih rastlinah in indeksiranje (Colnarič in sod., 1985:149).

Indeksiranje pomeni cepljenje cepičev preučevanega trsa na določene sorte vinske trte, ki se značilno in stalno odzovejo na določeno virusno okužbo. Čeprav noben izmed indikatorjev iz rodu *Vitis* ni odporen na okužbo z GFLV, se na virus najhitreje in najbolj tipično odzove vrsta *Vitis rupestris* sorte St. George. Po 3–4 tednih po inokulaciji s cepljenjem se na listih rastlin *V. rupestris* sorte St. George pojavijo kloroze v obliki pik, lis ali črt, včasih pa so prisotne tudi lokalizirane nekroze. Omenjena bolezenska znamenja so prehodne narave. Kasneje, po 2–3 mesecih po inokulaciji, se običajno razvijejo kronična bolezenska znamenja, kot so zmanjšana rast, mile deformacije listov ali izrazita nazobčanost listov (Martelli in sod., 2001).

Indeksiranje se lahko izvaja z okulacijo, cepljenjem zeleno na zeleno ali drugimi postopki. Indeksiranje se uporablja tudi za ugotavljanje virusnih okužb, pri katerih povzročitelj še ni znan (Tomažič, 2002; Martelli in sod., 2001).

Druga metoda, ki temelji na infektivnosti virusa, je dokazovanje virusov s pomočjo zelnatih testnih rastlin. Za dokazovanje GFLV se uporabljajo rastline: *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, kumare *Cucumis sativus* in fižol *Phaesus vulgaris*. Vsaka izmed naštetih rastlin kaže značilna bolezenska znamenja, ki se pojavijo po določenem času po mehanski inokulaciji, večinoma pa so to različna razbarvanja listov (Martelli in sod., 2001).

2.5.2 Metode, ki temeljijo na seroloških lastnostih virusa

Serološki testi temeljijo na vezavi protitelesa s plaščnim proteinom virusa, ki predstavlja antigen.

Najpogostejše uporabljena metoda za določanje virusov v rastlinskem materialu je encimskoimunna metoda ELISA. Test odlikuje visoka občutljivost, saj v 1 ml vzorca lahko zaznamo že 1 ng virusnega antigena. Zaradi tega in gospodarne uporabe reagentov je test ELISA zamenjal številne druge serološke teste, ki se uporabljajo v rastlinski virologiji. Ločimo posredno in neposredno različico testa ELISA. Pri neposredni metodi zaznavamo antigen s specifičnim protitelesom, na katerega je vezan encim. Pri posrednem postopku pa s sekundarnim encimsko označenim protitelesom zaznavamo primarno, za antigen specifično, protitelo. Pri obeh različicah lahko antigen vežemo na trdno površino ali na predhodno vezana specifična protitelesa (Van Regenmortel in Dubs, 1993).

Že od svojega prvega opisa leta 1977 se za dokazovanje rastlinskih virusov najpogostejše uporablja neposredni sistem dvojnih protiteles t. i. metoda dvojnega sendviča (double antibody sandwich ELISA, DAS ELISA). Pri tej prva neoznačena protitelesa, ki so vezana na trden nosilec, vežejo antigen, ki ga želimo dokazati. Na nastale komplekse protiteles in

antigena vežemo druga, z encimom označena protitelesa. Posredna metoda, pri kateri na nosilec najprej vežemo antigen, pa se imenuje PTA ELISA (plate trapped antigen ELISA). Sledi vezava prvih protiteles, proti katerim so usmerjena druga, z encimom označena protitelesa. Po dodajanju primernega substrata ta po delovanju encima spremeni barvo (Garnsey in Cambra, 1993).

Test ELISA se izvaja na trdnih nosilcih, mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. Po vsaki fazi dodajanja reagentov je zelo pomembno izpiranje, s katerim odstranimo nevezane snovi. Včasih je po adsorpciji prve plasti reagentov koristna uporaba pufru za blokiranje, ki prekrije preostala prosta vezavna mesta v vdolbinicah in tako prepreči nespecifično vezavo sledečih reagentov (Van Regenmortel in Dubs, 1993).

Ostali serološki testi, ki se uporabljajo v rastlinski virologiji so še: precipitacijski testi v tekočem mediju (precipitacija, aglutinacija), imunodifuzijski testi (precipitacije v gelu), serološki testi na trdnih nosilcih (radioimunska metoda, imunofluoresenčna metoda) ter testi z uporabo imunskega pivnika (immunoblotting) (Van Regenmortel in Dubs, 1993).

2.5.3 Metode, ki temeljijo na morfoloških lastnostih virusa

Najbolj natančna metoda za neposredno opazovanje virusov v soku okuženih rastlin je elektronska mikroskopija. Zgradba nekaterih virusov je tako značilna, da jih po morfoloških posebnostih lahko uvrstimo v določeno družino. Pri tem se uporablja metoda negativnega kontrastiranja. Pogoji za optimalno opazovanje virusov je zadostno število njihovih delcev, kar včasih predstavlja omejitev. Pri tem je v pomoč imunska elektronska mikroskopija, ki neposredno povezuje serologijo z elektronsko mikroskopijo. Pri metodi ISEM (immunosorbent electron microscopy) mrežice prekrijemo s protitelesi, ki jih nato inkubiramo z rastlinskim sokom, v katerem iščemo viruse. Na ta način koncentriramo virusne delce. Izboljšava metode ISEM predstavlja tudi t. i. dekoracija, kar pomeni da na mrežico adsorbirane viruse označimo z še enimi protitelesi. Z uporabo specifičnih protiteles lahko ločujemo morfološko enake viruse, s protitelesi dekorirane viruse pa zlahka ločimo od nedekoriranih (Van Regenmortel in Dubs, 1993; Mavrič in Ravnikar, 1998).

Svetlobni mikroskop se v virologiji uporablja le pri opazovanju znotrajceličnih sprememb, predvsem vključkov, ki se značilno pojavljajo v gostiteljski celici pri okužbah z določenimi virusi (Edwardson, 1993: 108).

2.5.4 Metode, ki temeljijo na lastnostih nukleinskih kislin

Izjemen razvoj metod molekularne biologije in njihova postopna poenostavitve sta v zadnjih dveh desetletjih korenito spremenila način raziskovanja virusnih okužb.

Dokazovanje in opredelitev virusnega genoma se začne z njegovo osamitvijo. Za postopek izolacije RNA je pomembno, da poteka v okoliščinah, v katerih je možnost prisotnosti encimov RNaz zmanjšana na minimum. Osamljeno RNA običajno prepisemo v komplementarno in bolj stabilno DNA (cDNA) z reverzno transkriptazo. Molekularna metoda s katero dobimo največ podatkov o virusnem genomu in s katero neposredno in nedvoumno dokažemo virusne nukleinske kisline je metoda določevanja nukleotidnega zaporedja. Ker je slednja še vedno časovno zamudna, draga in tehnično zahtevna se še ne uporablja v rutinsko. V ta namen se uporabljajo različne bolj ali manj občutljive in specifične posredne molekularne metode. Delimo jih v dve skupini: hibridizacijske metode (fluorescentna in situ hibridizacija ali FISH, hibridizacija po Southernu, hibridizacija po Northernu, dot-blot hibridizacija, mikromreže) in metode pomnoževanja delcev nukleinskih kislin (verižna reakcija s polimerazo – PCR in PCR v realnem času) (Poljak, 1998).

Tudi pri določanju virusne variabilnosti na nukleotidnem nivoju ima največjo informativno vrednost metoda določevanja nukleotidnega zaporedja. Danes pogosto uporabljena metoda, ki je hitra, enostavna in ponovljiva ter nudi okvirno sliko o obstoječi variabilnosti v neki populaciji, je analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). Slednja temelji na uporabi ustreznih restrikcijskih encimov, ki prepoznavajo kratka zaporedja DNA, kamor se vežejo in prekinajo verigi. Razlike v velikostih fragmentov oz. restrikcijskih vzorcih, vidnih na elektroforetskem gelu, odražajo razlike v nukleotidnem zaporedju dveh DNA. Poleg RFLP se za ocenjevanje genske variabilnosti uporabljajo še metode: iskanje prstnih odtisov oz. fingerprinting s ribonukleazo T1, analiza konformacijskega polimorfizma enoverižnih DNA (Single Stranded Polymorphism, SSCP) ter nekatere hibridizacijske metode (Garcia - Arenal in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VINOGRADI

3.1.1 Opis vinogradov

V raziskavo smo vključili trse različnih sort iz vinogradov na različnih lokacijah na Primorskem. Rastlinski material vinske trte *Vitis vinifera* L. smo nabirali v kolekcijskem vinogradu v Ložah, selekcijskem vinogradu v Komnu, kolekcijskem vinogradu v Malinkovcih, vinogradu v Dutovljah, v Ampelografskem vrtu v Kromberku, petih vinogradih v Vrhpolju ter vinogradu v Krajni vasi.

Kolekcijski vinograd v Ložah pri Vipavi je bil zasajen leta 1985. Tu je posajenih 22 starih primorskih sort. To so deloma naše stare domače, deloma pa udomačene sorte, ki se pri nas gojijo že najmanj 200 let (Korošec - Koruza 1992).

Ampelografski vrt Biotehniške fakultete je bil posajen med letoma 1930 in 1940 v Kromberku pri Novi Gorici. Deloval je kot prvi slovenski muzejski vinograd. Različne stare sorte vinske trte so nabrali v celotni Vipavski dolini. Ker so trse v tem času tudi presajali ter vinograd obnavljali, so trsi, ki smo jih vzorčili in opazovali, mlajši od prvotno posajenih. Tudi trsi, ki danes rastejo v kolekcijskem vinogradu v Ložah, so bili tja prenešeni iz Ampelografskega vrta v Krombreku. Danes je vinograd v Kromberku namenjen raznim poskusom, ki potekajo na Biotehniški fakulteti (Klarić, 2004).

Selekcijski vinograd v Komnu na Krasu je bil posajen v letih od 1989 do 1991. V njem je od 10 do 20 trsov 78 elit sorte Refošk. Vinograd je bil posajen z namenom izbrati ustrezne elite za klonsko selekcijo in odbiro zdravih cepljenk ter obdržati stare tipe sorte Refošk (Tomažič, 1999).

Kolekcijski vinograd v Malinkovcih pri Komnu je bil zasajen leta 1998. V njem smo nabrali potomke starih matičnih trt, ki izvirajo iz vinogradov v Vogljah, Komnu in Krajni vasi. Matične trte, ki so stare preko 100 let, so pri predhodnih raziskavah pokazale pozitiven rezultat na prisotnost GFLV s testom ELISA.

Vinograd v Dutovljah, Krajni vasi in vinogradi v Vrhpolju so v lasti lokalnih vinogradnikov ter služijo za proizvodnjo grozdja.

Trsi v vinogradih so označeni z imenom sorte, ki ji sledi številka vrste, v kateri se trs nahaja, ter zaporedna številka trsa v tej vrsti (npr. volovnik 2/45).

3.1.2 Nabiranje rastlinskega materiala

Rastlinski material smo nabrali na omenjenih lokacijah na Krasu in v Vipavski dolini januarja in konec maja 2005. Januarja smo vzorčili rozge, suhe olesenele dele, 183 trt različnih sort. Za izbor teh trsov smo se odločili na podlagi opazovanj bolezenskih znamenj iz leta 2004, ko so pri večini trsov opazili znamenja, ki jih pripisujejo okužbi z GFLV ter trse s testom ELISA tudi testirali na prisotnost GFLV (Vojvoda, 2005). S pomočjo teh predhodnih rezultatov smo v število 183 vzorcev želeli, poleg okuženih z GFLV, zajeti tudi zdrave trse oz. trse, ki niso okuženi z virusom GFLV.

V času mladih poganjkov konec maja smo vzorčili vrhnje liste 67 trt različnih sort. Teh 67 vzorcev smo izbrali za natančno popisovanje bolezenskih znamenj in fenofaz skozi celo sezono.

Glede na rezultate testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja 2005 smo v izbor 67 vzorcev želeli zajeti trse, ki so okuženi samo z GFLV, trse okužene z GFLV in še enim ali več drugih virusov za opazovanje morebitnih medsebojnih učinkov različnih virusov ter kontrolne rastline, ki so zdrave ali niso okužene z GFLV.

3.1.3 Popisovanje bolezenskih znamenj in fenofaz

Bolezenska znamenja in fenofaze, razvojne stadije vinske trte, smo popisovali na izbranih 67 trsih v rastni sezoni od aprila do septembra 2005. Fenofaze smo beležili glede na sistem fenofaz, ki sta ga leta 1977 razvila W.Eichorn in D.H.Lorenz (priloga A).

Opazovali smo bolezenska znamenja na listih, poganjkih, steblih, socvetjih, grozdih in na lesu ter celoten izgled trsa. Na listih smo bili pozorni na bolezenska znamenja kot pahljačavost listov, nesimetrični listi (listni polovici nista enakomerno razviti), peteršiljavost listov, kloroze žil, kloroze medžilnih prostorov v obliki rumenih pik, obročev ali krogov in lis, rumenenje celotnih listov, zvijanje ali gubanje listov in rdečenje listov. Na poganjkih smo popisovali bifurkacije na členkih (viličasta rast), bifurkacije na medčlenkih, dvojne členke oz. nasproti ležeča očesa, zraslost poganjkov, ploščata stebela, cik-cak rast in metlasto rast poganjkov. Na steblih podlage in žlahtnega dela trte smo iskali morebitna znamenja razbrazdanja, na grozdih pa bolezenska znamenja kot majhne jagode, majhni grozdi, osipavanje jagod ter redkejši grozdi (manjše število jagod na grozdu). Pri celotnem izgledu trsa smo opazovali ali so listi manjši in gosti ter ali ima trs videz grma. Nekaterih bolezenskih znamenj kot bifurkacije na medčlenkih, zvijanje ali gubanje listov in rdečenje listov literatura sicer ne pripisuje okužbi trte z virusom GFLV, vendar ker smo omenjena znamenja opazili že v prejšnjih rastnih sezonah in so bili opazovani trsi okuženi tudi z več virusi hkrati, smo bili na njih prav tako pozorni.

3.1.3.1 Obdelava podatkov dobljenih s popisovanjem bolezenskih znamenj

Analizo razvrščanja trsov v skupine glede na izražanje podobnih bolezenskih znamenj in grafični prikaz deležev trsov z bolezenskimi znamenji po skupinah smo naredili v statističnem programskem okolju R. Za mero podobnosti med spremenljivkami smo uporabili Sokal-Michenerjevo mero, razvrščali pa smo po hierarhični Wardovi metodi.

3.2 ANALIZA VZORCEV

3.2.1 Homogenizacija rastlinskega materiala za test ELISA

V primeru rozg smo v ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba) zatehtali 0,5 g nastrganega floemskega tkiva posameznega vzorca. Rastlinski material smo homogenizirali v 7,5 ml ekstrakcijskega pufru s pomočjo homogenizatorja (Homex Bioreba). Po enakem postopku smo zatehtali 1 g mladih listov in jih homogenizirali v 10 ml ekstrakcijskega pufru.

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

TRIS	264 mM
TRIS-HCl	236 mM
NaCl	137 mM
PVP K25	2 %
PEG 6000	2 mM
Tween 20	0,05 %

3.2.2 Test ELISA

S testom ELISA smo dokazovali 10 najpogostejše prisotnih virusov pri vinski trti: GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GVB in RSPaV. Uporabili smo dve različni tehniki: neposredno metodo dvojni sendvič (DAS ELISA) in posredno metodo (indirect PTA ELISA). V obeh primerih smo na mikrotitrne ploščice v posamezne vdolbinice nanесли negativno in pozitivno kontrolo ter ekstrakcijski pufer. Vse vzorce smo testirali v dveh ponovitvah.

Pri obeh metodah smo uporabili enake pufre:

Pufer za izpiranje za ELISA (pH 7,4)

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

Karbonatni pufer za ELISA (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	35 mM

Substratni pufer za ELISA (pH 9,8)

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

Konjugatni pufer za ELISA (pH 7,4)

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

3.2.2.1 DAS ELISA

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

V vdolbinice mikrotitrne ploščice (Greiner) smo odpipetirali po 200 µl protiteles proti ustreznemu virusu, razredčenih v karbonatnem pufru v razmerju 1 : 1000. Ploščico smo inkubirali čez noč v hladilniku pri temperaturi 4 °C ter nato vdolbinice 4-krat sprali s pufrom za izpiranje.

V vdolbinice na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali po 190 µl v ekstrakcijskem pufru homogeniziranega rastlinskega materiala. Ploščico smo inkubirali čez noč pri 4 °C in nato 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. Po izpiranju smo v vdolbinice odpipetirali po 180 µl protiteles proti določenemu virusu konjugiranih z alkalno fosfatazo (Bioreba), razredčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000. Po petih urah inkubacije pri 30 °C smo ploščico 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 200 µl p-

nitrofenilfosfata s koncentracijo 1 mg/ml v substratnem pufru. Ploščice smo inkubirali na sobni temperaturi ter po 30 minutah, 1 uri, 2 urah in 18 urah pojav rumene barve, ki označuje okuženo rastlino, odčitali spektrofotometrično pri 405 nm. Uporabili smo čitalec mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in program BioLinx 2.20.

3.2.2.2 Neposredni test ELISA (indirect PTA ELISA)

Z neposredno metodo smo dokazovali okužbo z virusoma GVB in RSPaV.

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

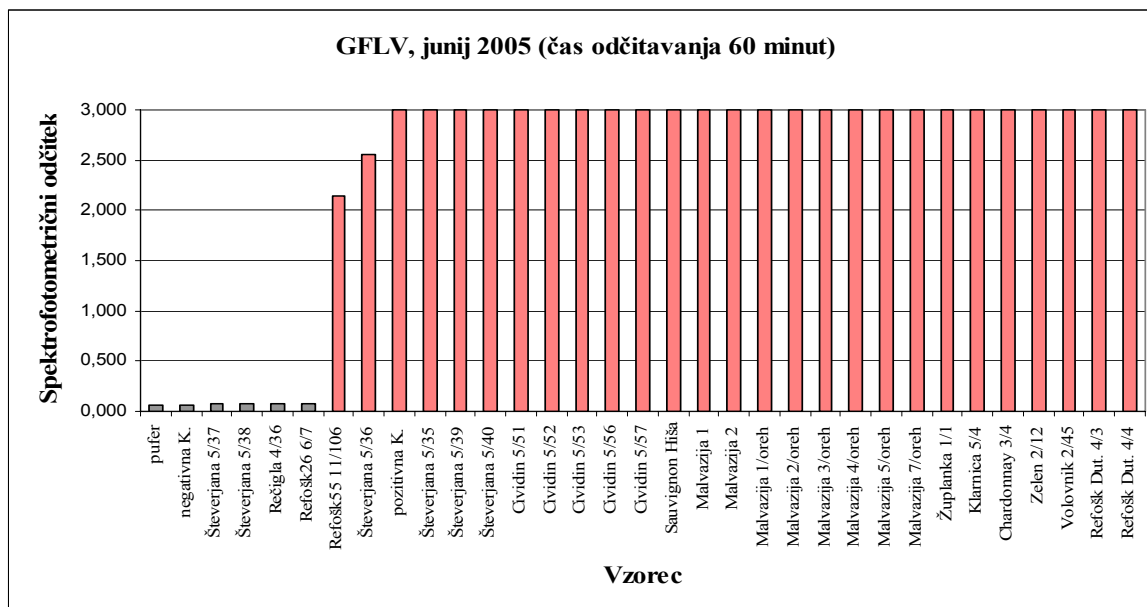
Nadaljevali smo z dodajanjem 190 µl specifičnih protiteles proti določenemu virusu. Specifična protitelesa proti virusu GVB (Agritest) smo nanесли razredčena v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000, prav tako protitelesa proti RSPaV (Gonsalves D., osebna komunikacija). Po dveh urah inkubacije pri 37 °C smo ploščico 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 180 µl protiteles proti določenemu virusu konjugiranih z alkalno fosfatazo, razredčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000 za GVB (Agritest) in 1 : 34000 za RSPaV (Sigma A-3687). Po dveh urah inkubacije pri 37 °C smo ploščico ponovno 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 200 µl p-nitrofenilfosfata s koncentracijo 1 mg/ml v substratnem pufru. Po 30 minutah, 1 uri, 2 urah in 18 urah smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in programom BioLinx 2.20 izmerili absorpcijo pri 405 nm.

3.2.2.3 Obdelava podatkov testa ELISA

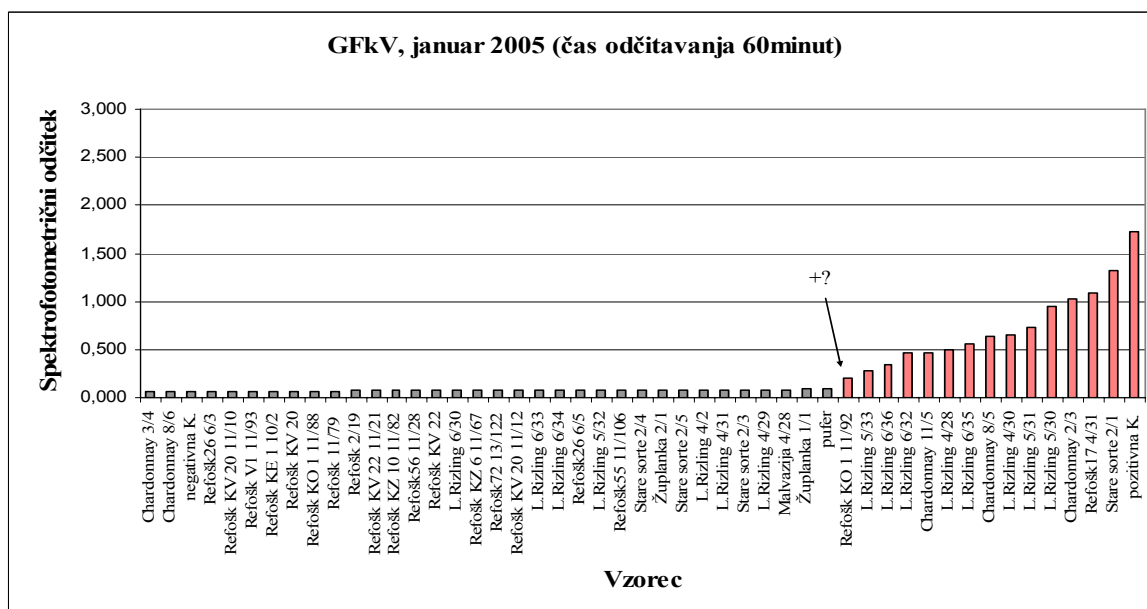
Podatke smo obdelali z računalniškim programom Excel (Microsoft). Za vsak vzorec smo iz ponovitev izračunali povprečno vrednost odčitkov. Za vsako ploščico smo narisali grafikon iz spektrofotometričnih odčitkov vzorcev. Iz grafikonov smo na podlagi povišanih in nizkih fotometričnih vrednosti vzorcev določili mejo med pozitivnimi (okuženimi) in negativnimi (neokuženimi) vzorci. Za pozitivne smo večinoma šteli vzorce, pri katerih je bila absorpcija po eni oz. dveh urah inkubacije 2- do 3-krat večja kot absorpcija referenčne negativne kontrole. Ta način določanja meje med pozitivnimi in negativnimi vzorci se uporablja tudi v rutinskem testiranju.

Za primer podajam obdelavo rezultatov za virus GFLV (slika 6), kjer je meja med pozitivnimi in negativnimi vzorci jasno določljiva, ter obdelavo rezultatov za virus GFkV (sliki 7 in 8). Pri slednjem meja ni tako jasna, zato smo vzorce, ki imajo povišane spektrofotometrične vrednosti, vendar so te relativno nizke, označili z oznako +?. V takih primerih smo si pomagali tudi s kasnejšimi odčitki po 18 urah, ko smo preverili, ali so se

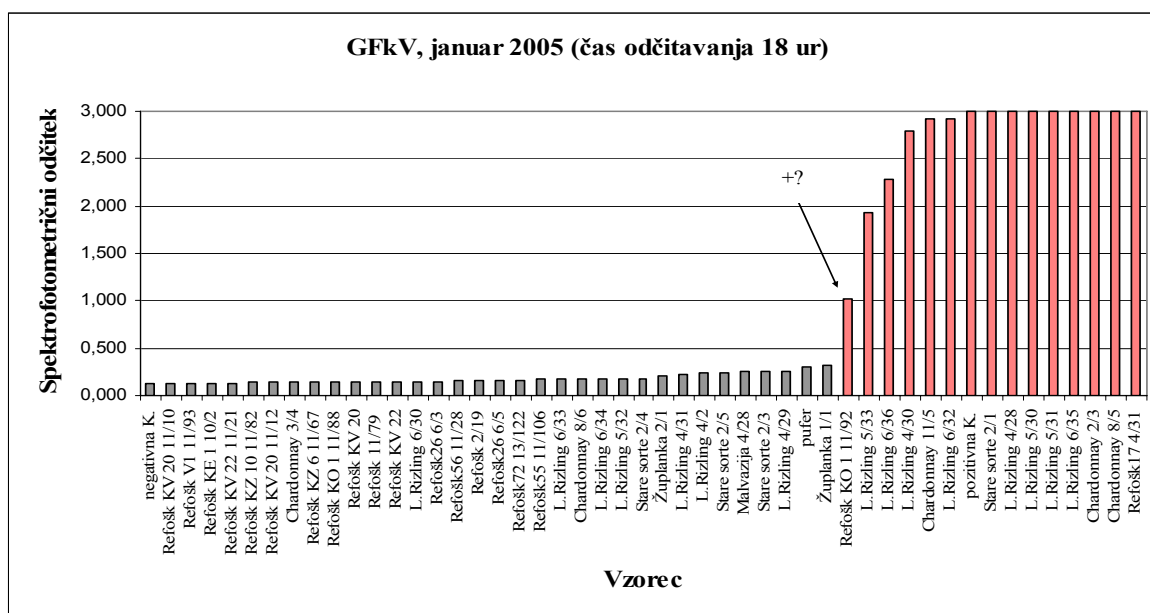
spektrofotometrične vrednosti domnevno pozitivnih vzorcev zares povišale, medtem ko se pri negativnih vzorcih niso bistveno spremenile. Enako smo se odločali pri vseh ostalih podobnih primerih.



Slika 6: Primer grafičnega prikaza spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV 60 minut po dodatku substrata v juniju 2005. Pozitivni vzorci so obarvani rdeče, negativni pa sivo.



Slika 7: Primer grafičnega prikaza spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFkV 60 minut po dodatku substrata v januarju 2005. Pozitivni vzorci so obarvani rdeče, negativni pa sivo. Z oznako +? je označen vzorec, pri katerem je vrednost povišana, vendar relativno nizka.



Slika 8: Primer grafičnega prikaza spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFkV 18 ur po dodatku substrata v januarju 2005. Pozitivni vzorci so obarvani rdeče, negativni pa sivo. Z oznako +? je označen vzorec, pri katerem je vrednost povišana, vendar relativno nizka.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo s postopnim zniževanjem temperature naleganja začetnih oligonukleotidov (Touchdown PCR)

Vzorci virusne cDNA, dobljene z metodo lovljenja virusa GFLV na protitelesa (immunocapture, IC) in reverzno transkripcijo (RT) smo prejeli iz predhodnih raziskav (Klarić, 2004; Vojvoda, 2005). Pomnoževali smo 11 vzorcev sorte volovnik.

Verižno reakcijo s polimerazo s postopnim zniževanjem temperature naleganja začetnih oligonukleotidov smo za vsak vzorec posebej izvedli z začetnima oligonukleotidoma GFLV 2AF, ki nalega na 5' koncu RNA2, in EV00N1, ki nalega na 3' koncu RNA2. Začetna oligonukleotida smo izbrali tako, da smo pri pomnoževanju dobili fragmente skupne dolžine vseh treh genov 2A, 2B in 2C (3463 – 3469 bp) (slika 9).

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke dali 26 µl vode, 20 µl reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo in 4 µl cDNA. Da bi povečali specifičnost naleganja začetnih oligonukleotidov, smo v začetnih korakih PCR povišali temperaturo naleganja (60 °C). Pri vsakih naslednjih 4 ciklih pa znižali temperaturo naleganja za 1 °C. Na ta način smo kljub uporabi degeneriranega začetnega oligonukleotida povečali specifičnost parjenja baz med začetnim oligonukleotidom in matrično DNA v začetnih stopnjah PCR ter zagotovili, da se je v nadaljnjih stopnjah res pomnoževalo željeno zaporedje. Vzorci smo inkubirali v aparaturi za PCR (Prekin Elmer 9700):

94 °C	3 min	}	4 cikli za vsako T naleganja začetnih oligonukleotidov = 24 ciklov
94 °C	30 s		
60-55 °C	1 min		
68 °C	5 min		
94 °C	30 s	}	20 ciklov
55 °C	1 min		
68 °C	5 min + 5 s vsak cikel		
68 °C	10 min		

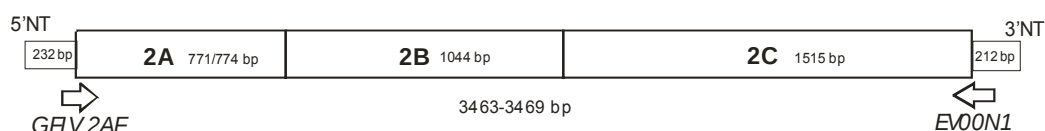
Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo (Vigne s sod., 2003):

Sterilna voda	8,6 µl
10X Taq pufer (Promega)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM, Promega)	3 µl
dNTP (10 mM, Promega)	1 µl
GFLV 2AF (50 pmol/µl)	1 µl
EV00N1 (50 pmol/µl)	1 µl
Taq polimeraza (5 U/µl, Promega)	0,4 µl

Začetni oligonukleotidi (Degenerirani nukleotidi: Y = C ali T):

GFLV 2AF 5'-CTYTTAYTTTGGCGCTTTATTTGYTTAG-3'

EV00N1 5'-GACTATCTAGACACATATATACACTTGGGTCTTTTAA-3'



Slika 9: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na matrično cDNA med verižno reakcijo s polimerazo. Začetna oligonukleotida sta označena s puščicama, pod katerima je ime posameznega začetnega oligonukleotida. Številke znotraj okvirjev predstavljajo velikosti genov in nekodirajočih regij v baznih parih. Številka med puščicama označuje velikost pomnoženega fragmenta v baznih parih

3.2.3.1 Gelska elektroforeza

Na 1 % agaroznem gelu s TAE pufrom smo preverili velikost pomnoženih fragmentov. Elektroforeza je potekala 60 minut pri napetosti 80 V. Po končani elektroforezi smo iz forografije gela ocenili količino DNA v posameznem vzorcu glede na lestvico znane velikosti in koncentracije (1kbp DNA Ladder, Promega).

3.2.4 Izolacija fragmenta iz gela (po navodilih proizvajalca Promega)

Ker so se z verižno reakcijo s polimerazo kljub uporabi različice PCR s postopnim zniževanjem temperature naleganja začetnih oligonukleotidov poleg specifičnega fragmenta pomnožili še nespecifični fragmenti, smo produkte PCR nanесли na gel, ločili fragmente med seboj in specifične fragmente izrezali iz gela. DNA smo očistili s kompletom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Rezine gela smo dali v predhodno stehtano sterilno mikrocentrifugirko in ponovno stehtali. Na vsakih 10 mg gela smo dodali 10 μ l pufra za vezavo na membrano in inkubirali v termobloku 5 minut pri 60 °C. Ko se je rezina gela popolnoma stopila, smo vsebino mikrocentrifugirke prenesli na kolono, nameščeno v mikrocentrifugirki, in centrifugirali eno minuto pri 16000 g. Nato smo dodali 750 μ l pufra za izpiranje, centrifugirali 1 minuto pri 16000 g, nanесли 500 μ l pufra za izpiranje in centrifugirali 5 minut pri 16000 g. Kolono smo prestavili v novo sterilno mikrocentrifugirko, dodali 50 μ l sterilne vode in centrifugirali 1 minuto pri 16000 g.

Očiščene produkte PCR smo koncentrirali z obarjanjem DNA. Vzorcju smo dodali 125 μ l absolutnega etanola in 5 μ l 3 M Na-acetata (pH 5,2). Vzorce smo inkubirali čez noč pri temperaturi –20 °C. Centrifugo smo ohladili na 4 °C in vzorce centrifugirali 30 min pri 20000 g. Supernatant smo odstranili in dodali 180 μ l 70 % etanola. Vzorce smo ponovno centrifugirali 15 min pri 20000 g. Supernatant smo previdno odstranili in DNA posušili v odprtih mikrocentrifugirkah na sobni temperaturi. DNA smo raztopili v ustrezni količini vode in jo shranili pri –20 °C do uporabe.

3.2.5 Ligacija v pGEM-T Easy vektor (povzeto po navodilih proizvajalca Promega)

Ker je bilo kar nekaj rastlin okuženih z več kot eno genotipsko varianto GFLV smo produkte PCR (3463 – 3469 bp) vnesli v plazmide in z njimi transformirali kompetentne celice *Escherichia coli* DH5 α . Tako smo zagotovili, da je vsaka od transformiranih celic prejela plazmid s produktom le ene izmed genotipskih variant, ki so okuževale rastlino.

Za vstavljanje očiščenih produktov v plazmidne vektorje smo uporabili komplet pGEM-T Easy Vector System I (Promega). Plazmidni vektor pGEM-T Easy je lineariziran z restriktazo EcoRV in ima na obeh 3' koncih dodan timin. Le – ta poveča učinkovitost ligacije PCR produktov v vektor, saj imajo ti na 5' koncih dodan en ali dva adenina, ki jih ustvari izbrana termostabilna Taq polimeraza (Promega).

Za uspešnejšo ligacijo smo skušali zagotoviti, da je molarno razmerje med vektorjem in insertom znašalo 1:3. K 3 μ l očiščenih in oborjenih PCR produktov smo dodali 5 μ l ligacijskega pufra, 0,5 μ l 50 ng/ μ l plazmidnega vektorja pGEM-T Easy, 0,5 μ l sterilne vode ter 1 μ l 3 U/ μ l DNA-ligaze T4. Vzorce smo inkubirali čez noč pri 4 °C.

3.2.6 Transformacija celic

Plazmidne vektorje pGEM-T Easy z vstavljenim produktom PCR smo v bakterije *Escherichia coli* DH5 α vnesli s toplotnim šokom. Po transformaciji smo bakterije gojili na trdnem gojišču LB/Amp/X-Gal/IPTG. Z modro-belim testom smo izbrali kolonije, ki so imele v plazmidnem vektorju pGEM-T Easy vstavljene produkte PCR.

Gojišče SOC smo pripravili tako, da smo zmešali 2 g triptona, 0,5 g kvasnega ekstrakta, 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, dolili smo 60 ml vode in sterilizirali z avtoklaviranjem 20 min pri 120 °C. Po sterilizaciji smo dodali 1 ml 2 M Mg²⁺ raztopine in 1 ml 2 M raztopine glukoze, umerili pH na 7, dolili vodo do 100 ml ter sterilizirali s filtriranjem.

Gojišče SOC (pH 7)

Tripton	2 %	}	sterilizirano z avtoklaviranjem
Kvasni ekstrakt	0,5 %		
NaCl	10 mM		
KCl	2,5 mM		
MgCl ₂	10 mM		
MgSO ₄	10 mM		
Glukoza	20 mM		

Tekoče gojišče LB/Amp smo pripravili tako, da smo zmešali tripton, kvasni ekstrakt in NaCl ter dolili vodo. Umerili smo pH na 7 in avtoklavirali. Ko se je gojišče ohladilo na 60 °C, smo dodali ampicilin, premešali ter napolnili epruvete do 5ml.

Tekoče gojišče LB/Amp

Tripton	2 %
Kvasni ekstrakt	0,5 %
NaCl	85 mM
Ampicilin	0,01 %

Trdno gojišče LB/Amp/agar smo pripravili tako, da smo zmešali tripton, kvasni ekstrakt, NaCl in agar ter dolili vodo. Umerili smo pH na 7 in avtoklavirali. Ko se je gojišče ohladilo na 60 °C, smo dodali ampicilin, premešali in nalili v petrijevke.

Gojišče LB/Amp/agar

Tripton	2 %
Kvasni ekstrakt	0,5 %
NaCl	85 mM
Agar	1,5 %
Ampicilin	0,01 %

Trdno gojišče LB/Amp/X-Gal/IPTG smo naredili tako, da smo zmešali tripton, kvasni ekstrakt, NaCl in agar ter dolili vodo. Umerili smo pH na 7 in avtoklavirali. Ko se je gojišče ohladilo na 50 °C, smo dodali ampicilin, X-Gal in IPTG, premešali ter nalili v petrijevke.

Gojišče LB/Amp/X-Gal/IPTG

Tripton	2 %
Kvasni ekstrakt	0,5 %
NaCl	85 mM
Agar	1,5 %
Ampicilin	0,01 %
X-Gal	0,008 %
IPTG	0,05 mM

Suspenzijsko kulturo kompetentnih celic *Escherichia coli* DH5 α shranjeno na –80 °C smo oddalili na ledu in previdno premešali. 100 μ l suspenzijske kulture bakterij smo dodali k 5 μ l ligacijske mešanice plazmidnega vektorja pGEM-T Easy z vstavljenimi produkti PCR, rahlo premešali in inkubirali 20 minut na ledu, 50 sekund v vodni kopeli pri 42 °C in 2 minuti na ledu. Vzorcem smo dodali 900 μ l gojišča SOC in jih inkubirali s stresanjem pri 300 rpm 90 minut pri 37 °C. Na vsako izmed 6 petrijevk s trdnim gojiščem LB/Amp/X-Gal/IPTG smo razmazali po 200 μ l posameznega vzorca in inkubirali čez noč pri 37 °C.

Od vsakega vzorca smo izbrali nekaj belih kolonij in jih precepili na trdno gojišče LB/Amp ter inkubirali čez noč pri 37 °C. Posamezne kolonije smo s trdnega gojišča precepili v 5 ml tekočega gojišča LB/Amp in inkubirali s stresanjem čez noč pri 37 °C. Prekonočne kulture smo prenesli v mikrocentrifugirke, dodali glicerol (30 % končnega volumna) in tako nastale trajne kulture shranili na –80 °C.

3.2.7 Izolacija plazmidov (po navodilih proizvajalca Promega)

Plazmide smo izolirali s kompletom Wizard SV 96 Plasmid DNA Purification System (Promega). V globoko mikrotitrsko ploščico smo v vsako izmed 96 vdolbinic nacepili 1,5 ml tekočega gojišča LB/Amp in nekaj μ l suspenzije bakterij z vključenim plazmidom posameznega vzorca. Inkubirali smo s stresanjem, 18 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami centrifugirali 15 min pri 1500 g, odlili supernatant in pelete resuspendirali v 250 μ l pufra za resuspenzijo. Uporabili smo multikanalno pipeto. V vdolbinice smo nato dodali 250 μ l pufra za lizo celic in previdno premešali. Po 3 minutah smo dodali 350 μ l nevtralizacijskega pufra in bakterijske lizate iz posameznih vdolbinic prenesli v ploščico za čiščenje bakterijskih lizatov. To smo postavili na vezavno ploščico in obe na poseben podstavek s katerim skupaj z vakuumsko črpalko odstranili bakterijski lizat, plazmidi pa so se vezali na vezavno ploščico. Ploščico za čiščenje

bakterijskih lizatov smo zavrgli, v vdolbinice vezavne ploščice pa nanесли 500 μl nevtralizacijskega puфра in ga s priključitvijo na vakuum za 1 minuto tudi odstranili. Nato smo nanесли po 1 ml puфра za izpiranje in sistem priključili na vakuum za 1 minuto. Zadnji korak smo ponovili, le da smo odstranjevanje puфра za izpiranje z vakuumom podaljšali na 10 minut. Vezavno ploščico smo namestili na elucijsko ploščico in obe na podstavek s povezavo na vakuumsko črpalko. V vdolbinice vezavne ploščice smo nanесли 100 μl sterilne vode in s pomočjo vakuuma plazmide zbrali v elucijski ploščici. Elucijski volumni so variirali med 60 in 70 μl . Mikrotitrsko elucijsko ploščico smo pokrili s samolepilno folijo in plazmide shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do uporabe.

3.2.7.1 Gelska elektroforeza izoliranih plazmidov

Na 1 % agaroznem gelu s TAE puфrom smo preverili prisotnost izoliranih plazmidov. Elektroforeza je potekala 90 minut pri napetosti 120 V.

3.2.8 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Velikost vstavljenih produktov PCR v plazmidni vektor pGEM-T Easy smo preverili z verižno reakcijo s polimerazo. To smo za vsak vzorec izvedli z začetnima oligonukleotidoma pGEMT fwd in pGEMT rev, ki nalegata na plazmid zelo blizu mesta insercije fragmentov.

V 200 μl mikrocentrifugirke smo dali 26 μl sterilne vode, 20 μl reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo (preglednica) in 4 μl 100-krat redčenega plazmida. Vzorce smo inkubirali v aparaturi za PCR (Prekin Elmer 9700):

94 $^{\circ}\text{C}$	3 min	} 30 ciklov
94 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
55 $^{\circ}\text{C}$	40 s	
68 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
68 $^{\circ}\text{C}$	10 min	

Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo:

Sterilna voda	7 μl
10X pufer Taq (Promega)	5 μl
MgCl ₂ (25 mM, Promega)	3 μl
dNTP (10 mM, Promega)	2 μl
pGEMT fwd (50 pmol/ μl)	1 μl
pGEMT rev (50 pmol/ μl)	1 μl
polimeraza Taq (5 U/ μl , Promega)	1 μl

Začetni oligonukleotidi:

pGEMT fwd 5'-ATACGACTCACTATAGGGCG-3'
pGEMT rev 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'

3.2.8.1 Gelska elektroforeza

Na 1 % agaroznem gelu s TAE pufrom smo preverili velikost produktov PCR oziroma velikost fragmentov, ki so se vključili v plazmidni vektor pGEM-T Easy. Elektroforeza je potekala 90 minut pri napetosti 120 V.

3.2.9 Vgnezdna verižna reakcija s polimerazo (Nested PCR)

Vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli za vzorce, pri katerih je bil fragment, ki smo ga želeli vključiti v plazmidni vektor, ustrezne velikosti. Pomnoževali smo gen 2C, za katerega so v predhodnih raziskavah potrdili, da je najbolj variabilen izmed treh genov na RNA2. Uporabili smo začetna oligonukleotida EV00N1 in EV00N3.

V 200 µl mikrocentrifugirke smo dali 28 µl sterilne vode, 20 µl reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo in 2 µl produkta PCR, ki smo ga dobili z namnoževanjem fragmentov vključenih v plazmidni vektor, z začetnimi oligonukleotidi, ki so nalegali na plazmid. Vzorce smo inkubirali v aparaturi za PCR (Prekin Elmer 9700):

94 °C	3 min		
94 °C	20 s	}	10 ciklov
55 °C	40 s		
68 °C	2 min		
94 °C	20 s	}	20 ciklov
55 °C	40 s		
68 °C	2 min + 5 s vsak cikel		
68 °C	7 min		

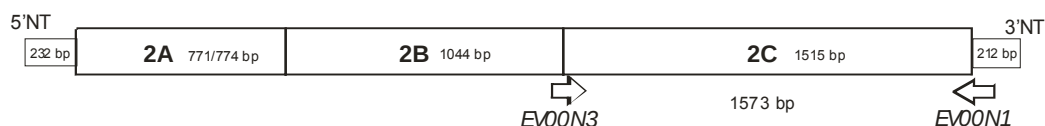
Sestava reakcijske mešanice za vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo:

Sterilna voda	8,6 µl
10X pufer Taq (Promega)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM, Promega)	3 µl
dNTP (10 mM, Promega)	1 µl
EV00N3 (50 pmol/µl)	1 µl
EV00N1 (50 pmol/µl)	1 µl
polimeraza Taq (5 U/µl, Promega)	0,4 µl

Začetni oligonukleotidi (Degenerirani nukleotidi: Y = C ali T) (Vigne s sod., 2003):

EV00N3 5'-ACTGTCTAGAGGATTRGCYGGYAGAGGAGT-3'

EV00N1 5'-GACTATCTAGACACATATATACACTTGGGTCTTTTAA-3'



Slika 10: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na matrično DNA med vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo. Začetna oligonukleotida sta označena s puščicama, pod katerima je ime posameznega začetnega oligonukleotida. Številke znotraj okvirjev predstavljajo velikosti genov in nekodirajočih regij v baznih parih. Številka med puščicama označuje velikost pomnoženega fragmenta v baznih parih.

3.2.9.1 Gelska elektroforeza in ocenjevanje količine DNA v vzorcih

Velikost pomnoženih fragmentov (1573 bp) smo preverili na 1 % agaroznem gelu s TAE pufrom. Elektroforeza je potekala 45 minut pri napetosti 100 V.

Po končani elektroforezi smo iz fotografije elektroforetskega gela ocenili količino DNA v posameznem vzorcu glede na lestvico fragmentov znane velikosti in koncentracije (1 kbp DNA Ladder, Promega).

3.2.9.2 Izolacija fragmenta iz gela (po navodilih proizvajalca Promega)

Ker so se z vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo poleg specifičnega fragmenta z velikostjo 1573 bp pomnožili še nespecifični fragmenti, smo produkte PCR nanesti na gel, ločili fragmente med seboj in specifične fragmente izrezali iz gela. DNA smo očistili s kompletom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (glej 3.2.4).

DNA smo po koncentriranju z obarjanjem raztopili v ustrezni količini vode glede na ocenjeno količino DNA v posameznem vzorcu tako, da je bila končna koncentracija 10 ng/μl. Prečiščeno DNA smo shranili pri -20 °C do uporabe.

3.2.9.3 Rezanje DNA z encimoma StyI in EcoRI (povzeto po Vigne s sod., 2003)

Gen 2C smo rezali z encimoma StyI in EcoRI. Encima sta restrikcijski endonukleazi, ki prepoznavata tarčni zaporedji dolgi šest baznih parov. Encim StyI reže znotraj zaporedja CCWWGG, pri čemer je W lahko A ali T. Encim EcoRI reže znotraj zaporedja GAATTC.

K 5 μl očiščenih produktov PCR s koncentracijo 10 ng/ μl smo dodali 10 μl reakcijske mešanice za restrikcijo in inkubirali tri ure v vodni kopeli pri 37 °C.

Sestava reakcijske mešanice za restrikcijo z EcoRI:

Sterilna voda	7,75 μl
10X pufer H (Promega)	1,5 μl
100X BSA (Promega)	0,15 μl
EcoRI (10 U/ μl , Promega)	0,6 μl

Sestava reakcijske mešanice za restrikcijo z StyI:

Sterilna voda	7,75 μl
10X pufer F (Promega)	1,5 μl
100X BSA (Promega)	0,15 μl
StyI (10 U/ μl , Promega)	0,6 μl

3.2.9.2.1 Gelska elektroforeza

Po restrikciji smo vzorce nanesti na 2 % agarozni gel v TAE pufru. Elektroforeza je potekala dve uri pri 120 V.

Na podlagi slike gelov z različnimi restrikcijskimi vzorci smo se odločili, katere trajne kulture smo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja. Želeli smo zajeti čimveč različnih genotipskih variant virusa GFLV.

3.2.9.3 Obdelava rezultatov analize RFLP

Za vzorce, pri katerih smo popisovali bolezenska znamenja smo, poleg že natančno obdelanih restrikcijskih vzorcev oz. restrikcijskih tipov za gena 2A in 2B (Vojvoda, 2005) želeli določiti restrikcijske tipe tudi za gen 2C.

Slike gelov z restrikcijskimi vzorci za gen 2C (Klarić, 2004; Tomažič, osebna komunikacija) smo skušali obdelati s pomočjo poskusne verzije računalniškega programa Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics). Za lažjo analizo rezultatov restrikcije smo v spletni bazi podatkov National Center for Biotechnology (NCBI) na spletni strani <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> poiskali vsa že znana nukleotidna zaporedja gena 2C in s pomočjo programa RestrictionMapper version 3 na spletni strani <http://www.restrictionmapper.org/> simulirali rezanje z encimoma StyI in EcoRI. Tako smo pridobili podatke o nekaterih restrikcijskih mestih in velikostih fragmentov za gen 2C. Izkazalo se je, da je za natančno obdelavo kompleksnih restrikcijskih vzorcev na gelu število restrikcijskih tipov za gen 2C preveliko. Zato smo se osredotočili na obdelavo restrikcijskih vzorcev za gen 2C le pri sorti volovnik, za katero smo določili tudi

nukleotidna zaporedja (glej 3.2.10). S pomočjo teh smo po simuliranju rezanja z encimoma StyI in EcoRI natančno določili nekatera restrikcijska mesta in velikosti fragmentov in jih primerjali s fragmenti na gelu.

3.2.10 Določanje nukleotidnega zaporedja

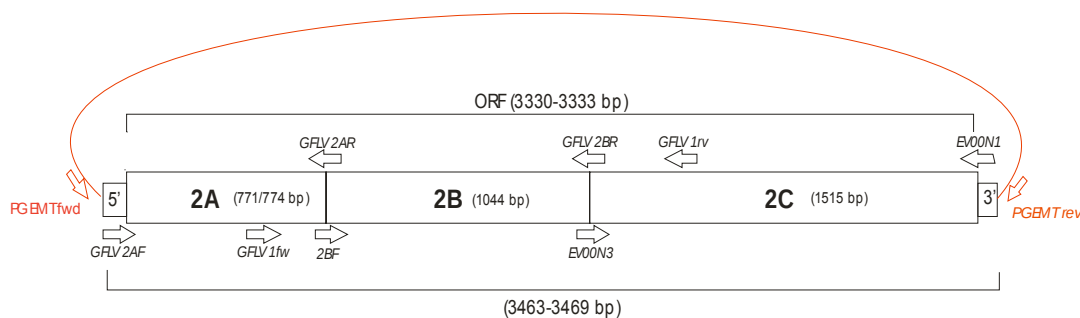
Nukleotidno zaporedje smo določili 32 v plazmide vstavljenim fragmentom iz 10 rastlin sorte volovnik.

Vzorce smo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja s šestimi začetnimi oligonukleotidi (GFLV 2AR, GFLV 2BF, GFLV 2BR, EV00N3, pGEMT fwd in pGEMT rev) na Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Nemčija. Poslali smo v glicerolu shranjene trajne kulture bakterij, *Escherichia coli* DH5 α z vstavljenim plazmidnim vektorjem pGEM-T Easy in željenim insertom.

Dobili smo 6 nukleotidnih zaporedij po celotni dolžini fragmenta, ki smo jih za vsak vzorec posebej sestavili v celoto. Sestavljena nukleotidna zaporedja so bila na dveh odsekih nezanesljiva, zato smo oblikovali še dva dodatna začetna oligonukleotida (GFLV 1fw, GFLV 1rv) in 32 vzorcev ponovno poslali na dodatno določanje nukleotidnega zaporedja v podjetje Macrogen, Korea. Poslali smo liofilizirane plazmide in začetna oligonukleotida v ustrezni koncentraciji (Gutierrez, osebna komunikacija).

Začetni oligonukleotidi (Degenerirani nukleotidi: Y = C ali T; H = A, T, ali C; M = A ali C; R = A ali G; K = G ali T; D = A, G ali T; B = C, G ali T)

GFLV 2AR	5'-CAATHGTYTGCCCMCCRGTA-3'
GFLV 2BF	5'-CTACYGGKGGGACARACDATT-3'
GFLV 2BR	5'-GGTTGARCTCARYCTRGGCT-3'
EV00N3	5'-ACTGTCTAGAGGATTRGCGYGGYAGAGGAGT-3'
pGEMT fwd	5'-ATACGACTCACTATAGGGCG-3'
pGEMT rev	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'
GFLV 1fw	5'-CCACTTGGAGGARGTGGTATGAC-3'
GFLV 1rv	5'-GRTGGATRAGCCARTGBGGRAC-3'



Slika 11: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na fragment (virusna RNA2), ki je vključen v plazmid pGEMT Easy. Začetni oligonukleotidi so označeni s puščicami, nad/pod katerimi je ime posameznega začetnega oligonukleotida. Plazmid in začetni oligonukleotidi, ki nalegajo nanj so označeni z rdečo. Številke znotraj okvirjev predstavljajo velikosti posameznih genov, označena je tudi velikost bralnega okvirja (ORF) in velikost fragmenta RNA2.

3.2.10.1 Obdelava nukleotidnih zaporedij

Delna nukleotidna zaporedja dobljena z 8 začetnimi oligonukleotidi smo sestavili v končno zaporedje za posamezen vzorec s programom Vector NTI Suite 7. Uporabili smo podprograma ContigExpress za sestavljanje delnih zaporedij in AlignX za poravnavo že sestavljenih končnih zaporedij.

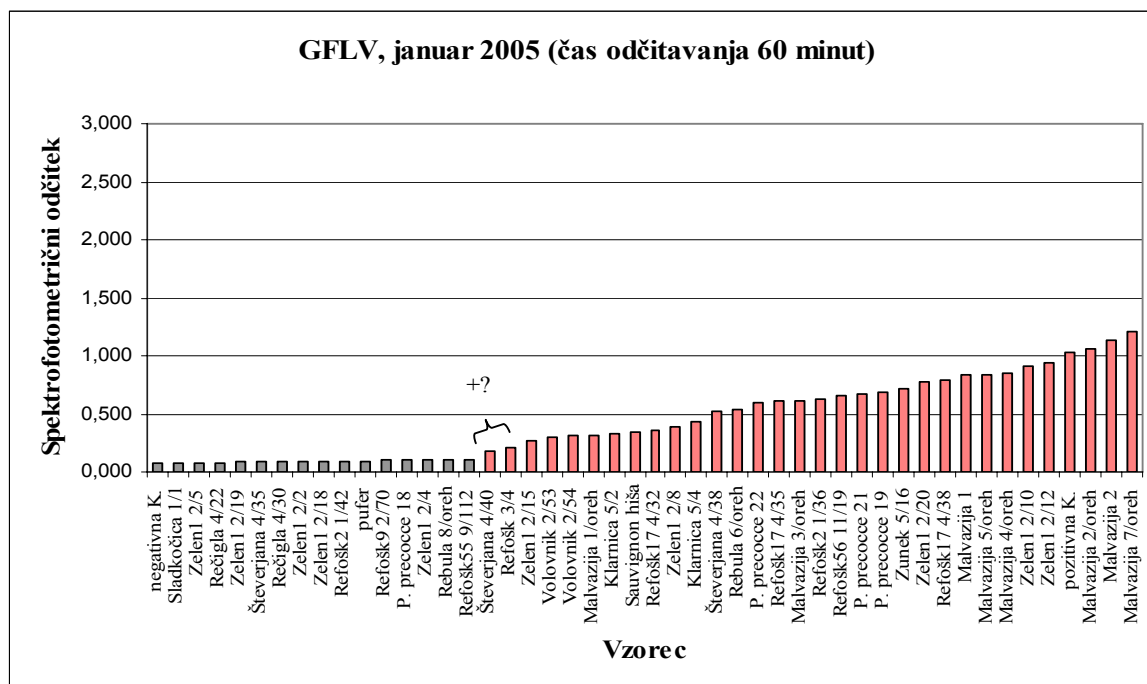
4 REZULTATI

4.1 TEST ELISA

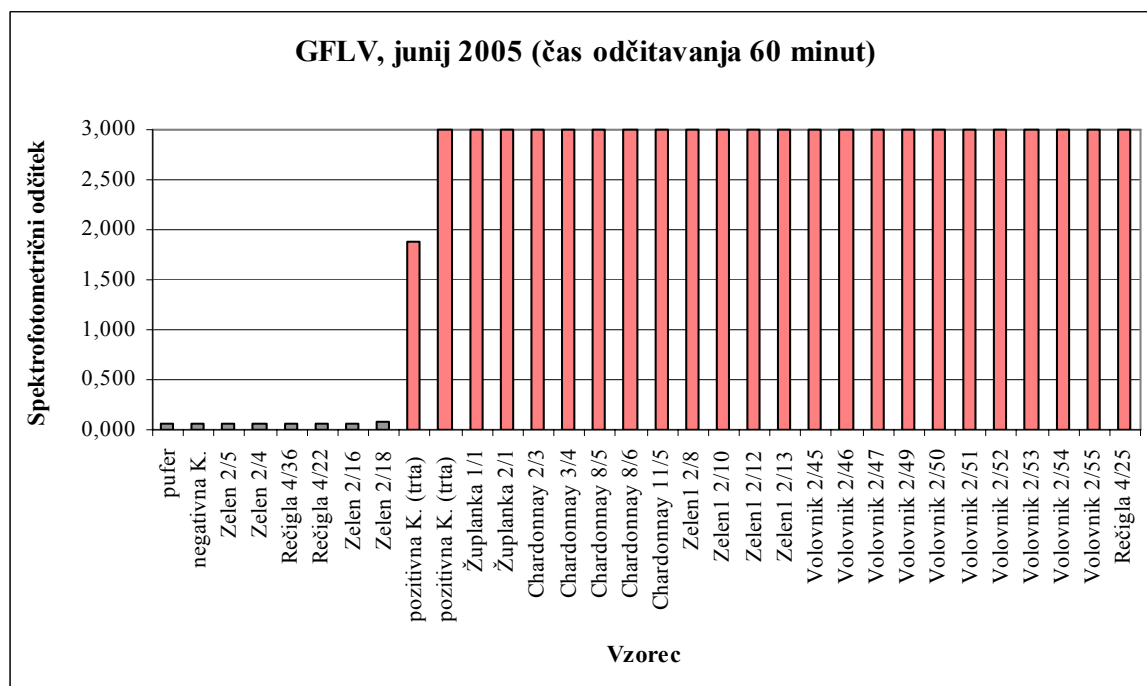
Od skupno 183 testiranih vzorcev na prisotnost 10 virusov smo virus GFLV dokazali pri 142 vzorcih, GFkV pri 77 vzorcih, GLRaV-3 pri 55 vzorcih, GLRaV-1 pri 37 vzorcih, GVA pri 26 vzorcih in GLRaV-2 pri 11 vzorcih (preglednice 1–7). S testom ELISA tako januarja kot junija nismo našli okužb z virusi ArMV, GLRaV-6 in GVB. Glede na to, da sta pri testiranju na prisotnost virusa ArMV obe pozitivni kontroli, tako proizvajalčeva kot tudi predhodno znan pozitiven vzorec iz vinograda (Tomažič, 2002), dali visoke spektrofotometrične vrednosti, ostali vzorci pa so kazali negativne vrednosti, virus verjetno res ni prisoten v testiranih rastlinah. Za virusa GLRaV-6 in GVB smo imeli le pozitivno kontrolo proizvajalca, ki je pri obeh dala visoke spektrofotometrične odčitke, medtem ko so odčitki preostalih vzorcev po eni ali dveh urah ostali nizki. Pri določenih vzorcih so se pri obeh virusih po 18 urah po dodatku substrata vrednosti zelo rahlo povečale, kljub temu pa smo zaključili, da virus ni prisoten v testiranih rastlinah. Pri testiranju prisotnosti virusa RSPaV nismo imeli pozitivne kontrole, smo pa testirali vzorce, pri katerih so predhodno dokazali virus (Tomažič, 2002), ki pa so vključno z ostalimi testiranimi vzorci reagirali negativno. Možno je sicer, da je v vzorcih, v katerih je bil RSPaV potrjen s predhodnimi testi, virus v nezaznavno nizkih koncentracijah. Verjetneje pa specifična poliklonska protitelesa proti virusu RSPaV niso delovala in s testom ELISA na prisotnost RSPaV nismo dobili uporabnih rezultatov. Iz tega razloga smo virus RSPaV izločili iz nadaljne obdelave rezultatov.

Januarja 2005, ko smo na prisotnost GFLV testirali olesenele rozge, so bile spektrofotometrične vrednosti nižje od vrednosti, ki smo jih dobili pri testiranju mladih listov spomladi 2005, vendar še vedno precej nad mejo med negativnimi in pozitivnimi vzorci (sliki 12 in 13). Pri ostalih virusih so bili odčitki pri obeh testiranjih, pozimi in spomladi, primerljivi.

Junija 2005, ko smo za večjo zanesljivost rezultatov s testom ELISA ponovno testirali trse, pri katerih smo opazovali bolezenska znamenja, se je pri 62 od 67 testiranih trsov rezultat ponovil. Pri trsih chardonnay 8/5 iz vinograda v Vrhpolju (preglednica 4) ter refošk 26 6/4, refošk 26 6/6, refošk 55 9/112 in refošk 55 11/108 iz vinograda v Komnu (preglednica 2) smo junija 2005 dokazali prisotnost virusa GFLV, medtem ko je bil januarja rezultat negativen. Pri prvih treh trsih so virus GFLV dokazali tudi junija 2004 (Vojvoda, 2005), trsov refošk 55 9/112 in refošk 55 11/108 pa niso testirali.



Slika 12: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV 60 minut po dodatku substrata v januarju 2005. Pozitivni vzorci so obarvani rdeče, negativni pa sivo. Z oznako +? sta označena vzorca, pri katerih je bila vrednost povišana, vendar relativno nizka.



Slika 13: Grafični prikaz spektrofotometričnih odčitkov testa ELISA za virus GFLV 60 minut po dodatku substrata v juniju 2005. Pozitivni vzorci so obarvani rdeče, negativni pa sivo.

Preglednica 1: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Ložah z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005. Vzorci obarvani s sivo, so bili testirani januarja in junija 2005, nepobarvani pa le januarja 2005. Pozitivni rezultati testa so označeni s +, negativni z –, rezultati pri katerih so bile vrednosti povišane, vendar relativno nizke pa s +? Oznaka / pomeni, da trsa nismo testirali ali pa je odmrli.

SORTA VRSTA/TRS	GFLV		GFkV		ArMV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-6		GVA		GVB	
	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05
Sladkočica 1/1	–	/	+	/	–	/	–	/	+?	/	+	/	–	/	–	/	–	/
Sladkočica 1/3	+	/	+	/	–	/	–	/	+	/	+	/	–	/	–	/	–	/
Sladkočica 1/10	–	/	+	/	–	/	–	/	+?	/	+	/	–	/	–	/	–	/
Zelen1 2/1	+	/	+?	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Zelen1 2/2	–	/	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Zelen1 2/4	–	–	+	+?	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/5	–	–	+	+?	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/6	+	/	+	/	–	/	–	/	–	/	+	/	–	/	–	/	–	/
Zelen1 2/8	+	+	+	+?	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/10	+	+	+	+?	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/12	+	+	+	+?	–	–	–	–	–	–	+	+?	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/13	+	+	+	+?	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/15	+	/	–	/	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/16	–	–	+	+?	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/17	–	/	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Zelen1 2/18	–	–	+	+?	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Zelen1 2/19	–	/	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Zelen1 2/20	+	/	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Zelen2 2/21	–	/	+?	/	–	/	–	/	–	/	+	/	–	/	–	/	–	/
Zelen2 2/22	+	/	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Zelen2 2/23	+	/	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Zelen2 2/25	–	/	+	/	–	/	–	/	–	/	+	/	–	/	–	/	–	/
Volovnik 2/45	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/46	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/47	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/49	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/50	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/51	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/52	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/53	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/54	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/55	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Volovnik 2/57	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Rečigla 4/22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Rečigla 4/25	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Rečigla 4/30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Števerjana 4/31	+	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Števerjana 4/34	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/	–	/
Števerjana 4/35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Števerjana 4/36	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Števerjana 4/37	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

(Se nadaljuje.)

[illegible]

Preglednica 2: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Komnu z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005. Vzorci obarvani s sivo, so bili testirani januarja in junija 2005, nepobarvani pa le januarja 2005. Pozitivni rezultati testa so označeni s +, negativni z –, rezultati pri katerih so bile vrednosti povišane, vendar relativno nizke pa s +?. Oznaka / pomeni, da trsa junija nismo testirali. Z rdečo je označen tisti rezultat, ki se je razlikoval med obema testiranjema

SORTA (ELITA) VRSTA/TRS	GFLV		GFkV		ArMV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-6		GVA		GVB	
	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05
Refošk2 1/36	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk2 1/38	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk2 1/42	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk2 1/44	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk9 2/67	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk9 2/68	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk9 2/70	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk9 2/71	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk9 2/79	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk9 2/80	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk9 2/81	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk9 2/82	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/28	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/29	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/30	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/31	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/32	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/33	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/34	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/35	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/38	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/40	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk17 4/43	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk26 6/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 6/2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 6/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 6/4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 6/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 6/6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 6/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 5/118	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 5/120	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk26 5/122	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk55 9/106	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk55 9/109	+	/	+	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk55 9/110	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Refošk55 9/112	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Refošk55 11/92	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk55 11/94	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk55 11/96	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/

(Se nadaljuje.)

Preglednica 2 (nadaljevanje): Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Komnu z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005. Vzorci, obarvani s sivo, so bili testirani januarja in junija 2005, nepobarvani pa le januarja 2005. Pozitivni rezultati testa so označeni s +, negativni z –, rezultati pri katerih so bile vrednosti povišane vendar relativno nizke, pa s +?. Oznaka / pomeni, da trsa nismo testirali. Z rdečo je označen tisti rezultat, ki se je razlikoval med obema testiranjema

SORTA VRSTA/TRS	GFLV		GFkV		ArMV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-6		GVA		GVB	
	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05
Refošk55 11/101	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk55 11/104	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk55 11/106	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Refošk55 11/108	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Refošk56 11/18	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk56 11/19	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk56 11/20	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk56 11/28	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk72 13/121	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk72 13/122	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk72 13/124	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk72 13/126	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/

Preglednica 3: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Dutovljah z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005. Vzorci, obarvani s sivo, so bili testirani januarja in junija 2005, nepobarvani pa le januarja 2005. Pozitivni rezultati testa so označeni s +, negativni z –, rezultati pri katerih so bile vrednosti povišane vendar relativno nizke, pa s +?.

SORTA VRSTA/TRS	GFLV		GFkV		ArMV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-6		GVA		GVB	
	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05
Refošk 1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk 2/19	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk 3/4	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk 3/13	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refošk 4/3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

[illegible]

Preglednica 5: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Kromberku z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli januarja in junija 2005. Vzorci, obarvani s sivo, so bili testirani januarja in junija 2005, nepobarvani pa le januarja 2005. Pozitivni rezultati testa so označeni s +, negativni z –, rezultati pri katerih so bile vrednosti povišane vendar relativno nizke pa s +?. Oznaka / pomeni, da trsa junija nismo testirali.

SORTA VRSTA/TRS	GFLV		GFkV		ArMV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-6		GVA		GVB	
	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05
Malvazija 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malvazija 2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+?	-	-	-	-	-	-
Malvazija 1/oreh	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+?	-	-	-	-	-	-
Malvazija 2/oreh	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malvazija 3/oreh	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+?	-	-	+?	+?	-	-
Malvazija 4/oreh	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malvazija 5/oreh	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malvazija 7/oreh	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+?	-	-	+?	+?	-	-
Rebula 6/oreh	+	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Rebula 8/oreh	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Sauvignon hiša	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pance precoce 18	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/	+	/	-	/
Pance precoce 19	+	/	+	/	-	/	+	/	+	/	+	/	-	/	+	/	-	/
Pance precoce 21	+	/	+	/	-	/	+	/	-	/	+	/	-	/	+	/	-	/
Pance precoce 22	+	/	+	/	-	/	+	/	-	/	+	/	-	/	+	/	-	/

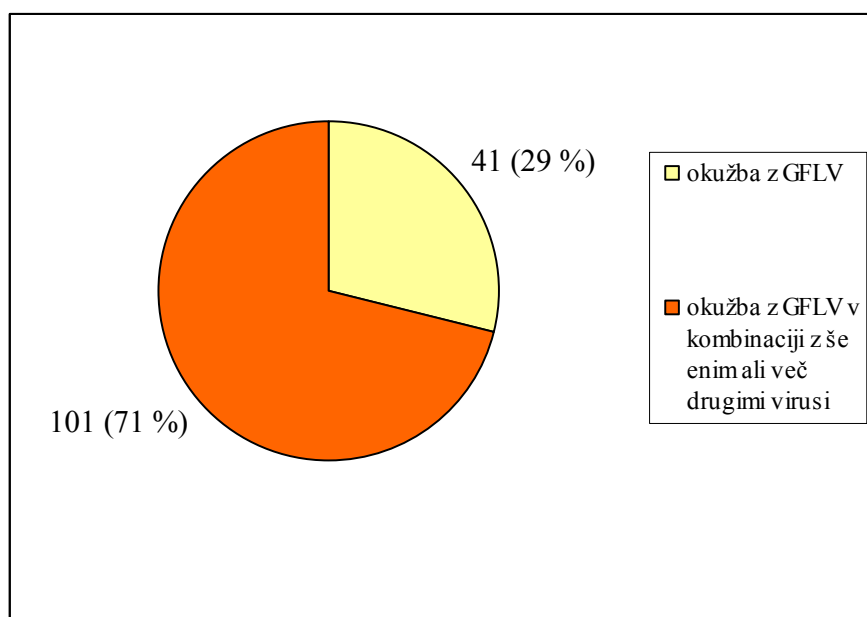
Preglednica 6: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Malinkovcih z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli le januarja 2005. Pozitivni rezultati testa so označeni s +, negativni z –, rezultati pri katerih so bile vrednosti povišane vendar relativno nizke, pa s +?. Oznaka / pomeni, da trsa junija nismo testirali.

SORTA VRSTA/TRS	GFLV		GFkV		ArMV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-6		GVA		GVB	
	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05
Refošk KE 3 10/1	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KE 1 10/2	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KO 1 11/88	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk KO 1 11/92	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KV20 11/10	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KV20 11/12	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KV22 11/21	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KZ 6 11/67	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KZ 10 11/82	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk V 1 11/93	+?	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/
Refošk 11/97	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/

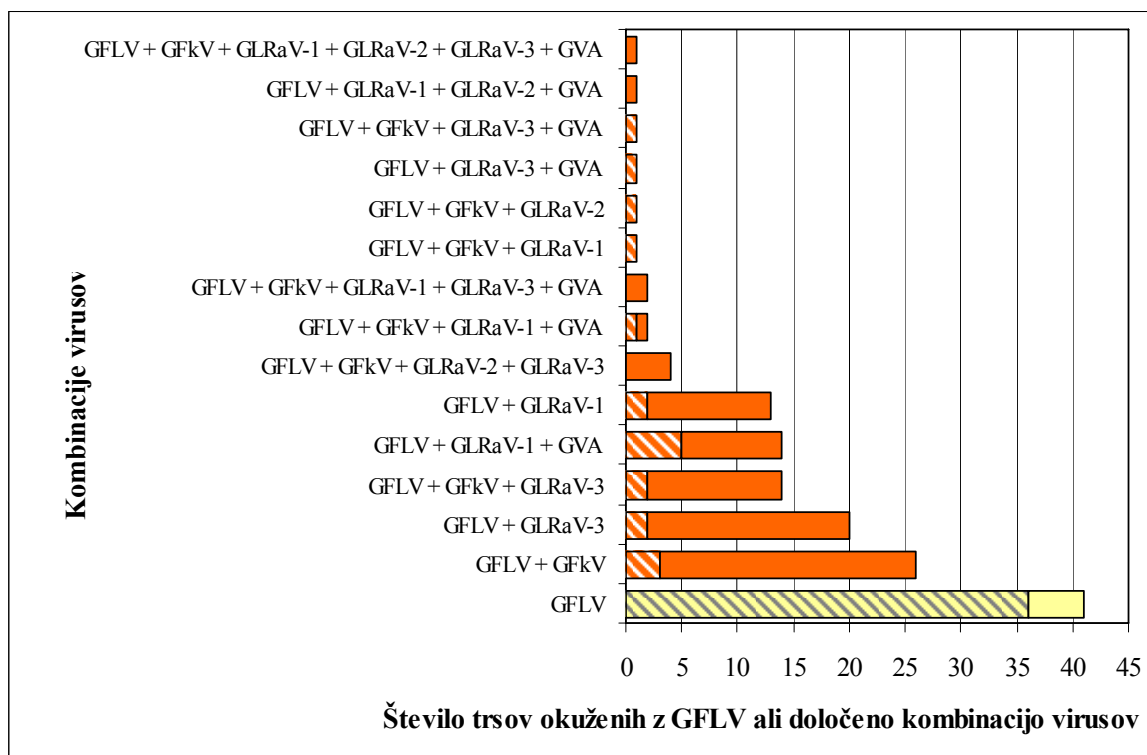
Preglednica 7: Seznam trsov vinske trte iz vinograda v Kromberku z rezultati testa ELISA, ki smo ga izvedli le januarja 2005. Pozitivni rezultati testa so označeni s +, negativni z -, rezultati pri katerih so bile vrednosti povišane vendar relativno nizke, pa s +?. Oznaka / pomeni, da trsa junija nismo testirali.

SORTA VRSTA/TRS	GFLV		GFkV		ArMV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3		GLRaV-6		GVA		GVB	
	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05	JAN 05	JUN 05
Refošk KV 20	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KV 21	+?	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/
Refošk KV 22	+	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/

Izmed 142 trsov, okuženih z GFLV je bilo 41 takih, ki so vsebovali samo GFLV, 101 pa jih je bilo poleg z GFLV okuženih še enim ali več drugimi virusi (slika 14). Med tistimi, ki so poleg GFLV vsebovali še druge viruse, je prevladovala kombinacija virusov GFLV in GFkV (26 trsov) ter GFLV in GLRaV-3 (20 trsov) (slika 15).

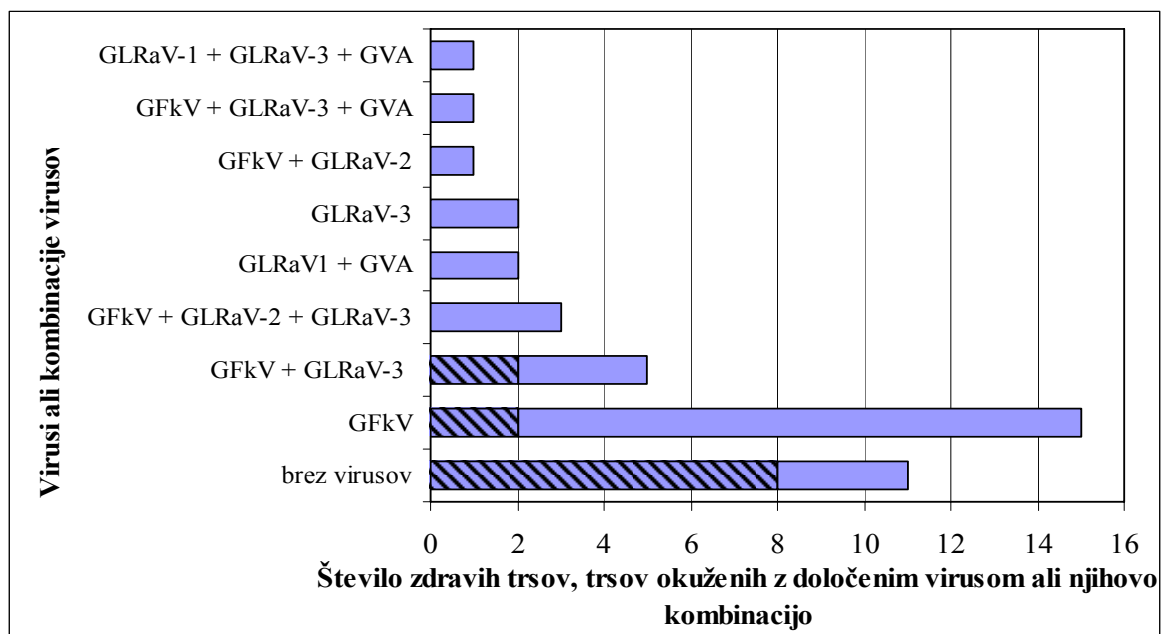


Slika 14: Okuženost testiranih trsov samo z virusom GFLV ali z GFLV in hkrati še drugimi virusi.



Slika 15: Okuženost vseh 101 trsov, ki so bili poleg z GFLV okuženi še z enim ali več različnimi virusi, ter 41 trsov ki so bili okuženi le z GFLV. Črtkano označeno predstavlja število trsov (55), pri katerih smo opazovali bolezenska znamenja

Za negativne kontrole pri opazovanju bolezenskih znamenj smo iskali zdrave trse. Ker je bilo tako zdravih kot okuženih le z GFLV, malo smo opazovali tudi trse z različnimi kombinacijami virusov. Našli smo 11 zdravih trsov in 30 trsov brez GFLV, pač pa okuženih z enim ali več drugimi virusi. Med slednjimi so prevladovali trsi, okuženi le z GFkV. Opazovali smo tako 8 zdravih trsov ter 4 trse brez GFLV, ki so bili okuženi z enim ali dvema drugima virusoma (slika 16).



Slika 16: Prikaz vseh 42 kontrolnih rastlin, ki so bile bodisi zdrave ali pa okužene z drugimi virusi in ne z GFLV. Črtkano označeno predstavlja število trsov (12), katere smo opazovali v okviru popisovanja bolezenskih znamenj.

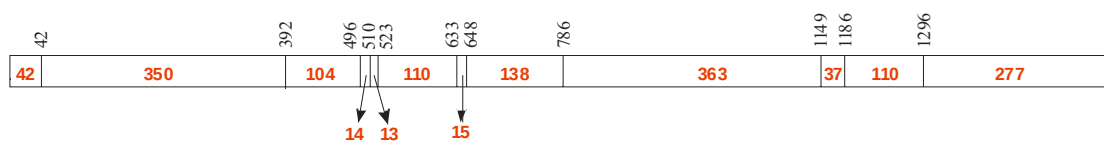
4.2 RESTRIKCIJSKI TIPI GENA 2C PO REZANJU Z ENCIMOMA STYI IN ECORI

Pri simulaciji rezanja gena 2C z encimom StyI smo iz baze podatkov na spletu dobili več kot 25 različnih restrikcijskih tipov. Pri nekaterih izmed njih so se določeni fragmenti med seboj razlikovali le za nekaj baznih parov. Če poleg tega upoštevamo še možen pojav novih restrikcijskih mest in možne rekombinacije pri RNA virusih je pri genu 2C po rezanju z encimom StyI mogoče res veliko število restrikcijskih tipov. Zaradi omenjenih razlogov smo restrikcijska mesta rezanja z encimom StyI ter tudi EcoRI natančno določili le za 11 vzorcev sorte volovnik. Pri teh smo si namreč za določitev velikosti fragmentov na elektroforetskih gelih pomagali tudi z dobljenimi nukleotidnimi zaporedji (glej 4.4).

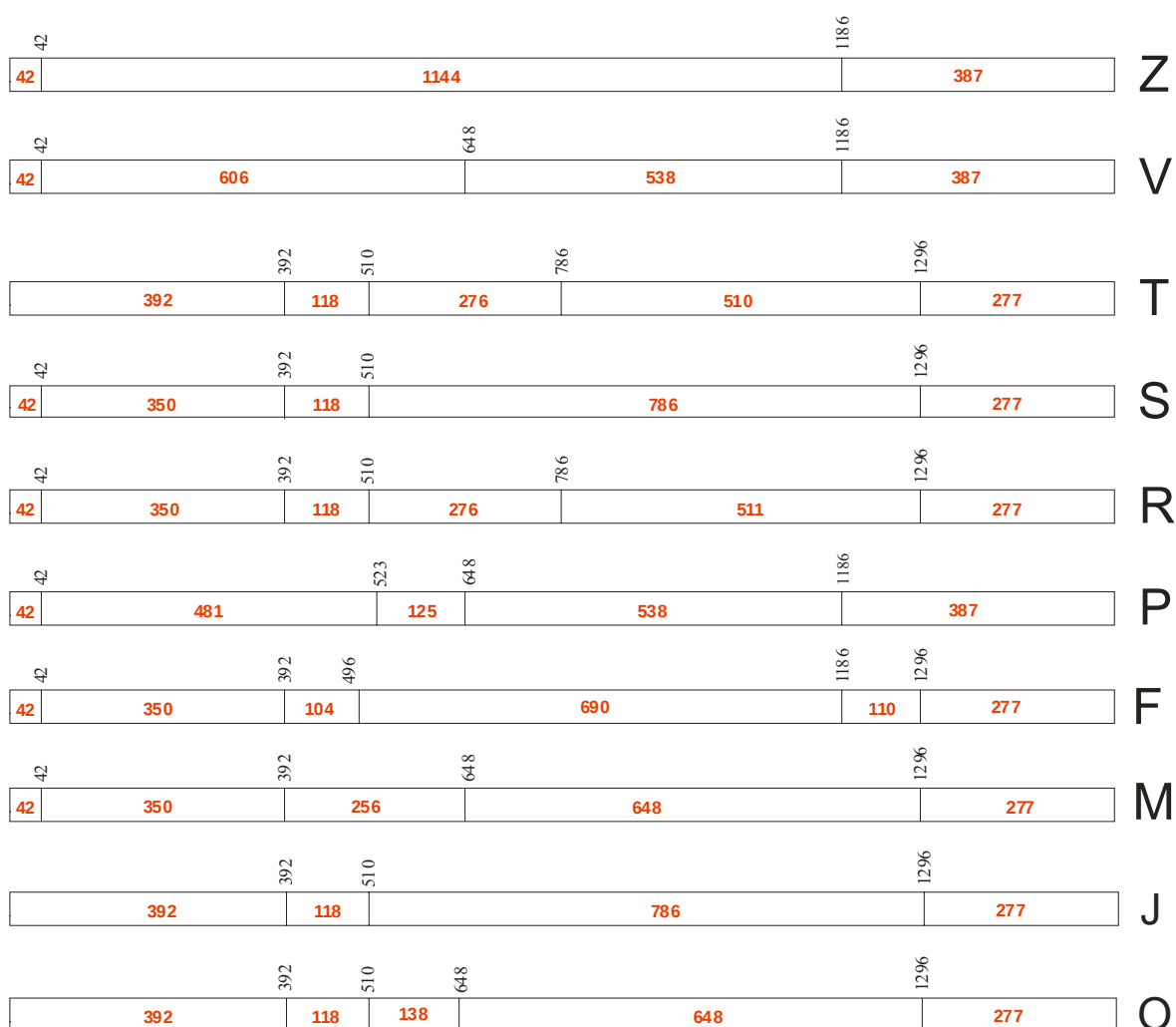
Pri sorti volovnik smo tako po rezanju gena 2C z encimom StyI ugotovili 9 različnih restrikcijskih tipov, ki smo jih označili s črkami J, M, O, P, R, S, T, V in Z. Zadnjih šest od naštetih smo potrdili z nukleotidnimi zaporedji, ostale tri smo dodatno določili iz elektroforetskih gelov. Restrikcijski tip referenčnega vzorca, gena 2C genotipske variante F13 virusa GFLV, z znanim nukleotidnim zaporedjem smo po rezanju z encimom StyI označili z oznako F (slika 17).

Po rezanju gena 2C z encimom EcoRI je vseh 11 vzorcev sorte volovnik ostalo nerazrezanih (oznaka N). Restrikcijski tip referenčnega vzorca F13, po rezanju z encimom EcoRI smo označili z oznako F (slika 18).

Vsa dozdej znana restrikcijska mesta po rezanju 2C s Styl

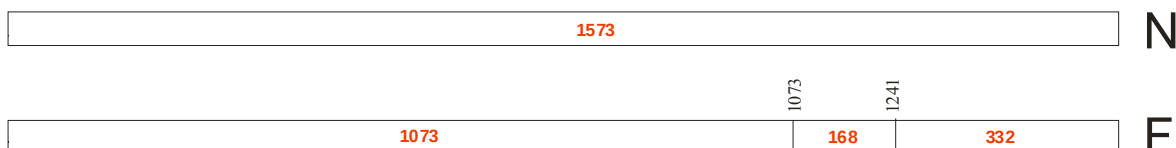


Restrikcijski tipi po rezanju 2C s Styl



Slika 17: Shematski prikaz restrikcijskih tipov pri rezanju gena 2C z encimom StylI. Leva stran sheme ustreza 5' koncu, desna pa 3' koncu pomnoženega fragmenta, ki vsebuje zapis gena 2C (sheme so orientirane v smeri 5' → 3'). Pokončne številke na okvirjih predstavljajo restrikcijska mesta, izražena s številom baznih parov, ki ločijo restrikcijsko mesto od 5' konca pomnoženega fragmenta. Številke znotraj okvirjev označujejo velikost fragmentov, izraženo v baznih parih. Na desni strani okvirjev so oznake restrikcijskih tipov.

Restriksijski tipi po rezanju 2C z EcoRI



Slika 18: Shematski prikaz restriksijskih tipov pri rezanju gena 2C z encimom EcoRI. Leva stran sheme ustreza 5' koncu, desna pa 3' koncu pomnoženega fragmenta, ki vsebuje zapis gena 2C (sheme so orientirane v smeri 5' → 3'). Pokončne številke na okvirjih predstavljajo restriksijska mesta, izražena s številom baznih parov, ki ločijo restriksijsko mesto od 5' konca pomnoženega fragmenta. Številke znotraj okvirjev označujejo velikost fragmentov, izraženo v baznih parih. Na desni strani okvirjev so oznake restriksijskih tipov.

Preglednica 8: Velikosti restriksijskih fragmentov in restriksijski tipi pri vzorcih sorte volovnik iz vinograda v Ložah po rezanju gena 2C z encimoma StyI in EcoRI. Velikosti fragmentov so izražene v baznih parih (bp).

Vzorec	Restriksijski fragmenti – StyI (bp)	Restriksijski tip – StyI	Restriksijski fragmenti – EcoRI (bp)	Restriksijski tip – EcoRI
Volovnik 2/45	1144, 511, 392, 387, 277, 118, 42	T, Z	1573	N
Volovnik 2/46	606, 538, 511, 392, 387, 277, 118, 42	V, T	1573	N
Volovnik 2/47	648, 606, 538, 511, 392, 387, 277, 138, 118, 42	O, T, V	1573	N
Volovnik 2/49	1144, 786, 606, 538, 511, 392, 387, 277, 118, 42	J, T, V, Z	1573	N
Volovnik 2/50	606, 538, 511, 392, 387, 277, 118, 42	T, V	1573	N
Volovnik 2/51	606, 538, 511, 392, 387, 277, 118, 42	T, V	1573	N
Volovnik 2/52	511, 392, 277, 118	T	1573	N
Volovnik 2/53	511, 392, 277, 118	T	1573	N
Volovnik 2/54	786, 606, 538, 387, 350, 277, 118, 42	S, V	1573	N
Volovnik 2/55	786, 648, 606, 538, 511, 392, 387, 350, 277, 256, 118, 42	J, M, T, V	1573	N
Volovnik 2/57	606, 538, 511, 481, 387, 350, 277, 125, 118, 42	P, R, V	1573	N
Referenčni vzorec F13	690, 350, 277, 110, 104, 42	F	1073, 332, 168	F

Pri večini vzorcev (9 od 11) smo potrdili mešane okužbe z več restriksijskimi tipi virusa GFLV, le pri dveh vzorcih samo en restriksijski tip. Na splošno sta pri restrikciji gena 2C s StyI prevladovala restriksijski tip T (pri 9 vzorcih od 11) ter tip V (pri 8 vzorcih od 11) (preglednica 8).

4.3 POPISOVANJE BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN FENOFAZ

Opazovali smo 28 bolezenskih znamenj na 67 izbranih trsih različnih sort vinske trte v petih vinogradih (preglednice 10, 12, 14, 16, 18).

Večino bolezenskih znamenj – ne pa vseh – smo na trsih opazovali tudi v rastni sezoni 2004 (Vojvoda, osebna komunikacija). Bolezenska znamenja so se večinoma ujemala v obeh rastnih sezonah, po pričakovanjih pa je prišlo tudi do manjših odstopanj med znamenji pri posameznih trsih.

Pri opazovanju fenofaz razlik med posameznimi trsi iste sorte nismo zaznali. Na določen datum smo opazili odstopanja med fenofazami le med različnimi sortami vinske trte (preglednice 9, 11, 13, 15, 17).

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 9: Vzorci vinske trte iz vinograda v Ložah z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami, popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A). Oznaka / pomeni, da za določen gen ni natančno obdelanih restrikcijskih tipov, prazno polje, da vzorec ni vseboval GFLV, oznaka / pri fenofazah pa označuje, da je trs odmrli.

Sorta vrsta/trs	VIRUSI (ELISA 2005)	GFLV						FENOFAZE, Datum				
		Gen 2A		Gen 2B		Gen 2C		20.4.2005	27.5.2005	1.7.2005	29.8.2005	15.9.2005
		Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI					
Zelen1 2/4	GFkV, GLRaV3	/	/	/	/	/	/	5	15–17	32	35–38	38
Zelen1 2/5	GFkV, GLRaV3	/	/	/	/	/	/	2–5	15–17	32	35–38	38
Zelen1 2/8	GFLV, GFkV	B	N	A	N	/	/	5–7	15–17	32	35–38	38
Zelen1 2/10	GFLV, GFkV, GLRaV3	N,J	N	B,F	N,A	/	/	3	15–17	32	35–38	38
Zelen1 2/12	GFLV, GFkV, GLRaV3	N,A,K	N	B,F	N,A	/	/	5–7	15–17	32	35–38	38
Zelen1 2/13	GFLV, GFkV	B	N	A	N	/	/	5–7	15–17	32	35–38	/
Zelen1 2/15	GFLV	N	N	B,F	N	/	/	1	/	/	/	/
Zelen1 2/16	GFkV	/	/	/	/	/	/	7	15–17	32	35–38	38
Zelen1 2/18	GFkV	/	/	/	/	/	/	7	15–17	32	35–38	38
Volovnik 2/45	GFLV	B,H,I	N,A	A	N	T,Z	N	2	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/46	GFLV	B,H,I	N,A	A	N	T,V	N	2–3	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/47	GFLV	B,I,N	N,A	A	N	O,T,V	N	2–3	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/49	GFLV	H,I	N,A	A	N	J,T,V,Z	N	2–3	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/50	GFLV	H,I	N,A	A	N	T,V	N	2	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/51	GFLV	B,H	N,A	A	N	T,V	N	2	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/52	GFLV	H	N	A	N	T	N	2	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/53	GFLV	H	N	A	N	T	N	2–3	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/54	GFLV	B,H,I	N,A	A	N	S,V	N	3	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/55	GFLV	B,N,H	N,A	A	N,A	J,M,T,V	N	2–3	15–17	31	35–38	38
Volovnik 2/57	GFLV	B,H	A	A	N	P,R,V	N	/	/	/	/	/
Rečigla 4/22		/	/	/	/	/	/	5–7	17	31	35–38	38
Rečigla 4/25	GFLV	N	N	B,F	N	/	/	5–7	17	32	35–38	38
Rečigla 4/30		/	/	/	/	/	/	7	17	32	35–38	38
Števerjana 4/35		/	/	/	/	/	/	9	17	31	35–38	38

(Se nadaljuje.)

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 9 (nadaljevanje): Vzorci vinske trte iz vinograda v Ložah z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A). Oznaka / pomeni, da za določen gen ni natančno obdelanih restrikcijskih tipov, prazno polje, da vzorec ni vseboval GFLV, oznaka / pri fenofazah pa označuje, da je trs odmrli.

Sorta vrsta/trs	VIRUSI (ELISA 2005)	GFLV						FENOFAZE, Datum				
		Gen 2A		Gen 2B		Gen 2C		20.4.2005	27.5.2005	1.7.2005	29.8.2005	15.9.2005
		Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI					
Števerjana 4/36	GFLV	/	/	/	/	/	/	7	17	31	35–38	38
Števerjana 4/37	GFLV	A	N	A	N	/	/	9	17	31	35–38	38
Števerjana 4/38	GFLV	A	N	A	N	/	/	5	17	31	35–38	38
Števerjana 4/40	GFLV	/	/	/	/	/	/	5–7	15–17	31	35–38	38
Cividin 5/51	GFLV	E	N	D,E	N	/	/	5	15–17	32	35–38	38
Cividin 5/52	GFLV	E	N	D,E	N	/	/	2–5	15–17	32	35–38	38
Cividin 5/53	GFLV	E	N	D,E	N	/	/	5–7	15–17	32	35–38	38
Cividin 5/56	GFLV	B,E,H,I,N	N	B,D,E	N	/	/	3	15–17	32	35–38	38
Cividin 5/57	GFLV	B,E,H,I	N	D,E	N	/	/	5–7	15–17	32	35–38	38

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 10: Vzorci vinske trte iz vinograda v Ložah z bolezenskimi znamenji, vidnimi v rastni sezoni 2005. Prisotnost bolezenskega znamenja smo označili s +.

Sorta vrsta/trs	LISTI										POGANJKI							STEBLO	GROZDI					TRS				
	Pahljačaasti listi	Nesimetrični listi	Peteršiljasti listi	Kloroze žil (rumene žile)	Kloroze medžilnih prostorov v obliki			Rumenenje listov	Nagubani listi, zvijanje listov	Rdečenje listov	Bifurkacija na členku (viličasta rast)	Bifurkacija na medčlenku	Kratki medčlenki	Dvojni členki (nasproti ležeče oko)	Zraslost pogankov	Ploščata stebila	Cik-cak rast	Metlasta rast	Razbrazdanje stebila podlage	Razbrazdanje stebila žlahtnega dela	Majhne jagode	Majhni grozdi	Osipavanje jagod	Redkejši grozdi	Ni pridelka	Manjši listi	Gosti listi	Grmast videz trsa
					Rumenih pik	Obročev	Lis																					
Zelen1 2/4																												
Zelen1 2/5																												
Zelen1 2/8									+				+															
Zelen1 2/10									+																			+
Zelen1 2/12					+								+															
Zelen1 2/13					+								+												+			
Zelen1 2/16							+		+				+															
Zelen1 2/18											+		+											+				
Volovnik 2/45		+					+				+		+	+		+	+											
Volovnik 2/46					+						+		+			+												
Volovnik 2/47		+									+		+	+		+		+						+				
Volovnik 2/49		+			+						+		+	+		+		+										
Volovnik 2/50		+									+		+			+		+										
Volovnik 2/51		+									+		+	+	+	+		+										
Volovnik 2/52		+									+		+	+		+		+							+			
Volovnik 2/53													+			+		+										
Volovnik 2/54													+			+		+						+				
Volovnik 2/55		+									+		+			+		+							+	+		
Rečigla 4/22													+															
Rečigla 4/25													+															
Rečigla 4/30																												

(Se nadaljuje.)

[illegible]

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 11: Vzorci vinske trte iz vinograda v Komnu z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A). Oznaka / pomeni, da za določen gen ni natančno obdelanih restrikcijskih tipov, prazno polje pa, da vzorec ni vseboval GFLV.

Sorta (elita) vrsta/trs	VIRUSI (ELISA 2005)	GFLV						FENOFAZE, Datum				
		Gen 2A		Gen 2B		Gen 2C		20.4.2005	27.5.2005	1.7.2005	29.8.2005	20.9.2005
		Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI					
Refošk9 2/71	GFLV	C	N	A	N	/	/	2	15	31	35–38	38
Refošk26 6/1		/	/	/	/	/	/	2–3	15	31	35–38	38
Refošk26 6/2	GFLV	C	N	A	N	/	/	2–3	15	32	35–38	38
Refošk26 6/3		/	/	/	/	/	/	3	15	32	35–38	38
Refošk26 6/4	GFLV	C	N	A	N	/	/	3	15	32	35–38	38
Refošk26 6/5		/	/	/	/	/	/	3	15	32	35–38	38
Refošk26 6/6	GFLV	C	N	A	N	/	/	3	15	32	35–38	38
Refošk26 6/7		/	/	/	/	/	/	3	15	32	35–38	38
Refošk26 5/118	GFLV	/	/	/	/	/	/	2	15–17	32	35–38	38
Refošk26 5/120	GFLV	C	N	A	N	/	/	2	15–17	32	35–38	38
Refošk26 5/122	GFLV	/	/	/	/	/	/	2	15–17	31	35–38	38
Refošk55 9/110	GFLV, GLRaV1, GVA	C	N	A	N	/	/	2–3	15–17	31	35–38	38
Refošk55 9/112	GFLV, GLRaV1, GVA	/	/	/	/	/	/	3	15–17	31	35–38	38
Refošk55 11/106	GFLV, GLRaV1, GVA	C	N	A	N	/	/	3–5	15–17	31	35–38	38
Refošk55 11/108	GFLV, GLRaV1, GVA	/	/	/	/	/	/	3	15–17	31	35–38	38

[illegible]

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 13: Vzorci vinske trte iz vinograda v Dutovljah z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A). Oznaka / pomeni, da za določen gen ni natančno obdelanih restrikcijskih tipov, prazno polje pa, da vzorec ni vseboval GFLV.

Sorta vrsta/trs	VIRUSI (ELISA 2005)	GFLV						FENOFAZE, Datum				
		Gen 2A		Gen 2B		Gen 2C		20.4.2005	27.5.2005	1.7.2005	29.8.2005	20.9.2005
		Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI					
Refošk 1/1		/	/	/	/	/	/	2	15–17	31	35–38	38
Refošk 2/19	GFLV	C	N	A	N	/	/	2–3	15–17	31	35–38	38
Refošk 3/4	GFLV, GLRaV1	I	N	A	N	/	/	2–3	15–17	31	35–38	38
Refošk 3/13	GFLV	N	N	A	N	/	/	2–3	15–17	31	35–38	38
Refošk 4/3	GFLV, GFKV, GLRaV2	C,E	N	A	N	/	/	2–3	15–17	31	35–38	38

Preglednica 14: Vzorci vinske trte iz vinograda v Dutovljah z bolezenskimi znamenji, vidnimi v rastni sezoni 2005. Prisotnost bolezenskega znamenja smo označili s +.

Sorta vrsta/trs	LISTI									POGANJKI						STEBLO	GROZDI				TRS								
	Pahljačasti listi	Nesimetrični listi	Peteršiljasti listi	Kloroze žil (rumene žile)	Rumenih pik	Obročev	Lis	Rumenenje listov	Nagubani listi, zvijanje listov	Rdečenje listov	Bifurkacija na členku (viličasta rast)	Bifurkacija na medčlenku	Kratki medčlenki	Dvojni členki (nasproti ležeče oko)	Zraslost poganjkov	Ploščata stebila	Cik-cak rast	Metlasta rast	Razbrazdanje stebila podlage	Razbrazdanje stebila žlahtnega dela	Majhne jagode	Majhni grozdi	Osipavanje jagod	Redkejši grozdi	Ni pridelka	Manjši listi	Gosti listi	Grmast videz trsa	
Refošk 1/1																													
Refošk 2/19																													
Refošk 3/4				+	+			+															+	+					
Refošk 3/13				+	+																		+	+					
Refošk 4/3					+		+	+														+	+	+					

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 15: Vzorci vinske trte iz vinograda v Vrhopolju z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A). Oznaka / pomeni, da za gen 2C ni natančno obdelanih restrikcijskih tipov.

Sorta vrsta/trs	VIRUSI (ELISA 2005)	GFLV						FENOFAZE, Datum				
		Gen 2A		Gen 2B		Gen 2C						
		Restriksijski tip – StyI	Restriksijski tip – EcoRI	Restriksijski tip – StyI	Restriksijski tip – EcoRI	Restriksijski tip – StyI	Restriksijski tip – EcoRI	20.4.2005	27.5.2005	1.7.2005	29.8.2005	15.9.2005
Župlanka 1/1	GFLV	N,C,P	N,B	A,B,C,N	N	/	/	3–5	16	32	35–38	38
Župlanka 2/1	GFLV, GLRaV1	C,P	N,B	B,E,N	N	/	/	2–3	15	32	35–38	38
Chardonnay 2/3	GFLV, GFkV, GLRaV1, GVA	A	N	N	N	/	/	5–7	18	32	35–38	38
Chardonnay 3/4	GFLV	A	N,A	N	N	/	/	5	17	32	35–38	38
Chardonnay 8/5	GFLV, GFkV, GLRaV1	N	N,A	A	N	/	/	5–7	18	32	35–38	38
Chardonnay 8/6	GFLV, GLRaV1, GVA	N,A	N,A	A,B	N	/	/	3–7	17	32	35–38	38
Chardonnay 11/5	GFLV, GFkV	N,A	N,A	A,B,E	N	/	/	3–5	18	32	35–38	38

Preglednica 16: Vzorci vinske trte iz vinograda v Vrhopolju z bolezenskimi znamenji, vidnimi v sezoni 2005. Prisotnost bolezenskega znamenja smo označili s +.

Sorta vrsta/trs	LISTI										POGANJKI										STEBLO	GROZDI					TRS	
	Pahljačasti listi	Nesimetrični listi	Petersilijasti listi	Kloroze žil (rumene žile)	Kloroze medžilnih prostorov v obliki			Rumenenje listov	Nagubani listi, zvijanje listov	Rdečenje listov	Bifurkacija na členku (viličasta rast)	Bifurkacija na medčlenku	Kratki medčlenki	Dvojni členki (nasproti ležeče oko)	Zraslost pogankov	Ploščata stebila	Čik-cak rast	Metlasta rast	Razbrazdanje stebila podlage	Razbrazdanje stebila žlahnega dela	Majhne jagode	Majhni grozdi	Osipavanje jagod	Redkejši grozdi	Ni pridelka	Manjši listi	Gosti listi	Grmast videz trsa
					Rumenih pik	Obročev	Lis																					
Župlanka 1/1	+		+		+						+		+	+					+						+	+	+	+
Župlanka 2/1	+		+				+	+	+				+	+			+		+			+			+	+	+	+
Chardonnay 2/3			+						+				+						+			+			+	+	+	
Chardonnay 3/4							+	+					+	+					+									
Chardonnay 8/5	+	+	+		+				+				+	+			+	+	+	+						+	+	+
Chardonnay 8/6							+	+	+				+				+		+		+					+	+	
Chardonnay 11/5	+	+	+								+		+	+			+	+				+	+	+		+	+	+

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 17: Vzorci vinske trte iz vinograda v Kromberku z virusi, dokazanimi s testom ELISA, restrikcijskimi tipi treh genov virusa GFLV po rezanju z encimoma StyI in EcoRI (Vojvoda, 2005) ter fenofazami popisanimi na določen datum po sistemu, ki sta ga razvila Eichorn in Lorenz (Priloga A). Oznaka / pomeni, da za določen gen ni natančno obdelanih restrikcijskih tipov.

Sorta vrsta/trs	VIRUSI (ELISA 2005)	GFLV						FENOFAZE, Datum			
		Gen 2A		Gen 2B		Gen 2C					
		Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip– EcoRI	Restrikcijski tip – StyI	Restrikcijski tip – EcoRI	20.4.2005	27.5.2005	1.7.2005	15.9.2005
Malvazija 1	GFLV	A,O	N,B	B,N	N	/	/	1	15	32	38
Malvazija 2	GFLV, GLRaV3	/	/	/	/	/	/	1	15	32	38
Malvazija 1/orah	GFLV, GLRaV3	C	N,A	A	N,B	/	/	1–2	15	31	38
Malvazija 2/orah	GFLV	B	N,A	A	N,B	/	/	1–2	15	31	38
Malvazija 3/orah	GFLV, GFkV, GLRaV3, GVA	E	N,A	C	N	/	/	1–2	15	31	38
Malvazija 4/orah	GFLV	H,I	N,A	A,B,N	N	/	/	1–2	15	31	38
Malvazija 5/orah	GFLV	N,C,I	N,A	A,B,E,N	N	/	/	1–2	15	31	38
Malvazija 7/orah	GFLV, GLRaV3, GVA	N,A	N,A,B	B,E,N	N	/	/	1–2	15	31	38
Sauvignon hiša	GFLV	N,C	N,A,B	E,N	N	/	/	2	15	31	38

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 18: Vzorci vinske trte iz vinograda v Kromberku z bolezenskimi znamenji, vidnimi v rastni sezoni 2005. Prisotnost bolezenskega znamenja smo označili s +.

Sorta vrsta/trs	LISTI									POGANJKI							STEBLO	GROZDI				TRS							
	Pahljačasti listi	Nesimetrični listi	Peteršiljasti listi	Kloroze žil (rumene žile)	Rumenih pik	Obročev	Lis	Rumenenje listov	Nagubani listi, zvijanje listov	Rdečenje listov	Bifurkacija na členku (viličasta rast)	Bifurkacija na medčlenku	Kratki medčlenki	Dvojni členki (nasproti ležeče oko)	Zraslost poganjkov	Ploščata stebila	Cik-cak rast	Metlasta rast	Razbrazdanje stebila podlage	Razbrazdanje stebila žlahtnega dela	Majhne jagode	Majhni grozdi	Osipavanje jagod	Redkejši grozdi	Ni pridelka	Manjši listi	Gosti listi	Grmast videz trsa	
Malvazija 1		+					+				+		+	+															
Malvazija 2		+					+				+		+	+								+		+					
Malvazija 1/oreh							+				+		+										+			+			
Malvazija 2/oreh							+						+											+					
Malvazija 3/oreh			+				+						+												+				
Malvazija 4/oreh							+				+		+										+						
Malvazija 5/oreh							+				+		+	+									+						
Malvazija 7/oreh			+				+						+	+											+				
Sauvignon hiša													+										+	+					

Izmed 28 bolezenskih znamenj, ki smo jih opazovali na izbranih trsih, v letu 2005 nismo zaznali rumenenj medžilnih prostorov v obliki obročev ali krogov ter bifurkacij na medčlenku.

Pri 4 od 8 zdravih trsov smo proti pričakovanjem zasledili tudi značilnosti, ki so podobne bolezenskim znamenjem. Na zdravih trsih sorte Refošk smo opazili osipanje jagod, na trsu sorte Rečigla pa tudi kratke medčlenke.

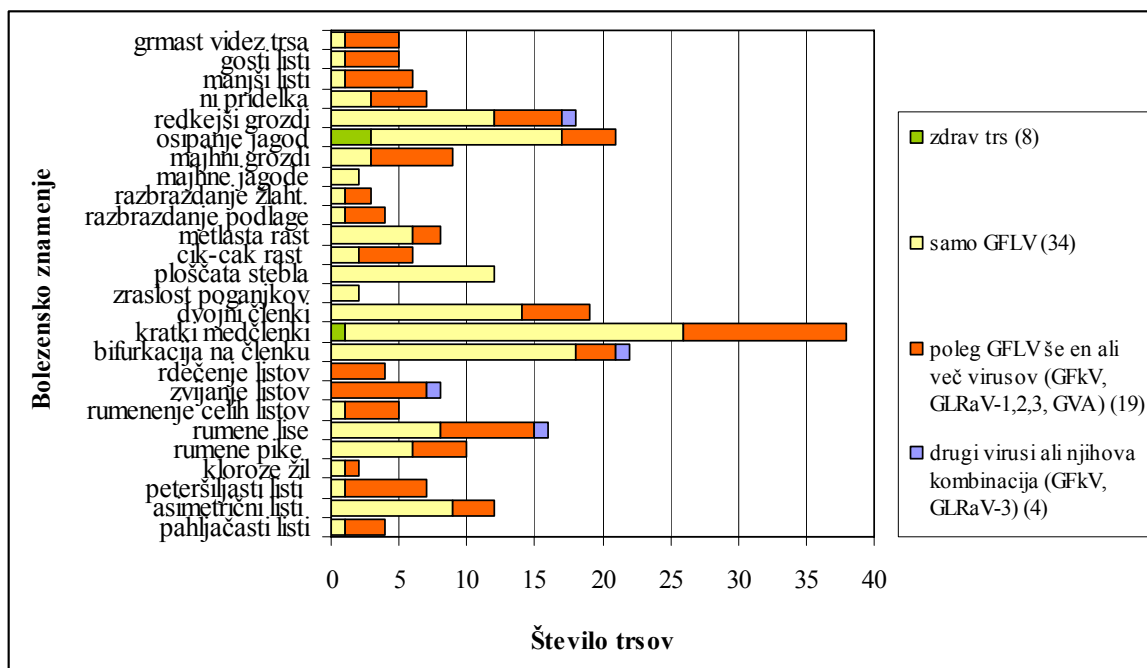
Kombinacija virusov GFkV in GLRaV-3, s katero sta bila okužena dva trsa ni povzročila nobenih bolezenskih znamenj na sorti zelen.

Večino bolezenskih znamenj kot so pahljačasti listi (slika 20), asimetrični listi, peteršiljasti listi (slika 20), rumenenje medžilnih prostorov v obliki rumenih pik (slika 21) ali lis, rumenenje celotne površine listov (slika 21), dvojni členki (slika 22), cikcakasta rast (slika 22), razbrazdanje podlage ali žlahtnega dela trte (slika 23), majhni grozdi, odsotnost pridelka, manjši listi, gosti listi in grmast videz trsa (slika 23) ter metlasto rast poganjkov (slika 24) smo zaznali pri trsih, ki so bodisi vsebovali samo GFLV ali pa so poleg GFLV vsebovali še en ali več drugih virusov (slika 19). Tudi redkejši grozdi, bifurkacije na členkih (slika 24) in rumene lise medžilnih prostorov so bila pogosto vidna bolezenska znamenja tako pri trsih, ki so bili okuženi samo z GFLV, kot tudi pri trsih, ki so bili poleg z GFLV okuženi še z drugimi virusi, našli smo jih pa tudi pri trsu, ki je vseboval samo virus GFkV (slika 19).

Ploščata stebila (slika 24), zraslost poganjkov in majhne jagode smo opazili le na trsih, ki so bili okuženi le z virusom GFLV (slika 19).

Znamenji, ki sta se kot večina ostalih pojavili na trsih okuženih z GFLV in pri trsih z mešanico virusov, med katerimi je bil tudi GFLV, ter poleg tega pri manjšem številu zdravih rastlin, sta bili osipanje jagod (slika 25) in kratki medčlenki (slika 25). Krajšanje medčlenkov je bilo nasploh najpogostejše vidno bolezensko znamenje v rastni sezoni 2005 (slika 19).

Med trsi, ki so kazali znamenja rdečenja in/ali zvijanja listov (slika 26), ni bilo takih, ki bi bili okuženi samo z GFLV, temveč so poleg GFLV vsebovali tudi druge viruse. Poleg tega je bilo zvijanje listov opazno tudi pri trsu, ki je bil okužen samo z GFkV (slika 19). Trsi z rdečenjem listov so vsi vsebovali kombinacijo virusov GFLV, GLRaV-1 in GVA.



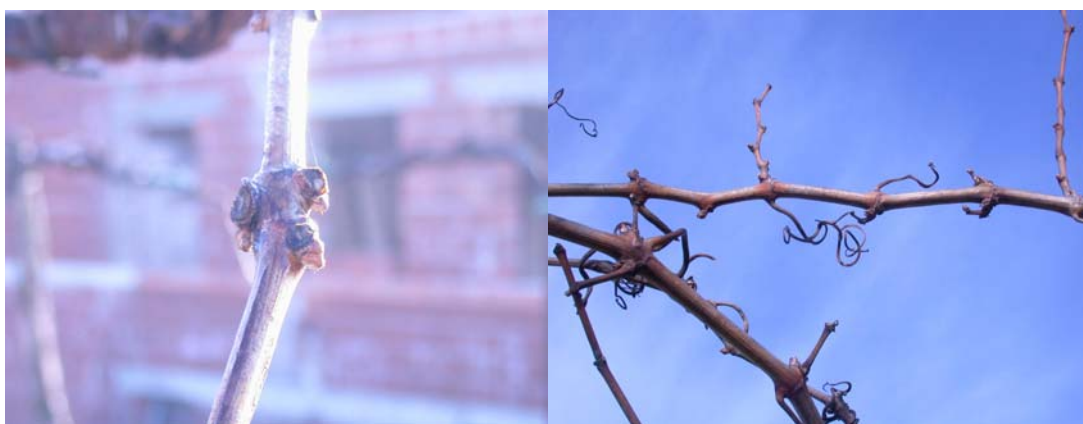
Slika 19: Grafični prikaz števila trsov, ki so izražali določena bolezenska znamenja in so bili zdravi, okuženi le z GFLV, ali poleg z GFLV še z enim ali več drugimi virusi, ali pa so vsebovali druge viruse, kot GFkV ali kombinacijo GFkV in GLRaV-3. Številke v oklepaju v legendi predstavljajo absolutno število opazovanih trsov.



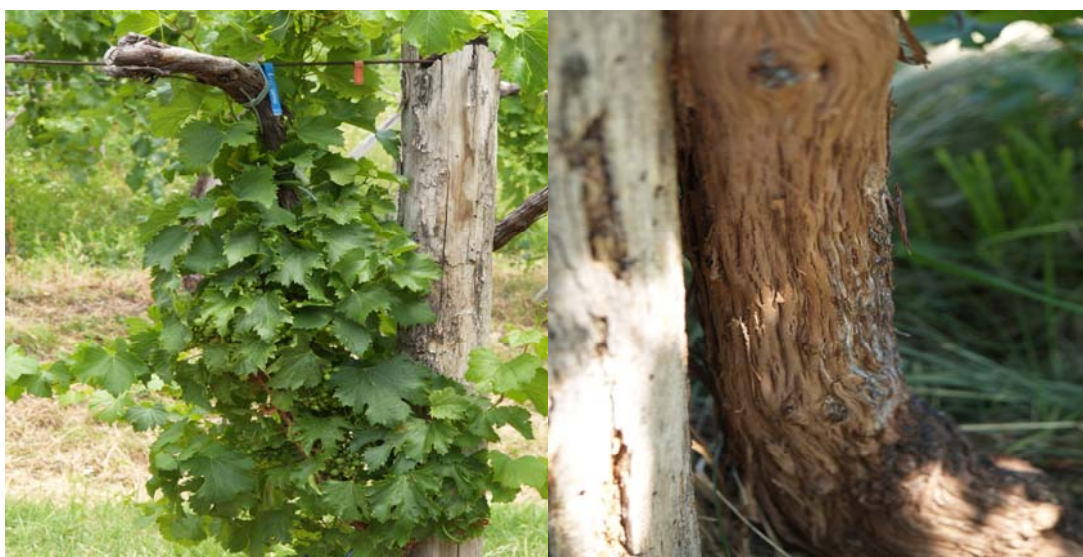
Slika 20: Bolezenska znamenja na listih vinske trte. Levo – gosti deformirani in petersiljasti listi, desno – pahljačast list



Slika 21: Bolezenska znamenja v obliki rumenenja listov vinske trte. Levo – rumenenje medžilnih prostorov v obliki pik, desno – rumenenje celotnih listov



Slika 22: Bolezenska znamenja na pogankih vinske trte. Levo – dvojna očesa, desno – cik cak rast



Slika 23: Bolezenska znamenja na pogankih in lesu vinske trte. Levo – zbitost pogankov oziroma grmast videz trsa, desno – razbrazdanje stebela žlahtnega dela



Slika 24: Bolezenska znamenja na stebli in poganjkih vinske trte. Levo – metlasta rast poganjkov, desno – ploščato steblo in bifurkacija ne členku



Slika 25: Bolezenska znamenja na poganjkih in grozdih vinske trte. Levo – krajšanje medčlenkov, na sredini – močno osipanje jagod, desno – normalno razvit grozd



Slika 26: Bolezenska znamenja v obliki zvijanja in rdečenja listov vinske trte. Levo – zvijanje listov, desno – rdečenje listov

4.3.1 Različne sorte vinske trte in bolezenska znamenja

Bolezenska znamenja smo opazovali pri 10 različnih sortah vinske trte in sicer na 9 belih sortah (zelen, volovnik, cividin, števerjana, rečigla, malvazija, sauvignon, chardonnay in župlanka) ter eni rdeči sorti (refošk).

Glede na rezultate testiranja januarja smo imeli razmeroma majhno število trsov posameznih sort, ki so bili okuženi samo z GFLV ali pa zdravi (negativna kontrola), in sicer le za sorte rečigla, števerjana in refošk. Tako smo se osredotočili na opazovanje bolezenskih znamenj s štirih zornih kotov:

- opazovanje trsov okuženih samo z GFLV in primerjava z zdravimi trsi iste sorte
- opazovanje trsov iste sorte, okuženih samo z GFLV brez primerjave s kontrolnimi zdravimi rastlinami
- opazovanje trsov okuženih samo z GFLV in primerjava s trsi iste sorte, ki so bili poleg z GFLV okuženi še z drugimi virusi
- opazovanje trsov okuženih z GFLV in hkrati še z enim ali več drugimi virusi ter primerjava s trsi iste sorte, ki ne vsebujejo GFLV, temveč enega ali več drugih virusov

S prvimi tremi pristopi smo ugotavljali, katera bolezenska znamenja so posledica okužbe z GFLV na določeni sorti vinske trte, s tretjim in četrtnim pristopom pa skušali tudi izločiti, katerih znamenj ne moremo zagotovo pripisati okužbi z GFLV.

Trse okužene samo z GFLV, in zdrave trse smo primerjali pri sortah rečigla in števerjana iz vinograda v Ložah ter pri sorti refošk iz vinograda v Komnu in Dutovljah. Pri sorti rečigla smo izmed 28 bolezenskih znamenj opazili le krajšanje medčlenkov tako pri trti okuženi z GFLV kot tudi pri eni izmed zdravih trt (preglednici 9 in 10). Na sorti števerjana pri trsih okuženih z GFLV in zdravih trsih ni bilo vidnih nobenih bolezenskih znamenj (preglednici 9 in 10).

V vinogradu v Komnu smo pri trsih sorte refošk, okuženih samo z GFLV, opazili predvsem bolezenska znamenja na grozdih: osipanje jagod, redkejša grozde, majhne jagode in majhne grozde. Na listih smo zaznali rumenenje medžilnih prostorov listov v obliki pik, pri enem trsu pa tudi bifurkacijo na členku in kratke medčlenke. Zadnji dve znamenji smo v rastni sezoni 2004 opazili še dodatno na dveh trsih. Osipanje jagod smo v letu 2005 zaznali tudi pri treh izmed štirih zdravih trsov (preglednici 11 in 12).

Podobno kakor v vinogradu v Komnu so bila tudi v Dutovljah na trsih sorte refošk, okuženih le z GFLV, opazna predvsem znamenja na grozdih v obliki osipanja jagod in redkejših grozdov. Pri enem trsu je bilo vidno rumenenje tako žil kot tudi medžilnih prostorov listov v obliki pik, vendar za ti dve znamenji ne moremo zagotovo trditi, da sta posledica okužbe z GFLV, saj je bil trs, po znamenjih kot jesensko rjavenje listov in

propad trsa sodeč, okužen še drugim nevirusnim povzročiteljem. Deformacij na poganjkih pri opazovanih trsih v vinogradu v Dutovljah nismo zaznali, zdrav trs pa tudi ni kazal nobenih značilnosti podobnih bolezenskim znamenjem (preglednici 13 in 14).

Za opazovanje znamenj, ki so posledica okužbe samo z GFLV, – nismo jih sicer mogli primerjati s kontrolnimi zdravimi rastlinami iste sorte – smo se osredotočili na sorti volovnik in cividin iz vinograda v Ložah. Na trsih sorte volovnik smo skupno opazili 12 bolezenskih znamenj, ki jih pripisujejo okužbi z GFLV. Vseh 11 trsov je imelo deformirane poganjke v obliki ploščatih stebel in kratkih medčlenkov, večina pa tudi bifurkacije na členkih, dvojne členke ter metlasto rast poganjkov. Pogosti so bili tudi nesimetrični listi, pri posameznih trsih pa smo opazili še kloroze medžilnih prostorov listov v obliki pik ali lis, zraslost poganjkov, cikcakasto rast, redkejša grozda ali celo odsotnost pridelka (preglednici 9 in 10). Zelo podobna bolezenska znamenja kot pri sorti volovnik so se pojavila tudi pri trsih sorte cividin. Pri slednjih smo na vseh trsih opazili bifurkacije na členkih, dvojne členke ter pri štirih od petih rastlin tudi kratke medčlenke. Pri posameznih trsih so se poleg naštetih znamenj pojavili še nesimetrični listi, kloroze medžilnih prostorov lista v obliki rumenih lis, zraslost poganjkov, ploščata stebela, cikcakasta rast, metlasta rast, osipavanje jagod ter odsotnost grozdov (preglednici 9 in 10).

Za tretji pristop, to je primerjavo bolezenskih znamenj na rastlinah, okuženih samo z GFLV, z bolezenskimi znamenji na trsih iste sorte, ki so poleg GFLV vsebovali še druge viruse, smo se odločili v vinogradih v Vrhpolju, Kromberku, Komnu in Dutovljah.

V vinogradu v Vrhpolju lahko v primeru sorte župlanka okužbi z GFLV pripišemo bolezenska znamenja kot pahljačavost in peteršiljavost listov, pikčasto rumenenje med žilami listov, viličasta rast poganjkov, kratki medčlenki, dvojni členki, razbrazdanje stebela žlahtnega dela, manjši in gosti listi ter grmast videz trsa. Pri trsu iste sorte, ki je bil poleg z GFLV okužen še z GLRaV-1, so izstopala še znamenja rumenenja medžilnih prostorov listov v obliki lis in rumenenje celotnih listov ter gubanje listov.

V istem vinogradu smo na trsu sorte chardonnay, ki je vseboval le GFLV, opazili tako rumenenje medžilnih prostorov listov v obliki lis kot tudi rumenenje celotnih listov ter kratke medčlenke, dvojne členke in razbrazdanje lesa podlage. Pri trsih iste sorte, ki so bili poleg z GFLV okuženi še z enim ali več drugimi virusi (GFkV, GLRaV-1, GVA), smo opazili še številna druga znamenja, med drugim peteršiljaste in pahljačaste, goste in majhne liste ter rumenenje celotnih listov. Gubanje oziroma zvijanje listov smo opazili pri 3 trsih sorte Chardonnay, ki so vsi v svoji kombinaciji virusov vsebovali GLRaV-1 (preglednici 15 in 16).

V vinogradu v Kromberku smo pri malvazijah, ki so bile okužene le z GFLV, zaznali nesimetrične liste, rumenenje listnih površin med žilami v obliki lis, na poganjkih pa

viličasto rast, kratke medčlenke in nasproti ležeča očesa ter redkejša grozde. Našteta znamenja tako lahko pripišemo virusu GFLV. Ta znamenja smo večinoma zaznali tudi pri trsih, ki so poleg GFLV vsebovali še druge viruse. Pri dveh trsih, okuženih z GFLV, GLRaV-3 in GVA, smo na listih opazili zelo poglobljene stranske sinuse, ki spominjajo na obliko listov peteršilja. Morda tudi slednje znamenje povzroča virus GFLV ali pa je res posledica okužbe trsov poleg z GFLV še z drugimi virusi (preglednici 17 in 18). Osipanja jagod zaradi odsotnosti primerjave z zdravimi rastlinami iste sorte in zaradi ugotovitev iz vinograda v Komnu ne moremo pripisati samo okužbi z GFLV.

Virus GFLV je na sorti sauvignon povzročil kratke medčlenke in redkejša grozde. Da GFLV povzroča samo ti dve znamenji ne moremo trditi z gotovostjo, saj bi za to morali opazovati večje število trsov. Osipanje jagod pa zaradi pojava pri zdravih trsih pri drugih sortah tudi pri sorti Sauvignon ne moremo pripisati le GFLV.

Pri sorti refošk iz vinograda v Komnu smo pri štirih trsih opazili značilno rdečenje listov med žilami in vsi so bili okuženi s kombinacijo virusov GFLV, GLRaV-1 in GVA (preglednici 11 in 12). Ker noben izmed opazovanih trsov sorte refošk, ki so bili okuženi samo z GFLV, ni izražal rdečenja listov, lahko to znamenje pripišemo virusu GLRaV-1, kar navaja tudi različna literatura (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998), ali pa kombinaciji virusov GLRaV-1 in GVA. Verjetnost za slednjo potrjuje tudi ugotovitev, da na refošku 3/4 iz vinograda v Dutovljah, ki je bil okužen s kombinacijo virusov GFLV in GLRaV-1, nismo zasledili rdečenja listov.

V vinogradu v Ložah na sorti zelen pa smo spremljali znamenja, ki so se pojavljala na trsih, okuženih z GFLV in hkrati še z enim ali več drugimi virusi, ter jih primerjali s trsi iste sorte, ki niso vsebovali GFLV temveč enega ali več drugih virusov. Kratki medčlenki so se pojavili pri trsih, ki so vsebovali samo virus GFkV, GFLV v kombinaciji z GFkV ali kombinacijo virusov GFLV, GFkV in GLRaV3, nismo pa jih zasledili pri trsih z virusoma GFkV in GLRaV-3. Pri slednjih dveh trsih nasploh nismo zasledili nobenih bolezenskih znamenj (preglednici 9 in 10). Na večini trsov sorte zelen, ki so bili okuženi z različnimi kombinacijami virusov, so v rastni sezoni leta 2004 poleg znamenj, vidnih leta 2005, opazili predvsem več rumenenja medžilnih prostorov listov.

Podobno kot rdečenja listov tudi zvijanja listov ne moremo pripisati okužbi z virusom GFLV, saj se je znamenje pojavilo le pri okužbah z večimi virusi hkrati, nikoli pa pri trsih, ki so vsebovali samo GFLV. Skupni faktor pri vseh trsih, ki so kazali znamenja zvijanja listov, je bila prisotnost bodisi enega izmed virusov GLRaV ali GFkV. Obema pa literatura (Bovey in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1998; Martelli, 1993) pripisuje zvijanje listov.

Na splošno je bilo več bolezenskih znamenj, ki jih pripisujejo okužbi z GFLV, opaznih pri belih sortah (župlanka, chardonnay, volovnik, cividin, malvazija), predvsem deformacije

na poganjkih. Te smo na rdeči sorti refošk zaznali le izjemoma. Pri sorti refošk so prevladovala bolezenska znamenja na grozdih, predvsem redkejši grozdi ter tudi razna razbarvanja listov.

4.3.2 Različne genotipske variante virusa GFLV in bolezenska znamenja

V pomoč pri iskanju morebitnih povezav med različnimi genotipskimi variantami in izražanjem določenih bolezenskih znamenj nam je bil tudi dendrogram (slika 27), ki je trse razdelil v 6 skupin glede na izražanje podobnih bolezenskih znamenj. Za vsako izmed skupin je značilno vsaj eno ali več skupnih bolezenskih znamenj ali pa so v skupini razvrščeni le trsi, ki niso izražali nobenih znamenj (zeleno obarvani vzorci) (slika 27). Na sliki 28 so prikazana bolezenska znamenja, ki so prevladovala v posamezni skupini oz. skupna znamenja na podlagi katerih je program razvrstil trse v šest skupin.

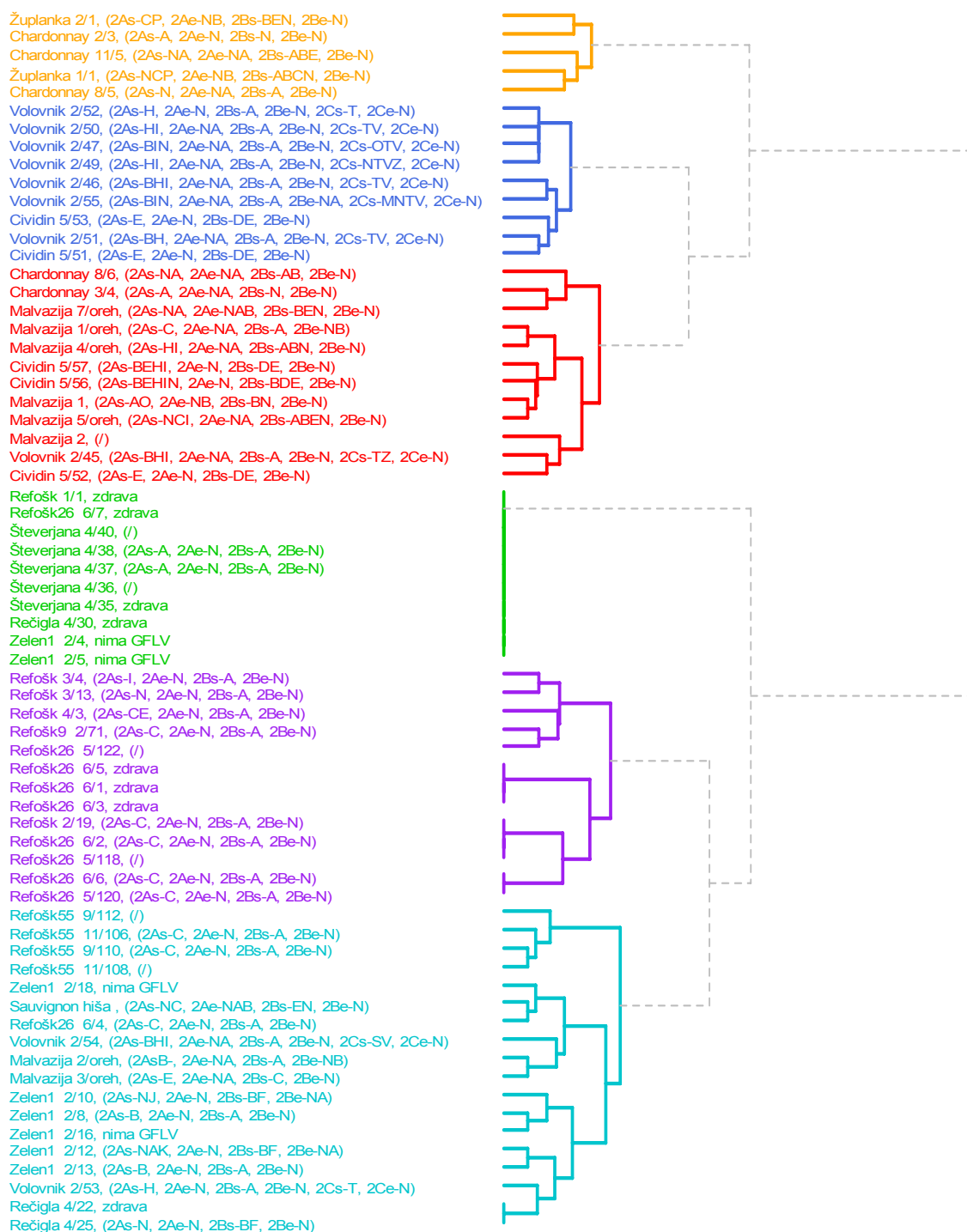
V prvi skupini (rumeno obarvani vzorci) je pri vseh petih vzorcih skupna lastnost prisotnost peteršiljastih listov, majhnih in gostih listov ter kratkih medčlenkov, pri večini pa se pojavijo tudi pahljačasti listi in grmast videz trsa. V drugi skupini (temno modro obarvani vzorci) smo pri vseh vzorcih opazili ploščata stebila in viličasto rast pogankov, pogosti so bili tudi kratki medčlenki. Skupna lastnost v tretji skupini (rdeče obarvani vzorci) so kratki medčlenki in rumenenje medžilnih prostorov listov v obliki lis. V četrti skupini (zeleno obarvani vzorci), kamor so uvrščeni trsi brez bolezenskih znamenj so vsi predstavniki sorte števerjana, med drugim dva trsa, ki sta okužena samo z GFLV in sicer restriksijskim tipom A (StyI) in N (EcoRI) za gen 2A in restriksijskim tipom A (StyI) in N (EcoRI) za gen 2B. V peti skupini (vijolično obarvani vzorci) smo pri vseh vzorcih opazili osipanje jagod. V tej skupini so, kot smo že ugotovili, tako zdrave rastline kot tudi okužene z GFLV. V zadnjo, šesto skupino (svetlo modro obarvani vzorci) so uvrščeni vzorci, na katerih smo zaznali bodisi rdečenje listov bodisi kratke medčlenke. Trsi z rdečenjem listov, česar ne pripisujemo okužbi z GFLV, temveč okužbi z GLRaV-1 ali kombinaciji virusov GLRaV-1 in GVA, znotraj te skupine oblikujejo svojo podskupino.

Eden glavnih namenov naše raziskave je bilo tudi iskanje povezave med različnimi genotipskimi variantami in določenimi bolezenskimi znamenji, vendar zanesljivih povezav nismo našli. Povezavo med genotipskimi variantami in določenimi bolezenskimi znamenji smo iskali znotraj sort kot tudi med različnimi sortami. Posebej smo se osredotočili na sorto volovnik, pri kateri imamo znane restriksijske tipe za vse 3 gene, ki se nahajajo na RNA2. Odstopanje smo sicer opazili pri trsu volovnik 2/57, ki edini vsebuje restriksijska tipa P in R pri rezanju gena 2C z encimom StyI in je odmrli, vendar zaradi pomanjkanja podatkov o ostalih bolezenskih znamenjih ne moremo trditi, da obstaja povezava med omenjeno kombinacijo restriksijskih tipov in odmrtnostjo rastline. Morda bi lahko povezavo iskali tudi med restriksijskima tipoma S ali O po rezanju gena 2C s StyI in redkejšimi

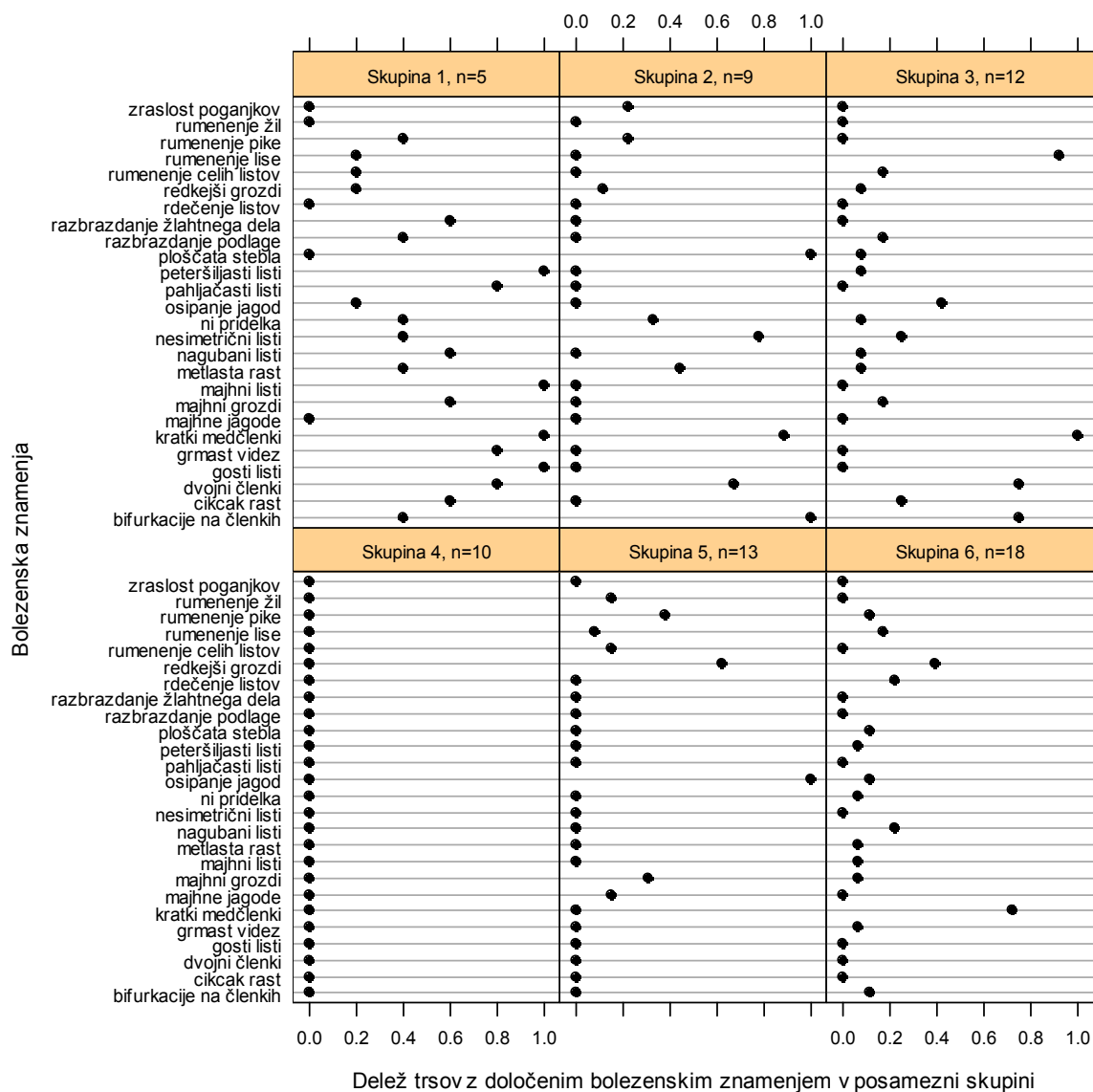
grozdi, pri trsih volovnik 2/47 in volovnik 2/54, vendar tudi v tem primeru hipoteze ne moremo zagotovo podpreti.

Tako v primeru sorte volovnik kot tudi cividin nekateri trsi gostijo vsaj dva ali več genotipskih variant nekateri pa le eno varianto virusa GFLV. V obeh primerih je prišlo do izražanja podobnega števila bolezenskih znamenj. Poleg tega izražajo tudi podobna bolezenska znamenja, kar je razvidno tudi na dendrogramu, saj se vzorci z enojnim restrikcijskim tipom kot tudi z večimi restrikcijskimi tipi razvrstijo v isto skupino.

Z dendrograma je razvidno tudi, da se posamezne sorte večinoma razvrstijo v posamezne skupine. Pri trsih določene sorte, ki izstopajo iz skupine kamor so razvrščeni ostali predstavniki iste sorte nismo uspeli najti povezave med izražanjem določenega bolezenska znamenja in restrikcijskimi tipi.



Slika 27: Grafični prikaz (dendrogram) razvrstitve vzorcev v 6 skupin glede na izražanje podobnih bolezenskih znamenj. Oznake 2As, 2Bs in 2Cs pomenijo, da smo gene 2A, 2B in 2C rezali z encimom StyI, zraven oznak pa sledijo restrikcijski tipi. Oznake 2Ae, 2Be in 2Ce pomenijo, da smo posamezne gene rezali z encimom EcoRI, zraven sledijo restrikcijski tipi.

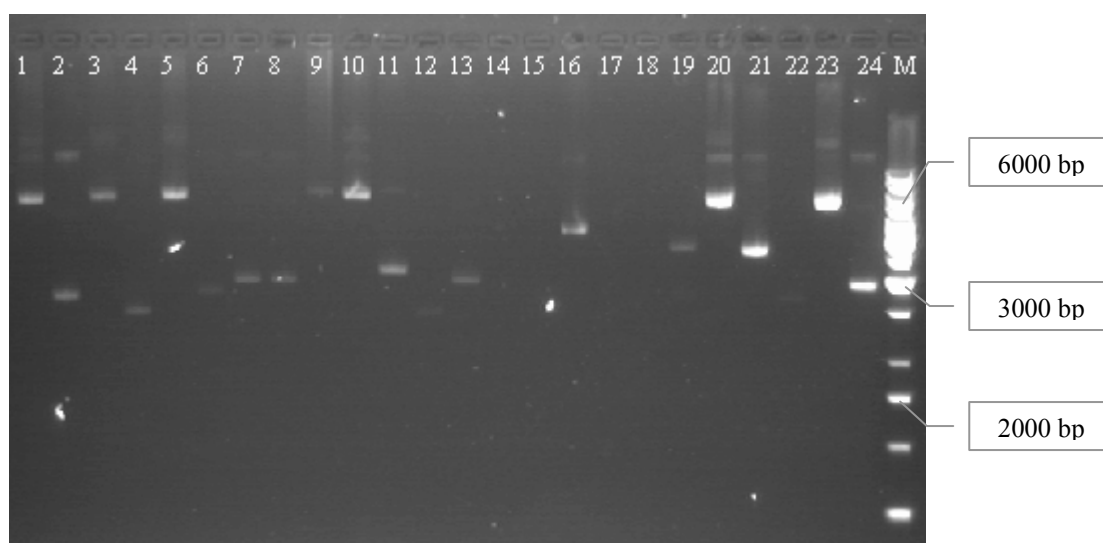


Slika 28: Grafični prikaz bolezenskih znamenj ali njihovih kombinacij, ki prevladujejo v posamezni skupini, kamor so razvrščeni trsi, na podlagi izražanja podobnih bolezenskih znamenj. Oznaka n predstavlja število vseh trsov v posamezni skupini.

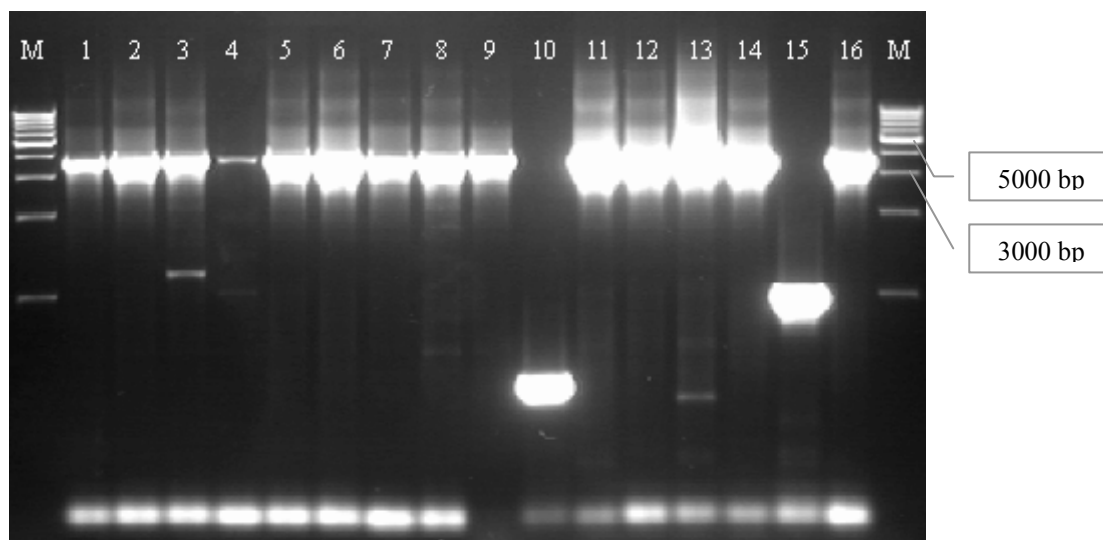
4.4 DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Da bi določili nukleotidno zaporedje v plazmide vstavljenim fragmentom, smo plazmide izolirali iz približno 8 do 10 belih kolonij za vsako izmed 11 rastlin sorte volovnik. Čeprav so plazmidi v celici lahko v sproščeni ali dodatno zviti obliki, ki drugače potujejo v električnem polju gelske elektroforeze, smo iz slike gela na katerega smo nanесли izolirane plazmide lahko videli, da veliko plazmidov ne vsebuje fragmentov željene velikosti (3463–

3469 bp). Tisti plazmidi, ki so vsebovali iskani fragment, so na gelu potovali do višine 6000 bp glede na označevalec velikosti, ki je označen s črko M (slika 29). Da so zares le ti plazmidi vsebovali fragment željene velikosti, smo potrdili tudi z reakcijo PCR, s katero smo vključene fragmente pomnožili s pomočjo začetnih oligonukleotidov (pGEMT fwd in pGEMT rev), ki nalegajo na plazmid zelo blizu mesta insercije (slika 30). Glede na število belih kolonij je bilo število polnih plazmidov z željenim vključkom relativno majhno. Tako pri rastlini volovnik 2/46 nismo uspeli vključiti fragmenta prave velikosti in posledično zaporedja virusne RNA2 iz te rastline nismo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja.



Slika 29: Fotografija elektroforetskega gela z izoliranimi plazmidi. M – označevalec velikosti; 1 – »volovnik 2/47 3/7«; 2 – »volovnik 2/50 5/11«; 3 – »volovnik 2/47 3/8«; 4 – »volovnik 2/50 5/2«; 5 – »volovnik 2/47 3/10«; 6 – »volovnik 2/50 5/3«; 7 – »volovnik 2/49 4/11«; 8 – »volovnik 2/50 5/4«; 9 – »volovnik 2/49 4/2«; 10 – »volovnik 2/50 5/5«; 11 – »volovnik 2/49 4/3«; 12 – »volovnik 2/50 5/6«; 13 – »volovnik 2/49 4/4«; 14 – »volovnik 2/50 5/10«; 15 – »volovnik 2/49 4/5«; 16 – »volovnik 2/50 5/11«; 17 – »volovnik 2/49 4/6«; 18 – »volovnik 2/50 5/12«; 19 – »volovnik 2/49 D/1«; 20 – »volovnik 2/51 6/1«; 21 – »volovnik 2/49 D/2«; 22 – »volovnik 2/51 6/2«; 23 – »volovnik 2/49 D/3«; 24 – »volovnik 2/51 6/3«



Slika 30: Fotografija elektroforetskega gela s fragmenti željenih velikosti, ki smo jih dobili pri pomnoževanju insertov v izoliranih plazmidih s PCR reakcijo in uporabo začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo zelo blizu mesta insercije. M – označevalec velikosti; 1 – »volovnik 2/45 1/9«; 2 – »volovnik 2/47 3/1«; 3 – »volovnik 2/47 3/2«; 4 – »volovnik 2/47 3/4«; 5 – »volovnik 2/47 3/5«; 6 – »volovnik 2/47 3/6«; 7 – »volovnik 2/47 3/8«; 8 – »volovnik 2/47 3/10«; 9 – »volovnik 2/49 4/2«; 10 – »volovnik 2/49 4/3«; 11 – »volovnik 2/49 D/3«; 12 – »volovnik 2/50 5/5«; 13 – »volovnik 2/51 6/1«; 14 – »volovnik 2/51 6/5«; 15 – »volovnik 2/51 6/7«; 16 – »volovnik 2/52 7/11«

Plazmide z željenimi vključki vseh ostalih 10 rastlin sorte volovnik smo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja z 8 začetnimi oligonukleotidi. Za posamezno rastlino smo poslali od 1 do 6 plazmidov. Izmed 32 plazmidov z inserti RNA2 virusa GFLV, poslanih na določanje nukleotidnega zaporedja, smo delna nukleotidna zaporedja dobljena z 8 začetnimi oligonukleotidi uspešno sestavili v končno zaporedje za 28 insertov. S tem smo zajeli nukleotidna zaporedja genotipskih variant virusa pri 9 izmed 10 rastlin (Gutierrez, osebna komunikacija).

Ker so že iz predhodnih raziskav ugotovili, da več informacij o variabilnosti genov na RNA2 pridobimo z encimom *StyI* (Vojvoda, 2005), v nadaljevanju navajamo rezultate le za ta encim. Z določitvijo nukleotidnih zaporedij 28 virusnih RNA2 smo s simulacijo rezanja genov z encimom *StyI* potrdili 3 od 4 restrikcijskih tipov za gen 2A, dobljenih z RFLP analizo, 1 od 1 za gen 2B, ter 6 od 9 restrikcijskih tipov za gen 2C dobljenih z RFLP (preglednica 19).

Preglednica 19: Seznam vzorcev, pri katerih smo določili nukleotidno zaporedje RNA2 GFLV (med začetnima oligonukleotidoma 2AF in EV00N1) ter restrikcijski tipi treh genov, ki smo jih potrdili s simulacijo rezanja z encimom StyI.

Vzorec z oznako plazmida	Restrikcijski tipi genov po simulaciji rezanja s StyI		
	2A	2B	2C
Volovnik 2/45 1/9	B	A	Z
Volovnik 2/47 3/1	I	A	V
Volovnik 2/47 3/4	I	A	V
Volovnik 2/47 3/5	I	A	V
Volovnik 2/47 3/8	I	A	V
Volovnik 2/47 3/10	I	A	V
Volovnik 2/49 4/2	I	A	V
Volovnik 2/49 D/3	I	A	V
Volovnik 2/50 5/5	I	A	V
Volovnik 2/50 11/25	I	A	V
Volovnik 2/51 6/1	B	A	V
Volovnik 2/51 6/5	B	A	V
Volovnik 2/51 5/7	H	A	T
Volovnik 2/51 5/20	B	A	V

Vzorec z oznako plazmida	Restrikcijski tipi genov po simulaciji rezanja s StyI		
	2A	2B	2C
Volovnik 2/51 5/21	H	A	T
Volovnik 2/52 7/11	H	A	T
Volovnik 2/54 9/8	B	A	V
Volovnik 2/54 8/6	B	A	S
Volovnik 2/54 8/7	B	A	V
Volovnik 2/55 9/16	H	A	T
Volovnik 2/55 9/20	B	A	V
Volovnik 2/55 9/24	B	A	V
Volovnik 2/57 11/4	B	A	V
Volovnik 2/57 11/5	B	A	V
Volovnik 2/57 11/6	B	A	V
Volovnik 2/57 10/10	B	A	V
Volovnik 2/57 10/12	H	A	R
Volovnik 2/57 10/18	H	A	P

S simulacijo rezanja nukleotidnih zaporedij z encimom StyI smo tako za gen 2A kot za 2B potrdili mesta rezanja encima dobljena z analizo RFLP. Vsak restrikcijski tip, ki smo ga za posamezno rastlino dokazali z nukleotidnimi zaporedji, smo v predhodnih raziskavah dobili tudi z RFLP, razen pri dveh rastlinah (volovnik 2/55 in volovnik 2/57) pri genu 2A, kjer smo dodatno dokazali še en restrikcijski tip (H), ki ga z RFLP nismo zaznali.

Z določitvijo nukleotidnih zaporedij smo pridobili podatek tudi o tem, kateri restrikcijski tip gena 2C se pri posamezni genotipski varianti pojavi v kombinaciji s katerim restrikcijskim tipom gena 2A.

S poravnavo 28 nukleotidnih zaporedij virusne RNA2 (zaporedje med začetnima oligonukleotidoma 2AF in EV00N1), izoliranih iz 9 različnih rastlin, smo dobili najmanj 88,1 % ujemanje zaporedij (preglednica 20). Enake odstotke ujemanj na nukleotidnem nivoju smo dobili tudi pri poravnavi vseh 28 ORF. Pri poravnavi nukleotidnih zaporedij kjer se nahaja gen 2A (zaporedje med začetnima oligonukleotidoma 2AF in 2AR) smo dobili 88,4 % ujemanje, za gen 2B (zaporedje med začetnima oligonukleotidoma 2BF in 2BR) 89,0 % ujemanje ter za gen 2C (zaporedje med začetnima oligonukleotidoma EV00N3 in EV00N1) 86,6 % ujemanje.

Pri poravnavi delov gena 2C (med začetnima oligonukleotidoma EV00N3 in EV00N1) nukleotidnih zaporedij za posamezen restrikcijski tip (V ali T) smo potrdili največ 1,1 do 1,7 % razlik na nukleotidnem nivoju. Podobno smo za del, kjer se nahaja gen 2A za

posamezen restrikcijski tip (B, H ali I) dokazali največ 1,3 do 1,9 % razlikovanje na nukleotidnem nivoju med posameznimi zaporedji.

Pri poravnavi delov vseh 28 nukleotidnih zaporedij, kjer se nahaja gen 2B, za katerega smo dokazali le en restrikcijski tip (A), smo dobili kar 10,9 % razlikovanje med posameznimi zaporedji.

Če smo poravnali celotna zaporedja tistih vzorcev, ki so imeli enak restrikcijski tip za vse tri gene 2A, 2B in 2C, smo dobili 99,0 – 99,7 % ujemanje nukleotidov (preglednica 20).

Velikosti genov 2B in 2C so bile pri vseh dobljenih nukleotidnih zaporedjih enake (1044 bp za gen 2B in 1515 za gen 2C), velikost je variirala le za gen 2A (771 ali 774 bp).

Na sliki 31 so prikazana tri nukleotidna zaporedja RNA2, ki smo jih izolirali iz plazmidov, ki so vsebovali fragmente RNA2 izolirane iz iste rastline (volovnik 2/54). Nukleotidi, potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reče encim StyI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

Blas, M. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2006

Preglednica 20: Odstotki ujemanja v nukleotidnih zaporedjih vseh 28 RNA2 GFLV izoliranih iz več rastlin sorte volovnik. Oznaka npr. 2/45 1/9 pomeni trs volovnik 2/45 plazmid 1/9. S sivo so označeni odstotki ujemanj v nukleotidnih zaporedjih treh RNA2 GFLV, izoliranih iz ene rastline, za katero so prikazana tudi nukleotidna zaporedja (slika 31). V desnem robu preglednice so prikazani restrikcijski tipi po simulaciji rezanja s StyI za vse tri virusne gene, 2A, 2B in 2C.

	2/45 1/9	2/47 3/1	2/47 3/4	2/47 3/5	2/47 3/8	2/47 3/10	2/49 4/2	2/49 D/3	2/50 5/5	2/50 11/25	2/51 6/1	2/51 6/5	2/51 5/7	2/51 5/20	2/51 5/21	2/52 7/11	2/54 9/8	2/54 8/6	2/54 8/7	2/55 9/16	2/55 9/20	2/55 9/24	2/57 11/4	2/57 11/5	2/57 11/6	2/57 10/10	2/57 10/12	2/57 10/18	GFLV (Styl)		
																													2A	2B	2C
2/45 1/9	100	97.8	97.7	97.9	97.7	97.9	97.7	97.8	97.7	98.0	99.6	99.5	88.4	99.5	88.4	88.4	100	88.3	99.5	88.4	99.4	99.4	99.4	99.3	99.3	99.3	88.3	99.2	B	A	Z
2/47 3/1		100	99,3	99,6	99,3	99,5	99,1	99,2	99,0	99,3	97,9	97,8	89,7	97,8	89,7	89,7	97,8	89,5	97,6	89,7	97,7	97,7	97,6	97,6	97,6	97,6	89,5	97,5	I	A	V
2/47 3/4			100	99,5	99,3	99,5	99,0	99,0	99,0	99,2	97,7	97,7	89,3	97,7	89,4	89,5	97,7	89,2	97,5	89,4	97,6	97,6	97,5	97,4	97,4	97,4	89,2	97,4	I	A	V
2/47 3/5				100	99,4	99,6	99,2	99,2	99,1	99,3	97,9	97,9	89,5	97,8	89,6	89,6	97,9	89,4	97,7	89,5	97,7	97,7	97,6	97,6	97,6	97,6	89,3	97,5	I	A	V
2/47 3/8					100	99,5	99,0	99,0	99,0	99,1	97,7	97,8	89,3	97,7	89,4	89,4	97,7	89,3	97,5	89,3	97,5	97,5	97,5	97,4	97,4	97,4	89,1	97,3	I	A	V
2/47 3/10						100	99,3	99,2	99,3	99,4	97,9	98,0	89,6	97,9	89,7	89,7	97,9	89,6	97,7	89,7	97,7	97,7	97,7	97,6	97,6	97,6	89,5	97,6	I	A	V
2/49 4/2							100	99,4	99,1	99,3	97,8	97,8	89,3	97,8	89,3	89,4	97,7	89,3	97,5	89,3	97,6	97,6	97,5	97,5	97,5	97,5	89,2	97,3	I	A	V
2/49 D/3								100	99,0	99,3	97,8	97,8	89,4	97,8	89,3	89,4	97,8	89,2	97,5	89,4	97,6	97,6	97,5	97,5	97,5	97,5	89,2	97,4	I	A	V
2/50 5/5									100	99,7	97,8	97,8	89,2	97,7	89,3	89,4	97,7	89,2	97,5	89,3	97,5	97,5	97,5	97,4	97,4	97,4	89,2	97,3	I	A	V
2/50 11/25										100	98,0	98,0	89,5	98,0	89,5	89,6	98,0	89,3	97,8	89,6	97,8	97,8	97,7	97,7	97,7	97,7	89,4	97,6	I	A	V
2/51 6/1											100	99,7	88,5	99,7	88,4	88,4	99,6	88,3	99,4	88,4	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	99,4	88,3	99,3	B	A	V
2/51 6/5												100	88,4	99,6	88,4	88,4	99,5	88,3	99,3	88,4	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	99,4	88,3	99,3	B	A	V
2/51 5/7													100	88,4	99,3	99,0	88,4	98,8	88,3	99,4	88,3	88,3	88,4	88,4	88,4	88,4	99,1	88,2	H	A	T
2/51 5/20														100	88,4	88,4	99,5	88,2	99,3	88,4	99,4	99,4	99,3	99,3	99,3	99,3	88,3	99,2	B	A	V
2/51 5/21															100	99,1	88,4	98,9	88,3	99,3	88,3	88,3	88,4	88,3	88,4	88,3	99,0	88,2	H	A	T
2/52 7/11																100	88,4	98,7	88,3	99,0	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	98,9	88,2	H	A	T
2/54 9/8																	100	88,3	99,5	88,4	99,4	99,4	99,4	99,3	99,3	99,3	88,3	99,2	B	A	V
2/54 8/6																		100	88,2	98,8	88,2	88,2	88,3	88,2	88,2	88,2	98,9	88,1	B	A	S
2/54 8/7																			100	88,3	99,2	99,2	99,2	99,1	99,1	99,1	88,2	99,0	B	A	V
2/55 9/16																				100	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	88,3	99,1	88,2	H	A	T
2/55 9/20																					100	100	99,3	99,2	99,2	99,2	88,2	99,1	B	A	V
2/55 9/24																						100	99,3	99,2	99,2	99,2	88,2	99,1	B	A	V
2/57 11/4																							100	99,7	99,7	99,7	88,2	99,6	B	A	V
2/57 11/5																								100	99,7	99,7	88,2	99,5	B	A	V
2/57 11/6																									100	99,7	88,2	99,5	B	A	V
2/57 10/10																										100	88,2	99,5	B	A	V
2/57 10/12																											100	88,2	H	A	R
2/57 10/18																												100	H	A	P

	1	GFLV 2AF	50
Vol_2/54_9/8	CTCTTACTTT	GCGCTTTATT	TGCTTAGCAT TTTATTGAGT TTGTTTAAAA
Vol_2/54_8/7	CTCTTACTTT	GCGCTTTATT	TGCTTAGCAT TTTATTGAGT TTGTTTAAAA
Vol_2/54_8/6	CTTTTACTTT	GCGCTTTATT	TGTTTAGCAT CTTGTTAAGT GTTTTAAAA
	51	ORF, 2A	100
Vol_2/54_9/8	AGCTTTCATT	TTGTTT...CT	TTTAT.TTTC CTGCCCTTAT GGGCAAATTT
Vol_2/54_8/7	AGCTTTCATT	TTGTTT...CT	TTTAT.TTTC CTGCCCTTAT GGGCAAATTT
Vol_2/54_8/6	AGCTTTTATT	TTGTTT...CT	TTTAT.TTTC CTGCCCTTAT GGGCAAATTT
	101		150
Vol_2/54_9/8	TATTTTCCCA	ACAGGCGTCT	GGCCTGTTGG GCTGCTGGAA AGAACCCCCA
Vol_2/54_8/7	TATTTTCCCA	ACAGGCGTCT	GGCCTGTTGG GCTGCTGGAA AGAACCCCCA
Vol_2/54_8/6	TACTACTCCA	ACAGGCGTCT	GGCCTGTTGG GCAGCTGGGA AGAACCCCCA
	151		200
Vol_2/54_9/8	TCTAGGGGGT	TCTGTGCAAC	AATGGCTGGC GGCCATTAGT ACTGACCCCT
Vol_2/54_8/7	TCTAGGGGGT	TCTGTGCGAC	AATGGCTGGC GGCCATTAGT ACTGACCCCT
Vol_2/54_8/6	CCTTGGGGGT	TCCATAGAAC	AATGGCTGTT GGCCATTAGT ACTGACCCCT
	201		250
Vol_2/54_9/8	CCTTCCGCCA	AACTGTAAAG	GAGGATGTCC AGGATAACAA ACTGCAGCCT
Vol_2/54_8/7	CCTTCCGCCA	AACTGTAAAG	GAGGATGTCC AGGATAACAA ACTGCAGCCT
Vol_2/54_8/6	CCTTCCGCCA	AACTGTAAAG	GGGGATGTCC AGGATAATCG GGATGAGCCT
	251		300
Vol_2/54_9/8	ACGGCTGTCA	GGATGTTTTT	CTGGAAAGTG GGATTCGGGC CCATTGACAA
Vol_2/54_8/7	ACGGCTGTCA	GGATGTTTTT	CTGGAAAGTG GGATTCGGGC CCATTGACAA
Vol_2/54_8/6	TCGGCTATCC	GGATGTTTTT	CTGGAAATTG GGATACGGGC CCACTGATAA
	301		350
Vol_2/54_9/8	CCCGGAAAAA	TGTGATTGGC	ATTTTCGTCCT CACGGGCGAG AGGCCAACAC
Vol_2/54_8/7	CCCGGAAAAA	TGTGATTGGC	ATTTTCGTCCT CACGGGCGAG AGGCCAACAC
Vol_2/54_8/6	CCCGGAAAAA	TGCGACTGGC	ATTTTGTCTCT CACGGGCGAG AGGCCACAGC
	351		400
Vol_2/54_9/8	AGCCGTCCCG	GCCGGTTAAA	GCCGACGAGG TTGTGGTGGT GCCACAATCG
Vol_2/54_8/7	AGCCGTCCCG	GCCGGTTAAA	GCCGATGAGG TTGTGGTGGT GCCACAATCG
Vol_2/54_8/6	AGCCGACCGA	GCCGGTTAAA	GCTCATGAGG TTGTGGT... GCCACAACCG
	401		450
Vol_2/54_9/8	AAGAAGGTGA	TGACTCCATC	GCCACCTCCT CCCCCAACTC CCTACTTTAG
Vol_2/54_8/7	AAGAAGGTGA	TGATTCCATC	GCCACCTCCT CC...AACTC CCTACTTTAG
Vol_2/54_8/6	AAGAAGGTAG	TGATTCCCTC	ACCACCTCCT CCCCCAACTC CCTACTTTAG
	451		500
Vol_2/54_9/8	GGCTGTTGGG	GCTTTTGCAC	CAACCCGGTC CGGGTTTGTT CGGGCCACTG
Vol_2/54_8/7	GGCTGTTGGG	GCTTTTGCAC	CAACCCGGTC CGGGTTTGTT CGGGCCACTG
Vol_2/54_8/6	GGCTGTTGGG	GCTTTTGCAC	CAACCAGGTC CGGGTTTATT CGGGCCACTG

Slika 31: Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2, izoliranih iz rastline volovnik 2/54. Nukleotidi potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reže encim StyI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

	501		550
Vol_2/54_9/8	TGGAAAGGCT CATCCGTGAA CGGGAAGAGT CGAGAGCTGC GGCACCTCTTT		
Vol_2/54_8/7	TGGAAAGGCT CATCCGTGAA CGGGAAGAGT CGAGAGC CGC GGCACCTCTTT		
Vol_2/54_8/6	TGGAAAG ACT CACCCG G GAA CGGGAAGAGT CGAGAGCTGC GGCACCTCTTT		
	551		600
Vol_2/54_9/8	GCCGAATTGC CATTGGAGTA CCCTCAGGGT GCTCCTTTGA AGTTGAGCCT		
Vol_2/54_8/7	GCCGAATTGC CATTGGAGTA CCCTCAGGGT GCTCCTTTGA AGTTGAGCCT		
Vol_2/54_8/6	GCCGAATTGC CATTGGAGTA TCCTCAAGGT GCTCCTTTGA AATTGAGTCT		
	601		650
Vol_2/54_9/8	GGCAATGAAG TTTGCCATGC TCAAACATAC CACTTGGAGG AAGTGGTATG	GFLV 1fw →	
Vol_2/54_8/7	GGCAATGAAG TTTGCCATGC TCAAACATAC CACTTGGAGG AAGTGGTATG		
Vol_2/54_8/6	GGC G ATGAAG TT C GCCATGC TCAAACATAC CACTTGGAGG AAGTGGTATG		
	651		700
Vol_2/54_9/8	ACACTAGTGA TGAGCGCCTC TTGAAGGCTC ATCCTGGTGG TCCTTGTCTT		
Vol_2/54_8/7	ACACTAGTGA TGAGCGCCTC TTGAAGGCTC ATCCTGGTGG TCCTTGTCTT		
Vol_2/54_8/6	ACACTAGTGA TGAGCGCCTC TT TG AGGCC ATCCTGGTGG TCCTTGT TT C		
	701		750
Vol_2/54_9/8	CCT T CTCCTC CCCCAATCCA AAGTCCTCCC TCTTTTCAAG AGAGGGTTAG		
Vol_2/54_8/7	CCTCCTCCTC CCCCAATCCA AAGTCCTCCC TCTTTTCAGG AGAGGGTTAG		
Vol_2/54_8/6	CCTCCTCCTC CCC T AATCCA AAG C CCTCCC TCT C TTCAGG AGAGG AT AA G		
	751		800
Vol_2/54_9/8	GGAATTC TGC AGGATGAAAT CCTGTGCCAA GGCTTTTGCC TTGGAAACCT		
Vol_2/54_8/7	GGAATTC TGC AGGATGAAAT CCTGTGCCAA GGCTTTTGCC TTGGAAACCT		
Vol_2/54_8/6	GG A TTCTGC AGGATGAA G T CCTG C GCCAG GGCTTTTGCC CT GGAAACCT		
	801		850
Vol_2/54_9/8	CTCTGGGTCT CAATAAGGCC TGGGTGGGTT TGGTAGACAT CCCCAGCACC		
Vol_2/54_8/7	CTCTGGGTCT CAATAAGGCC CGGGTGGGTT TGGTAGACAT CCCCAGCACC		
Vol_2/54_8/6	CTCT A GGTCT TAACA AGGCC TGGGT A GGTT TAGTAGATAT CCCCAGCA CT		
	851		900
Vol_2/54_9/8	TCTGTGTGCT GTGCGGATGG TAGAACTACC GGTGGGCAAA CGATTGCTCA	2A 2B GFLV 2AR →	
Vol_2/54_8/7	TCTGTGTGCT GTGCGGATGG TAGAACTACC GGTGGGCAAA CGATTGCTCA		
Vol_2/54_8/6	G CTGTGTGCT GTGCGGATGG G AGAACTACC GGTGGGCAAA CGATTGCTCA	GFLV 2BF →	
	901		950
Vol_2/54_9/8	AGAAGCTGAC CCTTTGCAAC ATAG A GTCAG CATATCAGTA GCCCCCGGTA		
Vol_2/54_8/7	AGAAGCTGAC CCTTTGCAAC ATAGGGTCAG CAT G TCAGTA GCCCCCGGTA		
Vol_2/54_8/6	AGAAGCTG A T CCTTTGCAAC ATAGGGTCAG CAC A TC T G T G GCCCCCGGTA		
	951		1000
Vol_2/54_9/8	GGGCACAATG GATCTCCGAG CGCAGACAGG CTCTGCGAAG GAGAGAGCAA		
Vol_2/54_8/7	GGGCACAATG GATCTCCGAG CGCAGACAGG CTCTGCGAAG GAGAGAGCAA		
Vol_2/54_8/6	GGGCACAATG G GCTCCGAG CGCAGACAGG CTCTGCG T AG GAGAGAGCA G		

Slika 31 (nadaljevanje): Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2, izoliranih iz rastline volovnik 2/54. Nukleotidi potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reče encim StyI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

	1001		1050
Vol_2/54_9/8	GCAAATAGCT	TGCAGGGTCT	TGCTGCTCAG ACTGATATGA CTTTGTAGCA
Vol_2/54_8/7	GCAAATAGCT	TGCAGGGTCT	TGCTGCTCAG ACTGATATGA CTTTGTAGCA
Vol_2/54_8/6	GCAAATAGCC	TGCAGGGCCT	TGCTGCTCAG ACAGACATGA CATTGTAGCA
	1051		1100
Vol_2/54_9/8	GGCCAGGAAC	GCCTATCTTG	GCGCTGCTGA CATGATTGAG CAAGGCCTAC
Vol_2/54_8/7	GGCCAGGAAC	GCCTATCTTG	GCGCTGCTGA CATGATTGAG CAAGGCCTAC
Vol_2/54_8/6	GGCCAGGAAT	GCATATCTTG	GCGCTGCTGA TATGATTGAG CAAGGCCTAC
	1101		1150
Vol_2/54_9/8	CGCTACTTCC	CCCTCTGCGC	AGCGCTTATG CCCTAGGGG CTTGTGGAGG
Vol_2/54_8/7	CGCTACTTCC	CCCTCTGCGC	AGCGCTTATG CCCTAGGGG CTTGTGGAGG
Vol_2/54_8/6	CGCTGCTTCC	CCCTCTACGC	AGCGCATATG CCCTAGGGG TTTGTGGAGG
	1151		1200
Vol_2/54_9/8	GGACCCCTCAA	CCAGAGCCAA	TTACACGCTT GATTTCAGGC TCAATGGTAT
Vol_2/54_8/7	GGACCCCTCAA	CCAGAGCCAA	TTACACGCTT GATTTCAGGC TCAATGGTAT
Vol_2/54_8/6	GGACCCCTTA	CCAGAGCCAA	TTACACATTG GATTTCAGGC TCAATGGTAT
	1201		1250
Vol_2/54_9/8	TCCGACTGGG	ACAAACACAT	TGGAAATATT GTACAATCCC GTGTCGGAAG
Vol_2/54_8/7	TCCGACTGGG	ACAAACACAT	TGGAAATATT GTACAATCCC GTGTCGGAAG
Vol_2/54_8/6	CCCGACTGGG	ACAAATACAT	TAGAAATTTT GTATAATCCC GTGTCGGAAG
	1251		1300
Vol_2/54_9/8	AAGAGATGGA	AGAGTACCGG	GACAGAGGCA TGTGCGCTGT GGTGGTTGAT
Vol_2/54_8/7	AAGAGATGGA	AGAGTACCGG	GACAGAGGCA TGTGCGCTGT GGTGGTTGAT
Vol_2/54_8/6	AGGAAATGGA	AGAGTACTGG	GATAGGGGTA TGTACGCCGT GGTAAATTGAT
	1301		1350
Vol_2/54_9/8	GCGCTAGAAA	TAGCTATAAA	CCC GTTCGCGC ATGCCTGGAA ATCCAACGGA
Vol_2/54_8/7	GCGCTAGAAA	TAGCTATAAA	CCC GTTCGCGC ATGCCTGGAA ATCCAACGGA
Vol_2/54_8/6	GCGCTAGAAA	TAGCGATAAA	TCCATTGGC ATGCCTGGTA ATCCAACGGA
	1351		1400
Vol_2/54_9/8	CTTGACTGTC	GTGGCAACTT	ATGGGCATGA ACGTGATATG GCGCGTGCCT
Vol_2/54_8/7	CTTGACTGTC	GTGGCAACTT	ATGGGCATGA ACGTGATATG GCGCGTGCCT
Vol_2/54_8/6	CTTAAGTGT	GTGGCAACGT	ACGGACATGA GCGTGACATG ACACGTGCCT
	1401		1450
Vol_2/54_9/8	TTATTGGATC	TGCTTCCACA	TTCTTAGGGA ATGGGTTAGC TAGAGCCATT
Vol_2/54_8/7	TTATTGGATC	TGCTTCCACA	TTCTTAGGGA ATGGGTTAGC TAGAGCCATT
Vol_2/54_8/6	TTATTGGTTC	TGCCTCCACT	TTCTTGGGAA ATGGGCTGGC ACGAGCTATT
	1451		1500
Vol_2/54_9/8	TTCTTTCCTG	GCTTGCAATA	TAGTCAGGAG GAACCAAGGC GCGAATCTAT
Vol_2/54_8/7	TTCTTTCCTG	GCTTGCAATA	TAGTCAGGAG GAACCAAGGC GCGAATCTAT
Vol_2/54_8/6	TTCTTTCCTG	GCTTACAATA	TAGTCAGGAG GAACCAAGGC GCGAATCTAT

Slika 31 (nadaljevanje): Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2, izoliranih iz rastline volovnik 2/54. Nukleotidi potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reče encim StyI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

	1501		1550		
Vol_2/54_9/8	AATTCGCCTG	TATGTTGCCT	CTACTAACGC	CACTGTGGAT	ACTGATTCAA
Vol_2/54_8/7	AATTCGCCTG	TATGTTGCCT	CTACTAACGC	CACTGTGGAT	ACTGATTCAA
Vol_2/54_8/6	AATTCGCCTA	TATGTTGCTT	CTACTAATGC	TACTGTAGAC	ACTGATTGAG
	1551		1600		
Vol_2/54_9/8	TCTTGGCGGC	CATTAGTGTT	GGCACCTTGC	GTCAACACGT	TGGCTCCATG
Vol_2/54_8/7	TCTTGGCGGC	CATTAGTGTT	GGCACCTTGC	GTCAACACGT	TGGCTCCATG
Vol_2/54_8/6	TCTTGGCAGC	CATTAGCGTT	GGCACTCTGC	GTCAACACGT	TGGTTCCATG
	1601		1650		
Vol_2/54_9/8	CACTATCGTA	CTGTGGCAAA	TACCGTGCAC	CAGGCCCAGG	TGCAAGGAAC
Vol_2/54_8/7	CACTATCGTA	CTGTGGCGAA	TACCGTGCAC	CAGGCCCAGG	TGCAAGGAAC
Vol_2/54_8/6	CACTATCGAA	CGGTAGCTAG	TACTGTGCAT	CAAGCCCAGG	CGCAAGGTAC
	1651		1700		
Vol_2/54_9/8	GACACTCAGG	GCCACTATGA	TGGGTAATAC	TGTTGTAGTG	TCACCTGAAG
Vol_2/54_8/7	GACACTCAGG	GCCACTATGA	TGGGTAATAC	TGTTGTAGTG	TCACCTGAAG
Vol_2/54_8/6	GGTACTCAGG	GCCACTATGA	TGGGTAATAC	TGTTGTAGTG	TCGCCTGAAG
	1701		1750		
Vol_2/54_9/8	GAAGCCTAGT	CACTGGAACC	CCCGAAGCGA	AAGTCGAAAT	AGGGGGCGGT
Vol_2/54_8/7	GAAGCCTAGT	CACTGGAACC	CCCGAAGCGA	AAGTCGAAAT	AGGGGGCGGT
Vol_2/54_8/6	GAAGCCTAGT	TACTGGGACC	CCTGAAGCGA	GAGTTGAAAT	AGGGGGTGGT
	1751		1800		
Vol_2/54_9/8	TCAAGTATTA	GGATGGTGGG	ACCTCTGCAA	TGGGAGAGTG	TAGAGGAACC
Vol_2/54_8/7	TCAAGTATTA	GGATGGTGGG	ACCTCTGCAA	TGGGAGAGTG	TAGAGGAACC
Vol_2/54_8/6	TCTAGTATCA	GGATGGTAGG	ACCTCTACAA	TGGGAGAGTG	TAGAGGAACC
	1801		1850		
Vol_2/54_9/8	AGGGCAAAC	TTCTCTATCA	GAAGTCGCTC	ACGTTCCGTG	AGGATTGATA
Vol_2/54_8/7	AGGGCGAAC	TTCTCTATCA	GAAGTCGCTC	ACGTTCCGTG	AGGATTGATA
Vol_2/54_8/6	AGGGCAAATC	TTCTCTATCA	GAAGCCGCTC	ACGATCTGTG	AGAATTGATA
	1851		1900		
Vol_2/54_9/8	GAAATGTTGA	TCTTCCTCAA	CTTGAGGCTG	AGCCAGATT	GAGCTCAACC
Vol_2/54_8/7	GAAATGTTGA	TCTTCCTCAA	CTTGAGGCTG	AGCCAGATT	GAGCTCAACC
Vol_2/54_8/6	GAAATGTTGA	TCTTCCTCAA	CTTGAGGCCG	AGCCAGATT	GAGCTCAACC
	1901		1950		
Vol_2/54_9/8	GTGAGGGGAT	TGGCTGGTAG	AGGAGTGATT	TATATTCCCA	AGGATTGCCA
Vol_2/54_8/7	GTGAGGGGAT	TGGCTGGTAG	AGGAGTGATT	TATATTCCCA	AGGATTGCCA
Vol_2/54_8/6	GTGAGAGGAT	TAGCTGGTAG	AGGAGTAGTT	TACATCCCCA	AGGATTGCCA
	1951		2000		
Vol_2/54_9/8	GGCAAATAGG	TACTTGGGCA	CCCTGAATAT	ACGTGATATG	ATTCAGATT
Vol_2/54_8/7	GGCAAATAGG	TACTTGGGCA	CCCTGAATAT	ACGTGATATG	ATTCAGATT
Vol_2/54_8/6	GGCAAACAGG	TACTTAGGCA	CCCTGAACAT	ACGTGATATG	ATTCAGATT

Slika 31 (nadaljevanje): Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2, izoliranih iz rastline volovnik 2/54. Nukleotidi potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reče encim StyI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

	2001		2050
Vol_2/54_9/8	TCAAAGGTGT	TCAGTACGAA AAGTGGATAA CTGCAGGACT AGTCATGCCT	
Vol_2/54_8/7	TCAAAGGTGT	TCAGTACGAA AAGTGGATAA CTGCAGGACT AGTCATGCCT	
Vol_2/54_8/6	TTAAGGGTGT	CCAGTATGAA AAATGGATAA CTGCAGGATT AGTCATGCCT	
	2051		2100
Vol_2/54_9/8	ACCTTTAAGA	TAGTTATTAG GCTACCTGCT AATGCTTTTA CTGGATTGAC	
Vol_2/54_8/7	ACCTTTAAGA	TAGTTATTAG GCTACCTGCT AATGCTTTTA CTGGATTGAC	
Vol_2/54_8/6	ACTTTCAAGA	TAGTTGTTAG GCTACCTGCA AATGCCTTTA CGGGATTAAAC	
	2101		2150
Vol_2/54_9/8	GTGGGTGATG	AGCTTTGACG CTTATAACCG GATAACTAGT AGGATTACTA	
Vol_2/54_8/7	GTGGGTGATG	AGCTTTGACG CTTATAACCG GATAACTAGT AGGATTACTA	
Vol_2/54_8/6	GTGGGTAAATG	AGCTTTGATG CTTACAACCG GATAACTAGT AGAATCACTA	
	2151		2200
Vol_2/54_9/8	CTAGTGCAGA	TCCTGTATAC ACCTTGTGAG ← GFLV 1rv TCCCACACTG GCTTATCCAC	
Vol_2/54_8/7	CTAGTGCAGA	TCCTGTATAC ACCTTGTGAG TCCCACACTG GCTTATCCAC	
Vol_2/54_8/6	CTAGTGCTGA	TCCTGTGTAT ACCCTGTCTG TACCGCATTG GCTTATCCAT	
	2201		2250
Vol_2/54_9/8	CATAAGTTGG	GTACGTTTTTC TTGTGAGGTG GACTACGGAG AGTTGTGTGG	
Vol_2/54_8/7	CATAAGTTGG	GTACGTTTTTC TTGTGAGGTG GACTACGGAG AGTTGTGTGG	
Vol_2/54_8/6	CATAAGTTAG	GCACGTTTTTC TTGTGAGATA GATTATGGAG AATTGTGTGG	
	2251		2300
Vol_2/54_9/8	TCATGCCATG	TAGTTCAAGT CCACAACCTTT TGAATCTCCG AGACTACATT	
Vol_2/54_8/7	TCATGCCATG	TGGTTCAAGT CCACAACCTTT TGAATCTCCG AGACTACATT	
Vol_2/54_8/6	CCATGCAATG	TGGTTTAAAT CCACAACATT TGAGTCTCCA AGGCTACATT	
	2301		2350
Vol_2/54_9/8	TTACGTGTCT	CACTGGCAAC AACAAAGAGC TGGCGGCAGA CTGGCAAGCT	
Vol_2/54_8/7	TTACGTGTCT	CACTGGCAAC AACAAAGAGC TGGCGGCAGA CTGGCAAGCT	
Vol_2/54_8/6	TCACGTGCCT	AACTGGCAAT AATAAAGAGT TGGCAGCAGA CTGGCAAGCT	
	2351		2400
Vol_2/54_9/8	GTCGTAGAGC	TATATGCTGA ATTGGAAGAA GCTACTTCTT TTCTTGGGAA	
Vol_2/54_8/7	GTCGTAGAGC	TATATGCTGA ATTGGAAGAA GCTACTTCTT TTCTTGGGAA	
Vol_2/54_8/6	GTGTGTGAGC	TCTACGCAGA ACTGGAAGAA GCTACATCCT TTCTTGGAAA	
	2401		2450
Vol_2/54_9/8	ACCAACTTTG	GTTTTTGACC CAGGCGTTTT TAATGGCAAA TTCCAATTCC	
Vol_2/54_8/7	ACCAACTTTG	GTTTTTGACC CAGGCGTTTT TAATGGCAAA TTCCAATTCC	
Vol_2/54_8/6	ACCCACCCTTG	GTTTTTGACC CGGGTGTTTT TGATGGCAAA TTTCAGTATT	
	2451		2500
Vol_2/54_9/8	TGACTTGCCC	TCCCATATTC TTTGATCTCA CAGCCGTCAC GGCTCTTAAG	
Vol_2/54_8/7	TGACTTGCCC	TCCCATATTC TTTGATCTCA CAGCCGTCAC GGCTCTTAAG	
Vol_2/54_8/6	TGACTTGCCC	CCCCATATTC TTTGATCTAA CAGCCGTCAC GGCTCTTAAG	

Slika 31 (nadaljevanje): Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2, izoliranih iz rastline volovnik 2/54. Nukleotidi potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reče encim StyI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

	2501		2550
Vol_2/54_9/8	AGTGCTGGGC TGACGTTGGG ACAAGTCCCA ATGGTTGGCA CTACCAAGGT		
Vol_2/54_8/7	AGTGCTGGGC TGACGTTGGG ACAAGTCCCA ATGGTTGGCA CTACCAAGGT		
Vol_2/54_8/6	AGTGCTGGGC TGACGTTGGG CCAAGTTCCA ATGGTTGGCA CTACTAGGGT		
	2551		2600
Vol_2/54_9/8	TTATAATCTA AATAGCACTC TTGTGAGTTG TGTTC TAGGA ATGGGAGGAA		
Vol_2/54_8/7	TTATAATCTA AATAGCACTC TTGTGAGTTG TGTTC TAGGA ATGGGAGGTA		
Vol_2/54_8/6	TTACAACCTA AACAGTACTC TTGTGAGCTG TGTTTTGGGT ATGGGAGGTA		
	2601		2650
Vol_2/54_9/8	CTATTAGGGG AAGGGTGCAC ATTTGTGCGC CAATCTTCTA TAGTATAGTG		
Vol_2/54_8/7	CTATTAGGGG AAGGGTGCAC ATTTGTGCGC CAATCTTCTA TAGTATAGTG		
Vol_2/54_8/6	CTAATAAAGG AAAAGTGCAC ATTTGTGCAC CAATCTTTTA AAGTATTGTT		
	2651		2700
Vol_2/54_9/8	CTGTGGGTTG TGAGTGAGTG GAACGGGACC ACTATGGACT GGAATGAACT		
Vol_2/54_8/7	CTGTGGGTTG TGAGTGAGTG GAACGGGACC ACTATGGACT GGAATGAACT		
Vol_2/54_8/6	TTATGGGTTG TTAGCGAGTG GAACGGGACC ACTATGGACT GGAATGAACT		
	2701		2750
Vol_2/54_9/8	TTTCAAGTAT CCCGGGGTGT ATGTGGAAGA GGACGGAAGT TTTGAAGTTA		
Vol_2/54_8/7	TTTCAAGTAT CCCGGGGTGT ATGTGGAAGA GGACGGAAGT TTTGATGTTA		
Vol_2/54_8/6	TTTCAAATAT CCCGGGGTGT ATGTGGAAGA GGATGGAAGC TTTGAAGTTA		
	2751		2800
Vol_2/54_9/8	AAATTCGCTC TCCATATCAC CGAACGCCCG CTAGATTGCT TGTCGGCCAA		
Vol_2/54_8/7	AAATTCGCTC TCCATATCAC CGAACGCCCG CTAGATTGCT TGTCGGCCAA		
Vol_2/54_8/6	AAATTCGTTC TCCGTATCAC CGGACGCCTG CTAGGTTGCT TGCTGGTCAA		
	2801		2850
Vol_2/54_9/8	AGTCAGAGGG ACATGAGCTC TCTGAATTTT TATGCAATAG CGGGACCTAT		
Vol_2/54_8/7	AGTCAGAGGG ACATGAGCTC TCTGAATTTT TATGCAATAG CGGGACCTAT		
Vol_2/54_8/6	AGCCAGAGGG ATATGAGCTC TCTGAATTTT TATGCAATAG CAGGGCCCAT		
	2851		2900
Vol_2/54_9/8	CGCTCCTTCG GGTGAGACTG CACGACTTCC TATTGTTGTG CAGATCGATG		
Vol_2/54_8/7	CGCTCCTTCG GGTGAGACTG CACGACTTCC TATTGTTGTG CAGATCGATG		
Vol_2/54_8/6	CGCTCCAGCG GGTGAGACTG CCGGACTTCC TGTGTCTGT CAAATTGAGG		
	2901		2950
Vol_2/54_9/8	AGATTGTGCG CCCAGACCTC TCTTTACCAA GTTTTGAAGA TGATTACTTC		
Vol_2/54_8/7	AGATTGTGCG CCCAGACCTC TCTTTACCAA GTTTTGAAGA TGATTACTTC		
Vol_2/54_8/6	AGATTGTTTCG CCCAGACCTC TCCCTACCAA GTTTTGAAGA CGACTATTTT		
	2951		3000
Vol_2/54_9/8	GTGTGGGTAG ACTTTTCTGA GTTTACTCTC GACAAGGAAG AAATTGAGAT		
Vol_2/54_8/7	GTGTGGGTAG ACTTTTCTGA GTTTACTCTC GACAAGAAAG AAATTGAGAT		
Vol_2/54_8/6	GTGTGGGTAG ACTTTTCTGA GTTTACTCTT GATAAGGAAG AAATTGAGAT		

Slika 31 (nadaljevanje): Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2, izoliranih iz rastline volovnik 2/54. Nukleotidi potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reče encim StyI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

	3001		3050
Vol_2/54_9/8	TGGTTCTCGT TTCTTTGATT TCACTTCAAG AACTTGTAGA GTGTCTATGG		
Vol_2/54_8/7	TGGTTCTCGT TTCTTTGATT TCACTTCAAG AACTTGTAGA GTGTCTATGG		
Vol_2/54_8/6	TGGATCTCGT TTCTTTGATT TTA ⁺ CTTCAA ⁺ A TACTTGTAG ⁺ G GTTCTATGG		
	3051		3100
Vol_2/54_9/8	GCGAAAACCC ATTTGCTGCA ATGATTGCTT G ⁺ CCATGGATT GCATAGTGGT		
Vol_2/54_8/7	GCGAAAACCC ATTTGCTGCA ATGATTGCTT G ⁺ CCATGGATT GCATAGTGGT		
Vol_2/54_8/6	GAGAAAACCC ATTTGCTGCA ATGATTGCTT GT ⁺ CATGGATT GCATAGC ⁺ GGT		
	3101		3150
Vol_2/54_9/8	GTCCTGGACC TCAAATTTCA ATGGAGTCTG AACACTGAAT TTGGCAAGAG		
Vol_2/54_8/7	GTCCTGGACC TCAAATTTCA ATGGAGTCTG AACACTGAAT TTGGCAAGAG		
Vol_2/54_8/6	ATATTAGAT ⁺ C TCAAAC ⁺ TCCA GTGGAGTCTA AATAC ⁺ CGAAT TTGGCAAGAG		
	3151		3200
Vol_2/54_9/8	TAGCGGGAGC GTTACCATAA CTAAACTGGT GGGCGATAAA GCCACGGGTC		
Vol_2/54_8/7	TAGCGGGAGC GTTACCATAA CTAAACTGGT GGGCGATAAA GCCACGGGTC		
Vol_2/54_8/6	CAGCGGGAGC GTAACTATT ⁺ A CGAA ⁺ GTGGT GGGT ⁺ GATAAA G ⁺ CCATGGGCT		
	3201		3250
Vol_2/54_9/8	TGGACGGGCC TTCACAGATT TTTGCCCTAC AAAAGCTAGA GGGAGTTTCA		
Vol_2/54_8/7	TGGACGGGCC TTCACAGATT TTTGCCCTAC AAAAGCTAGA GGGAGTTTCA		
Vol_2/54_8/6	TGGATGGGCC ATCT ⁺ CAGGTT TTTGCCATAC GAA ⁺ AACTGGA GGGA ⁺ ACTACA		
	3251		3300
Vol_2/54_9/8	GAGTTGTTGG TTGGGAATTT TGCAGGAGCA AACCCAAATA CTCATTTTTC		
Vol_2/54_8/7	GAGTTGTTGG TTGGGAATTT TGCAGGAGCA AACCCAAATA CTCATTTTTC		
Vol_2/54_8/6	GAATTGTTGA TTGGGAATTT TGCAGGAGCA AATCC ⁺ CAACA CTCATTTCTC		
	3301		3350
Vol_2/54_9/8	TCTCTATAGT CGATGGATGG CAATTAAACT GGATCAAGCT AAGAGTATTA		
Vol_2/54_8/7	TCTCTATAGC CGATGGATGG CAATTAAACT GGATCAAGCT AAGAGTATTA		
Vol_2/54_8/6	CCTCTACAGT CGATGGATGG CAATTAAACT GGATCAAGCA ⁺ AAGAGTATTA		
	3351		3400
Vol_2/54_9/8	AAGTACTCCG CGTTTTATGT AAGCCTCGTC CAGGTTTTAG TTTTATGGA		
Vol_2/54_8/7	AAGTACTCCG CGTTTTATGT AAGCCTCGTC CAGGTTTTAG TTTTATGGA		
Vol_2/54_8/6	AGGTGCTCCG T ⁺ GTTTTGTGT AAGCCTCGTC CAGGTTT ⁺ CAG TTTTATGGA		
	3401	ORF, 2C	3450
Vol_2/54_9/8	AGAACCAGTT TCCCA ⁺ GTCTA GGGTATCTGA CTTTAAAAGA CCCAAGTGTA		
Vol_2/54_8/7	AGAACCAGTT TCCCA ⁺ GTCTA GGGTATCTGA CTTTAAAAGA CCCAAGTGTA		
Vol_2/54_8/6	AGAACCAGCT TCCCA ⁺ GTCTA GGGTATCAGA CTTTAAAAGA CCCAAGTGTA		
	3451	EV00N1	3469
Vol_2/54_9/8	TATATGTGTC TAGATAGTC		
Vol_2/54_8/7	TATATGTGTC TAGATAGTC		
Vol_2/54_8/6	TATATGTGTC TAGATAGTC		

Slika 31 (nadaljevanje): Poravnava treh nukleotidnih zaporedij RNA2, izoliranih iz rastline volovnik 2/54. Nukleotidi potemnjeni s sivo, se ujemajo pri vseh treh zaporedjih, obarvani z belo oz. rumeno pa prikazujejo razlike med zaporedji. Z rdečimi črkami so označena zaporedja, znotraj katerih reže encim EcoRI, z modrimi črkami pa zaporedja, znotraj katerih reče encim StylI. Rdeče usmerjene puščice nakazujejo začetek in konec bralnega okvirja (ORF) ter tudi obseg posameznih genov (2A, 2B in 2C). Vijolične puščice označujejo mesto naleganja začetnih oligonukleotidov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Test ELISA

Test ELISA ima številne dobre lastnosti: je poceni, hiter in občutljiv; vendar pri nekaterih virusih ne daje povsem zanesljivih rezultatov.

Ker so pri virusih GLRaV-6 in GVB, pri katerih smo imeli le pozitivno kontrolo proizvajalca, določeni vzorci pokazali zelo rahlo povišane vrednosti šele po 18 urah po dodatku substrata, kar pa ni zanesljiv dokaz, da je virus res prisoten, smo zaključili, da so vsi testirani vzorci negativni. Možni vzroki za povišane vrednosti so lahko navzkrižne reakcije z drugimi manj pogostimi virusi vinske trte, katerih prisotnosti nismo testirali, ali pa tudi nizke koncentracije iskanih virusov. Prisotnost obeh virusov, GLRaV-6 in GVB, bi bilo potrebno preveriti z bolj občutljivimi metodami (Western-Blot, RT-PCR). Enako velja tudi za virus RSPaV.

Pri dokazovanju GFLV s testom ELISA smo pri testiranju rozg dobili občutno nižje spektrofotometrične vrednosti vzorcev, pozitivnih na virus, kot pa pri testiranju mladih listov. Ob upoštevanju, da rastlinski material pri testiranjih ni bil razredčen v pufru v enakem razmerju, ampak z manjšimi razlikami in da so bile razlike v spektrofotometričnih vrednostih precej večje, smo zaključili, da so listi mladih poganjkov, na katerih so tudi bolezenska znamenja najbolj očitna, bolj primeren rastlinski material od zimskih rozg za dokazovanje virusa GFLV s testom ELISA.

Pri petih trsih (sorte chardonnay in refošk), pri katerih smo virus GFLV dokazali junija, medtem ko ga januarja nismo zaznali, je razlog za neskladje verjetno prerazporejanje GFLV v rastlini ali nizke koncentracije virusa pod mejo zaznave s testom ELISA. Našteto potrjuje dejstvo, da so najbolj primeren rastlinski material za dokazovanje GFLV sveži listi mladice vinske trte.

5.1.2 Bolezenska znamenja, fenofaze in genotipske variante GFLV

Pri opazovanju bolezenskih znamenj, ki jih pripisujejo okužbi z virusom GFLV, nas je zanimalo predvsem njihovo izražanje na različnih sortah, po drugi strani pa morebiten vpliv različnih genotipskih variant oz. restriksijskih tipov virusa GFLV na izražanje bolezenskih znamenj.

Rastni sezoni vinske trte, leta 2004 in 2005, sta bili meteorološko dokaj različni. Klimatske razmere spomladi so bile v obeh letih v mejah dolgoletnega povprečja. Poletje leta 2004 je

bilo bolj sušno in vroče, leta 2005 pa je bilo hladnejše in precej bolj deževno. To pojasni manjše razlike v izražanju bolezenskih znamenj pri posameznih trsih med obema letoma. Med drugim je verjetno to tudi razlog, da za razliko od leta 2004 v letu 2005 nismo opazili rumenenj medžilnih prostorov listov v obliki obročev ali krogov ter bifurkacij na medčlenkih.

Razlik med fenofazami med trsi ene sorte nismo zaznali, smo pa zaznali razlike med različnimi sortami znotraj enega vinograda. Verjetno bi morali za iskanje odstopanj v poteku rastnih faz vinske trte znotraj ene sorte trse opazovati v krajših časovnih intervalih.

Naš prvotni namen je bil opazovanje bolezenskih znamenj na trsih posamezne sorte vinske trte, okuženih samo z GFLV, v primerjavi z zdravimi rastlinami iste sorte. Trse, okužene le z GFLV, smo lahko primerjali z zdravimi trsi iste sorte le pri treh sortah: števerjana, rečigla in refošk in še pri teh na razmeroma nizkem številu trsov. Zato smo spremljali bolezenska znamenja na vseh trsih, ki so bili okuženi le z GFLV, pri tistih sortah, pri katerih za primerjavo nismo našli zdravih trsov, pa smo za primerjavo izbrali trse iste sorte okužene z drugimi virusi ali njihovimi kombinacijami. Tako smo spremljali tudi znamenja, ki jih povzroča okužba z drugimi virusi vinske trte.

Noben izmed trsov sorte števerjana, ki so bili okuženi le z GFLV ni izražal nobenih opazovanih bolezenskih znamenj. Iz tega lahko predvidevamo, da je sorta števerjana morda tolerantna na okužbo z virusom GFLV. Ker smo pri dveh trsih sorte števerjana za gen 2A in 2B potrdili enake restriksijske tipe, pri drugih dveh trsih pa restriksijskih tipov nismo določili, je možen vzrok za odsotnost bolezenskih znamenj pri omenjeni sorti tudi ta, da ta vsebuje blago genotipsko varianto GFLV.

Pri sorti rečigla smo tako pri zdravem kot tudi pri le z GFLV okuženem trsu zaznali krajšanje medčlenkov. Možno je, da pri zdravem trsu, pri katerem smo opazili kratke medčlenke, virusa nismo zaznali zaradi nezaznavno nizke koncentracije virusa. Ker pa smo test ELISA ponovili dvakrat v sezoni in ker so bili junija spektrofotometrični odčitki pri vseh ostalih vzorcih razmeroma visoki je veliko bolj verjetno, da krajšanje medčlenkov pri sorti rečigla ni bolezensko znamenje, ki ga povzroča okužba z GFLV. Pri sorti rečigla je krajšanje medčlenkov lahko sortna značilnost, lahko pa je tudi posledica močne burje med intenzivno rastjo trte (Tomažič, osebna komunikacija).

Osipanje jagod smo zasledili pri 14 le z GFLV okuženimi trsi ter tudi pri 3 zdravih trsih sorte refošk. Osipanje jagod je pri sorti refošk lahko posledica okužbe z GFLV, lahko pa so vzrok za obsežno osipanje jagod tudi neugodne razmere v času cvetenja (Tomažič, 1999). Vršič in Lešnik (2005) pa navajata, da je za manjši pridelek kot posledico osipanja jagod in slabšo odpornost trte proti boleznim lahko krivo tudi pretirano gnojenje trte.

Zanimivo je tudi, da osipanja jagod nismo zaznali pri trsih sorte refošk, ki so bili okuženi s kombinacijo virusov GFLV, GLRaV-1 in GVA. To je lahko posledica kombinacije dveh ali celo vseh treh omenjenih virusov. Pojava osipanja jagod nismo opazili tudi pri dveh trsih sorte Malvazija, ki sta bila oba okužena z GFLV, GLRaV-3 in GVA. Oba primera nakazujeta na to, da ni nujno, da se večje število virusov prisotnih v eni rastlini izraža z večjim številom bolezenskih znamenj, temveč je možno, da pri posamezni sorti ne pride do izražanja določenih znamenj.

Majhne jagode, majhni in redkejši grozdi ter rumenenje listov v obliki pik so bolezenska znamenja, ki jih okužba z GFLV povzroča pri sorti refošk, saj so se pojavila le na trsih, ki so vsebovali samo GFLV. Tudi pojav viličaste rasti in kratkih medčlenkov na poganjkih pri sorti refošk lahko pripišemo okužbi s preučevanim virusom. Resda so se omenjena znamenja v sezoni 2005 pojavila le na enem trsu, so se pa pri vsaj treh pojavila tudi v sezoni 2004.

Pri sortah volovnik in cividin smo opazili razmeroma veliko število bolezenskih znamenj. Problem, na katerega smo naleteli pri teh dveh sortah, je bila odsotnost zdravih trsov, zaradi česar nismo mogli določiti, katere so ampelografske značilnosti teh dveh sort in kaj bolezenska znamenja, ki jih povzroča GFLV. Verjetno pa lahko večino deformacij pri sorti volovnik, vidnih na poganjkih (bifurkacija na členkih, kratki medčlenki, dvojni členki, zraslost poganjkov, ploščata stebila, cikcakasta in metlasta rast), na listih (nesimetrični listi, kloroze medžilnih prostorov listov v obliki pik ali lis) in na grozdih (redkejši grozdi ali odsotnost grozdov) pripišemo okužbi z virusom GFLV. Podobno so tudi pri sorti cividin bolezenska znamenja, ki smo jih zaznali (bifurkacija na členku, kratki medčlenki, zraslost poganjkov, ploščata stebila, cikcakasta in metlasta rast, nesimetrični listi, kloroze medžilnih prostorov listov v obliki lis in odsotnost pridelka), verjetno v veliki meri posledica okužbe z GFLV in ne ampelografske značilnosti sorte.

Težava z odsotnostjo zdravih kontrol se je pojavila tudi pri sortah župlanka in chardonnay, ker pa smo pri njih opazili več bolezenskih znamenj, ki naj bi jih povzročal GFLV, smo zaključili, da sta obe zelo občutljivi na virus GFLV. Nasploh največ različnih bolezenskih znamenj na listih (pahljačasti in peteršiljasti listi, pikčasto rumenenje med žilami listov) in poganjkih (viličasta rast poganjkov, kratki medčlenki, dvojni členki, razbrazdanje stebila žlahtnega dela, manjši in gosti listi, ter grmast videz trsa), ki so bila verjetno posledica okužbe z GFLV, smo opazili pri sorti župlanka. Pri sorti chardonnay pa smo zaznali pojav še večjega števila bolezenskih znamenj pri trsih, ki so bili poleg z GFLV okuženi še z več virusi hkrati, kot pa pri trsu, ki je vseboval le GFLV. Morda v tem primeru pride, nasprotno od zaviralnega učinka dveh sorodnih virusov ArMV in GFLV, kot je uspel dokazati Huss in sod. (1989), do medsebojnega sodelovanja GFLV z drugimi nesorodnimi virusi in posledično izražanja večjega števila bolezenskih znamenj. Pri obeh omenjenih sortah smo opazili tudi razbrazdanje lesa na trsih okuženih le z virusom GFLV, a ker se to

znamenje pojavlja res redko in ker ga izmed številnih avtorjev virusu GFLV pripisujejo le Hewit in sodelavci (1970), dopuščamo možnost, da na pojav tega bolezenskega znamenja poleg GFLV vpliva še kak drug biotski ali celo abiotski dejavnik.

Glede na to, da smo tako pri trsih z večjim številom restrikcijskih tipov oz. genotipskih variant virusa GFLV kot tudi pri trsih z eno samo genotipsko varianto pri eni sorti zasledili podobno število znamenj, lahko trdimo, da več genotipskih variant virusa ne vpliva na izražanje več bolezenskih znamenj. Poleg tega podobna znamenja pri posameznih sortah kažejo na to, da so bolezenska znamenja bolj odvisna od občutljivosti sort kot pa od genotipskih variant GFLV. Res pa je tudi, da so genotipske variante bolj podobne znotraj sort kot med sortami, kar je verjetno posledica skupnih prednikov rastlin ene sorte, pri katerih so bili virusi verjetno dalj časa izolirani in se niso prenašali z nematodami med različnimi sortami. Zares smo prisotnost ogorčice *Xipxinema index* potrdili le v vinogradu v Dutovljah, v ostalih vinogradih pa ogorčic nismo zasledili (Vojvoda, 2005).

Našteta znamenja pri določeni sorti so verjetno res posledica okužbe z GFLV, vendar pri nekaterih sortah ne moremo trditi, da smo zares našli vsa bolezenska znamenja, ki jih virus povzroča. Za take zaključke bi morali v raziskavo vključiti večje število trsov posamezne sorte ter jih primerjati z zdravimi rastlinami. H kompleksnosti preučevanja bolezenskih znamenj v naravi pripomorejo tudi vsako leto spreminjajoči se vplivi okolja (klimatske razmere, pomanjkanje mikroelementov v tleh, uporaba agresivnih pesticidov, okužbe z nevirusnimi povzročitelji bolezni itd.).

5.1.3 Variabilnost GFLV v vzorcih trsov sorte volovnik iz vinograda v Ložah

V 11 trsih sorte volovnik smo našli 9 različnih restrikcijskih tipov gena 2C po rezanju z encimom StyI, v predhodnih raziskavah pa so našli 4 različne restrikcijske tipe gena 2A in le 1 restrikcijski tip gena 2B po rezanju z encimom StyI (Vojvoda, 2005). To se v skladu z že večkrat dokazano veliko variabilnostjo virusa GFLV na področju gena za plašni protein na nukleotidnem nivoju (Naraghi-Arani, 2000; Vigne in sod., 2003, Vigne in sod., 2004; Klarić, 2004)

Enako, kot so v predhodnih raziskavah potrdili za gen 2A, smo tudi za gen 2C pri večini vzorcev potrdili prisotnost večjega števila različnih restrikcijskih tipov v posamezni rastlini.

Obstaja tudi možnost, da pri določenih rastlinah, predvsem pri tistih, ki so bile okužene z večimi genotipskimi variantami hkrati, nismo zaznali vseh restrikcijskih tipov za gen 2C, saj so določene genotipske variante virusa v rastlinah lahko prisotne v zelo nizkih koncentracijah, poleg tega pa so bili restrikcijski vzorci na gelih po analizi RFLP zares kompleksni, v plazmide pa smo uspeli ujeti le po 1 do 3 genotipske variante.

5.1.4 Določanje nukleotidnih zaporedij

Glede na veliko število belih kolonij pri modro-belem testu je bilo število plazmidov, ki so vsebovali virusni fragment RNA2 želene velikosti (3463–3469 bp), relativno majhno. Pred ligacijo insertov v plazmid smo iz gela izolirali le inserte ustreznih velikosti, zato vzrok za prisotnost plazmidov z manjšim insertom ni znan. Morda pride nekje v postopku ligacije ali transformacije do rekombinacije in izrezovanja dela virusne RNA2, kar posledično privede do manjših vključkov v plazmidu.

Z določitvijo nukleotidnih zaporedij in simulacijo restrikcije genov smo ugotovili, da z analizo RFLP dobimo zelo natančne podatke o restrikcijskih mestih in posledično restrikcijskih tipih. To še posebej velja za gena 2A in 2B, pri katerih je število vseh možnih restrikcijskih tipov manjše kot pri genu 2C.

Vse restrikcijske tipe za gen 2B in 2C, ki smo jih dokazali s simulacijo rezanja dobljenih nukleotidnih zaporedij, smo zaznali tudi iz slike gelov po analizi RFLP. Za gen 2A smo pri dveh rastlinah s pomočjo nukleotidnih zaporedij dokazali dodatno še en restrikcijski tip (H), ki ga z RFLP nismo zaznali. Verjetno je bil omenjen restrikcijski tip v vzorcu obeh rastlin prisoten v zelo majhnih koncentracijah ter zato na sliki gela po analizi RFLP ni bil zaznaven.

Z nukleotidnimi zaporedji nismo zajeli vseh možnih restrikcijskih tipov, ki smo jih zaznali z analizo RFLP. Vzroke lahko iščemo v omejenem številu fragmentov, ki smo jih poslali na določanje nukleotidnega zaporedja.

Pri 28 genotipskih variantah smo na nukleotidnem nivoju za RNA2 ugotovili največ 11,9 % variabilnost. Glede na to, da smo za nukleotidna zaporedja pri genih 2A in 2C znotraj posameznih restrikcijskih tipov po rezanju s StyI dokazali variabilnost manjšo od 2 % lahko trdimo, da nam analiza RFLP poda zadovoljive podatke o genotipski variabilnosti na nivoju posameznega gena. S tem potrdimo tudi ustreznost izbire encima StyI za ugotavljanje variabilnosti genov 2A in 2C z RFLP. Pri poravnani nukleotidnih zaporedij dela, kjer se nahaja gen 2B, smo znotraj enega in edinega restrikcijskega tipa (A), torej vseh 28 zaporedij, zaznali kar 10,9 % variabilnost. To pomeni, da encim StyI ni ustrezen za oceno variabilnosti gena 2B.

Enako kot Vigne in sod (2005) pri preučevanju virusa GFLV v Franciji, smo tudi v Sloveniji ugotovili, da izmed treh genov 2A, 2B in 2C velikost v baznih parih (771 ali 774 bp) najbolj variira pri genu 2A.

Ugotovili smo, da nam analiza RFLP z uporabo encima StyI poda dobro oceno o variabilnosti posameznih genov, še posebno genov 2A in 2C, z njo pa ne moremo dobiti

podatka o številu genotipskih variant. Ne pove nam namreč, kateri restrikcijski tip gena 2A pripada isti RNA2 kot določen restrikcijski tip gena 2C in obratno. Ta podatek lahko pridobimo le z določanjem nukleotidnega zaporedja celotne RNA2 oz. njene kodirajoče regije.

Potrebno se je zavedati, da navedeni podatki in ugotovitve veljajo le za nukleotidni nivo zaporedij, ne pa tudi za aminokislinski, na katerem je variabilnost običajno manjša.

5.2 SKLEPI

Pri testiranju prisotnosti 10 najpogostejših virusov pri vinski trti s testom ELISA smo potrdili, da je izmed vseh trsov, ki so okuženi z GFLV, dobri dve tretjini takih, ki poleg GFLV vsebujejo še enega ali več drugih virusov. Ugotovili smo tudi, da so listi mladih poganjkov, nabrani spomladi, bolj primeren rastlinski material za dokazovanje virusa GFLV kot olesenele rozge pozimi.

Pri opazovanju bolezenskih znamenj, ki jih pripisujejo okužbi vinske trte z virusom GFLV, smo ugotovili, da se pri različnih sortah izražajo različna znamenja. Bolezenska znamenja so nasploh bolj izrazita pri belih sortah vinske trte, na katerih je poleg znamenj, vidnih na listih in grozdih, tudi več deformacij na poganjkih. Teh je opazno manj pri rdeči sorti refošk, pri kateri so najbolj izrazita bolezenska znamenja na grozdih. Pri nekaterih sortah (števerjana) je okužba z GFLV lahko latentna in zato ne izražajo nobenih bolezenskih znamenj. Opazili smo tudi, da se pri nekaterih sortah (chardonnay) število bolezenskih znamenj občutno poveča, če je rastlina okužena z več različnimi virusi hkrati, pri drugih sortah (refošk, malvazija) pa večje število različnih virusov, ravno nasprotno, povzroči odsotnost določenih bolezenskih znamenj.

Povezav med različnimi restrikcijskimi tipi oz. genotipskimi variantami in določenimi bolezenskimi znamenji na trsih iste sorte, ki so bili okuženi samo z virusom GFLV, nismo potrdili. Tudi število prisotnih genotipskih variant GFLV ni vplivalo na število izraženih bolezenskih znamenj na določenem trsu. Bolezenska znamenja so bolj odvisna od občutljivosti sort kot pa od genotipskih variant GFLV.

Z določitvijo nukleotidnih zaporedij 28 genotipskih variant virusa GFLV smo skladno s predhodnimi analizami RFLP dokazali, da je pri isti sorti vinske trte prisotnih več različnih genotipskih variant GFLV. Dodatno smo potrdili, da z analizo RFLP za gen 2A in 2B dobimo natančne podatke o restrikcijskih mestih encima StyI in posledično restrikcijskih tipih.

S poravnavo nukleotidnih zaporedij 28 genotipskih variant virusa GFLV smo na nivoju RNA2 ugotovili največ 11,9 % variabilnost. Za gen 2A in 2C smo znotraj posameznih restrikcijskih tipov po rezanju s StyI dokazali variabilnost manjšo od 2 %. S tem smo potrdili ustrezno izbiro encima za ta dva gena, trdimo pa lahko tudi da nam analiza RFLP poda dobro oceno o genotipski varibilnosti na nivoju posameznega gena, 2A ali 2C. Za gen 2B smo dokazali veliko varibilnost (do 10,9 %) znotraj edinega restrikcijskega tipa, kar pomeni, da izbira encima StyI pri metodi RFLP ni ustrezna za oceno variabilnosti tega gena.

Z določanjem nukleotidnih zaporedij lahko poleg variabilnosti na nukleotidnem nivoju pridobimo tudi podatke o variabilnosti velikosti posameznih genov kot tudi katere kombinacije restrikcijskih tipov za posamezen gen se zares pojavijo pri določeni genotipski varianti virusa.

6 POVZETEK

Na podlagi predhodnih raziskav smo izbrali 183 trsov različnih sort vinske trte na 7 različnih lokacijah Primorske ter jih s testom ELISA testirali prisotnost 10 najpogostejše prisotnih virusov pri vinski trti. Ugotovili smo, da je izmed vseh trsov, ki so okuženi z GFLV 71 % takih, ki poleg GFLV vsebujejo še enega ali več drugih virusov. V nadaljni izbor trsov pri katerih smo opazovali bolezenska znamenja smo želeli zajeti čim več trsov, ki bi bili okuženi samo z GFLV ter primerjalne trse, ki bi bili bodisi zdravi ali vsaj neokuženi z GFLV. Tako smo za popisovanje bolezenskih znamenj, ki jih pripisujejo okužbi z GFLV izbrali 67 trsov 10 različnih sort. Za večjo zanesljivost rezultatov smo pri teh trsih test ELISA ponovili.

Pri testu ELISA smo pozimi testirali olesenele rozge, spomladi pa liste mladih poganjkov. Izkazalo se je, da so listi poganjkov bolj primeren rastlinski material za dokazovanje virusa GFLV.

Pri popisovanju bolezenskih znamenj smo bili pozorni na vsa znamenja, ki jih različni avtorji pripisujejo okužbi z GFLV, ter tudi nekatera znamenja, za katere literatura navaja, da so posledica okužbe z drugimi virusi, katere smo prav tako potrdili v opazovanih trsih. Domnevali smo, da se na različnih sortah izrazijo različna bolezenska znamenja. To smo zares dokazali, saj se na belih sortah na splošno izraža več bolezenskih znamenj, ki jih pripisujejo okužbi z GFLV, kot pri rdeči sorti refošk. Na belih sortah smo opazili pogoste deformacije poganjkov ter različna bolezenska znamenja na listih in grozdih. Pri rdeči sorti pa so izstopala predvsem bolezenska znamenja, vidna na grozdih, medtem ko je bil pojav deformacij poganjkov bolj izjema kot pravilo. Opazili smo tudi, da je okužba z GFLV pri določenih sortah (števerjana) lahko latentna in zato ne izražajo nobenih bolezenskih znamenj. Pri enih sortah (chardonnay) se je število bolezenskih znamenj občutno povečalo če je bila rastlina okužena z več različnimi virusi hkrati, medtem ko pa je pri drugih sortah (refošk, malvazija) večje število različnih virusov, ravno nasprotno, povzročilo odsotnost določenih bolezenskih znamenj.

Drug namen opazovanja bolezenskih znamenja je bil iskanje morebitnih povezav med različnimi genotipskimi variantami oz. restrikcijskimi tipi in izražanjem določenih bolezenskih znamenj na trsih, ki so bili okuženi samo z GFLV. Omenjene povezave nismo potrdili na nobenem izmed opazovanih trsov. Tudi število prisotnih genotipskih variant v določeni rastlini ni vplivalo na število bolezenskih znamenj, ki se izrazijo. Zaključimo lahko, da se je virus na genetskem oz. nukleotidnem nivoju z rekombinacijami ali mutacijami precej razvijal, biološka raznolikost pa je ostala majhna. Ob upoštevanju dejstva, da so genotipske variante znotraj sort bolj podobne kot med sortami pa velja tudi, da so bolezenska znamenja bolj odvisna od občutljivosti sort kot pa od genotipskih variant GFLV.

Na nivoju nukleinskih kislin smo določili nukleotidno zaporedje 28 genotipskih variant virusa, ki smo jih izolirali iz skupno 9 rastlin sorte volovnik. S tem in predhodnimi analizami RFLP smo potrdili prisotnost več genotipskih variant znotraj ene sorte. Za vseh 28 genotipskih variant smo za RNA2 na nukleotidnem nivoju ugotovili največ 11,9 % variabilnost. Pri poravnavi nukleotidnih zaporedij delov, kjer se nahaja določen gen (2A, 2B ali 2C), za posamezen restrikcijski tip, dobljen na podlagi rezanja z encimom StyI, smo za 2A in 2C dokazali variabilnost manjšo od 2 %, za gen 2B pa celo 10,9 % variabilnost. S tem smo dokazali, da je uporaba encima StyI pri analizi RFLP za gen 2A in 2C ustrezna in dobro opiše variabilnost na nivoju teh dveh genov, za gen 2C pa je raba StyI neustrezna. To vsaj velja za virus GFLV, ki okužuje sorto volovnik.

Z določitvijo nukleotidnih zaporedij smo dokazali tudi variabilnost velikosti gena 2A (771 ali 774 bp), medtem ko sta bili velikosti genov 2B in 2C pri vseh 28 genotipskih variantah enake velikosti merjeno v baznih parih. Z analizo nukleotidnih zaporedij smo pridobili tudi podatek, kateri restrikcijski tipi pri posameznih genih dejansko sestavljajo genotipsko varianto.

7 VIRI

- Aaziz R., Tepfer M. 1999. Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *Journal of General Virology*, 80: 1339-1346
- Alejska M., Kurzynska - Kokorniak A., Broda M., Kierzek R., Figlerowicz M. 2001. How RNA viruses exchange their genetic material. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 2: 391-407
- Alkowni R., 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 the Grapevine (ICVG), 12-17 September, 2003, Locorotondo (Bari), Italy: extended abstracts. Locorotondo, University of Bari: 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: 12-22
- Belin C., Schmitt C., Demangeat G., Komar V., Pinck L., Fuchs M. 2001. Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology*, 291: 161-171
- Belin C., Schmitt C., Gaire F., Walter B., Demangeat G., Pinck L. 1999. The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *Journal of General Virology*, 80: 1347-1356
- Blažina I. 1992. Vzgoja zdravih trsov vinske trte sorte zelen (*Vitis vinifera* L. cv. Zelen) z metodo termoterapije in tkivne kulture. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 92 str.
- Borja M., Rubio T., Scholthof H.B., Jackson A.O. 1999. Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 2: 153-162
- 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.
- Cohn E., Tanne E., Nitzani F.E. 1970. *Xiphinema italiae*, a new vector of grapevine fanleaf virus. *Phytopathology*, 60: 181-182
- Colnarič J. 1980. Vinogradništvo. Ljubljana, Kmečki glas: 270 str.
- Colnarič J., Gregorič J., Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1985. Posebno vinogradništvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 399 str.
- Credi R. 1997. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. *Plant Disease*, 81: 1288-1292

- Das S., Raski D.J. 1969. Effect of grapevine fanleaf virus on the reproduction and the survival of its nematode vector *Xiphinema index* Thorne & Allen. *Journal of Nematology*, 1: 107 Cit. po: Demangeat G., Voisin R., Minot J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95: 1151-1156
- Demangeat G., Voisin R., Minot J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95: 1151-1156
- Drake J. W., Charkesworth B., Charkesworth D., Crow J. F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148: 1667- 1686
- Drake J.W., Holland J.J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 13910- 13913
- Edwardson J. R., Christie R. G., Purcifull D. E., Petersen M. A. 1993. Inclusions in diagnosing plant virus disease. V: *Diagnosis of plant virus diseases*. Matthews R. E. F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 101-128
- Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. 2005. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eight report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 1259 str.
- Fuchs M., Pinck M., Serghini M.A., Ravelonandro M., Walter B., Pinck L. 1989. The nucleotide sequence of satellite RNA in Grapevine fanleaf virus, strain F13. *Journal of General Virology*, 70: 955-962
- Gaire F., Schmitt C., Stussi-Garaud C., Pinck L., Ritzenthaler C. 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, 264: 25-36
- Garau R., Prota V.A., Piredda R., Boscia D., Prota U. 1994. On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A. *Vitis*, 33: 161-163
- Garcia - Arenal F., Fraile A., Malpica J. M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6: 225-232
- Garnsey S.M., Cambra M. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). V: *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Martelli G.P. (ed). Rome (Italy), FAO: 140-152
- Gonsalves D. 2002. "Protitelesa proti virusu RSPaV". Geneva, ZDA, Cornell University NYSAS, Department of Plant Pathology (osebni vir, 2002)
- Goszczynski D.E., Jooste A.E.C. 2003. Identification of grapevines infected with divergent variants of Grapevine virus A using variant-specific RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 112: 157-164
- Gutierrez Aguirre I. 2006. "Genska raznolikost virusa GFLV". Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Ion.Gutierrez@nib.si (osebni vir, 2006)

- Hans F., Pinck M., Pinck L. 1993. Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf nepovirus (strain F13). *Biochimie*, 75, 7: 597-603
- Hewitt W.B., Martelli G., Dias H.F., Taylor R.H. 1970. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=28> (februar 2006): 6 str.
- Hewitt W.B., Raski D.J., Goheen A.C. 1985. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* 48: 586-595 Cit. po: Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 3: 183-195
- Horvath J. 1993. Host plants in diagnosis. V: *Diagnosis of plant virus diseases*. Matthews R.E.F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 15-48
- Huss B., Walter B., Fuchs M. 1989. Cross- protection between arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Applied Biology*, 114: 45- 60
- Jerman I., Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, Študentska založba: 129 str.
- Klarič M. 2004. Polimorfizem plaščnega proteina pri virusu pahljačaste deformiranosti lista vinske trte (GFLV). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 52 str.
- Koren S., Avšič-Županc T. 1998. Virusna genetika in izvor virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 37-47
- Kurstak E. 1981. *Handbook of plant virus infections comparative diagnosis*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier: 943 str.
- Lai M.M.C. 1995. Recombination and its evolutionary effects on viurses with RNA genomes. V: *Molecular basis of virus evolution*. Gibbs A., Calisher C.H., Garcia-Arenal F. (eds.) Cambridge, Cambridge University Press: 119-132
- Laporte C., Vetter G., Loudes A.M., Robinson D.G., Hillmer S., Stussi-Garaud C., Ritzenthaler C. 2003. Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, 15: 2058-2075
- Maček J. 1986. Posebna fiopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Malpica J. M., Fraile A., Moreno I., Obies C. I., Drake J. W., Garcia – Arenal F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics*, 162: 1505-1511
- Martelli G.P. 1993. Rugose wood complex. V: *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Martelli G.P. (ed). Rome (Italy), FAO: 45-53

- Martelli G.P. 2003. Grapevine virology highlights 2000-2003. V: 14th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 12-17 September, 2003, Locorotondo (Bari), Italy: extended abstracts. Locorotondo, University of Bari: 3-10
- Martelli G.P., 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., 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 2006): 15 str.
- Masuta C. 2002. Recombination in plant RNA viruses. V: Plant viruses as molecular pathogens. Khan J. A., Dijkstra J. (eds.). New York, Food Products Press: 203-224
- Mavrič I., Ravnika M. 1998. Uporaba imunske elektronske mikroskopije v rastlinski virologiji. V: Zbornik posveta kmetijstvo in okolje. Bled, 12 in 13. marec 1998. Rečnik M., Verbič J. (ur). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 331-336
- Meng B., Zhu H.Y., Gonsalves D. 1999. Rupestris stem pitting associated virus-1 consists of a family of sequence variants. Archives of Virology, 144: 2071-2085
- Minafra A. 2000. Rugose wood of grapevines. V: 13th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Adelaide (Australia), 12-17 March, 2000. Adelaide, University of Adelaide: 30-35
- Moya A., Elena S. F., Bracho A., Miralles R., Barrio E. 2000. The evolution of RNA viruses: A population genetics view. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 13: 6967-6973
- Murant A.F. 1970. Descriptions of plant viruses. Arabis mosaic virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=16> (februar 2006): 6str.
- Nagy P.D., Bujarski J.J. 1995. Efficient system of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: Sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. Journal of Virology, 69: 131-140
- Naraghi - Arani P. 2000. Analysis of the genomic complexity of grapevine fanleaf nepovirus by PCR and RFLP and the relation of this complexity to symptomatology. Thesis. Davis, University of California: 187 str.
- Naraghi - Arani P., Daubert S., Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. Journal of General Virology, 82: 1792-1795
- Nolasco G., Santos C., Petrovic N., Teixeira Santos M., Cortez I., Fonseca F., Boben J., Nazare Pereira A.M., Sequeira O. 2006. Rupestris stem pitting associated virus isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a highly conserved coat protein. Archives of Virology, 151: 83-96
- Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. Compendium of grape diseases. 4th ed. St.Paul, The American Phytopathological Society Press: 93 str.

- Petrovič N., Boben J., Ravnikar M. 2004. Laboratorijsko testiranje trsnih rumenic v Sloveniji kaže na splošno prisotnost rumenice tipa počrnelosti lesa. *Acta Agriculturae Slovenica*, 83-2: 313-322
- Pinck L., Fuchs M., Pinck M., Ravelonandro M., Walter B. 1988. A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. *Journal of General Virology*, 69: 233-239
- Pinck L., Reinbolt J., Loudes A.M., Le Ret M., Pinck L. 1991. Primary structure and location of the genome-linked protein (VPg) of grapevine fanleaf nepovirus. *Federation of European Biochemical Societies*, 284, 1: 117-119
- Poljak M. 1998. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129 - 142
- Pravilnik o trženju materiala za vegetativno razmnoževanje trte. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 93: 9719-9735
- Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., Meredith C.P., 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease*, 67: 335-339 Cit. po: Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 3: 183-195
- Ritzenthaler C., Laporte C., Gair F., Dunoyer P., Schmitt C., Duval S., Piequet A., Loudes A. M., Rohfritsch O., Stussi-Garaud C., Pfeiffer P. 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum- derived membranes. *Journal of Virology*, 76, 17: 8808-8819
- Ritzenthaler C., Schmit A.C., Michler P., Stussi-Garaud C., Pinck L. 1995. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules in vivo. *Molecular Plant-Microbe Interactions. American Phytopathological Society*, 8, 3: 379-387
- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M., Pinck L. 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology*, 72: 2357-2356
- Sefc K.M., Leonhardt W., Steinkellner H. 2000. Partial sequence identification of grapevine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *Journal of Virological Methods* 86: 101-106
- Serghini M.A., Fuchs M., Pinck M., Reinbolt J., Walter B., Pinck L. 1990. RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology*, 71: 1433-1441
- Shi B.J., Habili N., Gafny R., Symons R.H. 2004. Extensive variation of sequence within isolates of Grapevine virus B. *Virus Genes*, 29: 279-285
- Szychowski J.A., Wolpert J.A., Semancik J.S. 1995. The vein-banding disease syndrome: A synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus. *Vitis*, 34: 229-232
- Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. 1999. Handbook of plant virus diseases. Boca Raton (Florida), CRC Press: 553 str.

- Taylor C.E., Brown D.J.F., 1997. Nematode vectors of plant viuses. CAB International, Wallingford, U.K. Cit. po: Demangeat G., Voisin R., Minot J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95: 1151-1156
- Tomažič I. 1999. Določanje virusov in njihov vpliv na ampelografske lastnosti vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 96 str.
- Tomažič I. 2002. Raziskava povzročitelja bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (*Vitis* sp.) Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 81 str.
- Tomažič I. 2005. "Biološka raznolikost virusa GFLV". Nova Gorica, Univerza v Novi Gorici, Irma.Tomazic@p-ng.si (osebni vir, 2005)
- Tzeng H.L.C., Chen M.J., Tzeng D.D.S. 1999. Improvement of techniques of purification of leafroll associated closterovirus from affected grapevines and the preparation of antisera for disease indexing. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40: 295-304
- Urek G., Hržič A. 1998. Ogorčice - nevidni zajedalci rastlin, fitonematologija. Ljubljana, samozaložba: 240 str.
- Van Regenmortel M. H. V., Dubs M. C. 1993. Serological procedures. V: *Diagnosis of plant virus diseases*. Matthews R.E.F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 159-214
- Vigne E., Bergdoll M., Guyader S., Fuchs M. 2004b. Population structure and genetic variability within isolates of grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, 85: 2435-2445
- Vigne E., Demangeat G., Komar V., Fuchs M. 2005. Characterization of naturally occurring recombinant isolate of Grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology*, 150: 2241-2255
- Vigne E., Komar V., Fuchs M. 2004a. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research*, 13, 2:165-179
- Viry M., Serghini M.A., Hans F., Ritzenthaler C., Pinck M., Pinck L. 1993. Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *Journal of General Virology*, 74: 169-174
- Vojvoda J. 2005. "Genska raznolikost virusa GFLV". Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Jana.Vojvoda@nib.si (osebni vir, 2005)
- Vojvoda J. 2005. Raznolikost izbranih genov virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 74 str.
- Vrščič S., Lešnik M. 2005. Vinogradništvo. 2. natis. Ljubljana, Kmečki glas: 360 str.
- Xiphinema* spp. 1998. Paris, INRA – L'institut national de la recherche agronomique. <http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/IMAGES/7033390.jpg> (marec 2006)

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem somentorici dr. Maruši Pompe Novak, ki si je vedno vzela čas za nasvete in pomoč pri zagatah praktičnega dela in pri pisanju diplomske naloge ter njen natančen pregled. Prisrčna hvala tudi mentorici prof. dr. Maji Ravnikar za prenekatero razpravo in idejo ter dopolnitve naloge. Hvala obema za prijazne vzpodbude.

Prof. dr. Tatjani Avšič Županc se zahvaljujem za branje diplomske naloge kljub časovni stiski.

Za res prijetno raziskovanje po vinogradih in marsikatero resnico o vinski trti hvala dr. Irmi Tomažič. Brez nje, bi se že tako velik vzorec trt, v katerih smo z ELISA iskali viruse, zdel še večji.

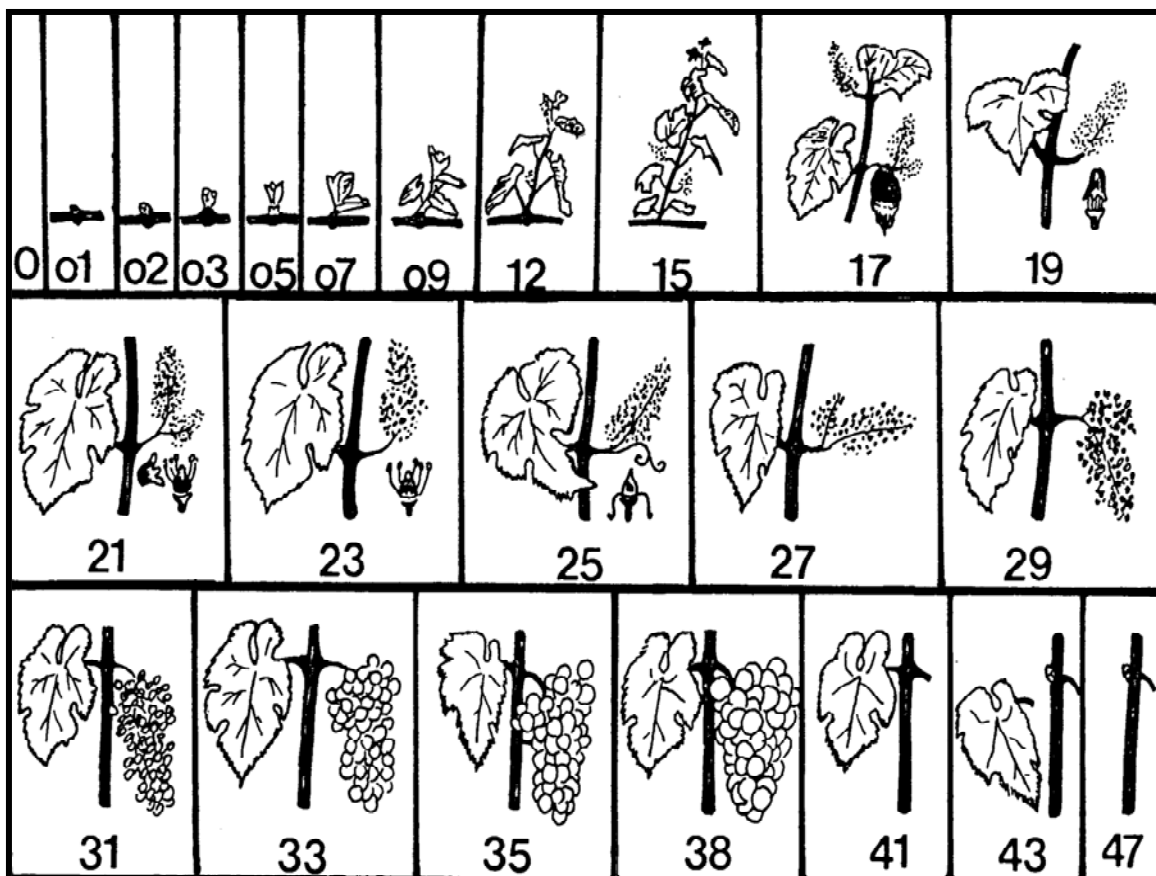
Hvala vsem Nib-ovcem, ki so mi zaupali 1001 laboratorijsko skrivnost, še posebej JaniV za odgovore na moja nešteta vprašanja in Ionu, ki mi je posodil nukleotidna zaporedja, katerih črke so po njegovi zaslugi zares na svojem mestu.

Za tekoč jezik hvala Petru, Mateji za risanje številnih dreves, Urbanu za fotoaparata, Binetu pa za vragolije.

PRILOGE

Priloga A

Fenološki razvojni stadiji vinske trte po sistemu, ki sta ga razvila K. W. Eichhorn, D. H. Lorenz



(00 – neopazovano, 01 – zimsko mirovanje, 02 – napenjanje brstov, 03 – stadij volnenega očesca, 05 – brstenje, 07 – prvi list se razpre, 09 – razviti 2 - 3 lističi, 12 – razvitih 5 - 6 lističev, 15 – kabrniki povečani, 17 – kabrniki polno razviti, 19 – začetek cvetenja, 21 – odpadlo 25 % cvetnih kapic, 23 – odpadlo 80 % cvetnih kapic, 26 – konec cvetenja, 27 – nastavek grozdja, 29 – grozdi se povešajo, 31 – jagode velikosti graha, 33 – začetek zapiranja grozdov, 35 – pričetek barvanja jagod, 38 – polna zrelost trgatev, 41 – končano zorenje lesa, 43 – listje začne odpadati, 47 – konec odpadanja listja)

