

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Urška ČEPIN

**ANALIZA VIRUSA RAZBRAZDANJA LESA RUPESTRISA (RSPaV)
V RASTLINAH IZ RODU VINSKE TRTE (*Vitis* sp.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANALYSIS OF RUPESTRIS STEM PITTING ASSOCIATED VIRUS
(RSPaV) IN PLANTS OF GENUS GRAPEVINE (*Vitis* sp.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

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

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je na seji dne 17. 6. 2005 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Ravnikar in za recenzentko prof. dr. Majo Kovač.

Mentorica: prof. dr. Maja Ravnikar
Recenzentka: prof. dr. Maja Kovač

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marina Dermastia
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: prof. dr. Maja Kovač
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo
in biotehnologijo

Datum zagovora: 11. 9. 2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška Čepin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.76:582.783(043.2)=863
KG	virusi/virus razbrazdanja lesa rupestrisa/RSPaV/vinska trta/ultrastruktura/elektronska mikroskopija
AV	ČEPIN, Urška
SA	RAVNIKAR, Maja (ment.)/KOVAČ, Maja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2006
IN	ANALIZA VIRUSA RAZBRAZDANJA LESA RUPESTRISA (RSPaV) V RASTLINAH IZ RODU VINSKE TRTE (<i>Vitis</i> sp.)
TD	diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	XV, 86 str., 2 pregl., 64 sl., 82 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	<p>Virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV) je najverjetneje povezan z nastankom bolezni razbrazdanja lesa rupestrisa (RSP), vendar še ni dokazano, da je povzročitelj te bolezni. Bolezen RSP povzroča počasnejšo rast vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.), zato so po nekaj letih bolni trsi opazno manjši od zdravih. Najboljši indikator za ugotavljanje bolezni RSP je rupestris (<i>Vitis rupestris</i> Scheele) sorte St. George, ki tvori najbolj izrazite jamice pod cepljenim mestom, kar je znak omenjene bolezni. Cilj diplomskega dela je bil ugotoviti, ali virus RSPaV povzroča ultrastruktурne spremembe na rupestrisu sorte St. George, ki ga okužuje. Za opazovanje smo izbrali zelene dele rastlin, brez vidnih bolezenskih znamenj. Z metodo ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) smo v izbranih rastlinah dokazali odsotnost 9 virusov, ki najpogosteje okužujejo vinsko trto, z metodama RT-PCR (reverse transcription and polymerase chain reaction) in imunsко elektronsko mikroskopijo (immuno electron microscopy, IEM) pa smo analizirali prisotnost RSPaV v izbranih rastlinah rupestrisa sorte St. George. Z metodama RT-PCR in IEM smo potrdili, da lahko virus vedno določimo v floemu stebla rastlin in da v listnih ploskvah ni enakomerno razporejen. Na ultrastruktURNEM nivoju smo na poltankih rezinah opazili zožane ksilemske elemente pri okuženih rupestrisih, v primerjavi z zdravimi. Na ultratankih rezinah smo videli razlike med zdravim in z RSPaV okuženim rupestrisom v mezofilu listov in v zrelih celicah sitastih cevi. V mezofilu smo v okuženih rupestrisih opazili več kloroplastov s podolgovatimi deformacijami, v celicah sitastih cevi pa smo našli stožčaste snope filamentov premera približno 15 nm, filamente premera približno 25 nm, elektronsko gosto snov ob porah sitaste plošče, membranske vključke in večjo količino fibrilarne snovi kot pri zdravih rastlinah. Da bi ugotovili, ali omenjene strukture kodira virus ali rastline, bi bilo potrebno opraviti imunolokalizacijo virusnih proteinov v tkivu rupestrisa.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 578.76:582.783(043.2)=863
CX viruses/Rupestris stem pitting associated virus/RSPaV/grapevine/ultrastructure/electron microscopy
AU ČEPIN, Urška
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/KOVAČ, Maja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2006
TI ANALYSIS OF RUPESTRIS STEM PITTING ASSOCIATED VIRUS (RSPaV) IN PLANTS OF GENUS GRAPEVINE (*Vitis* sp.)
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO XV, 86 p., 2 tab., 64 fig., 82 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV) is most probably affiliated with rupestris stem pitting disease (RSP) although it is not yet proven that RSPaV is its causing agent. RSP disease causes slower growth of grapevine (*Vitis vinifera* L.) which is why infected vines are significantly smaller than healthy ones. The best indicator of RSP is rupestris (*Vitis rupestris* Scheele) cultivar St. George featuring the most distinct pits under inoculation spot. Goal of our research was to determine whether RSPaV causes ultrastructural changes on infected plants. Green parts without signs of disease were selected for examination. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to prove absence of 9 most frequent grapevine viruses. Selected plants of cultivar St. George were analyzed with reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and immuno electron microscopy (IEM) to prove presence of RSPaV. RT-PCR and IEM methods were used to confirm that virus is always detectable in stem phloem and that in leaves it is not evenly distributed. On the ultrastructural level the semi-thin slices showed narrowed xylem elements in infected plants compared to healthy ones. Ultra-thin slices showed differences in leaf mesophyll and mature sieve-tube cells. Mesophyll of infected plants had more chloroplasts with oblong deformations whereas sieve-tube cells showed conical sheaves of filaments of diameter around 15 nm, filaments of diameter around 25 nm, electron-dense material near sieve plate pores, membrane inclusions and larger amount of fibrous material than in healthy plants. To determine whether the structures mentioned above are coded by either the virus or the plant itself would require immunolocalization of virus proteins in rupestris tissues.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	XIII
1 UVOD	1
1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
1.3 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREGLED BOLEZNI VINSKE TRTE	3
2.2 VIRUSI, KI NA VINSKI TRTI POVZROČAJO NAJVEČ ŠKODE.....	5
2.2.1 Rod <i>Nepovirus</i>	5
2.2.2 Rodova <i>Closterovirus</i> in <i>Ampelovirus</i>	6
2.2.3 Rod <i>Maculavirus</i>	7
2.2.4 Rodova <i>Vitivirus</i> in <i>Foveavirus</i>	8
2.3 BOLEZEN RAZBRAZDANJA LESA VINSKE TRTE.....	9
2.3.1 Kober stem grooving	10
2.3.2 Corky bark	10
2.3.3 LN 33 stem grooving	11
2.3.4 Rupestris stem pitting	11
2.4 VIRUS RSPaV	12
2.4.1 Splošne značilnosti virusa RSPaV.....	12
2.4.2 Metode za določanje virusa RSPaV	14
2.4.3 Lokalizacija virusa RSPaV v vinski trti	15
2.5 ULTRASTRUKTURNE SPREMEMBE, KI JIH LAHKO POVZROČAJO VIRUSI NA RASTLINSKEM TKIVU	17
2.5.1 Viroplazme	17
2.5.2 Ultrastrukturne spremembe jedra.....	18
2.5.3 Ultrastrukturne spremembe mitohondrija	20
2.5.4 Ultrastrukturne spremembe citoplazme	21
2.5.5 Ultrastrukturne spremembe kloroplastov.....	27
2.5.6 Ultrastrukturne spremembe vakuole.....	28
2.6 TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA.....	29

2.6.1	Rezine za opazovanje ultrastrukture.....	30
2.6.2	Negativni kontrast	34
3	MATERIALI IN METODE	36
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	36
3.2	ANALIZA VZORCEV	37
3.2.1	ELISA	37
3.2.2	RT-PCR	40
3.2.3	Testiranje prisotnosti RSPaV z elektronskim mikroskopom.....	43
3.3	PRIPRAVA PREPARATOV ZA OPAZOVARJE ULTRASTRUKTURE Z ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM	45
3.3.1	Priprava raztopin	45
3.3.2	Vklapljanje rastlinskega tkiva v smolo Agar 100.....	47
3.3.3	Poltanke rezine.....	48
3.3.4	Ultratanke rezine	49
4	REZULTATI.....	50
4.1	RASTLINSKI MATERIAL	50
4.2	ELISA.....	51
4.3	RT - PCR	52
4.4	IEM.....	54
4.5	POLTANKE REZINE.....	56
4.5.1	Listi zelenega poganjka	56
4.5.2	Stebelo zelenega poganjka	57
4.6	ULTRATANKE REZINE	58
4.6.1	Floem steba zelenega poganjka in listnih žil	58
4.6.2	Mezofil mlajšega in starejšega lista zelenega poganjka	66
4.6.3	Epidermalne celice listov in steba	69
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	70
5.1	RAZPRAVA.....	70
5.2	SKLEPI.....	77
6	POVZETEK	78
7	VIRI	80
	ZAHVALA	86

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam testiranih rupestrisov sorte St. George z rezultati imunske elektronske mikroskopije. (+) pomeni 1 - 3 virusi na 10 - 15 okenc mrežice, (++) pomeni 4 - 7 virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (+++) pomeni 8 in več virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (–) pomeni, da na mrežici nismo našli virusov.

Preglednica 2: Seznam testiranih Refoškov. Rezultati imunske elektronske mikroskopije. (+) pomeni 1 - 3 virusi na 10 - 15 okenc mrežice, (++) pomeni 4 - 7 virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (+++) pomeni 8 in več virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (–) pomeni, da na mrežici nismo našli virusov, (/) pomeni, da teh delov nismo testirali.

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura genoma RSPaV virusa (Gonsalves in Meng, 2000).	13
Slika 2: Virus RSPaV brez dekoracije. Merilo = 100 nm (Petrovič in sod., 2003).....	15
Slika 3: Koreninske celice koruze, okužene z MRDV. Tipična viroplazma s svetlo (L) in temno (D) kontrastiranimi polji. Virusni delci v citoplazmi so lahko v kristalni obliki (Cr) ali pa so naključno razporejeni. Merilo = 1µm (Francki in sod., 1985).	17
Slika 4: Celice listov kapusa, okuženega s CaMV. A, Viroplazma v jedru (P) in virusni delci v citoplazmi. B, Virusni delci v jedru (↑) in viroplazma (P) v citoplazmi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).....	17
Slika 5: Celica lista navadnega fižola, okuženega z BGMV. A, Majhni fibrilarni obroči v jedru v zgodnji fazi okužbe. B, Velik fibrilarni obroč (F) v jedru v pozni fazi okužbe. Jedrce (Ni). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	18
Slika 6: Floemska celica lista rastline krmne pese, okužene z BWYV. Vezikel s fibrilami lociran v prostoru med jedrnima membranama (puščica). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	18
Slika 7: Celica lista boba, okuženega z BBMV, z odstranjenimi ribosomi, tretiran z RNazami. A, Citoplazma zapolnjena z virusnimi delci in vezikulacija zunanje jedrne membrane. Merilo = 500 nm. B, Virusni delci v jedru (↑) in v citoplazmi. Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).....	19
Slika 8: Celica lista rastline <i>Nicotinia clevelandii</i> , okužene z AMV. Virusni delci v citoplazmi (C) in izrazito nagubana površina jedra (N). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	19
Slika 9: Celica sitaste cevi lista korenja, okuženega s CaRLV. Nenormalni mitohondriji z vakuolo in perifernimi vezikli, ki vsebujejo fibrilarno snov (↑). S tretiranjem z RNazami so odstranjeni ribosomi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).....	20
Slika 10: Celica lista navadne kumare, okužene s CV4. Mitohondriji z vezikli nepravilnih oblik in skladovnice virusnih delcev (↑ kažejo prečno prerezane skladovnice). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	20
Slika 11: Celice lista navadnega tobaka, okuženega s TRV (serotip I-II). Uničen mitohondrij, ki ga obkrožajo, a se nanj ne pritrjajo, virusni delci v citoplazmi. Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).....	21
Slika 12: Celica šiške koruze, okužene z OSDV. Virusni delci so lahko vidni v prečnem prerezu kot tubuli (t) ali odprtih zvitki (z) s triplastno strukturo (↑). Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).....	21
Slika 13: Celica lista navadnega kristavca, okuženega s TSWV. Membranski tubuli. Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).....	22
Slika 14: Celica ječmena, okuženega z BSMV. Mikrotelesce, ki vsebije elektronsko gosta polja in paličaste ali ploščate strukture z neznano funkcijo. Virusni delci v citoplazmi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	22
Slika 15: Floemska celica rastline <i>Nicotiana benthamiana</i> , okužene z LIYV. Temne stožčaste strukture so izločki plazmaleme (PLD) in virusi LIYV, ki izgledajo kot filamentozne strukture. Merilo = 0,58 µm. Plazmodezma (P) (Medina in sod., 2005).	22

Slika 16: Listna celica navadnega fižola, okuženega z GaMV. A , Velika multivezikularna telesa v citoplazmi. Merilo = 500 nm. B , Periferne vezikli multivezikularnih teles s fibrilarno snovjo, ki spominja na nukleinske kisline (↑). Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).	23
Slika 17: Listna celica navadnega tobaka, okuženega s PVX. Granulirane plošče prerezane prečno in virusni delci (↑) v citoplazmi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985)...	23
Slika 18: Celice lista navadnega kristavca, okuženega s TSWV. Vezikli z dvojno membrano, med katerima je elektronsko gosta snov. Merilo = 100 nm (Francki in ost., 1985)..	23
Slika 19: Celica lista rastline <i>Nicotiana glutinosa</i> , okužene s PVY. A , Cilindrični vključek odrezan vzdolžno izgleda kot snop (b) in prečno prerezan kot vetrnica (p). B , vetrnica (a) in obroček (s). Merili = 100 nm (Francki in ost., 1985).....	24
Slika 20: Celica lista krmne pese, okužene z BtMV. A , Razvijajoče satelitno telo ob jedru (Nu). B , Starejše satelitno telo z značilnimi vakuolami. C , Skupek tubulov povezan s satelitnim telesom. Merila = 500 nm (Francki in sod., 1985).	24
Slika 21: Celica lista metlike, okužene s SoMV. Virusne specifične fibrile v citoplazmi. (Odstranjeni ribosomi, tretiranje z RNazami). Merilo = 500 nm. (Francki in sod., 1985).....	25
Slika 22: Celica lista boba, okuženega z BBMV. Citoplazma vsebuje polja elektronsko goste amorfne snovi in vezikle s fibrilarno vsebino (↑). S tretiranjem z RNazami so odstranjeni ribosomi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	25
Slika 23: Mezofilna celica lista navadne rukvice, okužene z RaMV. Celica je zapolnjena z mambranskimi vezikli, ki so značilni za okužbo z virusi iz rodu <i>Comovirus</i> . Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).....	26
Slika 24: Rastoča celica sitaste cevi rastline iz rodu <i>Citrus</i> , okužene s CTV. "BYV"-tip veziklov (↑) s fibrilami, ki spominjajo na nukleinske kisline. merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).....	26
Slika 25: Listna celica navadnega graha, okuženega s PEMV. Vezikli s fibrilarno vsebino nastajajo iz jedrne membrane (↑ kažejo nadaljevanje zunanje jedrne membrane z vezikularno membrano). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	26
Slika 26: Mezofilna celica lista kitajskega zelja, okuženega s TYMV. A , Nabrekli in okrogli kloroplasti s številnimi perifernimi vezikli. Merilo = 500 nm. B , Kloroplastni periferni vezikli z dvoplastno membrano in fibrilarno vsebino (↑). Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).....	27
Slika 27: Mezofilna celica navadnega graha, okuženega s KYMV. V pozni fazih okužbe se pokažejo okrogli kloroplasti z velikimi vakuolami in številnimi perifernimi vezikli. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	27
Slika 28: Levo in desno - Celica iz lista rastline <i>Nicotiana clevelandii</i> , okužene s CMV. Manjši kloroplasti s slabo razvitimi granami in majhnimi škrobnimi zrni. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).....	28
Slika 29: Listne celice boba, okuženega z BBMV. Tilakoide kloroplasta so delno razmaknjene. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	28

Slika 30: Listne celice rastline <i>Nicotiana x edwardsonii</i> , okužene s TNV. Majhni vezikli s fibrilarno vsebino, povezani z notranjo površino tonoplasta, ob katerem je ER. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).	28
Slika 31: Prikaz delov zelenega poganjka (□), v katerih smo preverjali prisotnosti virusa z imunsko elektronsko mikroskopijo.	45
Slika 32: Zdrava rastlina rupestrisa sorte St. George 8. A, cela rastlina; B , steblo poganjka; C , starejši list; D , mlajši list.	50
Slika 33: Z RSPaV okužena rastlina rupestrisa St. George 8 (6 II/18). A, cela rastlina; B , stebelo poganjka; C , starejši list; D , mlajši list.	50
Slika 34: Zdrava rastlina rupestrisa sorte St. George 5. A, cela rastlina; B , poganjek s stebelom; C , starejši list; D , mlajši list.	51
Slika 35: Z RSPaV okužena rastlina rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). A, cela rastlina; B , poganjek s stebelom; C , starejši list; D , mlajši list.	51
Slika 36: Elektroforeza produkta PCR na agaroznem gelu, uporabljen par začetnih olugonukleotidov RSP 52 in RSP 53. Rup. pomeni rupestris sorte St. George, števili 5 in 8 predstavljata dva različna izvora rupestrisa, v oklepajih so oznake okuženih rastlin sorte Refošk, ki so bile cepljene na rupestris. M - mlajši listi, L - starejši listi in S - zeleni del steba in nastrgan floem olesenelega dela steba.	52
Slika 37: Elektroforeza produkta PCR na agaroznem gelu, uporabljen par začetnih olugonukleotidov RSP 48 in RSP 49. Rup. pomeni rupestris sorte St. George, števili 5 in 8 predstavljata dva različna izvora rupestrisa, v oklepajih so oznake okuženih rastlin sorte Refošk, ki so bile cepljene na rupestris. M - mlajši listi, L - starejši listi in S - zeleni del steba in nastrgan floem olesenelega dela steba.	53
Slika 38: Virus RSPaV.	54
Slika 39: Levo – Prečni prerez starejšega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5. Desno – Prečni prerez mladega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5.	56
Slika 40: Levo – Prečni prerez žil starejšega lista zdrave rastline rupestrisa sorte St. George 5. Desno – Prečni prerez žil starejšega lista z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44).	57
Slika 41: Levo – Prečni prerez žil steba z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Desno – Prečni prerez žil steba zdrave rastline rupestrisa sorte St. George 5.	57
Slika 42: Snopi filamentoznih struktur (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi steba z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Fibrilarna snov (F), verjetno P-protein, citoplazma (C).	59
Slika 43: Snopi filamentoznih struktur premera ~15 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi steba z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).	60
Slika 44: Snopi filamentoznih struktur premera ~15 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi steba z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).	60
Slika 45: Snopi filamentoznih struktur premera ~25 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi steba z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Citoplazma (C).	61

Slika 46: Snopi filamentoznih struktur premera ~25 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).	61
Slika 47: Snopi filamentoznih struktur (FS) v celici sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44).	62
Slika 48: Floemska celica zdravega rupestrisa sorte St. George 8 z zgoščenimi fibrilarnimi strukturami verjetno iz P-proteina (P). Citoplazma (C), mitohondrij (M), celična stena (S).	62
Slika 49: Zgoščene fibrilarne struktura verjetno iz P-proteina (P) v citoplazmi (C) nezrele floemske celice rupestrisa sorte St. George 8.	63
Slika 50: Floemske celice stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Celica spremljevlka (Cs) z jedrom (J) ob celici sitaste cevi (Si) s fibrilarno snovjo (F). Celična stena (S).	63
Slika 51: Fibrilarna snov (F) v osrednjem delu celice sitaste cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44).	64
Slika 52: Celica sitaste cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Fibrilarna snov (F) potuje skozi pore (Z) sitaste plošče. Membranska struktura ob celični steni (O), citoplazma (C), celična stena (S).	64
Slika 53: Fibrilarna snov (F), ki potuje skozi poro (Z) sitaste plošče med celicami sitaste cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Celična stena (S).	65
Slika 54: Celice sitastih cevi s fibrilarno snovjo (F), ki prehaja skozi pore (Z) sitaste plošče okrog katere je elektronsko gosta snov (G). Žila v steblu z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Celična stena (S).	65
Slika 55: Membranska struktura (O) ob celični steni (S) celice sitaste cevi stebla rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).	66
Slika 56: Celica gobastega tkiva mezofila mladega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5. Kloroplast z velikim škrobnim zrnom (K), mitohondrij (M), citoplazma (C), vakuola, ki vsebuje elektronsko gosto snov (V).	67
Slika 57: Celici palisadnega tkiva starejšega lista z RSPaV okuženega rupesrtisa sorte St. George 8 (6 II/18). Kloroplast z repkom in s škrobnimi zrni (K), citoplazma (C), vakuola polna elektronsko goste snovi (V), jedro (J), celična stena (S).	67
Slika 58: Mezofilni celici starejšega lista z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Kloroplast s škrobnim zrnom (svetlo) in/ali maščobnimi kapljicami (temno) (K), celična stena (S), citoplazma (C), medcelični prostor (Mc).	68
Slika 59: Celica žilnega parenhima starejšega lista z RSPaV okuženega rupestrisa St. George 5 (38 VIII/44). Kloroplast (K) z vidnimi membranami tilakoid, škrobnim zrnom (svetlo) in maščobnimi kapljicami (temno), jedro (J), celična stena (S), citoplazma (C).	68
Slika 60: Levo - Epidermalni celici mladega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5. Celična stena (S). Desno - Epidermalni celici starejšega lista rupestrisa sorte St. George 8. Kloroplast (K) z ovalnim vključkom (Vk), citoplazma (C), celična stena (S), vakuola (V).	69

Slika 61: Floemska parenhimska celica vinske trte sorte <i>Sylvaner</i> z boleznijo RSP. Virusni delci (V) ležijo vzporedno z žilnim snopom (Tzeng in sod., 1993). Celična stena (W).....	72
Slika 62: Virusni delci (V) v jedru (N) okuženih celic. Jedro ima deformirano krpasto obliko in je elektronsko gostejše (Tzeng in sod., 1993). Jedrna membrana (Nm), Celična stena (W).....	73
Slika 63: Veliko tubulov (T) se nahaja med plazmalemo (Pm) in celično steno (W) v floemskih parenhimskih celicah okuženih z RSP. Virusni skupki (V) so med številnimi nenormalnimi vezikli (Ve) (Tzeng in sod., 1993).	73
Slika 64: Razkroj membran (dM) in nenormalno oblikovani vezikli (Ve) v okuženih floemskih celicah (Tzeng in sod., 1993). Virusi (V), celična stena (W), tubuli (T).....	74

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AMV	virus mozaika lucerne (Alfalfa mosaic virus)
APLV	andski latentni virus krompirja (Andean potato latent virus)
ArMV	virus mozaika repnjaka (Arabis mosaic virus)
ASPV	virus razbrazdanja lesa jablane (Apple stem pitting virus)
BBMV	virus progastega mozaika boba (Broad bean mottle virus)
BBSV	virus obarvanja boba (Broad bean stain virus)
BBWV	virus venenja boba (Broad bean wilt virus)
BCMV	virus navadnega mozaika fižola (Bean common mosaic virus)
BGMV	virus zlatega mozaika fižola (Bean golden mosaic virus)
BN	rumenica tipa počnelosti lesa (Bois noir)
BPMV	virus lisavosti plodov fižola (Bean pod mottle virus)
BSMV	virus progastega mozaika ječmena (Barley stripe mosaic virus)
BtMV	virus mozaika pese (Beet mosaic virus)
BWYV	virus zahodne rumenice pese (Beet western yellows virus)
BYMV	virus rumenega mozaika fižola (Bean yellow mosaic virus)
BYV	virus rumenice pese (Beet yellows virus)
CaMV	virus mozaika cvetače (Cauliflower mosaic virus)
CaRLV	virus rdečenja listov korenja (Carrot red leaf virus)
CB	bolezen plutavosti lesa (Corky bark)
CGRMV	virus zelene obročkavosti češnje (Cherry green ring mottle virus)
CMV	virus mozaika kumar (Cucumber mosaic virus)
CP	plaščna beljakovina (coat protein)
CRW	plutavost in razbrazdanje lesa (Corky rugose wood)
CTV	virus citrus tristeza (Citrus tristeza virus)
CV4	kumarični virus 4 (Cucumber virus 4)
CYVV	virus rumenenja žil Clitorie (Clitoria yellow vein virus)
DAS ELISA	metoda dvojnega sendviča ELISA (double antibody sandwich ELISA)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (Deoxy ribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleotidi
ELISA	encimsko imunosorpcijski test (enzyme linked immunosorbent assay)
EMV	virus mozaika jajčevca (Eggplant mosaic virus)
FD	zlata trsna rumenica (Flavescence doree)
FDV	virus Fiji (Fiji disease virus)
FISH	fluorescentna in-situ hibridizacija (fluorescent in situ hybridisation)

GA	glutaraldehid
GaMV	virus mozaika Galinsoge (Galinsoga mosaic virus)
GCBaV	virus počrnelosti lesa vinske trte (Grapevine corky bark-associated virus)
GFkV	Grapevine fleck virus
GFLV	virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus)
GLRaV	virus zvijanja listov vinske trte (Grapevine leafroll associated virus)
GRGV	Grapevine red globe virus
GVA	virus vinske trte A (Grapevine virus A)
GVB	virus vinske trte B (Grapevine virus B)
IEM	imunska elektronska mikroskopija (Immuno electron microscopy)
ISEM	lovljenje virusov s protitelesi (immuno-sorbent electron microscopy, trapping)
KSG	razbrazdanje lesa tipa kober (Kober stem grooving)
KYMV	Kennedy yellow mosaic virus
LIYV	virus infektivnega rumenjenja solate (Lettuce infectious yellows virus)
LNSG	razbrazdanje lesa tipa LN 33 (LN 33 stem grooving)
MBP	beljakovina, ki veže maltozo (maltose binding protein)
MRDV	virus hrapave pritlikavosti koruze (Maize rough dwarf virus)
ORF	bralni okvir (open reading frame)
OSDV	virus sterilne pritlikavosti ovsu (Oat sterile dwarf virus)
PA	paraformaldehid
PB	fosfatni pufer
PEMV	Pea enation mosaic virus
PepMV	virus mozaika pepina (Pepino mosaic virus)
PLRV	virus zvijanja listov krompirja (Potato leafroll virus)
PTA ELISA	plate trapped antigen ELISA
PVP	polivinil-pirolidin
PVX	krompirjev virus X (Potato virus X)
PVY	krompirjev virus Y (Potato virus Y)
RaMV	Radish mosaic virus
RCNMV	virus nekrotičnega mozaika rdeče detelje (Red clover necrotic mosaic virus)
RNA	ribonukleinska kislina (Ribonucleic acid)
RSP	razbrazdanje na rupestrisu (Rupestris stem pitting)
RSPaV	virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus) =
GRSPaV	
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (reverse transcription and polymerase chain reaction)

RW	razbrazdanje lesa vinske trte (Grapevine rugose wood desease)
SBMV	Southern bean mosaic virus
SCMV	virus mozaika sladkornega trsa (Sugarcane mosaic virus)
SoMV	Sowbane mosaic virus
SqMV	virus mozaika buč (Squash mosaic virus)
Taq	polimeraza iz organizma <i>Thermophilus aquaticus</i>
TAV	virus aspermije paradižnika (Tomato aspermy virus)
TBSV	virus razraščanja in pritlikavosti paradižnika (Tomato bushy stunt virus)
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija (transmission electron microscopy)
TNV	virus nekroze tobaka (Tobacco necrosis virus)
TRSV	virus obročaste gnilobe tobaka (Tobacco ringspot virus)
TRV	Tobacco rattle virus
TSWV	virus pegavosti in uvelosti paradižnika (Tomato spotted wilt virus)
TYMV	virus rumenega mozaika repe (Turnip yellow mosaic virus)
U-Ac	uranil-acetat
VTMoV	Velvet tobacco mottle virus
WMV1	virus rumenega mozaika bučk 1 (Watermelon mosaic virus 1)

1 UVOD

1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE

Za virusne bolezni na vinski trti (*Vitis vinifera* L.) je značilen kompleks bolezenskih sprememb, ki so odvisne od vrste virusa ali kombinacije več virusov, od rastline in tudi od okolja. Virusne bolezni vinske trte so pomembne iz gospodarskega vidika, saj vplivajo na količino in kakovost pridelka.

Še poseben problem predstavljajo povzročitelji bolezni, ki povzročajo razbrazdanje lesa vinske trte (Grapevine rugose wood desease, RW) in posledično propadanje trsov. Bolezen RW, tipa razbrazdanje na rupestrisu (Rupestris stem pitting, RSP), povzroča počasnejšo rast žlahtne trte, zato so po nekaj letih bolni trsi opazno manjši od zdravih. Na lesu bolnih trsov se po 2 - 3 letih po okužbi pojavi majhne jamice in brazde pod cepljenim mestom. Najboljši indikator za ugotavljanje bolezni RSP je rupestris (*Vitis rupestris* Scheele) sorte St. George, ki tvori najbolj izrazite jamice. S to boleznijo povezujejo virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV) iz rodu *Foveavirus*, ki je zelo razširjen. Ni še dokazov, da je RSPaV povzročitelj bolezni razbrazdanja lesa, vendar je možen kandidat za nastanek omenjene bolezni. Na nastanek bolezenskih znamenj (tudi pri indikatorjih) lahko poleg okužbe vplivajo tudi drugi, za enkrat še nepoznani dejavniki. Virus RSPaV na listih vinske trte ne povzroča vidnih bolezenskih znamenj.

Lokalizacija RSPaV v celicah okuženih rastlin je bila do sedaj le bežno opisana, prav tako ne poznamo sprememb v ultrastrukturi, ki se morda pojavljajo v okuženih celicah in nam lahko posredujejo informacije, pomembne za lažjo razlago interakcije med virusom in rastlino ter potekom bolezni.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Raziskave bomo opravili na vinski trti (*Vitis vinifera* L.) za katero vemo, da na zelenih delih rastline RSPaV ne povzroča bolezenskih znamenj, kot tudi na rupestrisu (*Vitis rupestris* Scheele) sorte St. George, kjer so znamenja pogosto prisotna na olesenelem steblu. Kot začetni material za opazovanje bomo uporabili zelene dele rastlin, kjer ni opaznih vidnih bolezenskih znamenj. Pričakujemo da bo količina virusnih delcev nizka in da bo virus težko detektirati.

Na podlagi dosedanjih raziskav predvidevamo, da bomo virus zasledili vsaj v floemu mladih poganjkov in listov, kjer je do sedaj dokazana najvišja koncentracija virusa.

Kljub predvideni nizki količini virusa pa pričakujemo, da bomo z opazovanjem ultratankih rezin z elektronskim mikroskopom identificirali morebitne spremembe v ultrastrukturi rastlin iz rodu vinske trte, okuženih z RSPaV.

1.3 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela:

- je izbrati ustrezne rastline vinske trte sorte Refošk in rupestrisa sorte St. George za analize RSPaV,
- ugotoviti v katerih delih okuženega rastlinskega tkiva lahko določimo največjo količino virusa
- in na podlagi tega izbrati primerne dele rastline za ugotavljanje morebitnih sprememb v ultrastrukturi okuženih rastlin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREGLED BOLEZNI VINSKE TRTE

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

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 pojavi tudi bolezenska znamenja, ki jih povzročajo abiotski dejavniki, kot so neravnotežje hranil, okoljski stres ali kemična toksičnost (Pearson in Goheen, 1998).

Znamenja okužb pri glivičnih boleznih so dokaj enostavno razpoznavna, saj na okuženih organih skoraj vedno opazimo prevleke micelijev in trosonoscev s trosi. Med glivične bolezni in njene povzročitelje na vinski trti spadajo:

- peronospora vinske trte, ki je v slovenskih podnebnih razmerah gospodarsko najpomembnejša glivična bolezen vinske trte in jo povzroča gliva *Plasmopara viticola* Berl. & de Toni,
- pepelovka ali oidij, ki jo povzroča gliva *Uncinula necator* (Schwein.) Burr.,
- siva plesen ali grozdna gniloba, ki jo povzroča gliva *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuck.,
- črna pegavost vinske trte, ki jo povzroča gliva *Phomopsis viticola* Sacc.,
- rdeči listni ožig, ki ga povzroča gliva *Pseudopeziza tracheiphila* Müller,
- črna grozdna gniloba, ki jo povzroča *Guignardia bidwellii* (Ell.) Viala & Ravaz,
- črni pikec ali antraknoza, ki jo povzroča *Elsinoë ampelina* Shear,
- kap ali apopleksija ali evtipoza, ki jo povzroča gliva *Eutypa lata* Pers.,
- eska propadanje ali eskarioza, ki jo povzročajo glive *Phaeoacremonium* sp., *Phellinus* sp. *Stereum* sp. (Vršič in Lešnik, 2005).

Bolezni bakterijskega izvora so najmanj številne izmed bolezni trte. Velja omeniti bakterijski ožig mladik vinske trte, ki ga povzročata *Xylophilus ampelinus* Panagopolus, *Xylella fastidiosa* in bakterijski rak koreninskega vratu trte, ki ga povzroča *Agrobacterium tumefaciens* Smith (Vršič in Lešnik, 2005).

Bolezeni imenovane trsne rumenice povzročajo fitoplazme različnih tipov, od katerih sta najpomembnejša zlata trsna rumenica (Flavescence doree, FD) in rumenica tipa počnelosti lesa (Bois noir, BN) (Petrovič in sod., 2004).

Virusne bolezni vinske trte povzročajo hiranje, slabšo rodnost in izrojevanje vinske trte. Pomembnejše virusne bolezni trte so:

- kužno izrojevanje (fanleaf),
- rumeni mozaik (yellow mosaic),
- virusno zvijanje listja vinske trte (grapevine leafroll),
- razbrazdanost ali oplutelenost lesa vinske trte (rugose wood) (Vršič in Lešnik, 2005).

Njpomembnejši virusi, ki jih povezujejo z boleznimi na vinski trti, so iz rodov *Nepovirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Maculavirus*, *Vitivirus* in *Foveavirus*.

Vinska trta gosti tudi veliko škodljivcev, vendar so le redki gospodarsko pomembni. Največ je žuželk (škodljive vrste metuljev, škržatov, kaparjev, uši, stenic, resarjev, hroščev, itd.), pršic in ogrcev (ličinke hroščev). Škodljivci objedajo ali izsesavajo nadzemne 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 VIRUSI, KI NA VINSKI TRTI POVZROČAJO NAJVEČ ŠKODE

Virusne bolezni vinske trte so razširjene po celi svetu, kjerkoli vinska trta (*Vitis* sp.) uspeva. Na vinski trti je odkritih že 55 virusov, ki so razvrščeni v 17 rodov (Martelli, 2003). Med njimi so najbolj škodljivi virusi iz rodu *Nepovirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Maculavirus*, *Vitivirus* in *Foveavirus* (Martelli, 2000; Fauquet in sod., 2005).

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

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

GFLV je ekonomsko najpomembnejši nepovirus. V naravi okužuje le rastline iz rodu *Vitis*. Bolezen, ki lahko zmanjša letni pridelek grozdja tudi za 80 %, imenujemo kužno izrojevanje vinske trte (Maček, 1986; 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 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).

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).

Ultrastrukturne spremembe, ki jih povzročajo virusi iz rodu *Nepovirus* so citoplazemski vključki ob jedru, ki vsebujejo elemente endoplazemskega retikla, membranskih veziklov in ribosomov, lahko tudi skupke virusnih delcev. Verjetno so mesto zbiranja virusnih delcev in sinteze RNA. Druga značilnost so citoplazemski membranski tubuli, ki lahko prehajajo skozi plazmodezme (Kurstak, 1981).

2.2.2 Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus*

Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus* uvrščamo v družino *Closteroviridae*. Virusi obeh rodov so dolge nitaste oblike. Genom je sestavljen iz enojne linearne pozitivno polarne enoverižne RNA. Nekatere viruse prenašajo listne uši, kaparji različnih vrst in druge žuželke. Pogost je tudi prenos virusov s cepljenjem trsov, medtem ko se redko prenašajo s semenii (Fauquet in sod., 2005). V družino *Closteroviridae* spadajo virusi zvijanja listov vinske trte (Grapevine leafroll associated virus, GLRaV). GLRaV-2 uvrščamo 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 (Sefc in sod., 2000).

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 nepojasnjen, 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).

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. Spomladi se bolne rastline ne ločijo bistveno od zdravih, poleti pa se na okuženih listih 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 zakasnjenje 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).

Viruse iz družine *Closteroviridae* ponavadi najdemo v floemu (celicah sitastih cevi, celicah spremjevalkah, floemskih parenhimskih celicah), občasno tudi v epidermu in mezofilu listov. Ultrastrukturne spremembe, ki se lahko pojavijo so: vezikulacija kloroplastov, proliferacija membrane, degeneracija in vezikulacija mitohondrijev ter nastanek vključkov. Vključki, ki so glavna značilnost družine *Closteroviridae*, so sestavljeni iz skupkov virusnih delcev, membranskih veziklov, ki nastajajo iz endoplazemskega retikla ali iz perifernih veziklov mitohondrijev. Vezikli vsebujejo mrežasto fibrilarno snov povezano z virusnimi delci, ribosomi in madeži granuliranega elektronsko-gostega materiala. Virusi se povezujejo v jasne prečno progaste vlaknaste strukture ali, še pogosteje, v bolj ali manj razpuščene svežnje, pomešane s posameznimi membranskimi vezikli ali skupki veziklov (Fauquet in sod., 2005; Kurstak, 1981).

2.2.3 Rod *Maculavirus*

Rod *Maculavirus* pripada družini *Tymoviridae*. V omenjeni rod spadata virus Grapevine red globe virus (GRGV) in še nedavno neuvrščeni virus Grapevine fleck virus (GFkV). Sta izometrične oblike ter vsebujejo enojno linearno pozitivno polarno enoverižno RNA. Vektor zaenkrat ni znan, večinoma pa se prenaša le z okuženim razmnoževalnim rastlinskim materialom. Oba okužujeta izključno rastline iz rodu vinske trte, kjer sta latentna, z izjemo na rupestrisu, pri katerem GFkV na mladih listih povzroča rahlo prosojne pike ali lise (Fauquet in sod., 2005). 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 indeksiraju na rupestrisu 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).

Obe vrsti lahko najdemo le v floemskih celicah. Mitohondriji z GFkV okuženih trt se preoblikujejo v multivezikularna telesca.

2.2.4 Rodova *Vitivirus* in *Foveavirus*

Rodova *Vitivirus* in *Foveavirus* spadata v družino *Flexiviridae*. Virusi obeh rodov so nitaste oblike, dolgi približno 800 nm in debeli 12-15 nm. Njihov genom predstavlja enojna linearne pozitivno polarna enoverižna RNA. Razširjeni so povsod, kjer raste vinska trta. 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 uvrščamo virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV). Vsi trije omenjeni virusi se prenašajo z okuženim sadilnim materialom, GVA in GVB se prenašata še s kaparji iz rodov *Pseudococcus* in *Planococcus*. (Fauquet in sod., 2005). Vse tri viruse povezujejo z boleznijo razbrazdanja lesa (RW) na vinski trti, ki so jo najprej povezovali z okužbo z virusi iz rodu *Closterovirus* (Conti in sod., 1980).

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).

Okužene celice z virusi iz rodu *Vitivirus* so lahko poškodovane v različnem obsegu. Oblikujejo se vezikularne evaginacije tonoplasta, ki vsebujejo drobno fibrilarno snov, verjetno replikativno virusno RNA. V vinski trti se virusi nahajajo le v floemu, pri zelnatih rastlinah pa v drevo tudi v parenhim. Virusi se akumulirajo v citoplazmi v svežnjih ali parakristalnih skupkih.

V rod *Foveavirus* uvrščamo tudi virus razbrazdanja lesa jablane (Apple stem pitting virus, ASPV) in virus zelene obročkavosti češnje (Cherry green ring mottle virus, CGRMV), ki okužujeta jablano in češnjo. Prvi povzroča nepravilnosti v okuženih celicah, vendar ne povzroča nastanka nobenih specifičnih struktur ali vključkov. Virusni delci obeh virusov pa se združujejo v svežnje v citoplazmi mezofilnih celic lista in kažejo tendenco združevanja s konci (Fauquet in sod., 2005).

2.3 BOLEZEN RAZBRAZDANJA LESA VINSKE TRTE

Bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (Grapevine rugose wood desease, RW) ne morejo povezati z glivičnimi ali bakterijskimi okužbami. Ker se prenašajo s cepljenjem, domnevajo, da jih povzroča virus (Azzam in sod., 1991).

Cepljenje trsov povečuje možnost za nastanek bolezenskih znamenj razbrazdanja lesa. Vzrok temu je lahko okuženost podlage in cepiča z različnimi virusi, kar pripelje do mešane okužbe, kjer so znaki virusnih bolezni veliko bolj izraženi kot pri okužbi z enim samim virusom (Bonfiglioli in sod., 1998). Lahko je virus v podlagi v latentni obliki, vendar, ko se pri cepljenju prenese v cepič občutljive sorte, povzroči veliko škodo (Savino in sod., 1991). Golino (1993) je ugotovil, da je lahko virus v žlahtnem delu trsa, ki je cepljen na eno podlago, v latentni obliki, medtem ko bi na drugi podlagi lahko povzročil propadanje trsov. Iz tega izhaja nekompatibilnost med posameznimi podlagami in žlahtnimi trtami (Bonfiglioli in sod., 1998).

Bolezni se izrazijo s tvorbo jamic in brazd pod lubjem ali drugih nepravilnosti (zmanjšanje ksilemskih prevodnih cevi, hipertrofija parenhimskih celic v ksilemu in floemu in lahko tudi bulaste tvorbe v jamicah), ki ovirajo pretok hranilnih snovi in vode po rastlini. Pojavijo se na lesu žlahtnega dela trsa, na podlagi ali na obeh (Korošec, 1982). Posledice so zakasnjen razvoj popkov ter propadanje in smrt vinske trte (Martelli, 1993).

Glede na to ali se bolezenska znamenja po cepljenju pojavljajo na eni ali več izmed treh indikatorskih vrst iz rodu vinske trte:

- Kober 5BB, ki je križanec med *Vitis berlandieri* Planch. in *Vitis Riparia* Michx.,
- LN 33, ki je križanec med križancema Courderc 1613 in Thompson Seedless ter
- *Vitis rupestris* sorte St. George,

ločimo štiri bolezni:

- razbrazdanje lesa tipa kober (Kober stem grooving, KSG),
- bolezen plutavosti lesa (Corky bark, CB),
- razbrazdanje lesa tipa LN 33 (LN 33 stem grooving, LNSG),
- razbrazdanje na rupestrisu (Rupestris stem pitting, RSP) (Martelli, 1993; Minafra, 2000).

V Sloveniji so leta 1979 ugotovili številni propad in sušenje 3 - 4 leta starih trsov v vinogradih, posajenih s sorto Refošk. V povprečju je propadlo 17% trsov, v nekaterih vinogradih tudi do 50%. Ugotovili so več vrst razbrazdanja, ki so ga odkrili na štirih podlagah: Kober 5BB, rupestris sorte St. George, SO 4 in 420 A (*Vitis berlandieri* × *Vitis riparia*), slednja sta indikatorja za bolezen 'legno riccio', razbrazdanje pa so ugotovili tudi na žlahtnem delu trsov pri sorti Refošk. Največji delež okužbe je bil na trsih cepljenih na podlago SO 4. K tako številčnemu propadu je pripomoglo tudi takratno sušno obdobje (Korošec-Koruza, 1992).

2.3.1 Kober stem grooving

Za bolezen KSG je značilno razbrazdanje lesa na indikatorjih rastlinah Kober 5BB, vendar ne na rupestrisu sorte St. George in LN 33 (Martelli, 1993; Meng in sod., 1999). KSG verjetno povzroča virus GVA (Garau in sod., 1994; Credi, 1997).

2.3.2 Corky bark

Indikatorja za CB sta LN 33 in rupestris sorte St. George. Bolezen CB je razširjena povsod, kjer uspeva trta. Listi bolnih trsov se jeseni zvijajo, rdečijo in rumenijo ter lahko ostanejo dlje časa pritrjeni, medtem ko pri zdravih trsih že davno odpadejo. Značilne so brazde različnih dolžin na lesu pod skorjo, ki se zelo redko pojavijo pri žlahtni trti. Pri zelo občutljivem indikatorju 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 (Marteli, 1993; Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980). Z boleznijo plutavosti lesa skušajo povezati virus GVB, domnevajo pa tudi, da verjetno ni edini povzročitelj te bolezni (Boscia s sod., 1995b; Minafra, 2000). V Avstraliji so Shi in sodelavci (2004) preučevali virus GVB, vendar na nobenem od 232 z GVB okuženih trsov niso našli znamenj bolezni CB. Prav tako niso zaznali bolezenskih znamenj na indikatorju LN 33. Tudi oni so mnenja, da je CB kompleksna bolezen, ki jo povzroča več virusov. Namba in sod. (1991) so iz trsov, obolelih s CB, izolirali virus, ki so ga imenovali virus počnelosti lesa vinske trte (Grapevine corky bark-associated virus, GCBaV), ki naj bi povzročal CB, kasneje pa so ugotovili, da virus ne povzroča CB in je enak GLRaV-2, izoliranem v Franciji (Zimmermann in sod., 1990), zato so ga preimenovali v GLRaV-2 (Boscia in sod., 1995a).

CB pogosto zamenjujejo z boleznijo 'legno riccio', ki je razširjena v Italiji. Bolezen 'legno riccio' je bolj kompleksna, na lesu se izrazijo jamice in brazde. Morda gre pri njej za dvojno okužbo, okužbo s povzročitelji bolezni CB in RSP (Goheen, 1988a). Bonavia in sod. (1996) ločijo še razbrazdanje lesa imenovano plutavost in razbrazdanje lesa (Corky rugose wood, CRW), za katerega je značilna nepravilna tvorba plute nad cepljenim mestom in slabša rast trsov.

Conti in Milne (1985) sta ugotovila, da v trsih z znaki rdečenja in zvijanja listov, kot tudi v trsih z znaki razbrazdanja, pogosto nastopata skupaj virus vinske trte A (Grapevine virus A, GVA) in virus vinske trte B (Grapevine virus B, GVB).

2.3.3 LN 33 stem grooving

Pri bolezni LNSG se pojavi na indikatorju LN 33 brazde različnih dolžin, podobno kot pri bolezni CB, le da tu ne pride do tvorbe plute in razbarvanja listov. Ta bolezen ne povzroča tvorbe brazd na rupestrisu sorte St. George in Kober 5BB (Martelli, 1993).

2.3.4 Rupestris stem pitting

Bolezen RSP je najpogostejša bolezen kompleksa razbrazdanja lesa, ki se pojavlja širom po svetu (Meng in sod., 2003). Odkrili so jo leta 1976 v Kaliforniji na trsih, ki so jih uvozili iz zahodne Evrope in Avstralije (Goheen, 1988b; Zhang in sod., 1998)

Na lesu bolnih trsov se po 2 - 3 letih po okužbi pod cepljenim mestom pojavijo brazde in podolžne jamice – žlebiči, ki lahko segajo tudi do nekaj cm globoko v les. Najboljši indikator za ugotavljanje bolezni RSP je rupestris sorte St. George, ki tvori najbolj izrazite jamice, vendar se znaki lahko pokažejo tudi na drugih ameriških podlagah, ne pa na LN 33, ki je indikator za bolezni CB in LNSG (Pearson in Goheen, 1998). Rupestris sorte St. George izhaja iz južnega in zahodnega dela ZDA. Verjetno je najbolj znana sorta rupestrisa, ki se na veliko uporablja za gojenje francosko-ameriških hibridov in predvsem kot podlaga, na katero cepijo žlahtne sorte (http://en.wikipedia.org/wiki/Vitis_rupestris).

Bolezen RSP lahko povzroča počasnejšo rast žlahtne trte, zato so po nekaj letih bolni trsi opazno manjši od zdravih (Goheen, 1988b).

Credi (1997) je z indeksiranjem in ELISA ugotovil, da bolezen RSP ni povezana z virusi: GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5, GVA in GFKV. 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). Tomažič (2002) je našla tudi trto z znamenji razbrazdanja, ki je bila okužena s fitoplazmami, vendar ne z RSPaV. Bonfigioli in sod. (1998) namugujejo, da na nastanek bolezni RSP vpliva kombinacija virusov GVA in RSPaV. Na bolezenska znamenja pa lahko poleg okužbe vplivajo tudi drugi, sedaj še nepoznani dejavniki (Goheen, 1988b; Meng in sod., 2003; Korošec, 1982).

2.4 VIRUS RSPaV

2.4.1 Splošne značilnosti virusa RSPaV

Virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV) povezujejo z boleznijo razbrazdanja lesa vinske trte (Grapevine rugose wood disease, RW) tipa razbrazdanje na rupestrisu (Rupestris stem pitting, RSP), vendar za enkrat še ni dokazov, da bi bil omenjeni virus povzročitelj te bolezni. Zaradi podobnosti z virusom ASPV ga uvrščamo v rod *Foveavirus* (Goheen, 1988b; Martelli in Jelkmann, 2000; Meng in sod., 1999a; Meng in sod., 2003).

Na listih vinske trte RSPaV ne povzroča vidnih bolezenskih znamenj (Goheen, 1988b).

Meng in sod. (1998) so v trsih z znamenji bolezni RSP odkrili dsRNA z dolžino 8,7 kbp. Izolirano dsRNA so s pomočjo reverzne transkriptaze prevedli v cDNA, ki so jo potem klonirali v Lambda ZAP II vektorju, nakar so določili sekvenco virusa povezanega z RSP in ga imenovali RSPaV-1. Približno v istem času so Zang in sod. (1998) klonirali in sekvencirali dsRNA virusa, ki so ga imenovali Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) in ga prav tako povezovali z boleznijo RSP. Sekvenca GRSPaV virusa kaže 98 % podobnost z virusom RSPaV-1 (Meng in sod., 1999a). Sedaj ta virus imenujemo RSPaV.

Genom RSPaV virusa sestavlja 8726 nukleotidov in poli A rep na 3' koncu. Virus ima 5 bralnih okvirjev (open reading frame, ORF). ORF1 nosi zapis za virusno replikazo (predvidena velikost encima je 244 kDa) in se nahaja med 62-im in 6547-im nukleotidom.

ORF5 (med nukleotidi 7770 in 8549) predstavlja zapis za plaščno beljakovino (coat protein, CP) velikosti 28 kDa. Med njima pa se nahaja trojni genski blok ORF2-ORF4, ki naj bi imel nalogo pri prehajanju virusa med celicami (Meng in sod., 1998; Gonsalves in Meng., 2000; Regenmortel in sod., 2000).



Slika 1: Struktura genoma RSPaV virusa (Gonsalves in Meng, 2000).

Meng in sod. (2005) so s sekvenčno analizo klonov cDNA, ki ustrezajo reprezenativnim regijam virusnega genoma, dokazali tri nove genomske variante virusa RSPaV v vzorcih indikatorske rastline rupestris sorte St. George. Struktura genoma teh genomskeh variant je enaka (pet bralnih okvirjev). Za prevladujočo genomsko varianto virusa se je izkazala RSPaV-SG1, ki, kot kaže, ne povzroča bolezenskih znamenj razbrazdanja lesa rupestrisa. Z RSPaV-1 ima 87,3% podobnost zaporedja nukleotidov. Obe omenjeni genomske varianti virusa sta manj sorodni (približno 84%) s tretjo, imenovano RSPaV-BS, ki so jo sekvencirali iz francosko-ameriške hibridne trte Bertille Seyve 5563. Različne regije genoma so različno ohranjene, odvisno od evolucijskih selekcijskih pritiskov. Najbolj ohranjeni regiji predstavljata ORF1 z zapisom za replikazo in ORF5 z zapisom za CP. CP genomske variante imajo zelo podobne antigenske lastnosti, kar kaže na njihovo serološko podobnost. (Meng in sod., 1999b).

Santos in sod. (2003) ter Nolasco in sod. (2006) so odkrili 4 genomske variante virusa glede na variabilnost CP. Označili so jih z Gp1, Gp2a, Gp2b in Gp3. Zadnje tri so prisotne v različnih državah po svetu, Gp1 pa so našli le na Portugalskem. Obstoj le treh skupin (po raziskavah drugih avtrojev) razlagajo z majhno verjetnostjo, da bi našli skupino Gp1. Drugi vzrok bi pa lahko bil, da uvrščajo skupini Gp2a in Gp2b v eno, zaradi njune večje sorodnosti. Opazili niso nobene povezave med genomskimi variantami virusa RSPaV in različnimi sortami vinske trte, ki jih virusi okužujejo; prav tako niso opazili nobene povezave med genomskimi variantami virusa in njihovimi geografskimi lokacijami.

2.4.2 Metode za določanje virusa RSPaV

Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR) metoda je pomembno izboljšala diagnostiko RSPaV. Izdelan je poenostavljen protokol za izolacijo RNA iz vinske trte, ki se uspešno dopolnjuje z RT-PCR metodo. Za genom RSPaV obstaja veliko različnih parov začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na različna mesta plaščne beljakovine in replikaze (Meng in sod., 1999a; Meng in sod., 2003). S to metodo so tudi potrdili hipotezo, da obstaja več genomskeih variant sekvene genoma RSPaV, obenem pa nakazujejo možnost, da je lahko en trs hkrati okužen z več genomskeimi variantami virusa (Meng in sod., 1999b; Meng in sod., 2005; Nolasco in sod., 2006). Laboratorijske diagnostične metode so pomembne tudi zaradi ugotovitve, da je večina indikatorjev rupestrisa sorte St. George okuženih z virusom RSPaV (Petrovič in sod., 2000b).

Za razvoj seroloških diagnostičnih metod je bilo potrebno izdelati učinkovito protitelo. Virus se nahaja v okuženih trsih v nizkih koncentracijah (Tzeng in sod., 1993), zato izolacija virusa in pridobitev protiteles po klasični metodi ni bila mogoča. Na podlagi znanega nukleotidnega zaporedja genoma RSPaV so izdelali rekombinantna protitelesa. Gen za plaščno beljakovino so izrazili v bakteriji *Escherihia coli* in nato proizvedli protitelesa proti izraženi plaščni beljakovini (Meng in sod., 2003). V bakteriji *Escherihia coli* se je izražala rekombinantna fuzijska beljakovina (MBP/CP RSPaV), ki je sestavljena iz beljakovine, ki veže maltozo (maltose binding protein, MBP) in plaščne beljakovine (coat protein, CP) virusa RSPaV. Iz grobega beljakovinskega ekstrakta so jo izolirali s pomočjo afinitetne kromatografije, pri čemer so uporabili amilozno kromatografsko kolono. Z očiščeno rekombinantno beljakovino so imunizirali kunka, iz krvi katerega so pridobili poliklonska protitelesa imenovana As7-276 (Meng, 1999). S tako pridobljenimi protitelesi so se lahko začela proučevanja virusa RSPaV tudi s serološkimi tehnikami. Učinkovita poliklonska protitelesa so uporabili za dokaz variabilnosti genotipa virusa RSPaV pri različnih tkivih vinske trte z metodo Western blot in ELISA. Tako so razvili metodo, ki je hitrejša, cenejša, enako zanesljiva in bolj prikladna za analizo večjega števila vzorcev, kot je metoda biološkega indeksiranja (Meng in sod., 2000; Meng in sod., 2003; Petrovič, 2003).

Petrovič in sod. (2003) so prvič uporabili omenjena protitelesa za vizualizacijo virusnih delcev RSPaV z metodo lovljenja virusov s protitelesi (immuno-sorbent electron microscopy, ISEM, trapping) in dekoracijo s protitelesi. V rastlinskem soku vinskih trt, okuženih z RSPaV, so videli ukrivljen, 723 nm dolg paličast virusni delec, ki ga v kontrolnih zdravih rastlinah ni

bilo. Ugotovitve, da gre za virus RSPaV, so potrdili tudi z metodami RT-PCR, Western blot in ELISA, ki so jih naredili na istem rastlinskem materialu.



Slika 2: Virus RSPaV brez dekoracije. Merilo = 100 nm (Petrovič in sod., 2003).

2.4.3 Lokalizacija virusa RSPaV v vinski trti

Ugotovili so sezonska nihanja koncentracij virusa RSPaV v listih vinske trte. Višje koncentracije so bile od pomladi (marca) do konca poletja (začetek septembra), od takrat dalje so opazili upad koncentracije RSPaV, ki ga proti koncu sezone (konec oktobra) niso več zaznali. To se časovno sklada z začetkom in koncem rastne sezone vinske trte (Meng in sod., 2003; Steward in Nassuth, 2001; Petrovič in sod., 2003). Te ugotovitve se ne ujemajo z ugotovitvami Minafra in sod. (2000), da so koncentracije virusa v vseh tkivih okuženega rastlinskega materiala med junijem in oktobrom nespremenjene. Vzrok za to bi lahko bil v uspevanju trt na različnih geografskih lokacijah in s tem različnih klimatskih razmerah v Italiji in New Yorku.

Koncentracije virusa RSPaV so v trtah zelo nizke. Največje so dokazali na začetku poletja, v aktivno rastočih mladih tkivih, kot so stebla mladih zelenih poganjkov, lamine in petiole aktivno rastočih mladih listov, in v vseh organih (listi, steblo in korenine) mlade rastlinice v tkivni kulturi. Iz naštetih delov rastline dobimo najzanesljivejše rezultate o prisotnosti RSPaV. Virusov niso našli v starejših listih ne glede na letni čas ter v popkih zelenih poganjkov, nabranih poleti (Steward in Nassuth, 2001; Petrovič in sod., 2003; Meng in sod., 2003). Petrovič in sod. (2003) v kambiju dormantnih poganjkov rupestrisa sorte St. George niso našli virusov kljub temu, da so le-ti bili v zelenih poganjkih iste rastline. Tu se razhajajo z izsledki Minafra in sod. (2000), da je mogoče v kambiju dormantnih poganjkov dokazati virus tudi izven vegetativne sezone.

Steward in Nassuth (2001) sta v semenih testiranih rastlin vinske trte dokazali prisotnost RSPaV, čeprav je znano, da se RSPaV ne prenaša s semen. To nima pomena za vinogradništvo, saj se vinska trta razmnožuje vegetativno s sadilnim materialom in ne vzgaja iz semen.

2.5 ULTRASTRUKTURNE SPREMEMBE, KI JIH LAHKO POVZROČAJO VIRUSI NA RASTLINSKEM TKIVU

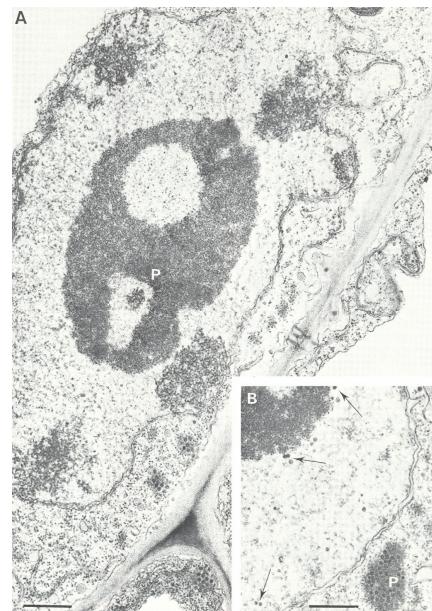
Virusi lahko na rastlinskem tkivu povzročajo različne ultrastrukturne spremembe celic. Spremembe se lahko pojavijo na kloroplastih, mitohondrijih, v vakuoli, jedru in največkrat v citoplazmi.

2.5.1 Viroplazme

Viroplazma je vključek v jedru ali v citoplazmi s temnejšimi in svetlejšimi področji, kjer poteka replikacija in sestavljanje virusov. Našli so jih v koreninskih celicah rastline *Nicotiana clevelandii*, okužene z virusom aspermije paradižnika (Tomato aspermy virus, TAV) in koruze (*Zea mays*), okužene z virusom hrupave pritlikavosti koruze (Maize rough dwarf virus, MRDV), v celicah šiške sladkornega trsa (*Saccharum* spp.), okuženega z virusom Fiji (Fiji disease virus, FDV) in v celicah listov kapusa (*Brassica oleracea*), okuženega z virusom mozaika cvetače (Cauliflower mosaic virus, CaMV) (Francki in sod., 1985) (Slike 3 in 4).



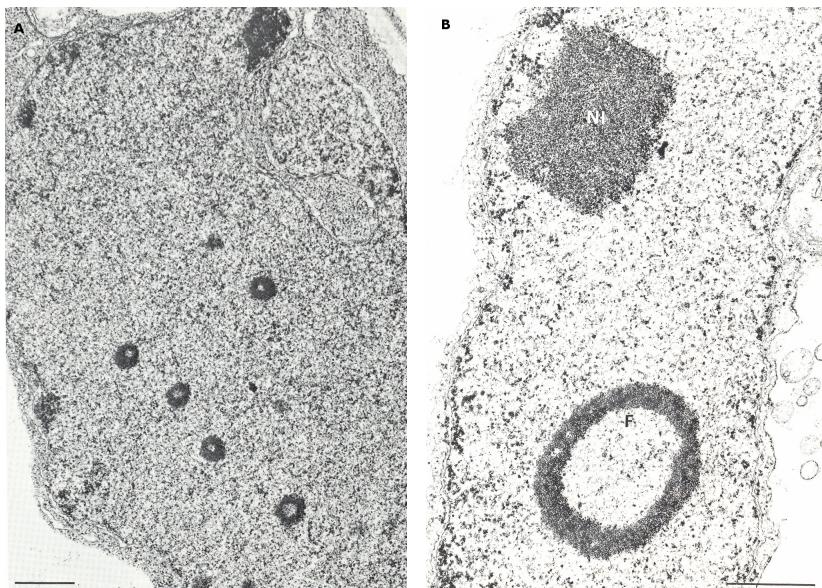
Slika 3: Koreninske celice koruze, okužene z MRDV. Tipična viroplazma s svetlo (L) in temno (D) kontrastiranimi polji. Virusni delci v citoplazmi so lahko v kristalni obliki (Cr) ali pa so naključno razporejeni. Merilo = 1µm (Francki in sod., 1985).



Slika 4: Celice listov kapusa, okuženega s CaMV. A, Viroplazma v jedru (P) in virusni delci v citoplazmi. B, Virusni delci v jedru (↑) in viroplazma (P) v citoplazmi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

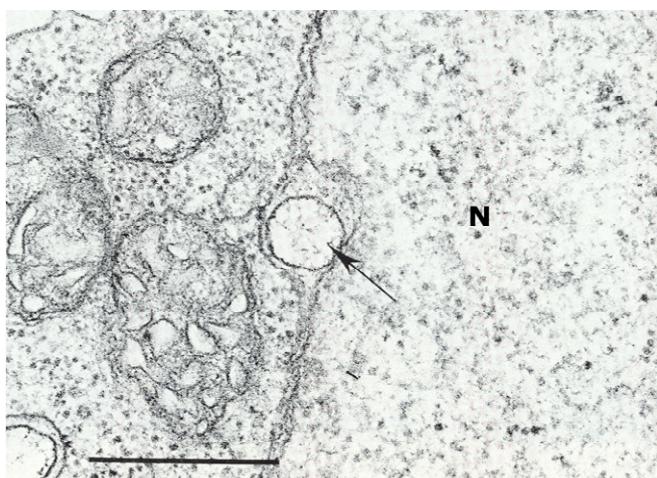
2.5.2 Ultrastrukturne spremembe jedra

Fibrilarne regije v obliki manjših ali večjih obročev v jedru se pojavljajo pri navadnem fižolu (*Phaseolus vulgaris*), okuženem z virusom zlatega mozaika fižola (Bean golden mosaic virus, BGMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 5).



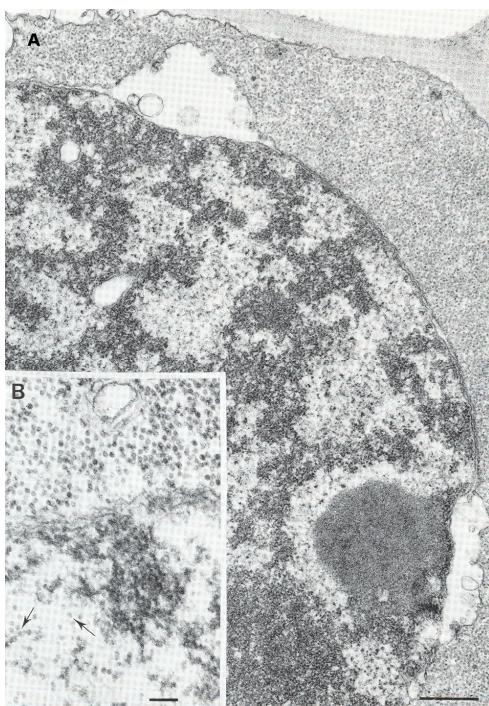
Slika 5: Celica lista navadnega fižola, okuženega z BGMV. **A**, Majhni fibrilarni obroči v jedru v zgodnji fazi okužbe. **B**, Velik fibrilarni obroč (F) v jedru v pozni fazi okužbe. Jedrce (Ni). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Vezikli s fibrilarno vsebino se pojavljajo v perinuklearnem prostoru celic spremljevalk rastline *Physalis floridana*, okužene z virusom zvijanja listov krompirja (Potato leafroll virus, PLRV), in krmne pese (*Beta vulgaris*), okužene z virusom zahodne rumenice pese (Beet western yellows virus, BWYV) (Francki in sod., 1985) (Slika 6).



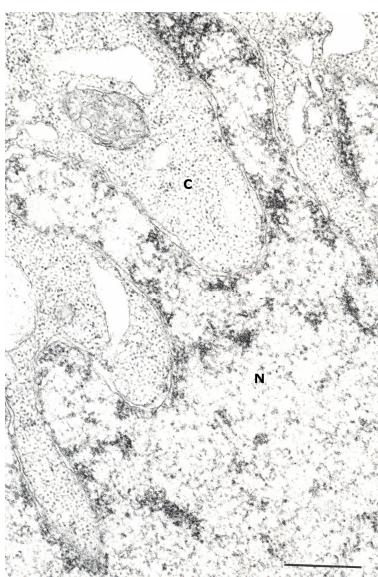
Slika 6: Floemska celica lista rastline krmne pese, okužene z BWYV. Vezikel s fibrilami lociran v prostoru med jedrnima membranama (puščica). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Vežikulacijo zunanje jedrne membrane so opazili pri bobu (*Vicia faba*), okuženem z virusom progastega mozaika boba (Broad bean mottle virus, BBMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 7).



Slika 7: Celica lista boba, okuženega z BBMV, z odstranjenimi ribosomi, tretiran z RNazami. **A**, Citoplazma zapolnjena z virusnimi delci in vezikulacija zunanje jedrne membrane. Merilo = 500 nm. **B**, Virusni delci v jedru (↑) in v citoplazmi. Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).

Zelo nagubana jedrna površina je značilna za rastlino *Nicotinia clevelandii*, okuženo z virusom mozaika lucerne (Alfalfa mosaic virus, AMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 8).



Slika 8: Celica lista rastline *Nicotinia clevelandii*, okužene z AMV. Virusni delci v citoplazmi (C) in izrazito nagubana površina jedra (N). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

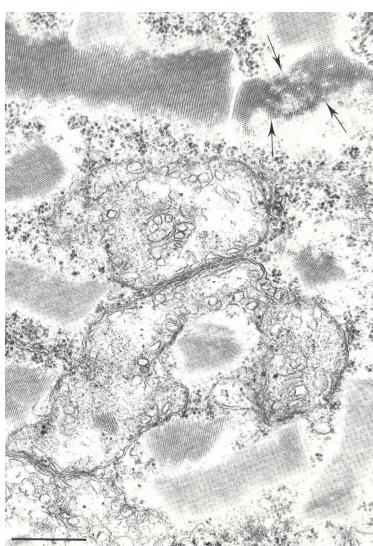
2.5.3 Ultrastrukturne spremembe mitohondrija

Mitohondriji celic spremljevalk vsebujejo vakuolo in periferne vezikle s fibrilarno snovjo. Te spremembe najdemo pri navadnem korenju (*Daucus carota*), okuženem z virusom rdečenja listov korenja (Carrot red leaf virus, CaRLV) (Francki in sod., 1985) (Slika 9).



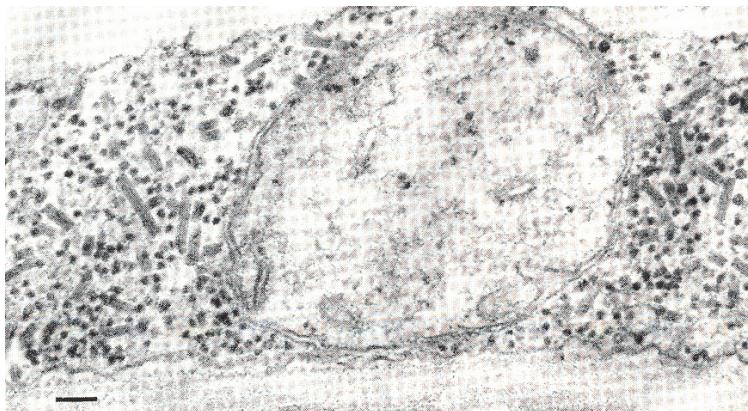
Slika 9: Celica sitaste cevi lista korenja, okuženega s CaRLV. Nenormalni mitohondriji z vakuolo in perifernimi vezikli, ki vsebujejo fibrilarno snov (↑). S tretiranjem z RNazami so odstranjeni ribosomi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Mitohondriji z vezikli se pojavljajo pri navadni kumari (*Cucumis sativus*), okuženi s kumaričnim virusom 4 (Cucumber virus 4, CV4) in pri *Nicotiana clevelandii*, okuženi z andskim latentnim virusom krompirja (Andean potato latent virus, APLV), virusom rumenenja žil Clitorie (Clitoria yellow vein virus, CYVV) ali virusom mozaika jajčevca (Eggplant mosaic virus, EMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 10).



Slika 10: Celica lista navadne kumare, okužene s CV4. Mitohondriji z vezikli nepravilnih oblik in skladovnice virusnih delcev (↑ kažejo prečno prerezane skladovnice). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Uničeno vsebino mitohondrija, ki ga obdajajo virusi, so videli pri navadnem tobaku (*Nicotiana tabacum*), okuženem s Tobacco rattle virus (TRV) (Francki in sod., 1985) (Slika 11).



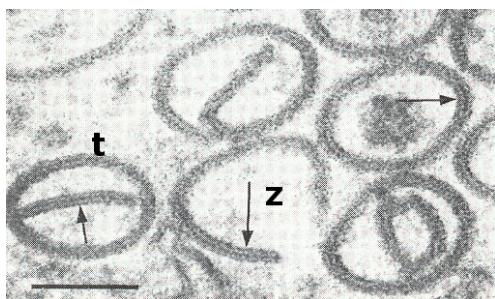
Slika 11: Celice lista navadnega tobaka, okuženega s TRV (serotip I-II). Uničen mitohondrij, ki ga obkrožajo, a se nanj ne pritrjajo, virusni delci v citoplazmi. Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).

Mitochondrije v obliki podkve z zrni v matriksu, ki za elektrone niso prepustna, so našli pri navadnem fižilu, okuženem z virusom lisavosti plodov fižola (Bean pod mottle virus, BPMV) (Kim in Fulton, 1972).

Mitochondrije, ki vsebujejo koncentrične lame, ki verjetno nastanejo iz ovojnice mitohondrija in znotraj katerih je granulirana elektronsko gosta snov, najdemo v mezofilnih celicah navadnega kristavca (*Datura stramonium*), okuženega z virusom razraščanja pritlikavosti paradižnika (Tomato bushy stunt virus, TBSV) in v navadnem fižolu, okuženem z BPMV (Kim in Fulton, 1972; Russo in Martelli, 1972).

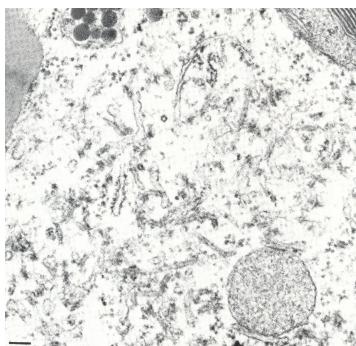
2.5.4 Ultrastrukturne spremembe citoplazme

Tubuli ali zvitki s triplastno strukturo se pojavljajo v citoplazmi pri koruzi okuženi z MRDV ali z virusom sterilne pritlikavosti ovsu (Oat sterile dwarf virus, OSDV) (Francki in sod., 1985) (Slika 12).



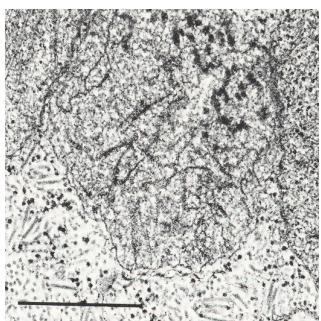
Slika 12: Celica šiške koruze, okužene z OSDV. Virusni delci so lahko vidni v prečnem prerezu kot tubuli (t) ali odprti zvitki (z) s triplastno strukturo (↑). Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).

Membranski tubuli nepravilnih oblik se pojavijo pri navadnem kristavcu, okuženem z virusom pegavosti in uvelosti paradižnika (Tomato spotted wilt virus, TSWV) (Francki in sod., 1985) (Slika 13).



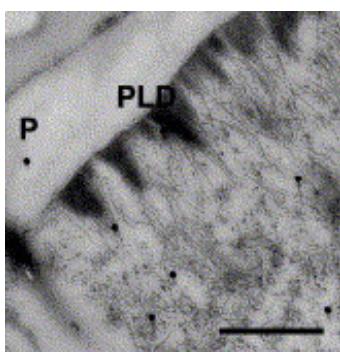
Slika 13: Celica lista navadnega kristavca, okuženega s TSWV. Membranski tubuli. Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).

Mikrotelesca z nenormalno temnimi predeli in paličastimi ali ploščatimi strukturami brez znane funkcije se pojavljajo pri ječmenu (*Hordeum vulgare*), okuženem z virusom ječmenovega progastega mozaika (Barley stripe mosaic virus, BSMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 14).



Slika 14: Celica ječmena, okuženega z BSMV. Mikrotelesce, ki vsebije elektronsko gosta polja in paličaste ali ploščate strukture z neznano funkcijo. Virusni delci v citoplazmi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Stožčaste filamentozne strukture ob celični membrani se ponavadi nahajajo ob plazmodezmah med celico spremljevalko in celico sitaste cevi rastline *Nicotiana benthamiana*, okužene z virusom infektivnega rumenenja solate (Lettuce infectious yellows virus, LIYV). Z imunolokalizacijo so dokazali, da gre za bolj ali manj vzporedno združene virusne delce, orientirane skoraj pravokotno na celično membrano (Medina in sod., 2005) (Slika 15).



Slika 15: Floemska celica rastline *Nicotiana benthamiana*, okužene z LIYV. Temne stožčaste strukture so izločki plazmaleme (PLD) in virusi LIYV, ki izgledajo kot filamentozne strukture. Merilo = 0,58 µm. Plazmodezma (P) (Medina in sod., 2005).

Multivezikularna telesa v citoplazmi se pojavljajo pri navadnem kristavcu, okuženem s TBSV in pri navadnem fižolu, okuženem z virusom mozaika Galinsoge (Galinsoga mosaic virus, GaMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 16).



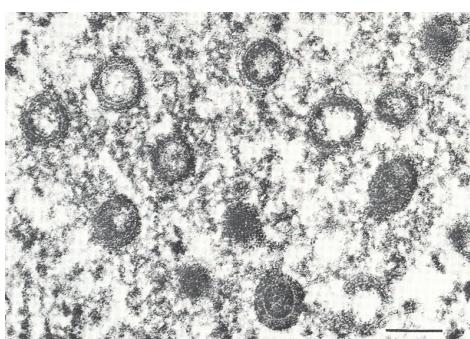
Slika 16: Listna celica navadnega fižola, okuženega z GaMV. **A**, Velika multivezikularna telesa v citoplazmi. Merilo = 500 nm. **B**, Periferni vezikli multivezikularnih teles s fibrilarno snovjo, ki spominja na nukleinske kisline (↑). Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).

Granulirane plasti v citoplazmi lahko opazimo pri navadnem tobaku, okuženem s krompirjevim virusom X (Potato virus X, PVX) (Francki in sod., 1985) (Slika 17).



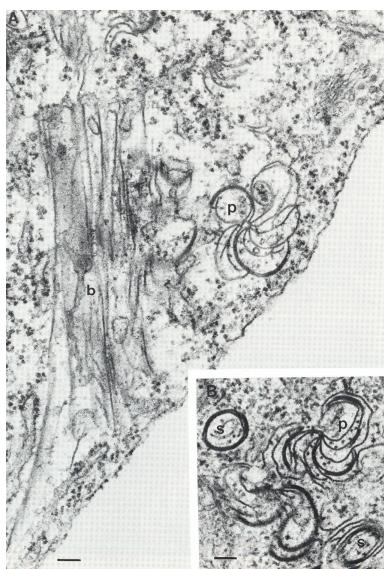
Slika 17: Listna celica navadnega tobaka, okuženega s PVX. Granulirane plošče prerezane prečno in virusni delci (↑) v citoplazmi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Vezikli z dvojno membrano se pojavljajo pri navadnem kristavcu, okuženem s TSWV (Francki in sod., 1985) (Slika 18).



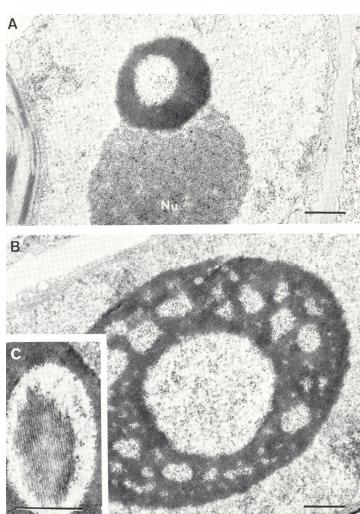
Slika 18: Celice lista navadnega kristavca, okuženega s TSWV. Vezikli z dvojno membrano, med katerima je elektronsko gosta snov. Merilo = 100 nm (Francki in ost., 1985).

Vključki, ki so prerezani vzdolžno, izgledajo kot snopi, prečno pa kot vetrnice in obročki, so značilni za *Potiviridae*. Takšne posebnosti najdemo pri raslini *Nicotiana glutinosa*, okuženi s krompirjevim virusom Y (Potato virus Y, PVY), pri bobu, okuženem z virusom rumenega fižolovega mozaika (Bean yellow mosaic virus, BYMV), pri koruzi, okuženi z virusom mozaika sladkornega trsa (Sugarcane mosaic virus, SCMV), pri navadnem fižolu, okuženem z virusom navadnega mozaika fižola (Bean common mosaic virus, BCMV), pri krmni repi, okuženi z virusom mozaika pese (Beet mosaic virus, BtMV), pri njivskem grahu (*Pisum arvense*), okuženem z BYMV in pri navadni kumari, okuženi z virusom rumenega mozaika bučk 1 (Watermelon mosaic virus 1, WMV1) (Francki in sod., 1985) (Slika 19).



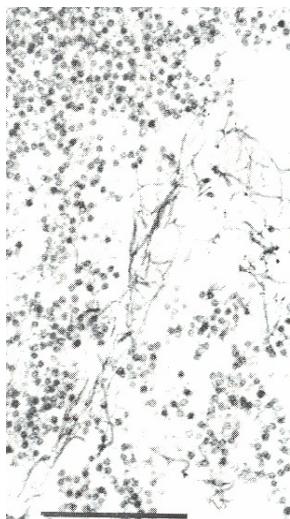
Slika 19: Celica lista rastline *Nicotiana glutinosa*, okužene s PVY. **A**, Cilindrični vključek odrezan vzdolžno izgleda kot snop (b) in prečno reznan kot vetrnica (p). **B**, vetrnica (a) in obroček (s). Merili = 100 nm (Francki in ost., 1985).

Satelitno telo ob jedru lahko najdemo pri krmni pesi, okuženi z BtMV. Starejša satelitna telesa imajo značilno vakuolizacijo (Francki in sod., 1985) (Slika 20).



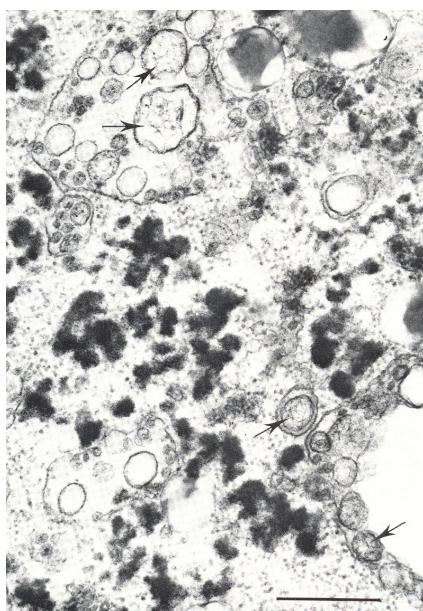
Slika 20: Celica lista krmne pese, okužene z BtMV. **A**, Razvijajoče satelitno telo ob jedru (Nu). **B**, Starejše satelitno telo z značilnimi vakuolami. **C**, Skupek tubulov povezan s satelitnim telesom. Merila = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Virusno specifične fibrile v citoplazmi in v citoplazemskih veziklih najdemo pri navadnem fižolu, okuženem s Southern bean mosaic virus (SBMV), pri rastlini *Nicotiana clevelandii*, okuženi z Velvet tobacco mottle virusom (VTMoV) in pri metlikci (*Chenopodium quinoa*), okuženi s Sowbane mosaic virus (SoMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 21).



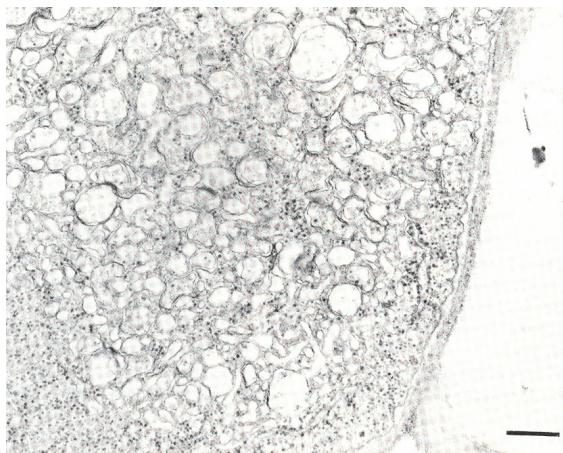
Slika 21: Celica lista metlike, okužene s SoMV. Virusne specifične fibrile v citoplazmi. (Odstranjeni ribosomi, tretiranje z RNazami). Merilo = 500 nm. (Francki in sod., 1985)

Amorfna polja elektronsko goste snovi v citoplazmi se pojavijo pri rastlini *Nicotiana clevelandii*, okuženi z APLV, CYVV ali EMV, pri *Nicotiana x edwardsonii*, okuženi z virusom nekroze tobaka (Tobacco necrosis virus, TNV), pri navadni buči (*Cucurbita pepo*), okuženi z virusom mozaika buč (Squash mosaic virus, SqMV), pri *Nicotinia clevelandii*, okuženi z virusom nekrotičnega mozaika rdeče detelje (Red clover necrotic mosaic virus, RCNMV) in pri bobu, okuženim z BBMV (Francki in sod., 1985) (Slika 22).

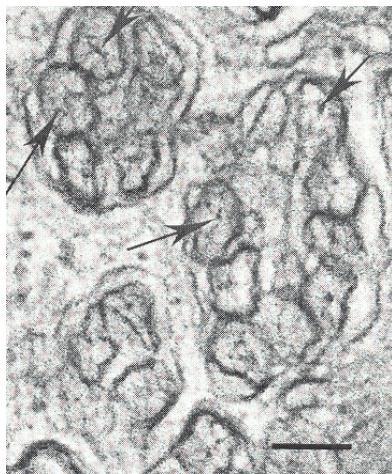


Slika 22: Celica lista boba, okuženega z BBMV. Citoplazma vsebuje polja elektronsko goste amorfne snovi in vezikle s fibrilarno vsebinou (↑). S tretiranjem z RNazami so odstranjeni ribosomi. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

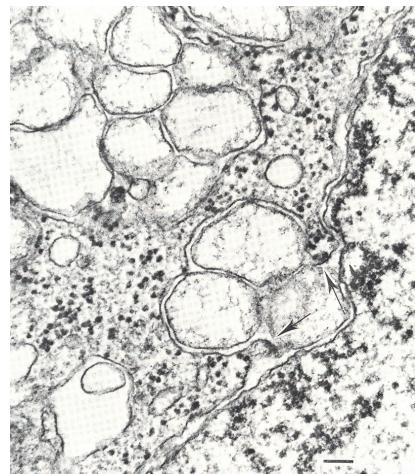
Proliferacija membrane v citoplazmi je vidna kot vezikli, ki imajo lahko fibrilarno vsebino, ki spominja na nukleinske kisline. Pri nekaterih lahko vidimo izvor veziklov iz jedrne membrane. Te stukturne spremembe vidimo pri: *Physalis floridana*, okuženi s PLRV, krmni pesi, okuženi z BWYV, navadni kumari, okuženi z virusom obročkaste gnilobe tobaka (Tobacco ringspot virus, TRSV), navadnem grahu (*Pisum sativum*), okuženem s Pea enation mosaic virus (PEMV), bobu, okuženem z BBMV ali z virusom obarvanja boba (Broad bean stain virus, BBSV), *Nicotiana clevelandii*, okuženi z virusom venenja boba (Broad bean wilt virus, BBWV), krmni pesi, okuženi z BtMV ali z virusom rumenice pese (Beet yellows virus, BYV), rastlinah iz rodu *Citrus*, okuženih z virusom citrus tristeza (Citrus tristeza virus, CTV) in navadni rukvici (*Eruca sativa*), okuženi z Radish mosaic virus (RaMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 23, 24 in 25).



Slika 23: Mezofilna celica lista navadne rukvice, okužene z RaMV. Celica je zapolnjena z membranskimi vezikli, ki so značilni za okužbo z virusi iz rodu *Comovirus*. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).



Slika 24: Rastoča celica sitaste cevi rastline iz rodu *Citrus*, okužene s CTV. "BYV"-tip veziklov (↑) s fibrilami, ki spominjajo na nukleinske kisline. merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).



Slika 25: Listna celica navadnega graha, okuženega s PEMV. Vezikli s fibrilarno vsebino nastajajo iz jedrne membrane (↑ kažejo nadaljevanje zunanje jedrne membrane z vezikularno membrano). Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

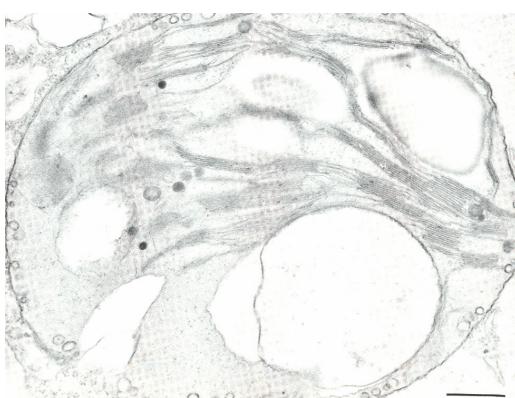
2.5.5 Ultrastrukturne spremembe kloroplastov

Nabrekli okrogli kloroplasti s številnimi perifernimi vezikli z dvojno membrano in fibrilarno vsebino se pojavljajo v mezofilnih celicah listov pri: kitajskem zelju (*Brassica pekinensis*), okuženem z virusom rumenega mozaika repe (Turnip yellow mosaic virus, TYMV), *Nicotiana glutinosa*, okuženi z EMV, navadnem fižolu, okuženem z GaMV in navadnem grahu, okuženem s Kennedy yellow mosaic virus (KYMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 26).



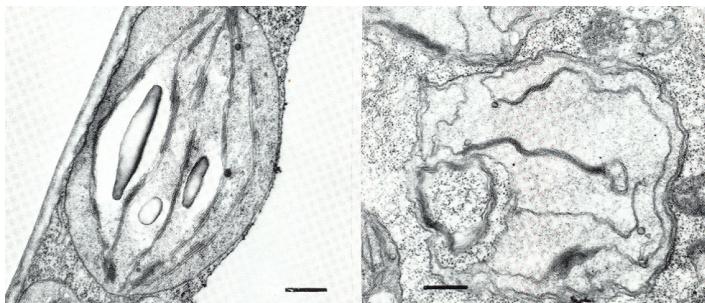
Slika 26: Mezofilna celica lista kitajskega zelja, okuženega s TYMV. A, Nabrekli in okrogli kloroplasti s številnimi perifernimi vezikli. Merilo = 500 nm. B, Kloroplastni periferni vezikli z dvoplastno membrano in fibrilarno vsebino (↑). Merilo = 100 nm (Francki in sod., 1985).

V kloroplastih lahko nastanejo vakuoli podobni vezikli verjetno iz vgreznenih veziklov na notranji površini membrane kloroplasta. Takšne ultrastrukturne spremembe najdemo pri *Nicotiana clevelandii*, okuženi z APLV, CYVV ali z EMV in navadnem grahu, okuženem s KYMV (Francki in sod., 1985) (Slika 27).



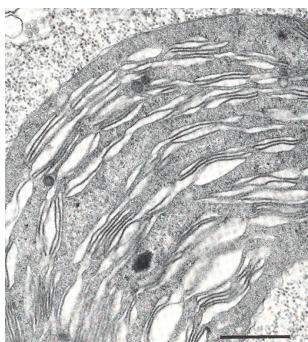
Slika 27: Mezofilna celica navadnega graha, okuženega s KYMV. V pozni fazici okužbe se pokažejo okrogli kloroplasti z velikimi vakuolami in številnimi perifernimi vezikli. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

Kloroplasti so manjši, s slabo razvitimi granami in majhnimi škrobnimi zrni. Takšne ultrastrukturne spremembe se pojavljajo pri *Nicotinia clevelandii*, okuženi z virusom mozaika kumar (Cucumber mosaic virus, CMV-U, T, M veriga) (Francki in sod., 1985) (Slika 28).



Slika 28: Levo in desno - Celica iz lista rastline *Nicotiana clevelandii*, okužene s CMV. Manjši kloroplasti s slabo razvitimi granami in majhnimi škrobnimi zrni. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

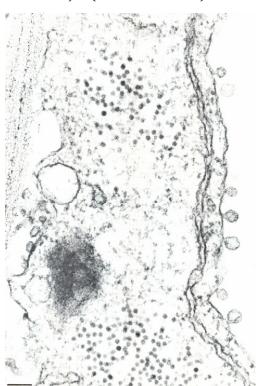
Tilakoide kloroplasta so delno ločene pri bobu, okuženem z BBMV (Francki in sod., 1985) (Slika 29).



Slika 29: Listne celice boba, okuženega z BBMV. Tilakoide kloroplasta so delno razmaknjene. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

2.5.6 Ultrastrukturne spremembe vakuole

Na notranji površini tonoplasta so majhni vezikli, v katerih lahko vidimo fibrilarno snov, ki spominja na nukleinske kisline. Te ultrastrukturne spremembe se pojavijo pri: rastlini *Nicotiana x edwardsonii*, okuženi s TNV, navadnem tobaku, okuženem s TAV in rastlini *Nicotiana glutinosa*, okuženi z virusom mozaika pepina (Pepino mosaic virus, PepMV) (Francki in sod., 1985) (Slika 30).



Slika 30: Listne celice rastline *Nicotiana x edwardsonii*, okužene s TNV. Majhni vezikli s fibrilarno vsebino, povezani z notranjo površino tonoplasta, ob katerem je ER. Merilo = 500 nm (Francki in sod., 1985).

2.6 TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Danes se za dokazovanje prisotnosti virusa, ki je povzročitelj razbrazdanja lesa v rastlinskem materialu, uporablajo metode, ki temeljijo na seroloških lastnostih (ELISA), na infektivnosti (s testnimi rastlinami, na katere inokuliramo sok okužene rastline), na lastnostih nukleinskih kislin virusa, ter na morfologiji virusa. Najhitrejše in najučinkovitejše od teh so molekularne metode, ki temeljijo na lastnostih nuklinskih kislin virusa in transmisija elektronska mikroskopija, ki temelji na morfologiji virusa in njegovih seroloških lastnostih.

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. Med posredne molekularne metode pa uvrščamo hibridizacijske metode (fluorescentna in situ hibridizacija ali FISH, hibridizacija po Southernu, hibridizacija po Northernu, dot-blot hibridizacija, mikromreže) in metode pomnoževanja delov nukleinskih kislin (verižna reakcija s polimerazo – PCR in PCR v realnem času) (Poljak, 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). Uporablja pa se tudi za pregledovanje poltankih rezin, kot orientacija pri rezanju ultratankih rezin.

TEM je po konstrukciji zelo podoben svetlobnemu mikroskopu. Elektronski žarek prihaja iz elektronske puške v kateri je katoda – filament (vorframova žarilna nitka) ali kristal, ki oddaja elektrone. Elektrone pospešujemo v vakumu s pomočjo anode. Žarek elektronov gre najprej skozi tanko odprtino v anodi, nato pa ga posebne elektromagnetne leče zberejo v različnih ravneh. V objektu pride do interakcije elektronov žarka in različnih delov preparata. Elektroni se elastično in neelastično sipajo in odbijajo, tisti, ki gredo skozi, pa se zberejo v žariščni ravnini in tako dobimo sliko. Zaradi sisanja elektronov so na sliki gosta mesta preparata temna, ker so to predeli z zmanjšanim elektronskim tokom (Štrus, 1996).

Preparat za TEM mora biti dovolj tanek, da žarek lahko prehaja skozenj. V primeru negativnega kontrastiranja virusov so virusi dovolj majhni, če pa želimo gledati tkivo, morajo biti rezine zelo tanke (okoli 70 nm).

2.6.1 Rezine za opazovanje ultrastrukture

Rastlinski material je za elektronsko mikroskopijo težavnejši od živalskega materiala. Debele celične stene, pogosto slabša prepustnost plazmaleme, visoka stopnja hidratacije celic (zaradi velike vodne vakuole), pogosta prisotnost zraka v medceličnih prostorih in pogosto hidrofobna površina rastlin so vzrok, da fiksativi in smole za elektronsko mikroskopskopijo težje prodirajo v rastlinske celice. Zato so tudi časi inkubacije rastlinskega tkiva daljši od časov inkubacije živalskega tkiva. Izjeme so le pri zelo mladih rastlinskih tkivih, kot so meristemske celice, mladi listi, laski in gamete (Robards in Wilson, 1993).

2.6.1.1 Fiksacija

S TEM, ki deluje v visokem vakumu, ne moremo opazovati živih objektov. Vzorce moramo zato najprej mehansko (zmrzovanje) ali kemijsko (fiksirna sredstva kot so formaldehid, glutaraldehid, osmijev tetroksid) fiksirati. Pomembno je, da vsaka celica čim hiteje pride v stik s fiksativom, saj s tem stabiliziramo celične strukture, tako da ustavimo proces avtolize in da ohranimo stanje čim bolj podobno stanju v živi celici (Štrus, 1996). Da ne pride do odstopanja plazmaleme od celične stene je med drugim pomembna osmolarnost raztopine fiksativa v pufru. Najboljše rezultate dajo rahlo hipertonične raztopine (Bullock, 1983). Pri rastlinskem tkivu se kot fiksativ ponavadi uporablja mešanica glutaraldehyda in formaldehyda v fosfatnem pufru (Hayat, 2000).

2.6.1.1.1 FORMALDEHID

Formaldehid je monoaldehid in je njenostavnejši aldehidni fiksativ. Je brezbarven plin, ki se topi v vodi, s katero reagira v metilenglikol. Pri koncentraciji, višji od 2% polimerizira in tvori polioksimetilenglikolne molekule. Metilenglikol v celici reagira z amino, amidnimi in sulfihidrilnimi skupinami, da nastane metilenski most. Polioksimetilenglikolne molekule so pri zamreženju hitrejše od metilenglikolnih (Griffiths, 1993). Formaldehid hitreje prehaja v celice tkiva, vendar slabše zamreži beljakovine, zato se uporablja v kombinaciji z glutaraldehydom za fiksiranje kompaktnejšega tkiva (semena), v katerega glutaraldehid zelo težko prehaja (Hayat, 2000).

2.6.1.1.2 GLUTARALDEHID

Glutaraldehid je alifatski dialdehid s petimi ogljiki. Ima relativno majhno viskoznost in je topen v vodi ter organskih topilih. Glutaraldehid je molekula brez naboja z molekulsko maso 100 g/mol, kar ji omogoča prehajanje skozi membrane, čeprav zaradi svoje velikosti potuje po tkivu nekoliko počasneje. Med fiksativi je najučinkovitejši pri ohranjanju ultrastruktur, ker hitro, učinkovito in irreverzibilno zamreži beljakovine. S tem stabilizira celični sistem mikrotubulov in mikrofilamentov ter celične organele (Hayat, 2000).

2.6.1.1.3 OSMIJEV TETROKSID

Molekula OsO₄ je simetrične tetraedrične oblike in je zato nepolarna. Ta lastnost ji omogoča prehajanje skozi nabite površine tkiv, celic in organelov, zaradi česar je zelo uporabna, kadar nas zanima znotrajcelična struktura. Največkrat se uporablja pri sekundarni fiksaciji za stabilizacijo lipidnih membran, pri čemer reagira z dvojnimi vezmi nenasičenih maščobnih kislin (Griffiths, 1993). Zaradi visoke molekulske mase izboljša kontrast, kar je njegova velika prednost pred ostalimi fiksativi. Njegova slaba lastnost je počasno prehajanje v tkivo, in nesposobnost zamreženja večine proteinov ter neohranjanje ogljikovih hidratov. Zaradi teh lastnosti se lahko ultrastruktura tkiva med fiksacijo bistveno spremeni. Ker zakrije tudi antigene, ga ne uporabljam, kadar želimo na rezinah imunocitokemijsko označiti antigene (Hayat, 2000).

2.6.1.2 Dehidracija

Dehidracija pomeni izmenjavo vode z organskimi topili kot sta aceton in etanol. Dehidracija tkiva je potrebna zaradi narave nekaterih smol za vklapljanje, ki se ne mešajo z vodo in zato, ker bi voda iz tkiva v okolju znižanega tlaka v elektronskem mikroskopu izparevala ter tako motila žarek elektronov.

Za dehidracijo navadno uporabljam naraščajočo alkoholno vrsto. Etanol skoraj ne povzroča razgradnje proteinov, pri visoki koncentraciji pa lahko pride do spiranja lipidov. Ker je epoksidna smola higroskopska, je treba še posebej paziti, da ne pride do stika z vodo, zato moramo pred vklapljanjem v smolo Agar 100 zamenjati etanol še z acetonom (Hayat, 2000).

2.6.1.3 Vklapljanje v epoksidno smolo

Ker tkiva niso dovolj čvrsta, da bi jih lahko rezali na zelo tanke rezine, jih vklapljam v primerno trd material, ki nam to omogoča. Obstaja zelo malo takšnih materialov, epoksidne smole so ene najboljših. Monomeri epoksidnih smol imajo značilno epoksidno skupino, ki tvori obroč iz dveh ogljikovih in enega kisikovega atoma. Ker reagirajo z molekulami celic, dobro ohranjajo strukturo, kar je primerno za opazovanje znotrajceličnih struktur (Luft, 1973; Hayat, 2000).

Polimerizacija epoksidnih smol poteka pri visokih temperaturah (35 - 60°C), pri čemer se tkivo lahko malo skrči (~ 2%). Mehanizem zamreženja tkiva s smolo je odvisen od trdilcev in pospeševalcev. Trdilci, kot so organski anhidridi, reagirajo z vmesnimi hidroksilnimi skupinami molekul smole in med njimi oblikujejo povezave. Ker je rakkja med trdilcem in smolo običajno počasna in zahteva visoko temperaturo, dodamo pospeševalec, ki pospešuje cepitev epoksidnih obročev, pri čemer se sprošča energija, ki omogoča polimerizacijo monomernih molekul smole pri nižjih temperaturah (Hayat, 2000).

Epoksidne smole so manj uporabne za imunsko označevanje antigenov, ker se pri rezanju epoksidnih smol naredi prenizek relief in ker so preveč hidrofobne, zaradi česar povzročajo preveliko ozadje (Kellenberger s sod., 1987; Causton, 1984). Za imunolokalizacijo so primernejše metakrilatne smole, ki ne reagirajo s celičnimi beljakovinami. Ker je rezanje lom po liniji najmanjšega odpora, gre lom v celici po stiku smole in beljakovine, pri čemer se lahko izpostavi do 6 nm višine beljakovine (Kellenberger s sod., 1987).

2.6.1.4 Rezanje ultratankih rezin

Za prehod elektronov skozi preparat je pomembno, da je preparat za opazovanje čim tanjši. Šele s konstrukcijo prvega ultramikrotoma (Palede in Blim, 1953) so bile dane možnosti za pripravo ultratankih rezin (Štrus, 1996).

Diamantni nož ima za rezanje veliko prednosti pred steklenimi noži. Prihrani nam ogromno časa, ker se z rezanjem kvaliteta ne slabša in ga ni potrebno menjevati; omogoča rezanje ekstremno tankih rezin (1 - 2 nm) za visoko resolucijo elektronske mikroskopije. Diamant je najtrši znan material, kar pomeni, da je odporen na strganje in drgnjenje. Ni pa tako odporen na lomljenje, zato je treba biti pri njegovi uporabi še posebej pazljiv (Hayat, 2000).

2.6.1.5 Kontrastiranje rezin

Kontrast pri TEM nastane zaradi elastičnega in neelastičnega sisanja in odbijanja elektronov, ki zadanejo v atome tkiva. Elastično sisanje elektronov se dogaja, ko se elektroni približajo jedru atoma in se zaradi elektrostatičnega privlaka odklonijo za nekaj stopinj, zaradi česar jih večina zgreši objektiv, pri tem pa ne izgubijo energije. Pri neelastičnem sisanju gre za interakcijo elektronov z elektroni iz orbitale atoma v vzorcu. V tem primeru elektroni izgubijo toliko energije, da ne pridejo do objektiva, njihovi odkloni pa so manjši od pol stopinje, zato bi se teoretično še ujeli v objektiv. Na delih, kjer se elektroni elastično in neelastično sipajo, vidimo temna polja. Elektroni, ki pridejo neovirano skozi vzorec, se zberejo v žariščni ravnini kot svetla polja. Tako dobimo črno-belo sliko.

Težke kovine s svojo visoko atomsko maso omogočajo večji opisani učinek in zato boljši kontrast kot atomi organskih snovi (ogljik, kisik, vodik, dušik) z manjšo atomsko maso. Kontrast lahko povečujemo tudi z zmanjševanjem napetosti zaradi česar se elektroni gibljejo počasneje in se tako sipajo pod večjim kotom.

Obstajajo specifična kontrastirna sredstva, ki se vežejo samo na določene strukture, pa tudi univerzalna kontrastirna sredstva, ki se vežejo na vse strukture v tkivu (Hayat, 2000).

2.6.1.5.1 URANIL-ACETAT

Uranil-acetat je ena najpogosteje uporabljenih soli za pozitivno kontrastiranje ultratankih rezin rastlinskega tkiva. Veže se na nukleinske kisline in proteine, z njimi pa se slabše kontrastirajo membrane (Robards in Wilson, 1993).

2.6.1.5.2 SVINČEV CITRAT

Svinčev citrat ima visoko afiniteto vezave na lipide in glikogen. Reagira z ogljikovim dioksidom iz zraka, pri čemer se tvori oborina svinčevega karbonata, zato ga je treba shranjevati v zaprtih epruvetah ter ga tik pred začetkom kontrastiranja prefiltrirati ali prevreti, da se odstrani ves CO₂ (Robards in Wilson, 1993).

2.6.2 Negativni kontrast

Metoda negativnega kontrastiranja se uporablja za identifikacijo virusov v soku okuženih rastlin. Zgradba nekaterih virusov je tako značilna, da jih po morfoloških posebnostih lahko uvrstimo v določeno družino. Pogoj za optimalno opazovanje virusov je zadostno število njihovih delcev, kar včasih predstavlja omejitev (Mavrič in Ravnikar, 1998).

2.6.2.1 Priprava mrežic

Za negativno kontrastiranje so priporočljive mrežice z gosto mrežo s 400 okni, ker imajo lahko zaradi dobre opore tanjšo folijo iz formvarja, s tem pa sta kontrast in resolucija boljša (Milne, 1993). Mrežice je dobro napariti z ogljikom, ker so ogljikovi atomi zaradi relativno nizke atomske mase zelo dobro prepustni za elektronski žarek. Tako lahko zaradi čistega ozadja lepše vidimo detajle vzorca, ki ga opazujemo (Hayat, 2000).

2.6.2.2 Homogenizacija rastlinskega materiala

Za opazovanje RSPaV iz tkiva vinske trte je zelo pomembno, da se pri homogenizaciji uporablja fosfatni pufer s PVP, saj virusov niso našli v vzorcih homogeniziranih s fosfatnim pufrom brez PVP (Petrovič in sod., 2003).

2.6.2.3 Lovljenje virusov s protitelesi

Če so koncentracije virusov v rastlinskem soku zelo nizke, si pomagamo z metodo imunske elektronske mikroskopije (Immuno electron microscopy, IEM), ki neposredno povezuje serologijo z elektronsko mikroskopijo. Prednost metode lovljenja virusov s potitelesi (immuno-sorbent electron microscopy, ISEM, trapping) pred ELISA testom je predvsem v tem, da z elektronskim mikroskopom opazujemo imunsko reakcijo. Tako se lahko prepričamo, da gre res za reakcijo protiteles z virusom in ne za reakcijo s kakšno drugo celično komponento. To je tudi vzrok, da se ISEM uporablja za testiranje tistih vzorcev, ki kažejo pri ELISA testu mejno vrednost. Pri metodi lovljenja virusov s potitelesi mrežice prekrijemo s protitelesi in jih nato inkubiramo z rastlinskim sokom, v katerem iščemo viruse. Na ta način koncentriramo virusne delce (Van Regenmortel in Dubs, 1993; Mavrič in Ravnikar, 1998).

2.6.2.4 Dekoracija virusov s protitelesi

Z dekoracijo izboljšamo metodo ISEM, kar pomeni, da na mrežico adsorbirane viruse označimo s še enim protitelesom, ki so specifični za virusno plično beljakovino. S protitelesi dekorirane viruse pod elektronskim mikroskopom zlahka ločimo od nedekoriranih (Van Regenmortel in Dubs, 1993; Mavrič in Ravnikar, 1998; Petrovič in sod., 2003).

2.6.2.5 Kontrastiranje z uranil-acetatom

Negativno kontrastiranje povečuje sisanje elektronov zaradi prisotnosti atomov težkih kovin v hidrofilnih področjih vzorca, kar izboljšuje kontrast. Vzorec in kontrastno sredstvo povzročata različno sisanje elektronov, kar vidimo kot svetli vzorec in temno kontrastno sredstvo. V prisotnosti uranil-acetata (U-Ac) se delci dobro primejo na formvar folijo in so relativno dobro negativno kontrastni, saj U-Ac ne povzroča večje granulacije ozadja. Leta se povečuje v prisotnosti elektronskega žarka. U-Ac se uporablja pri pH 2 - 5. Pri višjem pH in tudi v prisotnosti fosfatnega pufra se obarja v kristalno obliko. Na svetlobi in v prisotnosti kisika razpada. Vzorci, pripravljeni z U-Ac so stabilni in jih lahko shranimo za dalj časa (Hayat, 2000).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Izbrali smo dve zdravi in dve z RSPaV okuženi rastlini rupestrisa (*Vitis rupestris* Scheele):

- rupestris sorte St. George 8, ki je bil cepljen z okuženim trsom vinske trte (*Vitis vinifera* L.) sorte Refošk (6 II/18)
- rupestris sorte St. George 8
- rupestris sorte St. George 5, ki je bil cepljen z okuženim trsom vinske trte sorte Refošk (38 VIII/44)
- rupestris sorte St. George 5

Rastline so rastle v rastlinjaku pri relativni vlažnosti 50% (poleti) ali 30% (pozimi) in temperaturi 20 - 22°C ali več (poleti). Rastline so rastle pri sončni svetlobi in naravni fotoperiodi. V decembru smo rastline porezali in jih za en mesec prestavili v mračni prostor s temperaturo 2 - 10°C.

Poleg tega smo v začetku julija v selekcijskem vinogradu v Komnu na Krasu, ki je bil posajen v letih od 1989 do 1991 z namenom izbrati ustrezne elite za klonsko selekcijo in odbiro zdravih cepljenk ter obdržati stare tipe sorte Refošk (Tomažič, 1999), nabrali zelene poganjke 12 trsov vinske trte sorte Refošk:

- vinska trta sorte Refošk 3 I/49
- vinska trta sorte Refošk 4 I/90
- vinska trta sorte Refošk 6 II/18
- vinska trta sorte Refošk 16 IV/8
- vinska trta sorte Refošk 26 VI/1
- vinska trta sorte Refošk 26 VI/3
- vinska trta sorte Refošk 26 VI/5
- vinska trta sorte Refošk 28 VI/41
- vinska trta sorte Refošk 38 VII/44
- vinska trta sorte Refošk 43 VIII/113
- vinska trta sorte Refošk 48 IX/43
- vinska trta sorte Refošk 63 VII/120

3.2 ANALIZA VZORCEV

Z različnimi metodami smo preverili prisotnost 10 različnih virusov v izbranih vinskih trtah, med njimi tudi prisotnost virusa RSPaV.

3.2.1 ELISA

3.2.1.1 Homogenizacija rastlinskega materiala za test ELISA

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

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

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

3.2.1.2 Test ELISA

S testom ELISA smo dokazovali 9 najpogosteje prisotnih virusov pri vinski trti: GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA in GVB. Uporabili smo dve različni tehniki: neposredno metodo dvojni sendvič (DAS ELISA) in posredno metodo (indirect PTA ELISA). V obeh primerih smo na mikrotitrsko ploščice v posamezne vdolbinice nanesli 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

3.2.1.2.1 NEPOSREDNA METODA DVOJNI SENDVIČ (DAS ELISA)

Test DAS ELISA smo uporabili za analizo prisotnosti virusov GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6 in GVA s protitelesi proizvajalca Bioreba.

V vdolbinice mikrotitrsko ploščico (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 ekstracijskem 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 prisotnost virusa, odčitali spektrofotometrično pri 405 nm. Uporabili smo čitalec mikrotitrskih ploščic Dynatech MR5000 in program BioLinx 2.20.

3.2.1.2.2 POSREDNA METODA (INDIRECT PTA ELISA)

S posredno metodo ELISA smo analizirali prisotnost virusa GVB.

V vdolbinice mikrotitrске ploščice (Greiner) smo odpipetirali po 200 µl v ekstracijskem 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 GVB. Specifična protitelesa proti virusu GVB (Agritest) smo nanesli razredčena v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000. Po dveh urah inkubacije pri 37 °C smo ploščico 4-krat sprali s pufrom za izpiranje. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 180 µl protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo, razredčenih v konjugatnem pufru v razmerju 1 : 1000 za GVB (Agritest). 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.

3.2.1.2.3 OBDELAVA PODATKOV TESTA ELISA

Podatke smo obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel. 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 ali dveh urah inkubacije 2-krat do 3-krat večja kot absorpcija referenčne negativne kontrole. Ta način določanja meje med pozitivnimi in negativnimi vzorci se uporablja tudi v rutinskem testiranju.

3.2.2 RT-PCR

3.2.2.1 Izolacija celokupne RNA

Za izolacijo celokupne RNA smo od vsake rastline vzeli po tri različne dele poganjka (mlade liste, starejše liste ter združena zeleni del steba in nastrgan floem olesenelega dela poganjka).

Za izolacijo celotne RNA smo uporabili kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). V mikrocentrifugirko, ki je vsebovala 200 mg v tekočem dušiku homogeniziranega vzorca, smo dodali 900 µl pufra RLT, ki vsebuje gvanidinjev izotiocianat, ki inaktivira RNaze. Vzorec smo dobro premešali in inkubirali 3 minute na 56°C. Lizat smo nato prenesli v kolono QIAshredder (nameščeno v mikrocentrifugirki) in centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm. Supernatant smo prestavili v novo mikrocentrifugirko, mu dodali 0,5 volumna etanola in dobro premešali. Vzorec smo prenesli v kolono RNeasy mini spin (nameščeno v mikrocentrifugirki) in centrifugirali 20 sekund pri 10000 rpm. Kolono smo spirali tako, da smo vanjo zaporedoma dodali 700 µl pufra RW1 in centrifugirali 20 sekund pri 10000 rpm, dodali 500 µl pufra RPE in centrifugirali 20 sekund pri 13000 rpm, dodali 500 µl pufra RPE in centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm. Po vsakem centrifugiranju smo kolono RNeasy mini spin prestavili v novo mikrocentrifugirko. RNA smo iz kolone RNeasy mini spin izprali z zaporednim nanosom vode na kolono. 20 µl vode smo inkubirali 1 minuto, centrifugirali 1 minuto pri 10000 rpm, za tem dodali še 20 µl vode, inkubirali 1 minuto in centrifugirali 2 minuti pri 10000 rpm. Iz posamezne kolone smo tako dobili 40 µl celotne RNA, ki smo jo shranili pri -80 °C.

3.2.2.2 Postopek RT-PCR

3.2.2.2.1 DENATURACIJA RNA

Po 10 µl dsRNA od vsakega vzorca smo denaturirali 5 minut pri 94°C v termobloku.

3.2.2.2.2 SINTEZA cDNA

Za sintezo komplementarne verige (cDNA) smo pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala:

- 2,5 µl avtoklavirane ddH₂O
- 4 µl 10 x PCR pufer (ABI)
- 2 µl 25 mM MgCl₂ (ABI)
- 8 µl 10 mM dNTP (ABI)
- 0,5 µl RNase inhibitor (ABI)
- 1 µl MMLV reverzna transkriptaza (Promega)
- 1 µl začetni oligonukleotidi 1
- 1 µl začetni oligonukleotidi 2

K 20 µl reakcijske mešanice smo dodali 5 µl denaturirane celokupne RNA. Vzorce smo inkubirali v aparaturi za PCR (Prekin Elmer 9700) 1 h pri 42°C.

Uporabili smo dva para začetnih oligonukleotidov:

- RSP 52 5'-TGAAGGCTTTAGGGGTTAG-3'
- RSP 53 5'-CTTAACCCAGCCTTGAAAT-3'

- RSP 48 5'-AGCTGGGATTATAAGGGAGGT-3'
- RSP 49 5'-CCAGCCGTTCCACCACTAAT-3'

Par začetnih oligonukleotidov RSP 52 in RSP 53 pomnožuje 905 bp dolg del virusnega genoma, ki zajema celo virusno plaščno beljakovino (od nukleotida 7709 do nukleotida 8595) (Nolasco in sod., 2000).

Par začetnih oligonukleotidov RSP 48 in RSP 49 pomnožuje 330 bp dolg del virusnega genoma, ki kodira osrednji del virusne plaščne beljakovine (od nukleotida 8178 do nukleotida 8507) (Nolasco in sod., 2000).

3.2.2.2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Za verižno reakcijo s polimerazo smo pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala:

- 29 µl avtoklavirane ddH₂O
- 4 µl 10 x PCR pufer (ABI)
- 2 µl 25mM MgCl₂ (ABI)
- 3,2 µl 10 mM dNTP (ABI)
- 0,2 µl Taq DNA polimeraza (ABI)
- 0,8 µl začetni oligonukleotidi 1
- 0,8 µl začetni oligonukleotidi 2

K 40 µl mešanice za verižno reakcijo s polimerazo smo dodali 5 µl cDNA. Vzorce smo inkubirali v aparaturi za PCR (Prekin Elmer 9700):

94°C	3 min	
94°C	50 s	
55°C	50 s	} 40 ciklov
72°C	1,5 min	
72°C	10 min	

3.2.2.2.4 GELSKA ELEKTROFOREZA

Produkte verižne reakcije s polimerazo smo preverili z elektroforezo na 2% agaroznem gelu. 5 g agaroze (Agaroze for Routine use) in 250 ml pufra TAE smo v erlenmajerici segrevali do vretja, ohladili na 50°C, dodali 10 µl EtBr, premešali in nalili v nosilec za gel. Na gel smo nanesli 20 µl cDNA, zmešane s 4 µl nanašalnega pufra za elektroforezo. Uporabili smo 1 µl označevalca velikosti (Marker Gene Ruler™ 100 bp). Elektroforeza je potekala 90 minut pri napetosti 100V.

3.2.3 Testiranje prisotnosti RSPaV z elektronskim mikroskopom

Na prisotnost virusa RSPaV smo testirali tri različne dele mladega poganjka (starejši listi, mladi listi, floem mladega poganjka) štirih rastlin rupestrisa sorte St. George in 12 rastlin vinske trte sorte Refošk.

3.2.3.1 Priprava mrežic za elektronsko mikroskopijo

Uporabljali smo mrežice za elektronsko mikroskopijo proizvajalca Agar Scientific s premerom 3 mm, gosto mrežo (400 okenc), prevlečene s formvar folijo in naparjene z ogljikom, ki nudi virusom in drugim strukturam površino, na katero se lahko adsorbirajo.

3.2.3.2 Priprava raztopin

0,1 M fosfatni pufer (PB) za elektronsko mikroskopijo

raztopina A:

0,2 M NaH ₂ PO ₄ X 2H ₂ O	6,24 g
dd H ₂ O	200 ml

raztopina B:

0,2 M NaH ₂ PO ₄	7,5 g
dd H ₂ O	300 ml

Za 1 l 0,1 M PB za elektronsko mikroskopijo smo zmešali:

raztopina A	200 ml
raztopina B	300 ml
dd H ₂ O	500 ml

Umerili smo pH na 6,8 in hranili v hladilniku.

Ekstrakcijski pufer za vinsko trto (0,1 M PB z 2% PVP):

0,1 M PB za EM virusov	100 ml
PVP (polivinil-pirolidin)	2 g

1% uranil-acetat

(CH ₃ COO) ₂ UO ₂ x 2H ₂ O	1 g
dd H ₂ O	100 ml

3.2.3.3 Ekstrakcija

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 300 µl ekstrakcijskega pufra za vinsko trto. Iz delov lista z bolezenskimi znaki smo z britvico izrezali 3 x po 2 mm² velike koščke. Iz olesenelih delov smo s skalpelom odstranili les in nastrgali notranje plasti. Vzorce smo prenesli v mikrocentrifugirke s pufrom, kjer smo jih s palčkami strli. Za vsak vzorec smo uporabili drugo palčko.

3.2.3.4 Lovljenje virusov s protitelesi (ISEM) in dekoracija

Za določanje prisotnosti virusa v vzorcih smo izbrali metodo lovlenja virusov s protitelesi, ker so koncentracije virusa zelo nizke. Da smo dokazali, da so virusni delci, ki so se ulovili na mrežico za EM res RSPaV, smo virusne delce dekorirali s protitelesi.

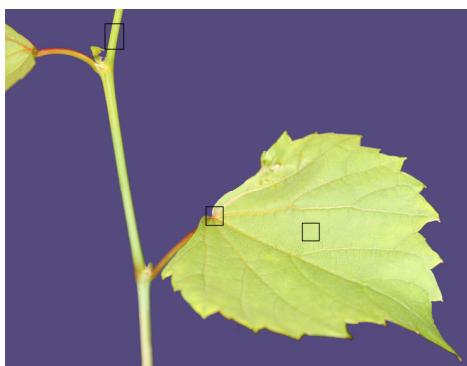
Na kapljico neprečiščenih poliklonskih protiteles As7-276 (15 - 20 µl na parafilmu), redčenih 1:1000 v 0,1 M PB, smo položili mrežico s stranjo s formvar folijo in naparjenim ogljikom navzdol, kamor so se v času 15 minutne inkubacije adsorbirala protitelesa. Mrežico smo sprali s približno 40 kapljicami 0,1 M PB in popivnali s filter papirjem. Zatem smo jo položili na kapljico vzorca in inkubirali 60 minut, popivnali s filter papirjem in jo sprali s približno 40 kapljicami 0,1 M PB. Mrežico smo nato položili na kapljico neprečiščenih poliklonskih protiteles As7-276, redčenih 1:50 v 0,1 M PB in inkubirali 15 min. Ostanek protiteles smo popivnali s filter papirjem in mrežico sprali s približno 40 kapljicami bdestilirane vode. Mrežico smo kontrastirali s 7 kapljicami 1% uranil-acetata, s filter papirjem popivnali preostanek U-Ac in jo položili na papir, da se je dobro posušila na zraku.

3.2.3.5 Pregledovanje mrežic

Mrežice smo pregledali s pomočjo transmisijskoga elektronskega mikroskopa (Philips CM 100) pri 80 kV, pri povečavah od 15000-krat do 92000-krat.

3.2.3.6 Lokalizacija in kvantifikacija RSPaV v poganjku

Prisotnost RSPaV smo z metodama trapping in dekoracijo preverjali v različnih delih zelenega poganjka (floem, listna ploskev in listne žile) (Slika 31) rupestrisa sorte St. George in vinske trte sorte Refošk. Pri nekaterih trtah sorte Refošk smo preverili prisotnost RSPaV le v floemu. Na vsaki mrežici s 400 okenci smo pregledali od 10 do 15 okenc in prešteli vse viruse RSPaV, ki smo jih na njih videli. Za lažjo predstavo smo števila pretvorili v znake: (+) pomeni 1-3 viruse, (++) pomeni 4-7 virusov, (+++) pomeni 8 in več virusov, (-) pa pomeni, da virusov na površini 10-15 okenc nismo našli.



Slika 31: Prikaz delov zelenega poganjka (□), v katerih smo preverjali prisotnosti virusa z imunsko elektronско mikroskopijo.

3.3 PRIPRAVA PREPARATOV ZA OPAZOVANJE ULTRASTRUKTURE Z ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

3.3.1 Priprava raztopin

0,1 M fosfatni pufer (PBS):

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,89 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
dd H ₂ O	1 l
pH=7	

0,08 M fosfatni pufer (PBS):

0,1 M PBS	400 ml
dd H ₂ O	100 ml

4% paraformaldehid (PA):

PA (Agar Scientific)	1,6 g
PBS	40 ml

Mešali smo čez noč, ker se zelo počasi topi.

pH = 7

Fiksativ (2% PA in 3% GA):

4% PA	10 ml
25% glutaraldehid (GA) (Agar scientific)	1,8 ml
0,08 M PBS	8,2 ml

Trdni (Hard) Agar 100 (Agar scientific):

Agar 100 epoxy smola	20 ml
DDSA trdilec	9 ml
MNA trdilec	12 ml

BDMA akcelerator 1,2 ml

Dodali smo ga tik preden smo vzorčke vstavili v modelčke.

3% vodni uranil-acetat

uranil-acetat (MERCK)	0,3 g
dd H ₂ O	10 ml

1% OsO₄

2% vodna raztopina OsO ₄ (Agar scientific)	10 ml
PBS	10 ml

Svenčev citrat

Pb ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ X 3H ₂ O (Agar scientific)	0,04 g
1 M NaOH	10 ml

3.3.2 Vklapljanje rastlinskega tkiva v smolo Agar 100

Smolo Agar 100 smo pred začetkom vklapljanja zmešali iz posameznih komponent po navodilih proizvajalca za trdo (hard) smolo, brez akceleratorja.

Celoten postopek fiksacije, dehidracije in infiltracije smo izvedli v mikrocentrifugirkah pri sobni temperaturi med stalnim mešanjem na vrtljivem kolesu.

3.3.2.1 Primarna fiksacija

Od vsake rastline smo vzeli mlade liste, stare liste in mlado zeleno stebelo, iz katerih smo neposredno v fiksativu v petrijevki narezali koščke tkiva in jih hitro prenesli v mikrocentrifugirke s fiksativom. Fiksacija je potekala 2 h. Po fiksaciji smo odstranili fiksativ in njegove ostanke sprali 3-krat po 10 min s PBS.

3.3.2.2 Sekundarna fiksacija

Koščke tkiva smo dali za 1 h v 1% OsO₄. Po končani sekundarni fiksaciji smo odstranili fiksativ in njegove ostanke spirali 3-krat po 5 min z 0,08M PBS.

3.3.2.3 Dehidracija

Fiksirane koščke tkiva smo dehidrirali v naraščajoči alkoholni vrsti, nato pa etanol zamenjali z acetonom. Prva stopnja dehidracije je potekala 20 min v 30% etanolu, druga prav tako 20 min, tokrat v 50% etanolu. V 70% etanolu smo koščke tkiva pustili čez noč. Naslednji dan smo jih dali v 90% etanol za 20 min in nato 2-krat po 20 min v absolutni etanol. Etanol smo z acetonom zamenjali postopno. Najprej smo dali koščke tkiva za 20 min v mešanico absolutnega etanola in acetona v razmerju 1:1, nato pa 2-krat za 20 min v aceton.

3.3.2.4 Infiltracija

Tudi infiltracija smole v tkiva je potekala postopno. Koščke tkiva smo dali najprej za 2 h v mešanico acetona in smole Agar 100 v razmerju 1:1, nato za 1 h v čisto smolo. Potem smo smolo zamenjali in inkubirali čez noč. Naslednji dan smo dali koščke tkiva še enkrat v čisto smolo za 1 h.

3.3.2.5 Polimerizacija

Smoli smo najprej dodali akcelerator ter jo mešali, da se ni prehitro trdila. V modelčke za plosko vlaganje smo dali najprej malo smole, nanjo položili koščke tkiva, jih poravnali in modelčke do vrha napolnili s smolo. Pazili smo, da ni bilo mehurčkov zraka.

Polimerizacija je potekala 3 dni pri 65°C. V smolo vključene koščke tkiva smo nato vzeli iz modelčkov in jih pred začetkom rezanja pustili stati najmanj 1 teden.

3.3.3 Poltanke rezine

3.3.3.1 Rezanje poltankih rezin

Poltanke rezine debeline 0,6 - 0,7 µm, smo rezali s steklenim nožem na ultramikrotomu (Reichert Ultracut S). Steklene nože smo naredili s pripravo za izdelovanje steklenih nožev (Reichert Knifemaker).

3.3.3.2 Barvanje poltankih rezin

Poltanke rezine smo z vodne površine kadičke na steklenem nožu prenesli v kapljico 30% raztopine acetona na objektno stekelo. Raztopino acetona smo posušili nad gorilnikom, da so se rezine prilepile na steklo. Vzorčke smo barvali s toluenskim modrilom, pripravljenim iz 2% toluenskega modrila, 2% boraksa in bidestilirane vode v razmerju 1:1:2. Kapljo barvila smo kanili na rezine, malo segreli in nato sprali s curkom vode.

3.3.3.3 Opazovanje poltankih rezin

Poltanke rezine smo opazovali s svetlobnim mikroskopom (Nikon) pri povečavah od 10-krat do 40-krat.

3.3.4 Ultratanke rezine

3.3.4.1 Rezanje ultratankih rezin

Ultratanke rezine debelin 70 nm smo rezali z diamantnim nožem (Du Pont Instruments Diamond Knife) na ultramikrotomu (Reichert Ultracut S.). Z vodne površine kadičke diamantnega noža smo ultratanke rezine pobrali na mrežice prevlečene s formvar folijo. Večinoma smo uporabljali mrežice z eno večjo luknjico (slot), pa tudi mrežice s 75 okni (75 mesh) in mrežice s 150 okni (150 mesh).

3.3.4.2 Kontrastiranje ultratankih rezin

Pred opazovanjem pod elektronskim mikroskopom smo rezine kontrastirali najprej 35 min s 3% vodnim uranil-acetatom, sprali z vodo in nato kontrastirali še 8 - 10 min s svinčevim citratom. Mrežice smo še enkrat sprali z vodo, jih posušili na zraku in shranili v škatlici.

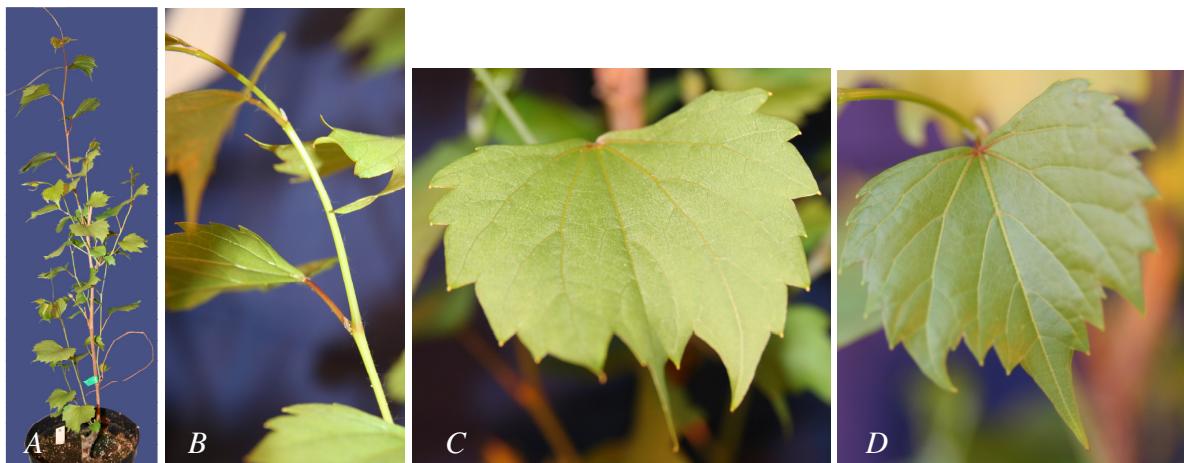
3.3.4.3 Opazovanje ultratankih rezin z elektronskim mikroskopom

Ultratanke rezine smo opazovali s transmisijskim elektronskim mikroskopom (Philips CM 100) pri 80 kV, pri povečavah od 2600-krat do 130000-krat.

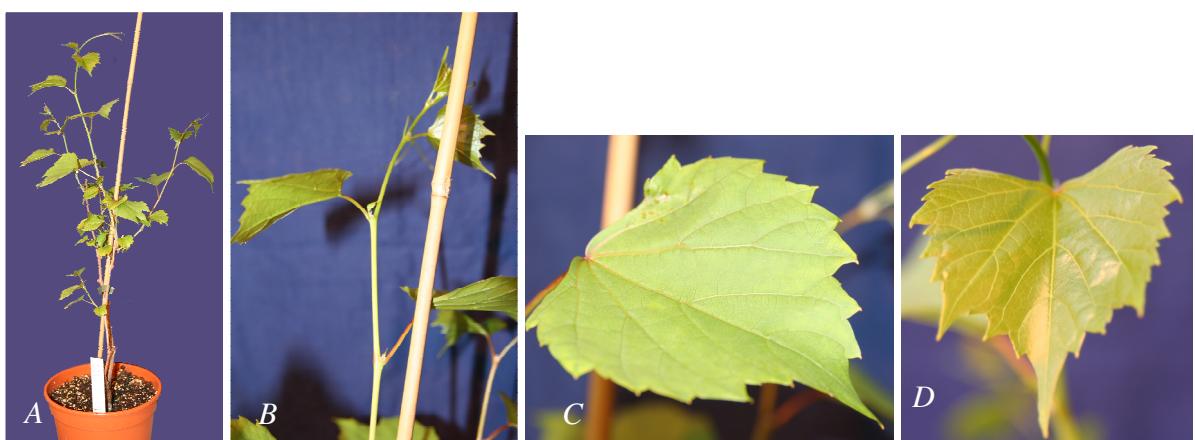
4 REZULTATI

4.1 RASTLINSKI MATERIAL

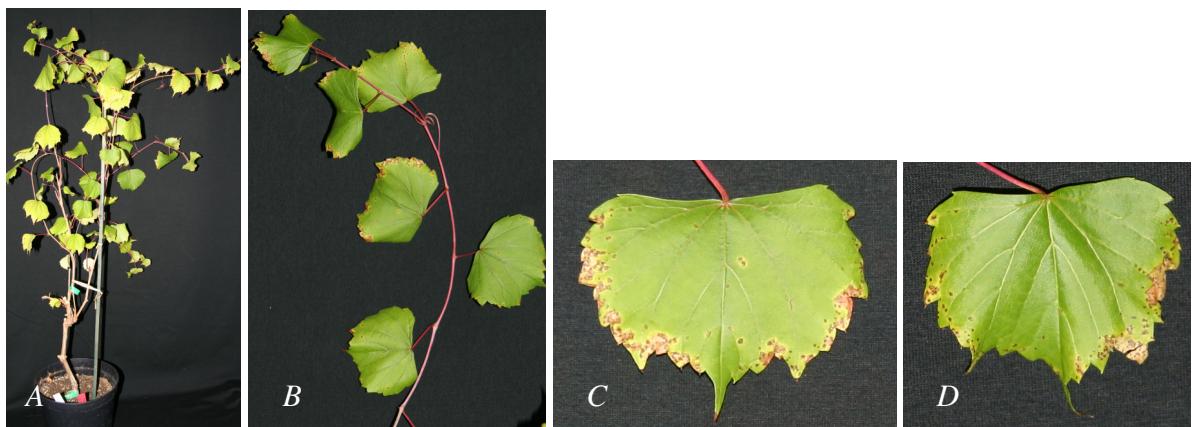
Zdravi (Sliki 32 in 34) in z RSPaV okuženi (Sliki 33 in 35) rastlini rupestrisa sorte St. George sta bili v primerljivem fiziološkem stanju. Na okuženih rastlinah (Sliki 33 in 35) ni bilo vidnih bolezenskih znamenj. Ker smo rastline rupestrisa 8 vzorčili v začetku maja, rastline rupestrisa 5 pa sredi julija, so bili poganjki rupestrisov 8 mlajši, bolj zeleni in manj oleseneli (Sliki 32 in 33), kot poganjki rupestrisov 5 (Sliki 34 in 35).



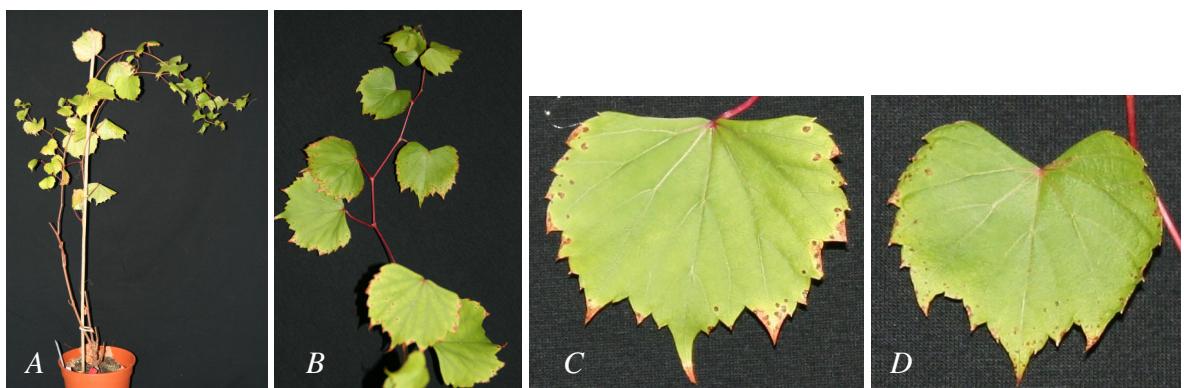
Slika 32: Zdrava rastlina rupestrisa sorte St. George 8. **A**, cela rastlina; **B**, steblo poganjka; **C**, starejši list; **D**, mlajši list.



Slika 33: Z RSPaV okužena rastlina rupestrisa St. George 8 (6 II/18). **A**, cela rastlina; **B**, stebelo poganjka; **C**, starejši list; **D**, mlajši list.



Slika 34: Zdrava rastlina rupestrisa sorte St. George 5. **A**, cela rastlina; **B**, poganjek s stebelom; **C**, starejši list; **D**, mlajši list.



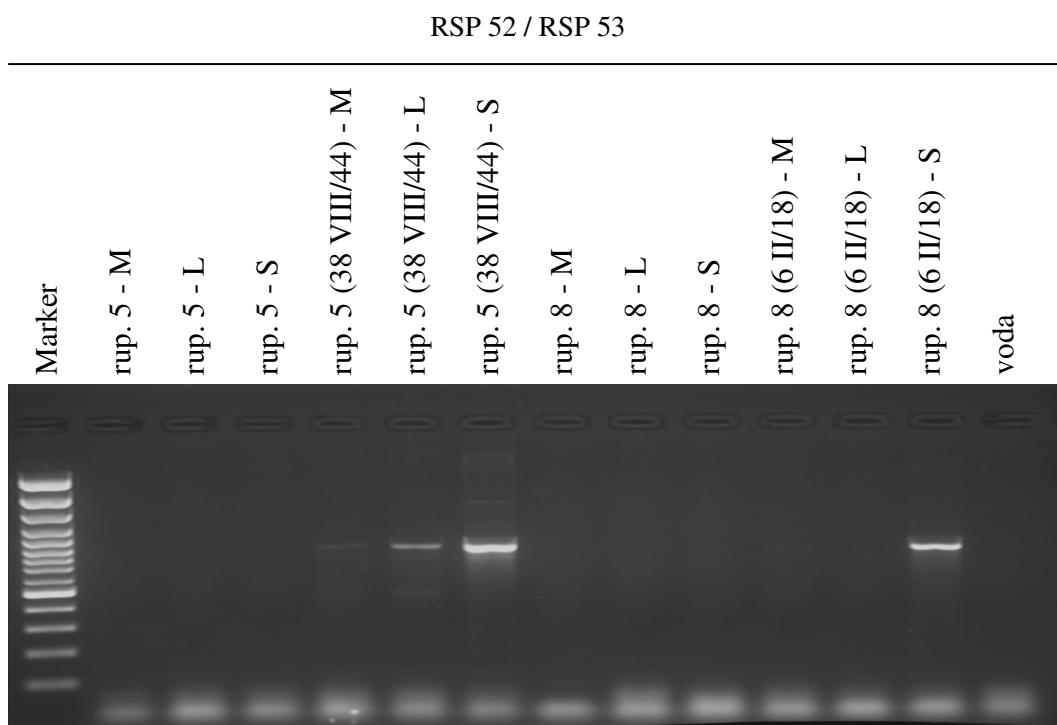
Slika 35: Z RSPaV okužena rastlina rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). **A**, cela rastlina; **B**, poganjek s stebelom; **C**, starejši list; **D**, mlajši list.

4.2 ELISA

S testom ELISA smo preverili prisotnost 9 virusov (GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA in GVB), ki najpogosteje okužujejo rastline iz rodu vinske trte, v štirih izbranih rastlinah rupestrisa. S testom ELISA smo dokazali, da nobeden od zgoraj naštetih virusov ni bil prisoten v nobeni od analiziranih rastlin in s tem zmanjšali možnost, da smo dokazovali ultrastrukturne spremembe povzročene s kakšnim drugim virusom.

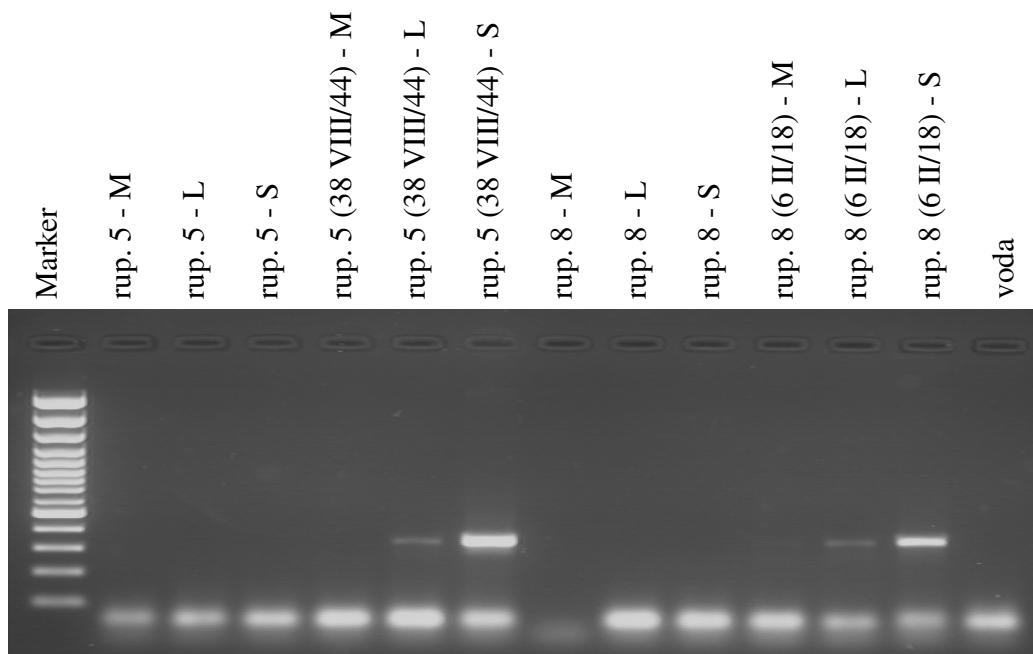
4.3 RT - PCR

Z metodo RT-PCR smo potrdili prisotnost virusa RSPaV v rupestrisu 5 (38 VIII/44) in rupestrisu 8 (6 II/18), ter odsotnost virusa v rupestrisu 5 in rupestrisu 8. Ker smo od vsake rastline pregledali različne dele poganjka, smo ugotovili, da je bilo virusa največ v mlademu steblu in floemu olesenelega dela stebla v okuženih rastlinah. Najmanj virusa je bilo v mladih listih okuženih rastlin. V mladih listih rupestrisa 8 (6 II/18) skoraj nismo zaznali virusa, v mladih listih rupestrisa 5 (38 VIII/44), od katere smo uporabili starejši poganjek, pa smo zaznali zelo malo virusa. Virus smo dokazali tudi v starejših listih obet okuženih rastlin (Sliki 36 in 37).



Slika 36: Elektroforeza produkta PCR na agaroznem gelu, uporabljen par začetnih olugonukleotidov RSP 52 in RSP 53. Rup. pomeni rupestris sorte St. George, števili 5 in 8 predstavlja dva različna izvora rupestrisa, v oklepajih so oznake okuženih rastlin sorte Refošk, ki so bile cepljene na rupestris. M - mlajši listi, L - starejši listi in S - zeleni del stebla in nastrgan floem olesenelega dela stebla.

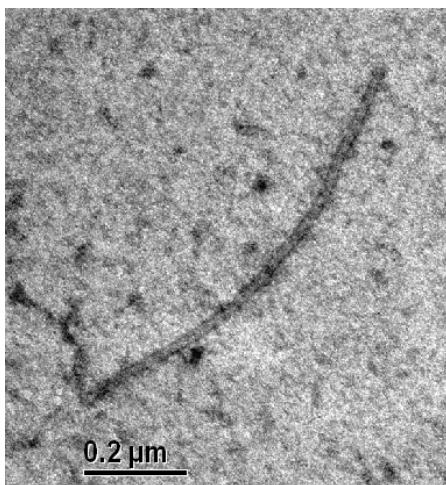
RSP 48 / RSP 49



Slika 37: Elektroforeza produkta PCR na agaroznem gelu, uporabljen par začetnih oligonukleotidov RSP 48 in RSP 49. Rup. pomeni rupestris sorte St. George, števili 5 in 8 predstavljata dva različna izvora rupestrisa, v oklepajih so oznake okuženih rastlin sorte Refošk, ki so bile cepljene na rupestris. M - mlajši listi, L - starejši listi in S - zeleni del stebla in nastrgan floem olesenelega dela steba.

4.4 IEM

Z imunsko elektronsko mikroskopijo (IEM) smo prav tako potrdili prisotnost virusa RSPaV (Slika 38) v okuženih rastlinah rupestrisa 5 (38 VIII/44) in rupestrisa 8 (6 II/18). V soku neokuženih rastlin rupestrisa 5 in rupestrisa 8 virusov nismo našli. V okuženih rastlinah smo viruse vedno našli v floemu stebla, kar ustreza našim pričakovanjem. V listih virusa nismo vedno določili (Preglednica 1 in 2). V okuženem rupestrisu 8 (6 II/18) je bil virus prisoten v listnih žilah, v listni ploskvi pa ga ni bilo, v okuženem rupestrisu 5 (38 VIII/44) je bila situacija ravno nasprotna (Preglednica 1).



Slika 38: Virus RSPaV.

Preglednica 1: Seznam testiranih rupestrisov sorte St. George z rezultati imunske elektronske mikroskopije. (+) pomeni 1 - 3 virusi na 10 - 15 okenc mrežice, (++) pomeni 4 - 7 virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (+++) pomeni 8 in več virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (–) pomeni, da na mrežici nismo našli virusov.

DEL POGANJKA RUPESTRIS	floem stebla	listne žile	listna ploskev
St. George 5 (38 VIII/44)	+	–	+++
St. George 5	–	–	–
St. George 8 (6 II/18)	+	++	–
St. George 8	–	–	–

Razporeditev virusa RSPaV smo z metodo imunske elektronske mikroskopije opazovali tudi v 12 trsih vinske trte sorte Refošk iz vinograda v Komnu. Prisotnost virusa v floemu smo potrdili v 11 rastlinah, v listih pa pri 4 rastlinah. Zanimivo je, da je bilo v večini primerih, kjer smo več virusov našli v floemu steba, manj virusov v listih in obratno. Kjer so virusi bili v listih, smo jih vedno našli v listni ploskvi (pri 4 rastlinah), medtem ko smo jih le v dveh rastlinah našli tudi v listnih žilah (Preglednica 2).

Preglednica 2: Seznam testiranih Refoškov. Rezultati imunske elektronske mikroskopije. (+) pomeni 1 - 3 virusi na 10 - 15 okenc mrežice, (++) pomeni 4 - 7 virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (+++) pomeni 8 in več virusov na 10 – 15 okenc mrežice, (–) pomeni, da na mrežici nismo našli virusov, (/) pomeni, da teh delov nismo testirali.

DEL POGANJKA SORTA VINSKE TRTE	floem steba	listne žile	listna ploskev
Refošk 3 I/49	+	/	/
Refošk 4 I/90	+++	/	/
Refošk 16 IV/8	+	/	/
Refošk 26 VI/5	++	/	/
Refošk 26 VI/1	+	/	/
Refošk 28 VI/41	+++	/	/
Refošk 26 VI/3	–	–	–
Refošk 6 II/18	+	++	++
Refošk 38 VII/44	+	–	+++
Refošk 48 IX/43	+	–	+
Refošk 43 VIII/113	+++	++	+
Refošk 63 VII/120	+++	–	–

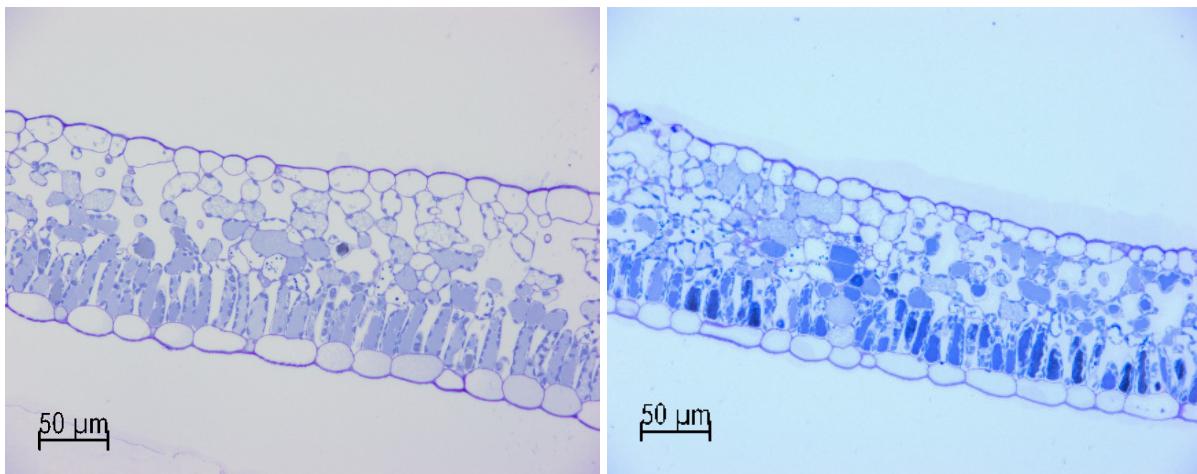
4.5 POLTANKE REZINE

Iz vsakega koščka tkiva smo najprej narezali nekaj poltankih rezin, jih pobarvali s toluenskim ali metilenskim modrilom in pogledali pod svetlobnim mikroskopom. Poltanke rezine smo rezali toliko časa, da smo prišli do ustreznega mesta v koščku tkiva, iz tega dela pa smo narezali ultratanke rezine.

Opazili smo nekaj razlik med zdravo in z RSPaV okuženo rastlino, ter med starejšo in zdravo rastlino, vendar nismo imeli statistično reprezentativnih vzorcev, da bi opaženo lahko tudi v splošnem trdili.

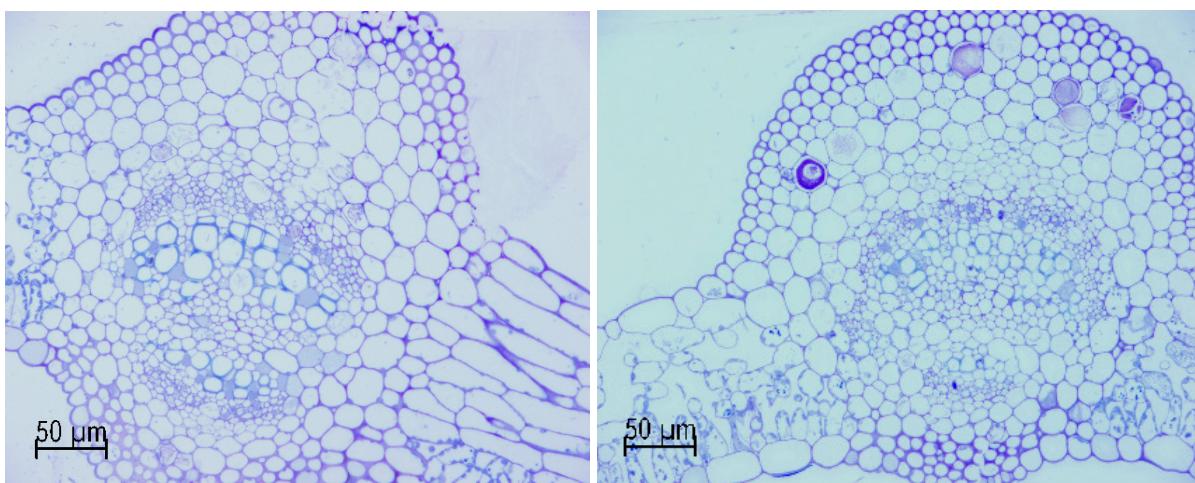
4.5.1 Listi zelenega poganjka

Na poltankih razinah smo pri starejših listih zdravih in z RSPaV okuženih rupestrisov (Slika 39 levo) v gobastem in palisadnem tkivu opazili večje medcelične prostore, kot pri mlajših listih (Slika 39 desno) zdravih in z RSPaV okuženih rupestrisov.



Slika 39: Levo – Prečni prerez starejšega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5. Desno – Prečni prerez mladega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5.

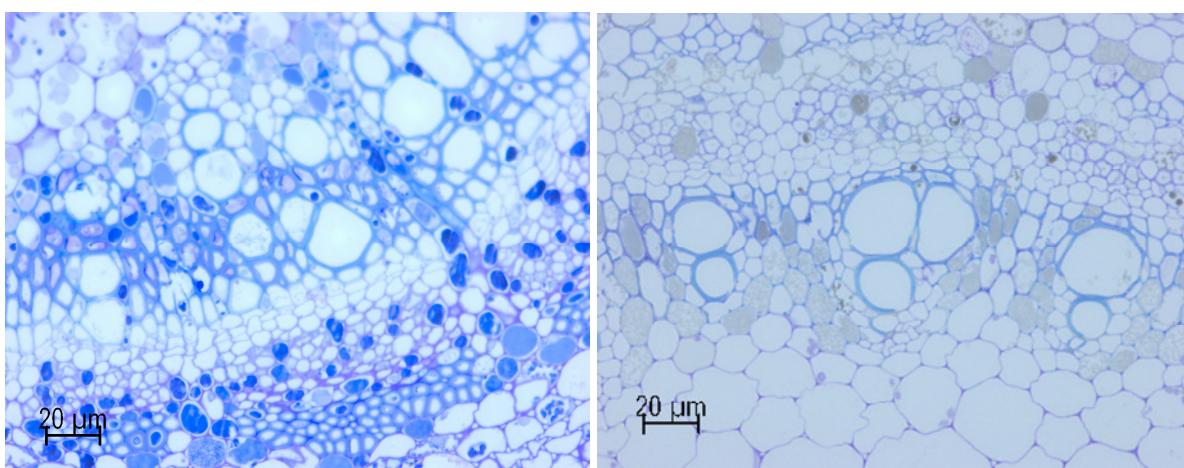
Na poltankih rezinah prečnih prerezov žil mlajših in starejših listov smo opazili, da so imeli ksilemski elementi žil v listih zdravih rupestrisov večji premer (Slika 40 levo) kot v listih z RSPaV okuženih rupestrisov (Slik 4 desno). Zmanjšanja števila ksilemskih elementov pri z RSPaV okuženih rupestrisih nismo opazili.



Slika 40: Levo – Prečni prerez žil starejšega lista zdrave rastline rupestrisa sorte St. George 5. Desno – Prečni prerez žil starejšega lista z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44).

4.5.2 Steblo zelenega poganjka

Tudi v žilah stebla z RSPaV okuženih rupestrisov sorte St. George (Slika 41 levo) smo opazili zožanje ksilemskih elementov, v primerjavi z zdravimi (Slika 41 desno).



Slika 41: Levo – Prečni prerez žil stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Desno – Prečni prerez žil stebla zdrave rastline rupestrisa sorte St. George 5.

4.6 ULTRATanke REZINE

Razlike v ultrastrukturi med zdravimi in z RSPaV okuženimi rastlinami rupestrisa smo opazili v floemu žil v listih in steblu ter v celicah mezofila. Razlike smo najlepše videli na vzdolžnih prerezih floemskih celic, predvsem v sitastih ceveh. Več razlik smo opazili med zdravimi in z RSPaV okuženimi rastlinami rupestrisa 5, od katerega smo pregledovali starejša poganjka, kot pri rupestrisu 8, od katerega smo pregledovali mlajša poganjka.

Med mlajšimi in starejšimi rastlinami, ter med mlajšim in starejšim listom so prisotne le naravne starostne razlike. V rupestrusu 5 (starejši poganjek) smo videli več že diferenciaciranih floemskih celic in manj ksilemskih celic v nastajanju kot v rupestrisu 8 (mlajši poganjek).

V epidermalnih celicah listov in zelenega steba nismo opazili razlik v ultrastukturi med zdravo in okuženo rastlino. Prav tako ni bilo vidnih ultrastrukturnih razlik v ksilemu žil, parenhimskih celicah skorje steba ter obžilnih parenhimskih celicah.

4.6.1 Floem steba zelenega poganjka in listnih žil

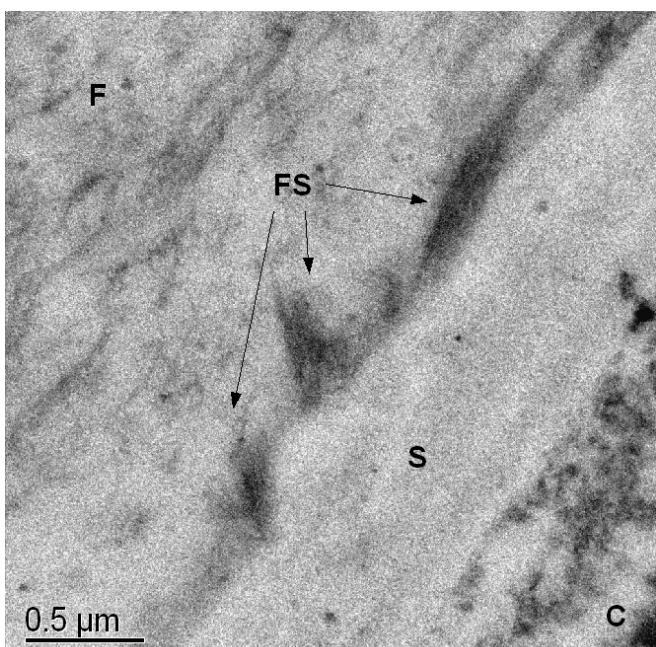
Najbolj značilna razlika v ultrastrukturi zdravega in z RSPaV okuženega rupestrisa je bila v prisotnosti filamentoznih struktur v okuženih rastlinah. V celicah sitastih cevi floema z RSPaV okuženega rupestrisa smo našli filamentozne strukture debelin ~15 nm (Slike 42, 43 in 44) in ~25 nm (Sliki 45 in 46), ki so se večinoma nahajale ob celični steni. Izjemoma posamezni snopi niso bili povezani s celično steno, vendar so se nahajali tik ob njej (Slika 47).

Pri zdravih in z RSPaV okuženih rastlinah smo videli nekaj celic s zgoščenimi filamenti (Sliki 48 in 49), ki so podobni P-proteinu (protein floema) (Cronshaw in Esau, 1967).

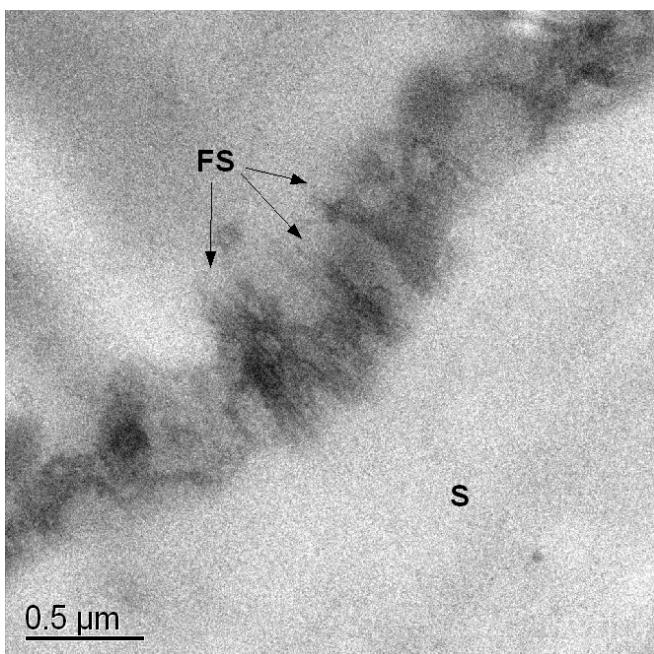
Pri zdravih in z RSPaV okuženih rastlinah rupestrisa smo našli celice sitastih cevi, ki so vsebovale fibrilarno snov, verjetno P-protein (Sliki 50 in 51). Takšnih celic je bilo v okuženih rastlinah vsaj še enkrat več v primerjavi z zdravimi rastlinami. Celic, ki so vsebovale fibrilarno snov, smo videli več tudi v starejših poganjkih kot v mlajših. Med zgoraj omenjenimi celicami smo pogosto opazili tudi pore v sitasti plošči (Slika 52), skozi katere je fibrilarna snov potovala po sitastih ceveh (Slika 53).

Ob porah med celicami sitastih cevi smo pri okuženih rastlinah pogosto opazili elektronsko gosto snov, česar pri zdravih rastlinah nismo videli (Slika 54).

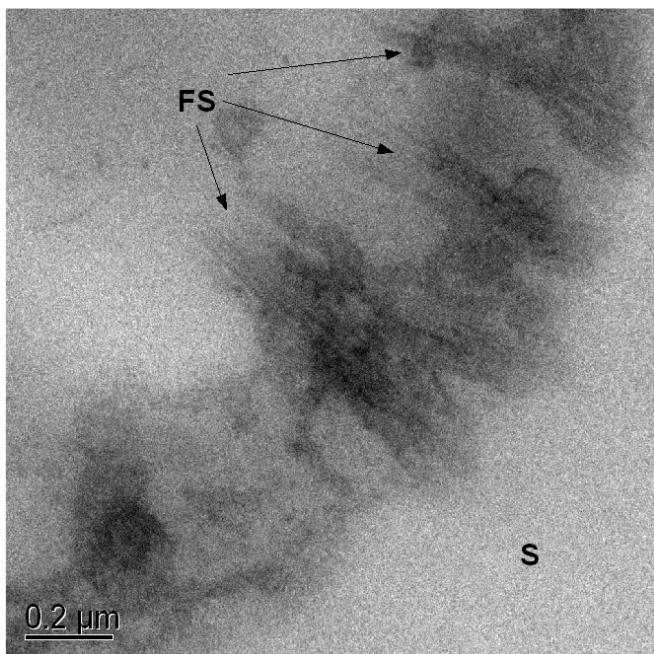
V celicah sitastih cevi s fibrilarno snovjo smo pri okuženih rastlinah velikokrat opazili membranske strukture, katerih vloge ne poznamo. Nekoliko so spominjali na autofagne vključke pri živalskih celicah in vedno so se nahajali ob celični steni (Slika 55).



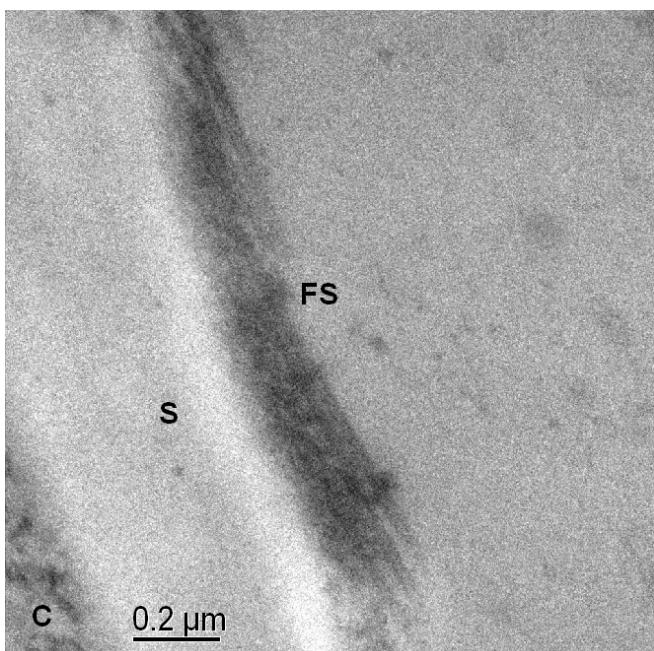
Slika 42: Snopi filamentoznih struktur (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Fibrilarna snov (F), verjetno P-protein, citoplazma (C).



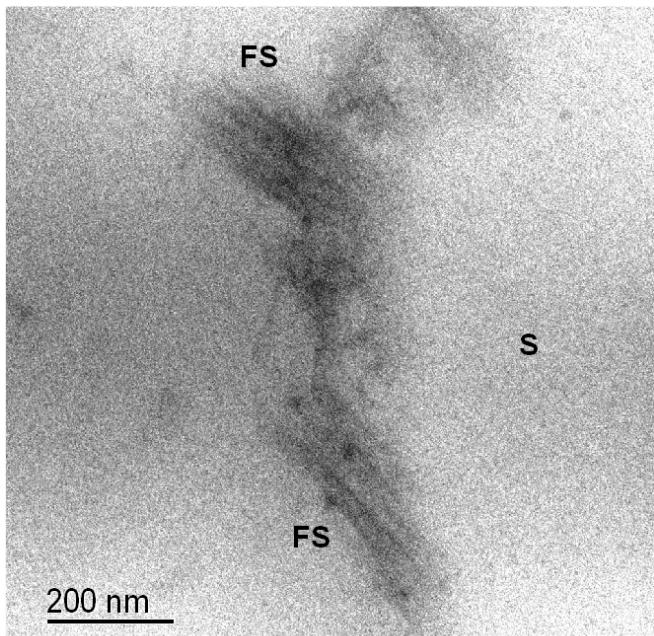
Slika 43: Snopi filamentoznih struktur premera ~15 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).



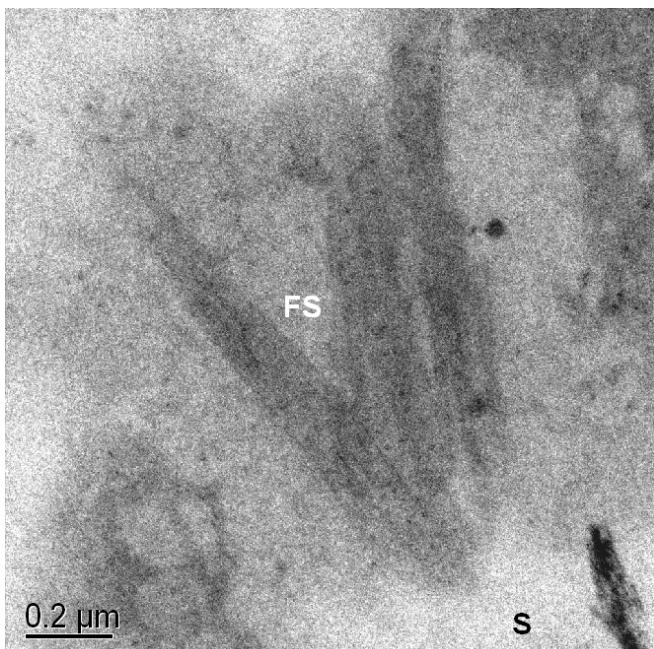
Slika 44: Snopi filamentoznih struktur premera ~15 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).



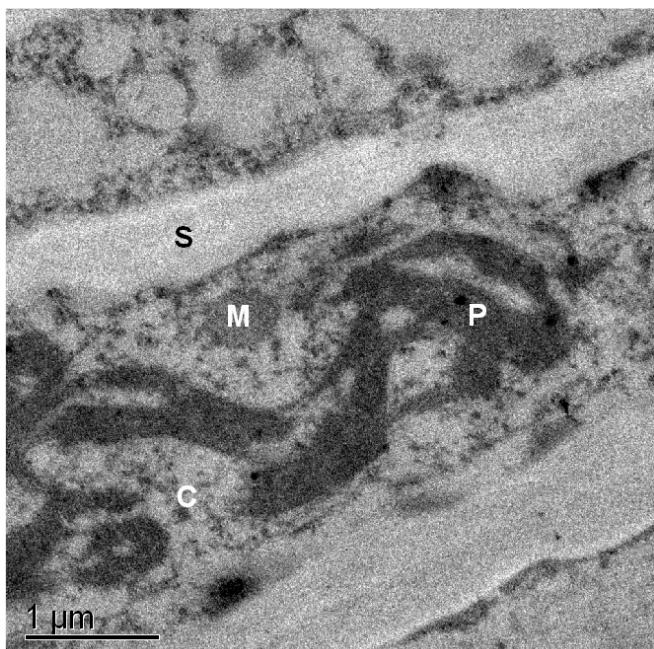
Slika 45: Snopi filamentoznih struktur premera ~25 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George5 (38 VIII/44). Citoplazma (C).



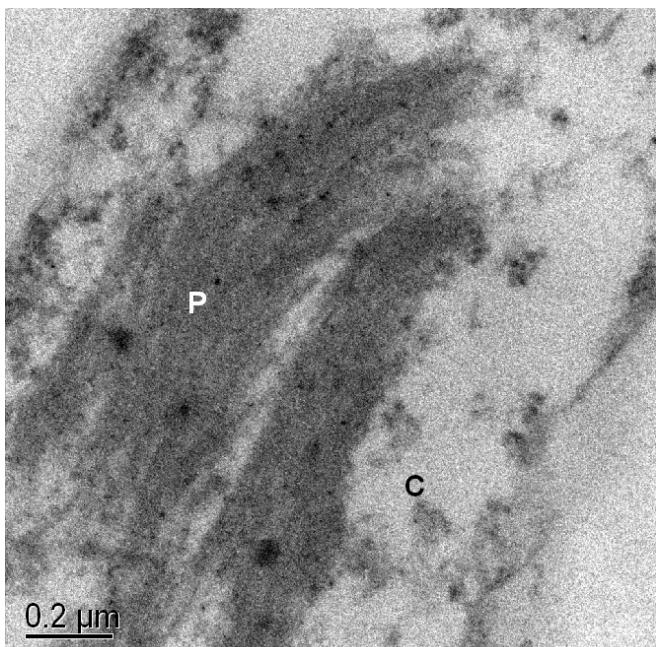
Slika 46: Snopi filamentoznih struktur premera ~25 nm (FS) ob celični steni (S) celice sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).



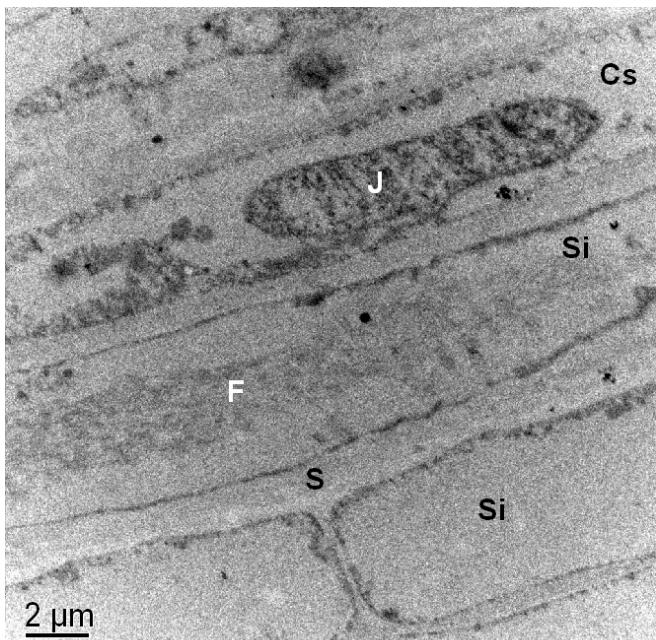
Slika 47: Snopi filamentoznih struktur (FS) v celici sitastih cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44).



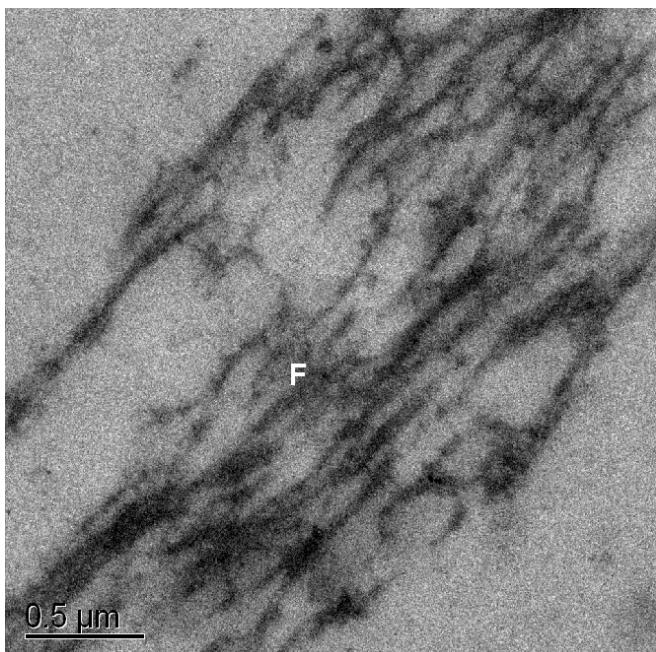
Slika 48: Floemska celica zdravega rupestrisa sorte St. George 8 z zgoščenimi fibrilarnimi strukturami verjetno iz P-proteina (P). Citoplazma (C), mitohondrij (M), celična stena (S).



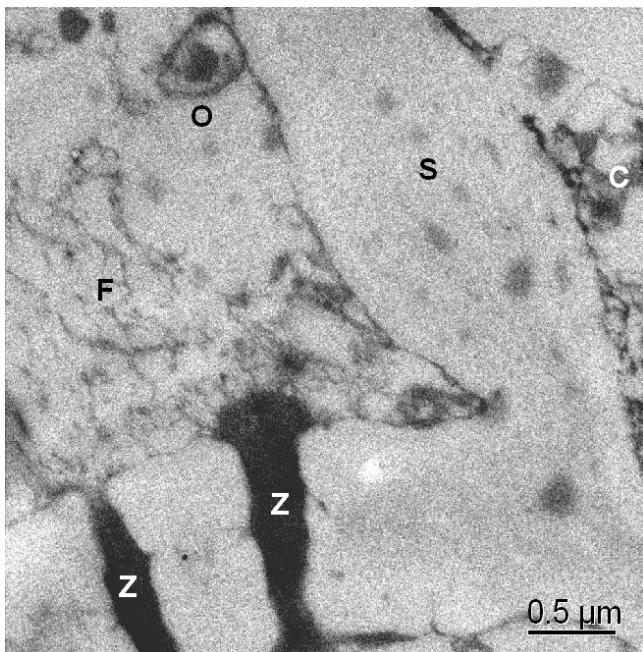
Slika 49: Zgoščene fibrilarne struktura verjetno iz P-proteina (P) v citoplazmi (C) nezrele floemske celice rupestrisa sorte St. George 8.



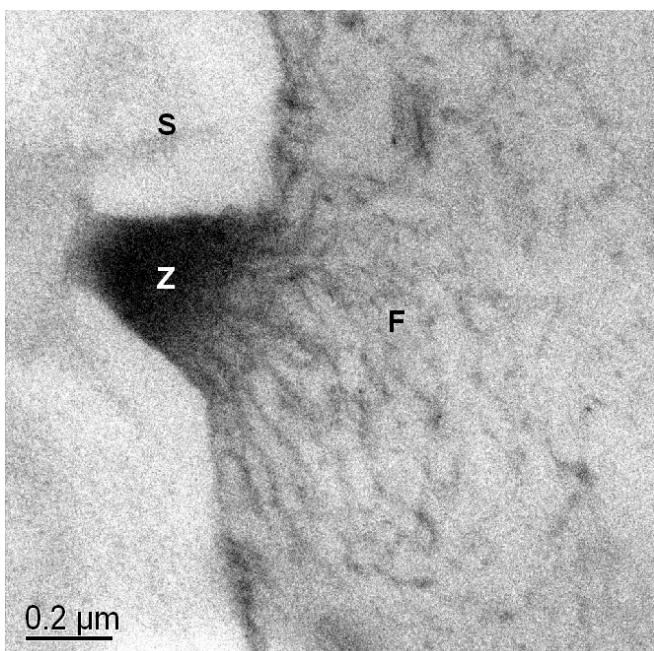
Slika 50: Floemske celice stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Celica spremljevlka (Cs) z jedrom (J) ob celici sitaste cevi (Si) s fibrilarno snovjo (F). Celična stena (S).



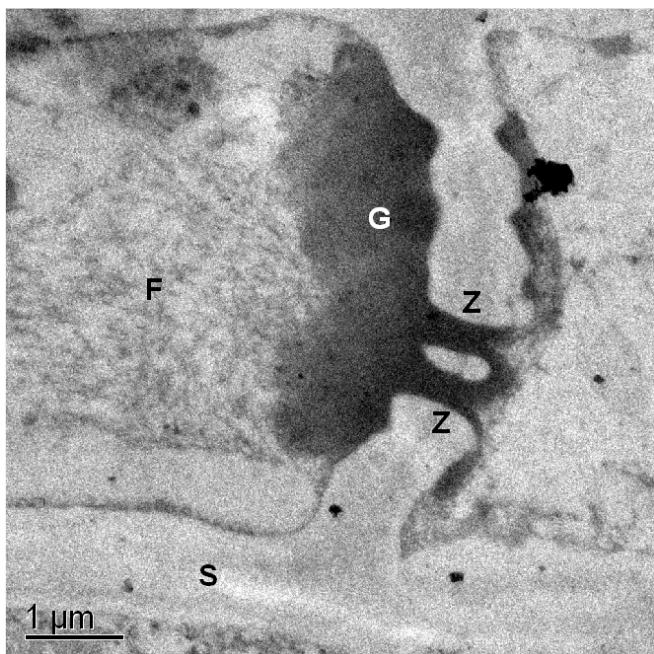
Slika 51: Fibrilarna snov (F) v osrednjem delu celice sitaste cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44).



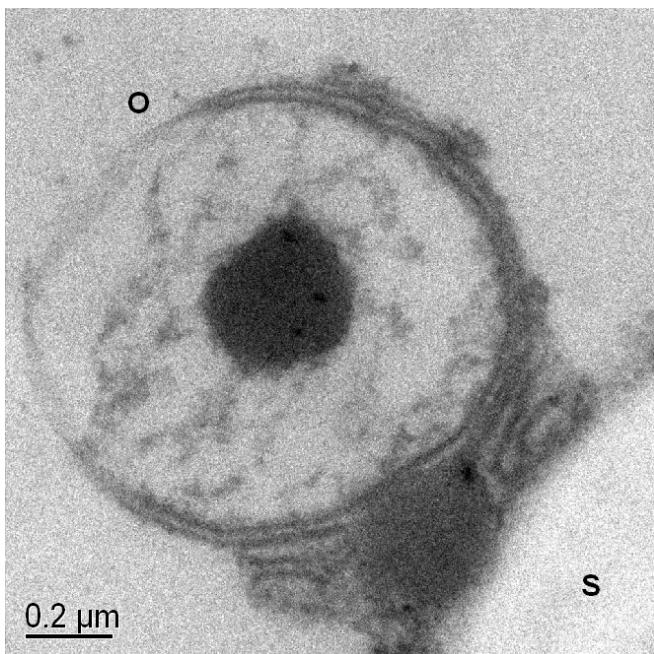
Slika 52: Celica sitaste cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Fibrilarna snov (F) potuje skozi pore (Z) sitaste plošče. Membranska struktura ob celični steni (O), citoplazma (C), celična stena (S).



Slika 53: Fibrilarna snov (F), ki potuje skozi poro (Z) sitaste plošče med celicami sitaste cevi stebla z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Celična stena (S).



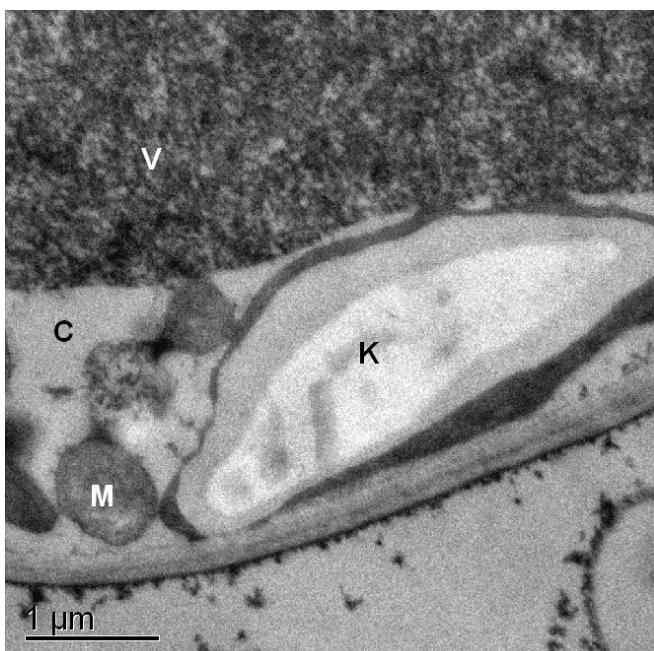
Slika 54: Celice sitastih cevi s fibrilarno snovjo (F), ki prehaja skozi pore (Z) sitaste plošče okrog katere je elektronsko gosta snov (G). Žila v steblu z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Celična stena (S).



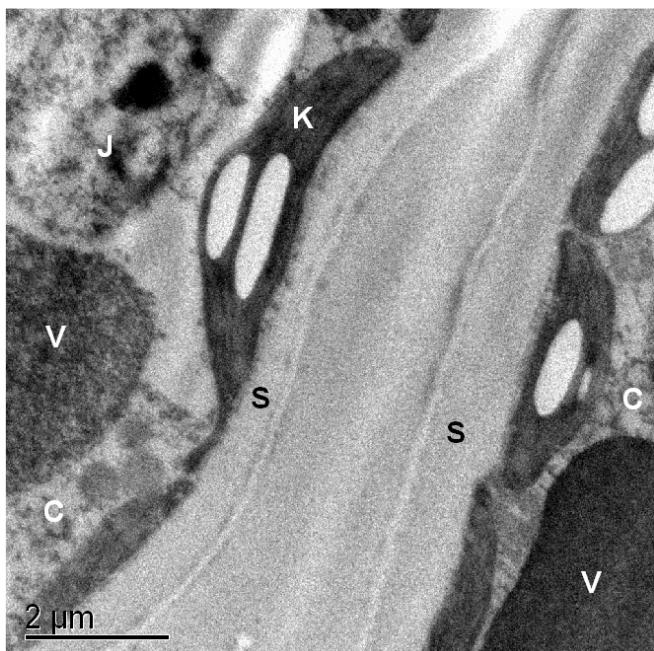
Slika 55: Membranska struktura (O) ob celični steni (S) celice sitaste cevi stebla rupestrisa sorte St. George 8 (6 II/18).

4.6.2 Mezofil mlajšega in starejšega lista zelenega poganjka

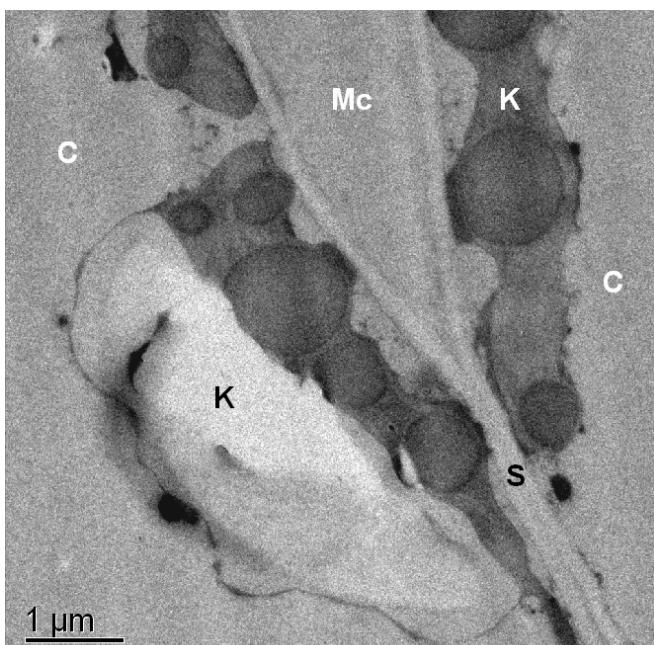
V celicah mezofila smo našli kloroplaste najrazličnejših oblik. Nekateri so vsebovali manjša škrobna zrna (Slika 57), drugi večja (Slika 56), nekateri pa so vsebovali tudi maščobne kapljice (Sliki 58 in 59). V celicah mezofila okuženih rastlin smo videli več kloroplastov s podolgovatimi deformacijami (Slika 57) kot v enakih celicah zdravih rastlinah, česar pa ne bi mogli trditi za epidermalne celice, kjer so se takšni kloroplasti pojavljali pri okuženih in neokuženih rastlinah podobno pogosto.



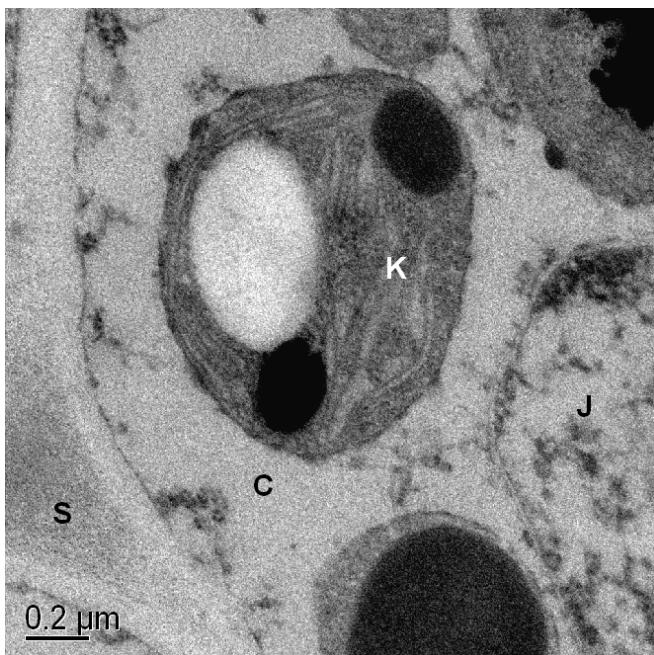
Slika 56: Celica gobastega tkiva mezofila mladega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5. Kloroplast z velikim škrobnim zrnom (K), mitohondrij (M), citoplazma (C), vakuola, ki vsebuje elektronsko gosto snov (V).



Slika 57: Celici palisadnega tkiva starejšega lista z RSPaV okuženega rupesrtisa sorte St. George 8 (6 II/18). Kloroplast z repkom in s škrobnimi zrni (K), citoplazma (C), vakuola polna elektronsko goste snovi (V), jedro (J), celična stena (S).



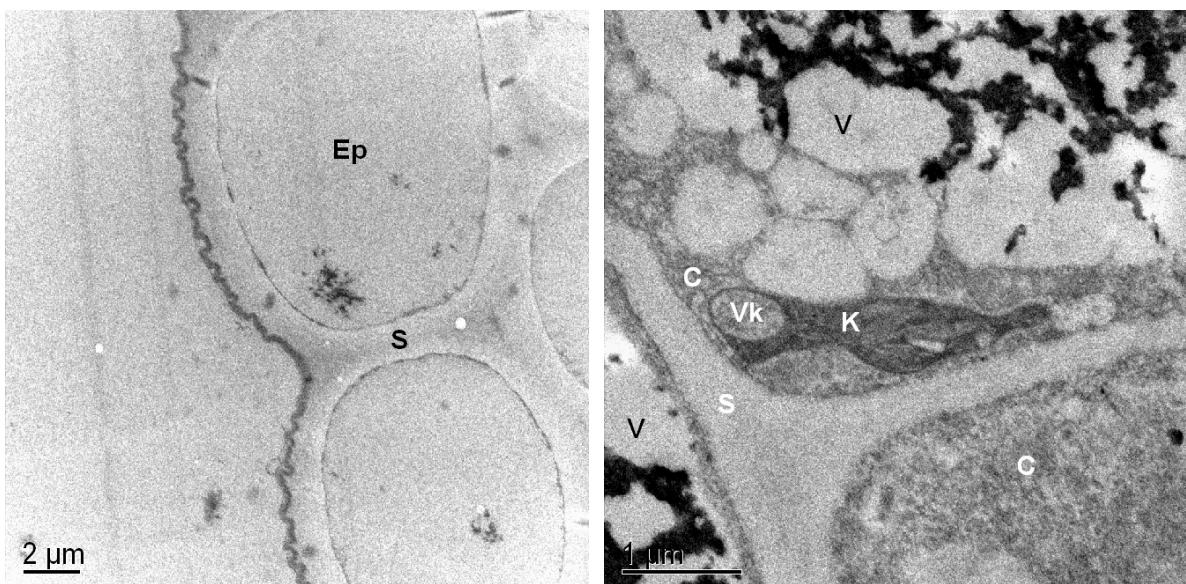
Slika 58: Mezofilni celici starejšega lista z RSPaV okuženega rupestrisa sorte St. George 5 (38 VIII/44). Kloroplast s škrobnim zrnom (svetlo) in/ali maščobnimi kapljicami (temno) (K), celična stena (S), citoplazma (C), medcelični prostor (Mc).



Slika 59: Celica žilnega parenhima starejšega lista z RSPaV okuženega rupestrisa St. George 5 (38 VIII/44). Kloroplast (K) z vidnimi membranami tilakoid, škrobnim zrnom (svetlo) in maščobnimi kapljicami (temno), jedro (J), celična stena (S), citoplazma (C).

4.6.3 Epidermalne celice listov in steba

Epidermalne celice mladih listov so bile večinoma malo aktivne, skoraj brez celičnih struktur (Slika 60 levo), medtem ko so bile epidermalne celice starejših listov in steba polne organelov in ostalih celičnih struktur (Slika 60 desno). Med zdravo in z RSPaV okuženo rastlino v epidermalnih celicah ni bilo razlik. Pri nekaterih epidermalnih celcah steba in starejšega lista so se pojavljali vključki v kloroplastih (Slika 60 desno).



Slika 60: Levo - Epidermalni celici mladega lista zdravega rupestrisa sorte St. George 5. Celična stena (S). Desno - Epidermalni celici starejšega lista rupestrisa sorte St. George 8. Kloroplast (K) z ovalnim vključkom (Vk), citoplazma (C), celična stena (S), vakuola (V).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

RSPaV smo v tkivu okuženega rupestrisa lokalizirali z metodama RT-PCR in imunsko elektronsko mikroskopijo. Čeprav PCR ni kvantitativna metoda, smo opazili, da je bilo največ virusa prisotnega v steblu, manj v starejših listih in najmanj v mladih listih (Sliki 36 in 37). Ti rezultati se ne ujemajo z izsledki Steward in Nassuth (2001), Petrovič in sod. (2003) in Meng in sod. (2003), ki so dokazali največje vsebnosti virusa na začetku poletja, v aktivno rastočih mladih tkivih, kot so stebla mladih zelenih poganjkov in aktivno rastoči mladi listi, virusov pa niso našli v starejših listih ne glede na letni čas. Različni rezultati so verjetno posledica opazovanja različno starih rastlin, saj so zgoraj omenjeni avtorji vzorčili iz starih vinskih trt, pri katerih so dokazali odsotnost virusov v velikih, starih listih. Naše testne rastline pa so bile še tako mlade, da pravih velikih starih listov niso imele. Stebla mladih zelenih poganjkov in mladi listi so za zgoraj omenjene avtorje predstavljal isto, kot je pri naših testnih rastlinah predstavljal cel mlad poganjek. V tem primeru smo vsi dokazali, da je virus prisoten v steblu in listih mladega zelenega poganjka. Mi pa smo opazovali prisotnost virusa v različnih delih mladega zelenega poganjka. Zelo majhna vsebnost virusa v najmlajših listih je lahko posledica nizke koncentracije virusa, možno pa je tudi, da je bilo pomnoževanje nukleinskih kislin inhibirano, saj le-tega nismo kontrolirali.

Z imunsko elektronsko mikroskopijo smo vzorce pregledali še bolj podrobno kot z metodo RT-PCR, saj smo ločili listne žile in listno ploskev. Z IEM smo gledali virusne delce, medtem ko smo z RT-PCR dokazovali prisotnost virusne RNA. Zaradi omenjenega rezultati IEM niso ponovitev rezultatov dobljenih z RT-PCR, ampak jih dopolnjujejo. Viruse smo pri večini testiranih raslin našli v floemu, medtem ko v listih niso bili vedno prisotni. Tudi v listih, kjer so bili virusi prisotni, jih nismo našli v vseh delih lista (Preglednici 1 in 2). V okuženem rupestrusu 8 (6 II/18) so bili virusni delci prisotni v listnih žilah in jih v listni ploskvi ni bilo, v okuženem rupestrisu 5 (38 VIII/44) pa je bila situacija ravno nasprotna (Preglednica 1). V listih vinske trte sorte Refošk smo virusne delce pogosteje našli v listni ploskvi kot v listnih žilah (Preglednica 2). Vzrok temu bi lahko bila večja površina floemskih elementov v listni ploskvi z razvezanimi, drobnimi žilicami, v primerjavi z velikimi listnimi žilami ali pa v koncentraciji virusov, saj vsebujejo večje žile več vode kot listna ploskev. Vsebnost virusa v listih je bila večja pri vseh testiranih rastlinah, ki so imele manj virusa v floemu. Rastline, ki so imele večjo vsebnost virusa v floemu, so imele manj virusa v listih (Preglednica 2). Iz tega lahko sklepamo, da se virus po listih in po rastlini prerazporeja in da je kljub temu stalno prisoten v floemu.

Glede na to, da so bili testirani rupestrisi okuženi z virusom RSPaV, ki je v latentni obliki, torej ne povzroča vidnih bolezenskih znamenj, očitnih sprememb na poltankih rezinah nismo pričakovali. Vendar smo kljub temu opazili zožanje ksilemskih elementov pri z RSPaV okuženih rastlinah rupestrisa sorte St. George, v primerjavi z zdravimi (Sliki 39 in 40). Teh opažanj se ne da posplošiti, saj je šlo le za preliminarna opazovanja z zelo majhnim številom vzorcev. Tzeng in sod. (1993) so s svetlobnim mikroskopom dokazali zmanjšanje in tudi propad ksilemskih elementov v žilah, posebej tistih ob tkivu žilnega kambija v vinskih trtah z boleznijo RSP, in sicer le pri nekaterih sortah (Pinot Noir, White Riesling in Sylvaner). Pri sortah Cabernet Franc, Dattier, Gewurztraminer, Malbec in LN-33 sprememb niso opazili. Propada ksilemskih elementov v našem delu nismo opazili, mogoče bi pri pregledu večjega števila vzorcev opazili tudi to razliko.

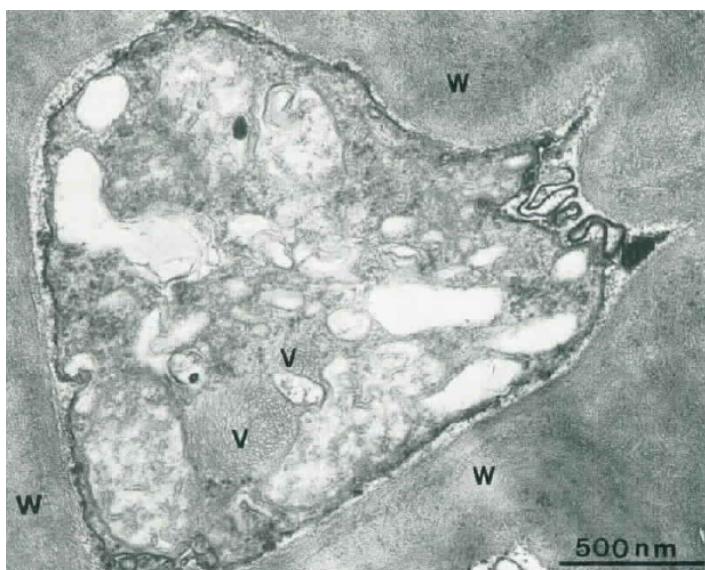
Na ultratankih rezinah smo opazili nekaj razlik med zdravimi in z RSPaV okuženimi rastlinami rupestrisa. Mezofilne celice mladih in starejših listov okuženih rastlin so vsebovale veliko več kloroplastov s podolgovatimi deformacijami (Slika 59), kot mezofilne celice zdravih rastlin. Glede na to, da se takšne modifikacije kloroplastov pojavljajo v epidermalnih celicah in parenhimskih celicah enako pogosto pri zdravih in okuženih rastlinah, so očitno naravni pojav v celicah vinske trte. Znano je, da lahko virus pospešuje naravni metabolizem in naravne celične pojave, zato sklepamo, da je virus posredno vplival na modifikacije kloroplastov v mezofilnih celicah listov. Vloga podolgovatih deformacij na kloroplastih še ni znana.

Tzeng in sod. (1993) so opazovali tudi ultrastrukturne spremembe v celicah skorje steba mladih poganjkov in celicah žil v listih vinske trte z boleznijo RSP, dokazano z indeksiranjem, v primerjavi z zdravimi rastlinami. V floemu mladega poganjka sorte Sylvaner so opazili dolge, ukrivljene, paličaste virusne delce, ki so se povezovali v skupke, vzporedne z žilnimi snopi (slika 61). Virusni delci so merili v premeru 7 - 8 nm. Koncentracija virusov v okuženih celicah je bila zelo nizka, le približno tri celice v prerezu žilnega snopa so ponavadi vsebovale po en skupek virusov. V naši raziskavi nismo opazili takšnih snopov, lahko pa že iz debeline virusa sklepamo, da je šlo v njihovem primeru za okužbo z drugim virusom, saj debelina 7 - 8 nm ne ustreza virusom iz družine *Foveavirus*. Virusni delci so bili prisotni predvsem v citoplazmi, našli pa so jih tudi v jedru okuženih celic (slika 62), ki so imele nespremenjene organele. Jedra, ki so vsebovala virusne delce, so bila ponavadi amorfna, krpaste oblike in močno kontrastirana (Slika 62).

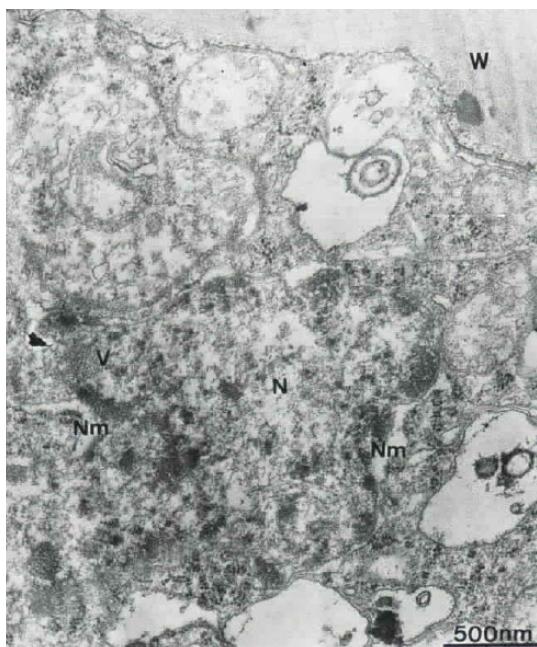
Med celično steno in plazmalemo so Tzeng in sod. (1993) našli tubule (slika 63) tudi v celicah, ki niso vsebovale virusnih skupkov, vendar pa je bilo v teh celicah veliko manj tubulov, kot v celicah z virusnimi skupki. Mogoče je, da tubuli predstavljajo aktivni membranski sistem, ki je

potreben za virusno prepisovanje, kar je dokazano pri tubulih v rastlinskih celicah, okuženih z BPMV (Kim in Fulton, 1971). Tzeng in sod. (1993) so v okuženem tkivu opazili tudi razkroj celičnih organelov, še posebej membranskih struktur (slika 64). Podobne celične ultrastrukturne spremembe so dokazali tudi pri sortah White Riesling in Dattier kljub temu, da virusnih delcev pri njih niso našli. V naši raziskavi nismo opazili nobenih podobnih ultrastrukturnih sprememb, kar spet potrjuje ugotovitve, da smo opazovali različna virusa.

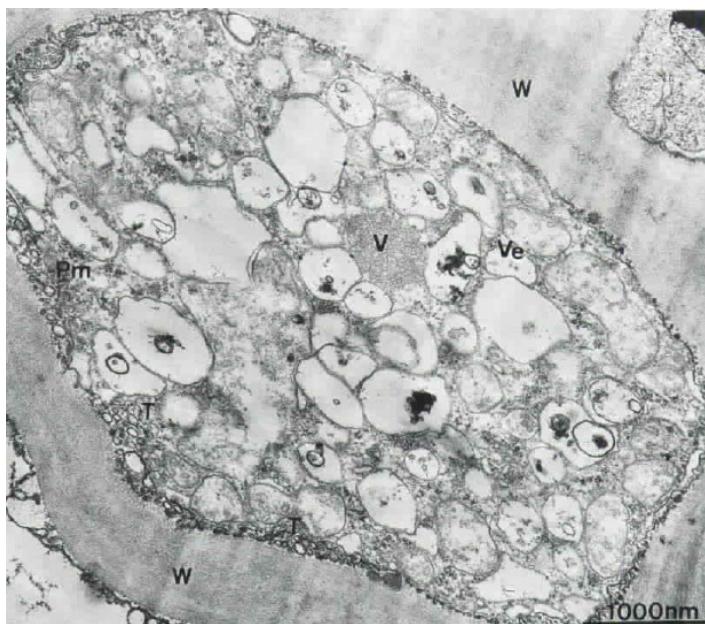
Prisotnost drugega virusa pri bolezni RSP postavlja pod vprašaj povezavo med boleznijo RSP in virusom RSPaV. Ker Tzeng in sod. (1993) niso izključili okužbe z drugimi virusi, misel, da bolezen RSP povzroča več virusov, ni izključena.



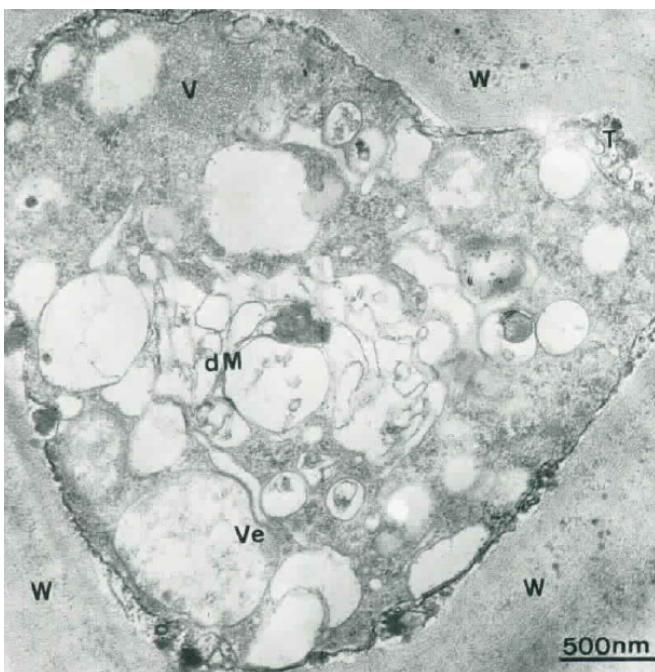
Slika 61: Floemska parenhimska celica vinske trte sorte Sylvaner z boleznijo RSP. Virusni delci (V) ležijo vzporedno z žilnim snopom (Tzeng in sod., 1993). Celična stena (W).



Slika 62: Virusni delci (V) v jedru (N) okuženih celic. Jedro ima deformirano krpasto obliko in je elektronsko gostejše (Tzeng in sod., 1993). Jedrna membrana (Nm), Celična stena (W).



Slika 63: Veliko tubulov (T) se nahaja med plazmalemo (Pm) in celično steno (W) v floemskih parenhimskih celicah okuženih z RSP. Virusni skupki (V) so med številnimi nenormalnimi vezikli (Ve) (Tzeng in sod., 1993).



Slika 64: Razkroj membran (dM) in nenormalno oblikovani vezikli (Ve) v okuženih floemskih celicah (Tzeng in sod., 1993). Virusi (V), celična stena (W), tubuli (T).

V naši raziskavi smo največ ultrastrukturnih posebnosti v okuženih rastlinah videli v floemskih celicah (Slika 52). Strukture, ki nastajajo pod vplivom virusne okužbe, so lahko zelo podobne strukturam, ki se pojavljajo pri nastanku floema, zato je težko ločevati katere strukture so posledica okužbe. Tak primer so filamentozne strukture v celicah sitastih cevi, ki so prisotne v zdravih in okuženih rastlinah, le da smo jih v okuženih rastlinah našli več.

V citoplazmi nediferenciranih celic sitastih cevi okuženih in zdravih rastlin smo opazili kompaktne strukture (Slike 48 in 49), verjetno iz filamentov P-proteina. Med diferenciacijo sitastih elementov kompaktne strukture iz P-proteina začnejo razpadati hkrati z razpadom tonoplasta in jedra, dokler ne ostanejo po vsej floemski celici razpršeni filamenti P-proteina (Slika 51) (Cronshaw in Esau, 1967). Vloga P-proteina še ni čisto znana, Fanson (1972) in Thaine (1969) predvidevata, da ima P-protein aktivno vlogo pri translokaciji fotosintetskih produktov (sladkorjev) skozi sitaste cevi. Vzrok, da smo zrelih celic sitastih cevi s filamentozno snovjo videli več v okuženih kot v zdravih rastlinah, bi bil lahko ta, da so virusni proteini na izgled podobni P-proteinu in da se prav tako nahajajo v celicah sitastih cevi, skozi katere se transportirajo.

Plazmodezme med celicami sitaste cevi se med diferenciacijo pretvorijo v velike sitaste pore na sitasti plošči. Pri nastanku por sodeluje kaloza, ki je prisotna v celični steni okrog plazmodezme, da razmakne celulozne mikrofibrile. Ko se kaloza razgradi, ostanejo v sitasti plošči velike pore. Kaloza nastane tudi kot odgovor na ranitev floema (Sjölund, 1997). Mogoče so površine elektronsko goste snovi, ki smo jih videli ob porah okuženih rastlin (Slika 54), povezane z nalaganjem kaloze, kar so opazili tudi pri okuženih rastlinah s fitoplazmami (Brzin, osebna komunikacija).

Pore med sitastimi celicami, so bile zapolnjene s fibrilarno, proteinsko snovjo, na nekaterih delih pa je izgledalo, da ta snov prehaja v citoplazmo (Sliki 52 in 53). Ne vemo, kakšnega nastanka je ta proteinska snov, možno pa je, da gre za virusni protein, kar so dokazali pri okužbi pese z BYV. Pore, zapolnjene s fibrilarno snovjo so lahko posledica fiksacije, pri kateri se proteini v porah denaturirajo (Cronshaw in Esau, 1967).

V odraslih celicah sitaste cevi s fibrilarno snovjo smo pri okuženih rastlinah opazili membranske vključke (Slika 55), ki bi lahko bili spremenjeni mitohondriji ali posledica zlaganja endoplazemskega retikla. Slednji se namreč pogosto nahaja ob celični steni in se po diferenciaciji v odrasco celico sitaste cevi reorganizira tako kot tudi ostale membranske strukture celice (Cronshaw in Esau, 1967). Glede na to, da takšnih struktur nismo našli v zdravih rastlinah, lahko ima pri nastanku teh vključkov posredno vlogo virus v povezavi z omenjenimi procesi.

Zelo očitni in drugačni od znanih struktur zdravih celic so filamentozni snopi ob celični steni odrasle celice sitaste cevi. Stožčasti snopi filamentov premera približno 15 nm (Slike 42, 43 in 44) močno spominjajo na stožčaste strukture ob celični membrani, ki so jih našli ob plazmodezmah med celico sitaste cevi in celico spremljevalko pri rastlini *N. benthamiana*, okuženi z LIYV (Slika 15). V tem primeru so z imunolokalizacijo dokazali, da so stožčaste filamentozne strukture in filamentozna snov v sitastih celicah virusnega izvora (Medina in sod., 2005).

Filamenti širine približno 25 nm se niso zlagali v stožčaste strukture, vendar so se velikokrat postavili v snope pravokotno ob celično steno ali pa so bili potisnjeni vzporedno ob celično steno (Sliki 45 in 46), kar so opazili tudi pri rastlini *Streptanthus tortuosus*, kjer so ugotovili, da gre za gladki endoplazemski retikel, ki v celicah sitastih cevi lahko obdaja tudi mitohondrije (Sjölund, 1997). Najverjetnejše gre tudi v našem primeru za nekaj podobnega.

Iz do sedaj znanih rezultatov ne moremo trditi, katere od opaženih struktur so virusnega izvora. Da bi to potrdili, bi bilo potrebno opravili imunolokalizacijo virusnih proteinov, podobno kot so to naredili Medina in sod. (2005) pri rastlini *N. benthamiana*, okuženi z LIYV. Pri tem nam bo v pomoč, da proti virusu RSPaV obstajajo poliklonska protitelesa As7-276, ki so jih naredili v Ameriki na Cornellu (Meng in sod., 2003), jih preverili, da delujejo v metodi ISEM (Petrovič in sod., 2003) ter jih uporabili za raziskavo variabilnosti genoma RSPaV (Nolasco in sod., 2006). Omenjena protitelesa se vežejo na plaščni protein, vendar prav tako na beljakovino, ki veže maltozo (MBP), kar nekoliko otežuje imunolokalizacijo virusa RSPaV.

5.2 SKLEPI

S pomočjo metod ELISA in RT-PCR smo izbrali dve zdravi in dve z RSPaV okuženi rastlini rupestrisa sorte St. George.

Z metodama RT-PCR in IEM smo potrdili, da RSPaV lahko vedno določimo v floemu steba ter ugotovili da virus v listnih ploskvah ni bil enakomerno porazdeljen in da se je prerazporejal po rastlini. Hkrati pa smo opazili, da je bilo več virusa v starejših kot v mlajših listih mladega poganjka.

Kljud temu, da na okuženih rastlinah ni bilo vidnih bolezenskih znamenj, smo v statistično nereprezentativnem vzorcu opazili zožanje ksilemskih elemetov v žilah listov in steba z RSPaV okuženih rupestrisov sorte St. George.

Največ razlik v ultrastrukturi je bilo v celicah sitastih cevi, kjer so bili prisotni filamenti premera približno 25 nm, stožčasti snopi iz filamentov premera približno 15 nm, površine elektronsko goste snovi ob porah sitaste plošče ter membranski vključki ob celičnih stenah. Celice sitastih cevi z RSPaV okuženih rupestrisov so vsebovale tudi veliko več fibrilarne snovi kot enake celice zdravih rupestrisov.

Filamenti širine približno 25 nm, zloženi v snope ob celični steni celic sitastih cevi, so verjetno gladki endoplazemski retikel. Stožčasti snopi iz filamentov premera približno 15 nm v zrelih celicah sitastih cevi bi lahko bili virusnega izvora.

Fibrilarna snov v zrelih celicah sitastih cevi pri zdravih rastlinah je verjetno P-protein, medtem ko bi pri okuženih rastlinah lahko del fibrilarne snovi predstavljali tudi virusni proteini.

Površine elektronsko goste snovi ob porah sitaste plošče okuženih rupestrisov sorte St. George so mogoče povezane z nalaganjem kaloze, kar so opazili pri okužbi rastlin s fitoplazmami.

Membranski vključki v zrelih celicah sitastih cevi, ki smo jih videli le pri okuženi rastlini bi lahko bili posledica posrednega delovanja virusa na membrane endoplazemskega retikla, mitohondrije ali kakšne druge membranske strukture, med procesom diferenciacije floemskih celic.

Da bi naše domneve lahko potrdili, bi bilo potrebno opraviti imunolokalizacijo proteinov virusa RSPaV v tkivu vinske trte, pri čemer bi si pomagali s poliklonskimi protitelesi As7-276, ki se vežejo na plaščni protein virusa RSPaV.

6 POVZETEK

Virus razbrazdanja lesa rupestrisa (Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV) je najverjetneje povezan z nastankom bolezni razbrazdanja lesa rupestrisa (RSP) čeprav še ni dokazano, da je povzročitelj te bolezni. Bolezen RSP povzroča počasnejšo rast vinske trte (*Vitis vinifera* L.), zato so po nekaj letih bolni trsi opazno manjši od zdravih. Najboljši indikator za ugotavljanje bolezni RSP je rupestris (*Vitis rupestris* Scheele) sorte St. George, ki tvori najbolj izrazite jamice pod cepljenim mestom, kar je znak omenjene bolezni.

Cilj diplomskega dela je bil ugotoviti, ali virus RSPaV povzroča ultrastrukturne spremembe na rupestrisu sorte St. George, ki ga okužuje. Izbrali smo dva z RSPaV okužena rupestrisa in dva zdrava rupestrisa. Z metodo ELISA smo v izbranih rastlinah dokazali odsotnost 9 virusov, ki najpogosteje okužujejo vinsko trto, z metodama RT-PCR in IEM pa smo analizirali prisotnost RSPaV v izbranih rastlinah rupestrisa sorte St. George.

Za opazovanje smo izbrali zelene dele rastlin, brez vidnih bolezenskih znamenj. Z metodama RT-PCR in IEM smo potrdili, da se virus stalno nahaja v floemu rastlin in da v listnih ploskvah ni stalno enakomerno razporejen.

RSPaV je bil v testiranih rastlinah v latentni obliki, torej ni povzročal vidnih bolezenskih znamenj, zato očitnih sprememb, vidnih na poltankih rezinah, nismo pričakovali. Kljub temu smo, na sicer statistično nerepresentativnem vzorcu, opazili zožanja ksilemskih elementov pri z RSPaV okuženih rastlinah rupestrisa sorte St. George v primerjavi z zdravimi.

Na ultrastrukturnem nivoju smo opazili razlike med zdravimi in z RSPaV okuženimi rupestrisi v mezofilu listov in na vzdožnih prerezih zrelih celic sitastih cevi, kjer so bile razlike tudi najlepše vidne. V mezofilu smo v okuženih rupestrisih opazili več kloroplastov s podolgovatimi deformacijami, v celicah sitastih cevi pa smo našli stožčaste snope filamentov premera približno 15 nm, filamente premera približno 25 nm, elektronsko gosto snov ob porah sitaste plošče, membranske vključke in večjo količino fibrilarne snovi, kot pri zdravih rastlinah.

Filamenti širine približno 25 nm, zloženi v snope ob celični steni celic sitastih cevi so verjetno gladki endoplazemski retikel. Stožčasti snopi iz filamentov premera približno 15 nm v zrelih celicah sitastih cevi bi lahko bili virusnega izvora.

Fibrilarna snov v zrelih celicah sitastih cevi pri zdravih rastlinah je verjetno P-protein, medtem ko bi pri okuženih rastlinah lahko del fibrilarne snovi predstavljali tudi virusni proteini.

Površine elektronsko goste snovi ob porah sitaste plošče okuženih rupestrisov sorte St. George so mogoče povezane z nalaganjem kaloze, kar so opazili pri okužbi rastlin s fitoplazmami.

Membranski vključki v zrelih celicah sitastih cevi, z RSPaV okuženih rastlin, so še najbolj podobni močno spremenjenim membranam endoplazemskega retikla, mitohondrijev ali drugih membranskih struktur in so najverjetneje nastali pod vplivom virusa RSPaV med procesom diferenciacije floemskih celic.

Samo na podlagi ultrastrukture ni mogoče trditi, da zgoraj opisane spremembe kodira RSPaV. Da bi lahko naše domneve potrdili, bi bilo potrebno opraviti imunolokalizacijo virusnih proteinov v tkivu vinske trte, pri čemer bi lahko uporabili poliklonska protitelesa As7-276.

7 VIRI

- Alkowni R., Rowhani A. 2003. Molecular characterization of Grapevine leafroll-associated virus 9, a new Closterovirus associated with grapevine leafroll disease complex. V: 14th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 12-17 September, 2003, Locorotondo (Bari), Italy: extended abstracts. Locorotondo, University of Bari: 33
- Azzam O.I., Gonsalves D., Golino D.A. 1991. Detection of RNA in grapevines showing symptoms of rupestris stem pitting disease and the variabilities encountered. Plant Disease, 75, 9: 960-964
- Bonavia M., Digiaro M., Boscia D., Boari A., Bottalico G., Savino V., Martelli G.P. 1996. Studies on “corky rugose wood” of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. Vitis, 35, 1: 53-58
- Bonfiglioli R.G., Habili N., Green M., Schliefert L. F., Symons R.H. 1998. The hiden problem – Rugose wood associated viruses in Australian viticulture. Aust. Grapegrower and Winemaker, 420: 9-13
- Boscia D., Greif C., Gugerli P., Martelli G.P., Walter B., Gonsalves D. 1995b. Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. Vitis, 34, 3: 171-175
- Boscia D., Masannat K.M., Abu-Zurayk A.R., Martelli G.P. 1995a. Rugose wood of grapevine in Jordan. Phytopath. medit., 34: 126-128
- 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
- Bullock G.R. 1984. The current status of fixation for electron microscopy: A review. Journal of microscopy, 133, 1: 1-15
- Causton B. E. 1984. The choice of resins for electronimmunocytochemistry. V: Immunolabeling for electron microscopy. Polak ed. Varndell ed. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier science publishers B. V.: 370
- Colnarič J. 1980. Vinogradništvo. Ljubljana, Kmečki glas: 208
- Conti M., Milne R.G. 1985. Closterovirus associated with leafroll and stem pitting in Grapevine. Phytopath. medit., 24: 110-113
- Conti M., Milne R.G., Luisoni E., Boccardo G. 1980. A Closterovirus from a stem-pitting-diseased grapevine. Phytopathology, 70: 394-399
- Credi R. 1997. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. Plant Disease, 81: 1288-1292
- Cronshaw J. in Esau K. 1967. Tubular and fibrilar components of mature and differentiating sieve elements. The Journal of Cell Biology, 34: 801-815

- 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. Clasification and nomenclature of viruses. Eight report of the International Comittee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 1259 str.
- Fenson D. S. 1972. A theory of translocation in phloem of *Heracleum* by contractile protein microfibrillar material. Can. J. Bot., 50: 479 - 497
- Francki R. I. B., Milne R. G., Hatta T. 1985. Atlas of plant viruses, Volume I. Boca Raton, Florida. CRC Press, Inc.: 209-222
- Francki R. I. B., Milne R. G., Hatta T. 1985. Atlas of plant viruses, Volume II. Boca Raton, Florida. CRC Press, Inc.: 267-284
- 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
- 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
- Goheen A.C. 1988a. Corky bark. V: Compendium of grape diseases. Person, R.C.; Goheen A.C. (eds.). St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society, APS PRESS: 52-53.
- Goheen A.C. 1988b. Rupestris stem pitting. V: Compendium of grape diseases. Person, R.C.; Goheen A.C. (eds.). St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society, APS PRESS: 53
- Goheen A.C. 1989. Virus diseases and grapevine selection. Am. J. Enol. Vitic., 40, 1: 67-72
- Golino D.A. 1993. Potential intereactions between rootstocks and grapevine latent viruses. Am. J. Enol. Vitic., 44, 2: 148-152
- Gonsalves D., Meng B. 2000. Rupestris stem pitting associated virus nucleic acids, proteins, and their uses. U.S. patent US 6093544-A
- 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
- Griffiths G. 1993. Fine structure immunocytochemistry. Berlin, Heidenberg, New York,
- Hayat M. A. 2000. Principles and techniques of electron microscopy. United Kingdom, Cambridge University Press: 533-543
- http://en.wikipedia.org/wiki/Vitis_rupestris

- Kellenberger E., Johansen R., Maeder M., Bohrmann B., Stauffer E., Villiger W. 1992. Artefacts and morphological changes during chemical fixation. *Journal of microscopy*, 168: 181-210
- Kim K. S. in Fulton J. P. 1971. Tubules with virus like particles in leaf cells infected with bean pod mottle virus. *Virology*, 43: 329-337
- Kim K. S. in Fulton J. P. 1972. Fine structure if plant cells infected with Bean pod mottle virus. Academic Press. *Virology*, 49: 112-121
- Koenig R., Lesemann D.-E. 2001. Plant virus identification. *Encyclopedia of life sciences*.
- Korošec Z. 1982. Propadanje mladih trt na Krasu. *Sodobno kmetijstvo*, 15, 7-8: 312-316
- Korošec-Koruza Z. 1992. Varovanje in vrednotenje sortne raznolikosti vinske trte v Sloveniji. *Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljubl.*, 59: 157-162
- Kurstak E. 1981. *Handbook of plant virus infections comparative diagnosis*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier: 943
- London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, Springer – Verlag: 459
- Luft J. H. 1973. Embedding media – old and new. V: *Advanced techniques in biological electron microscopy*. Koehler J. K. ed. Berlin, Heidelberg, New York, Springer – Verlag: 1-34
- Maček J. 1986. Posebna fiopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276
- 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., Jelkmann W. 2000. Genus Foveavirus. V: *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner (eds.). SanDiego, Academic Press: 985-989

- Mavrič I., Ravnikar M. 1998. Uporaba imunske elektronske mikroskopije v rastlinski virologiji. V: Zbornik posveta kmetijstvo in okolje. Bled, 12 in 13. marec 1998. Rečnik M., Verbič J. (ur). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 331-336
- Medina V., Sudarshana M. R., Tian T., Ralston K. S., Yeh H.-H., Falk B. W. 2005. The *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV)-encoded P26 is associated with plasmalemma deposits within LIVY-infected cells. *Virology*, 333: 367-373
- Meng B. 1999. Rupestris stem pitting of grapevines: Insights on etiology, and development of reverse transcription-polymerase chain reaction and immunoassays for diagnosis. Doctoral Dissertation. Cornell University: 130
- Meng B., Credi R., Petrovic N., Gonsalves D. 2000. Detection of rupestris stem pitting associated foveavirus in grapevines with antibodies to recombinant coat protein of the virus. *Arc. virology*: 1-31
- Meng B., Credi R., Petrovic N., Tomazic I., Gonsalves D. 2003. Antiserum to Recombinant Virus Coat Protein Detects *Rupestris stem pitting associated virus* in Grapevines. *Plant Dis.*, 87: 515-522
- Meng B., Johnson R., Peressini S., Forsline P.L., Gonsalves D. 1999a. Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *Eur. j. plant pathol.*, 105: 191-199
- Meng B., Li C., Wang W., Goszczynski D., Gonsalves D. 2005. Complete genome sequences of two new variants of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and comparative analyses. *Journal of General Virology*, 86: 1555-1560
- Meng B., Pang S., Forsline P.L., McFerson J.R., Gonsalves D. 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *J. Gen. Virol.*, 79: 2059-2069
- Meng B., Zhu H.Y., Gonsalves D. 1999b. Rupestris stem pitting associated virus-1 consist of a family of sequence variants. *Arch. Virol.*, 144: 2071-2085
- Milne R. G. 1993. Electron microscopy of *in vitro* preparations. V: Diagnosis of plant virus diseases. Matthews R. E. F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 215-251
- Minafra A., Casati P., Elicio V., Rowhani A., Saldarelli P., Savino V., Martelli G. P. 2000. Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *Vitis*, 39, 3: 115-118
- Namba S., Boscia D., Azzam O., Maixner M., Hu J.S., Golino D., Gonsalves D. 1991. Purification and properties of closteroviruslike particles associated with grapevine corky bark diseases. *Phytopathology*, 81: 964-970

- Nolasco G., Mansinho A., Teixeira Santos M., Soares C., Sequeira Z., Correia P.K., Sequeira O.A. 2000. Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. European Journal of Plant Pathology, 106: 311-318
- Nolasco G., Santos C., Petrovič N., Teixeira Santos M., Cortez I., Fonseca F., Boben J., Nazare Pereira A.M., Sequeira O. 2006. *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV) isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a high conserved coat protein. Archives of virology, 151, 1: 83-96
- Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. Compendium of grape diseases. 4th ed. St.Paul, The American Phytopathological Society Press: 93
- Petrović N., Meng B., Ravnikar M., Mavric I., Gonsalves D. 2003. First detection of *Rupestris stem pitting associated virus* Particles by Antibody to a Recombinant Coat Protein. Plant Dis., 87: 510-514
- 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
- Petrovič N., Penev B., Krastanova T., Meng B., Gonsalves D. 2000b. Distribution of rupestris stem pitting associated virus in greenhouse and field grown *Vitis rupestris* 'St. George'. V: XIIIth meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Adelaide, 12-17 March, 2000. Adelaide, Australia, University of Adelaide and CSIRO: 35-36
- Poljak M. 1998. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142
- Robards A.W. in Wilson A.J. 1993. Procedures in electron microscopy. Chichester, New York, John Wiley & Sons, 2:2.1-2:2.2 in 5:6.1-5:6.63
- Russo M. in Martelli G. P. 1972. Ultrastructural observations on Tomato bushy stunt virus in plant cells. Academic Press. Virology, 49: 122-129
- Santos C., Santos M. T., Cortez I., Boben J., Petrović N., Pereira A. N., Sequeira O. A., Nolasco G. 2003. Analysis of the genomic variability and design of an asymmetric PCR ELISA assay for the broad detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. V: Proceedings of the 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine. Locorotondo: 126-127
- Savino V., Di Terlizzi B., Rivieccio S., Di Silvio R. 1991. Presence in clonal rootstocks of a graft-transmissible factor that induces stunting and bushy growth in European grapevines. V: Proceedings of the 10th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine. Volos, Greece: 202-210

- 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
- 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
- Sjölund R. D. 1997. The phloem sieve element: a river runs through it. *The Plant Cell*, 9: 1137-1146
- Steward S., Nassuth A. 2001. RT-PCR Based detection of Rupestris stem pitting associated virus within field-grown grapewines throughout the year. *Plant Dis.* 85: 617-620.
- Štrus J. 1996. Navodila za vaje iz Splošne zoologije, 1. del. Mikroskop in mikroskopiranje. Ljubljana, Scripta: 27-29
- Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. 1999. Handbook of plant virus diseases. Boca Raton (Florida), CRC Press: 553
- Thaine R. 1969. Movement of sugars through plants by cytoplasmic pumping. *Nature*, 222: 873 - 875
- 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
- Tomažič I. 2002. Raziskava povzročitelja bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (*Vitis* sp.) Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 81
- Tzeng H.C., Tzeng D.D.-S., Goheen A.C. 1993. Anatomical and tissue culture studies of Rupestris stem pitting-affected grapevine. *Bot. Bull. of Acad. Sin.*, 34: 73-82
- Van Regenmortel M. H. V., in Dubs M. C. 1993. Serological procedures. V: Diagnosis of plant virus diseases. Matthews R.E.F. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 159-214
- Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Boshop D.H.L. 2000. Virus taxonomy: Classification and Nomancalature of Viruses. Academic press: 985-989
- Vršič S., Lešnik M. 2005. Vinogradništvo. 2. natis. Ljubljana, Kmečki glas: 360
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K., Golino D.A., Rowhani A. 1998. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology*, 88: 1231-1237
- Zimmermann D., Bass P., Legin R., Walter B. 1990. Caracterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease of grapevine. *J. Phytopathol.*, 130: 205-218

ZAHVALA

Moja skromna zahvala velja dr. Maruši Pompe Novak, ki si je vedno vzela čas za izčrpne odgovore na moja nešteta vprašanja in za nepogrešljive nasvete pri izdelavi diplomskega dela. Predvsem pa se ji zahvaljujem za ves prosti čas, ki ga je žrtvovala za natančne preglede, popravke in dopolnitve diplome.

Mentorici prof. dr Maji Ravnikar se iskreno zahvaljujem za koristne nasvete in ideje, za optimizem in vzpodbudne besede.

Obema se zahvaljujem tudi zato, ker sta me navdušili za rastlinsko fiziologijo, mi omogočili, da sem delala diplomo na tem področju ter ves čas verjeli, da bom zastavljeni tudi v resnici izpeljala.

Mag. Magdi Tušek Žnidarič se prisrčno zahvaljujem za njeno prepotrebno pomoč in potrpljenje pri praktičnem delu diplome, za nasvete, prijetne in produktivne pogovore ter za njeno pozitivnost.

Zahvaljujem se dr. Irmi Tomažič za zabavne popoldneve v vinogradih, za pomoč pri PCR-ju ter za odgovore na številna vprašanja.

Za opravljene teste ELISA se zahvaljujem Marjanci Blas.

Najlepša hvala prof. dr. Marini Dermastia in prof. dr. Maji Kovač za hiter pregled diplome, koristne nasvete in popravke.

Zahvaljujem se tudi Ireni Šest iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, ki mi je omogočila mikroskopiranje na elektronskem mikroskopu, ko je bil naš v nedelujočem stanju.

Dr. Nataši Petrovič se zahvaljujem za odgovore na vsa moja vprašanja.

Hvala vsem iz oddelka za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo Nacionalnega inštituta za biologijo, ki so mi pomagali pri kakršnikoli zagati, predvsem Poloni Kogovšek za pomoč pri PCR-ju in prijetne pogovore ter Špeli Bebler za pomoč, ko sem jo potrebovala.

Hvala tudi vsem iz Katedre za zoologijo iz Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti, predvsem dr. Nadi Žnidaršič, ki mi je večkrat priskočila na pomoč pri mikroskopiranju in slikanju poltankih rezin ter Luku Malenšku za tehnično podporo in računalniške nasvete.

Hvala domačim za vso podporo in hvala Nejcu, ki je bil z mano.

Hvala vsem prijateljem in znancem, ki so verjeli vame in mi vlivali optimizem.