

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Simona PRUS

**GENETSKA RAZNOLIKOST SATELITSKE RNA MOLEKULE
VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENETIC VARIABILITY OF SATELLITE RNA MOLEKULE OF
GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Ravnikar in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentorica: prof. dr. Maja Ravnikar
Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 24.11.2010

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

Simona Prus

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 578.5:632.3:634.8(043.2)=163.6
KG virusi/ virus pahljačavosti listov vinske trte/ GFLV/ satelitska RNA/ vinska trta/
bolezni vinske trte/ IC-RT-PCR/ RFLP
AV PRUS, Simona
SA RAVNIKAR, Maja (mentor)/ ŽGUR-BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN GENETSKA RAZNOLIKOST SATELITSKE RNA MOLEKULE VIRUSA
PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 54 str., 3 pregl., 17 sl., 2 pril., 91 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) uvrščamo v rod *Nepovirus* in poddružino *Comovirinae* iz družine *Secoviridae* (Sanfaçon in sod., 2009). Genom virusa GFLV je sestavljen iz dveh linearnih pozitivno usmerjenih enoverižnih molekul genomske RNA (RNA1 in RNA2), poleg teh pa lahko vsebuje še veliko linearno molekulo satelitske RNA (satRNA), ki za podvojevanje in enkapsidacijo potrebuje genomsko RNA virusa GFLV (Fauquet in sod., 2005). Na podlagi analiz raznolikosti molekule RNA2 je znano, da obstaja veliko število genotipskih različkov virusa GFLV, vendar pa genetske raznolikosti satRNA GFLV še niso raziskali. V okviru naše raziskave smo dobili vpogled v genetsko raznolikost satRNA z metodo lovljenja na protitelesa, obratno transkripcijo, verižno reakcijo s polimerazo (IC-RT-PCR) in metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) v 60 vzorcih vinske trte iz različnih vinogradniških lokacij na Krasu in Vipavski dolini. S preizkušanjem različnih kombinacij začetnih oligonukleotidov smo našli primerno kombinacijo, ki nam je z metodo IC-RT-PCR, potrdila prisotnost satRNA GFLV v 75 % naših vzorcev, kar je veliko več kot so dokazali v predhodnih raziskavah. Za ocenjevanje genetske raznolikosti smo uporabili metodo RFLP, pri čemer smo satRNA cepili z restrikcijskim encimom MboII. Potrdili smo prisotnost do 4 restrikcijskih tipov satRNA GFLV znotraj ene rastline in nismo ugotovili povezave med prisotnostjo in odsotnostjo satRNA GFLV, restriktotipi satRNA GFLV v vzorcu in pojavljanjem bolezenskih znamenj. Kot kaže satRNA GFLV ne vpliva na izražanje bolezenskih znamenj, ki jih povzroča virus GFLV.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.5:632.3:634.8(043.2)=163.6
CX viruses/ grapevine fanleaf virus/ GFLV/ satellite RNA/ grapevine/ grapevine diseases/ IC-RT-PCR/ RFLP
AU PRUS, Simona
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/ ŽGUR-BERTOK Darja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
PY 2010
TI GENETIC VARIABILITY OF SATELLITE RNA MOLECULE OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV)
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 54 p., 3 tab., 17 fig., 2 ann., 91 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is classified in genus *Nepovirus* in the subfamily *Comovirinae* and family *Secoviridae* (Sanfaçon in sod., 2009). The genome of GFLV virus is composed of two linear single-stranded positive sense genomic RNA molecules (RNA1 and RNA2). In some instances, GFLV also contain additional large linear satRNA molecule, which needs genomic RNA of helper GFLV virus for its multiplication and encapsidisation (Fauquet in sod., 2005). There is high genetic variability of genomic RNA2 molecule, but till now there have been no data available about genetic variability of satRNA GFLV. In our study we tried to get insight into the genetic variability of satRNA GFLV with IC-RT-PCR and RFLP on 60 grapevine samples from 11 different winegrowing locations in Karst and Vipava valley. By testing different combinations of primers, we found suitable primer pair for IC-RT-PCR, which confirmed presence of satRNA GFLV in 75 % of our samples. This is much more than it was proven in previous investigations. With restriction enzyme MboII we confirmed the presence of up to 4 different genotypic variants of satRNA GFLV in a single plant and found out that satRNA GFLV have no influence on symptom expression caused by GFLV, therefore there is no correlation between presence or absence of satRNA GFLV, number of satRNA restrictotypes per plant and symptom expression.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD.....	1
2 NAMEN IN HIPOTEZE	2
2.1 NAMEN DELA	2
2.2 HIPOTEZE	2
3 PREGLED OBJAV	3
3.1 VIRUS PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)	3
3.1.1 Taksonomska uvrstitev virusa GFLV	3
3.1.2 Splošne značilnosti virusa GFLV	3
3.1.3 Zgradba virusa	5
3.1.4 Podvojevanje virusa in citopatološke spremembe v gostiteljski celici	7
3.2 SATELITI	8
3.2.1 Molekula satelitske RNA (satRNA)	9
3.2.1.1 Velike satelitske RNA	10
3.2.1.2 Male linearne satelitske RNA	12
3.2.1.3 Krožne satelitske RNA	12
3.2.2 Prisotnost satelitske RNA GFLV	13
3.3 NAPREDKI V RAZISKAVAH SATELITOV	14
3.4 GENETSKA RAZNOLIKOST RNA VIRUSOV	15
3.4.1 Genetska raznolikost virusa GFLV	17
3.4.2 Genetska raznolikost satelitske RNA	19
4 MATERIAL IN METODE	22
4.1 VINOGRADI	22

4.1.1	Opis vinogradov	22
4.1.2	Nabiranje rastlinskega materiala	23
4.2	ANALIZA VZORCEV	23
4.2.1	Določanje prisotnosti satelitske RNA	23
4.2.1.1	Homogenizacija rastlinskega materiala	23
4.2.1.2	Lovljenje virusov na protitelesa (immunocapture, IC)	23
4.2.1.3	Obratno prepisovanje (RT)	24
4.2.1.4	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	24
4.2.1.5	Izolacija in čiščenje fragmentov iz gela	27
4.2.2	RFLP z restrikcijskim encimom MboII	28
4.2.2.1	Poravnava nukleotidnega zaporedja z Align X programom.....	28
4.2.2.2	Iskanje restrikcijskih encimov z internetnim programom Restriction Mapper	28
4.2.2.3	Virtualni RFLP.....	28
4.2.2.4	Cepitev DNA z encimom MboII (Fermentas)	29
4.2.2.5	Optimizacija cepitve DNA z encimom MboII (Fermentas)	29
4.2.2.6	Obdelava podatkov z računalniškim programom Bionumerics in določanje števila restrikcijskih tipov	30
4.2.2.7	Iskanje povezave med bolezenskimi znamenji in prisotnostjo/odsotnostjo satRNA ter iskanje povezave med bolezenskimi znamenji in različnimi restrikcijskimi tipi	30
5	REZULTATI	31
5.1	DOLOČANJE PRISOTNOSTI MOLEKULE satRNA.....	31
5.2	RFLP Z RESTRIKCIJSKIM ENCIMOM MboII	33
5.2.1	Pogostost pojavljanja restrikcijskih tipov na različnih lokacijah	39
5.2.2	Pogostost pojavljanja restrikcijskih tipov pri različnih sortah	41
5.2.3	Povezave med prisotnostjo/odsotnostjo satRNA in pojavljanjem bolezenskih znamenj na listih in steblu.....	41
5.2.4	Povezave med restrikcijskimi tipi in pojavljanjem bolezenskih znamenj na listih in steblu.....	41
6	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
6.1	RAZPRAVA.....	43
6.1.1	Določanje prisotnosti molekule satelitske RNA GFLV	43
6.1.2	Genetska raznolikost molekule satelitske RNA GFLV.....	43
6.1.3	Povezave med pojavljanjem molekule satRNA, restrikcijskimi tipi in pojavljanjem bolezenskih znamenj	45
6.2	SKLEPI	47
7	VIRI	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi.....	25
Preglednica 2: Kombinacije vseh začetnih oligonukleotidov.....	26
Preglednica 3: Velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi satRNA pri vzorcih iz različnih lokacij po cepitvi z encimom MboII.	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Ogorčica <i>Xiphinema index</i>	4
Slika 2: Virusni delci GFLV. Merilo = 100 nm (Martelli in sod., 2001).....	5
Slika 3: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditve genov na RNA1, RNA2 in satRNA. UTR - nekodirajoča zaporedja, VPg – virusni protein (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).....	6
Slika 4: Shematski prikaz podvojevanja, znotrajceličnega in medceličnega gibanja GFLV. Oznake: GA – Golgijev aparat, V – vezikli iz GA, MT – mikrotubuli, MP – gibalni protein, Pd – plazmodezma (Andret - Link in sod., 2004a).....	8
Slika 5: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na matrično satRNA molekulo med verižno reakcijo s polimerazo.....	24
Slika 6: Fotografija elektroforetskega gela po cepitvi satRNA z encimom MboII v koncentraciji 150 ng in 100 ng v restriktijski mešanici.	30
Slika 7: Elektroforetski gel. Ugotavljanje prisotnosti satRNA s kombinacijo začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP). S sivo označenimi vzorci smo ponovili gelsko elektroforezo.	31
Slika 8: Elektroforetski gel. Ugotavljanje prisotnosti satRNA s kombinacijo začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP). S sivo označenimi vzorci smo ponovili gelsko elektroforezo.	31
Slika 9: Elektroforetski gel. Ugotavljanje prisotnosti satRNA s kombinacijo začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP). S sivo označenimi vzorci smo ponovili gelsko elektroforezo.	32
Slika 10: Grafični prikaz prisotnosti satRNA virusa GFLV v 60-ih vzorcih različnih sort iz različnih geografskih lokacij na Krasu in Vipavski dolini.....	32
Slika 11: Grafični prikaz prisotnosti satRNA virusa GFLV na različnih geografskih vinogradniških lokacijah na Krasu in Vipavski dolini.	33
Slika 12: Shematski prikaz restriktijskih tipov po cepitvi molekule satRNA GFLV z encimom MboII. Leva stran sheme ustreza 5' koncu, desna pa 3' koncu pomožnega fragmenta, ki vsebuje zapis satRNA GFLV. Z odenbenjenimi številkami so označena restriktijska mesta, izražena s številom baznih parov, ki ločijo restriktijsko mesto od 5' konca pomožnega fragmenta. Številke znotraj okvirja označujejo velikost fragmentov izraženo v baznih parih (bp).....	34
Slika 13: Grafični prikaz pogostosti posameznih restriktijskih tipov pri cepitvi satRNA GFLV z encimom MboII.	35
Slika 14: Fotografija elektroforetskega gela po rezanju molekule satRNA GFLV z encimom MboII.	35
Slika 15: Fotografija elektroforetskega gela po cepitvi molekule satRNA GFLV z encimom MboII.	36
Slika 16: Grafični prikaz porazdelitve in pogostosti pojavljanja posameznih restriktijskih tipov satRNA GFLV pri cepitvi z MboII na različnih vinogradniških lokacijah na Krasu.	38
Slika 17: Grafični prikaz in pogostosti pojavljanja posameznih restriktijskih tipov satRNA GFLV pri cepitvi z MboII pri različnih sortah.	41

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi satRNA pri vzorcih iz različnih lokacij po cepitvi z encimom MboII, velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi genov 2A, 2B in 2C molekule RNA2 GFLV po cepitvi z encimoma StyI in EcoRI ter popisana bolezenska znamenja.

Priloga A2: Dendrogram. Prikaz podobnosti različnih sort vinske trte glede na prisotno satRNA, njene restrikcijske tipe in bolezenska znamenja. A, B, C, D in E so posamezni restrikcijski tipi. Močno izražena bolezenska znamenja so označena z m, šibko izražena bolezenska znamenja s š, če ni izraženih bolezenskih znamenj z -.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

1A	gen za proteazni kofaktor
2A	gen za homing protein
ArMV	virus mozaika repnjaka (<i>Arabis mosaic virus</i>)
1B	gen za NTP vezavni protein
2B	gen za gibalni protein
BaMV	virus mozaika bambusa (<i>Bamboo mosaic virus</i>)
BRSV	virus obročkaste pegavosti pese (<i>Beet ringspot virus</i>)
BRV	virus atavizma črnega ribeza (<i>Blackcurrant reversion virus</i>)
1C	gen za vezavni protein
2C	gen za plaščni protein
CCMV	virus razbarvanja in lisavosti kitajskega fižola (<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>)
cDNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
ChYMV	virus rumene lisavosti cikorije (<i>Chicory yellow mottle virus</i>)
CMV	virus mozaika kumar (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	plaščni protein (coat protein)
CYDV-RPV	izolat RPV virusa rumene pritlikavosti žit (<i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i>)
CymRSV	virus obročkaste pegavosti orhidej (<i>Cymbidium ringspot virus</i>)
1D	gen za cisteinsko proteazo
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleotid
1E	gen za od RNA odvisno RNA polimeraza
EcoRI	restrikcijski encim
ELISA	encimsko imunosorpcijski test (enzyme linked immunosorbent assay)
ER	endomembranski retikel
FP A, 1, 2, 3	začetni oligonukleotid (forward primer)
GA	golgijev aparat
GBLV	prikriti virus vinske trte iz Bolgarije (<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i>)
GDefV	virus deformacije listov vinske trte (<i>Grapevine deformation virus</i>)
GfKV	virus marmoriranosti vinske trte (<i>Grapevine fleck virus</i>)
GLRaV-1, 2, 3, 6	virus zvijanja listov vinske trte (<i>Grapevine leafroll associated virus</i>)
GRV	virus rozetavosti arašidov (<i>Groundnut rosette virus</i>)
GVA	virus vinske trte A (<i>Grapevine virus A</i>)
GVB	virus vinske trte B (<i>Grapevine virus B</i>)
HP	homing protein
IC	lovljenje virusa na protitelesa (immunocapture)
LTSV	virus prehodne progavosti lucerne (<i>Lucerne transient streak virus</i>)
MboII	restrikcijski encim
MLRSV	virus prikrite obročkaste pegavosti rdečelistne slive (<i>Myrobalan latent ringspot virus</i>)
MP	gibalni protein (movement protein)
MT	mikrotubuli
oligo-d(T) ₂₁ V	začetni oligonukleotid
ORF	odprt bralni okvir (open reading frame)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
Pd	plazmodezma
PEMV	virus izrastkov in mozaika graha (<i>Pea enation mosaic virus</i>)

MV	virus mozaika prosa (<i>Panicum small mosaic virus</i>)
PREM	delno kartiranje z restrikcijskimi encimi (partial restriction enzymatic mapping)
PSV	virus zakrnelosti arašidov (<i>Peanut stunt virus</i>)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
RP A, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9	začetni oligonukleotid (reverse primer)
RT	obratno prepisovanje (reverse transcription)
satRNA	satelitska RNA molekula (satellite RNA)
SCBPV	satelitski virus kronične čebelje paralize (Satellite chronic bee-paralysis virus)
SCMoV	virus lisavosti podzemne detelje (<i>Subterranean clover mottle virus</i>)
SLRSV	virus prikrite obročkaste pegavosti rdečih jagod (<i>Strawberry latent ringspot virus</i>)
SmuI (FauI)	restrikcijski encim
SMWLMV	satelitski virus belo črtastega mozaika koruze (<i>Satellite maize white line mosaic virus</i>)
SNMoV	virus lisavosti pasjega zelišča (<i>Solanum nodiflorum mottle virus</i>)
SPMV	satelitski virus mozaika prosa (<i>Satellite panicum mosaic virus</i>)
STMV	satelitski virus mozaika tobaka (<i>Satellite tobacco mosaic virus</i>)
STNV	satelitski virus odmiranja tobaka (<i>Satellite tobacco necrosis virus</i>)
TBRV	virus črne obročkavosti paradižnika (<i>Tomato black ring virus</i>)
TBSV	virus zakrnelosti in grmičavosti paradižnika (<i>Tomato bushy stunt virus</i>)
TCV	virus kodravosti repe (<i>Turnip crinkle virus</i>)
TNV	virus odmiranja tobaka (<i>Tobacco necrosis virus</i>)
TRSV	virus obročkaste pegavosti tobaka (<i>Tobacco ringspot virus</i>)
TspGWI	restrikcijski encim
UTR	nekodirajoča zaporedja
V	vezikli
VPg	virusni protein
VTMoV	virus žametne lisavosti <i>Velvet tobacco mottle virus</i>)

1 UVOD

Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) povzroča bolezen, imenovano kužno izrojevanje vinske trte, ki je razširjena v vseh večjih vinorodnih regijah po vsem svetu in lahko zmanjša letni pridelek grozdja tudi za 80 %, zelo občutljivim sortam vinske trte pa se lahko občutno skrajša tudi življenska doba. Virus se prenaša iz okuženih rastlin na zdrave z ektoparazitsko talno ogorčico *Xiphinema index*. Genom virusa je sestavljen iz dveh linearnih pozitivno usmerjenih enoverižnih molekul RNA, RNA1 in RNA2. Pri francoskem genotipskem različku virusa GFLV z oznako F13 so odkrili še dodatno, satelitsko molekulo RNA (satRNA). Vse tri molekule RNA imajo na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), na 3' koncu pa se zaključijo s poliA repom. SatRNA genotipskega različka GFLV F13 (GFLV-F13) je zgrajena iz 1114 nukleotidov. Na njej je zapis za protein P3, ki naj bi bil odgovoren za podvojevanje satRNA. Poleg tega satRNA za lastno podvojevanje in prenos potrebuje še genomske molekuli pomožnega virusa, RNA1 in RNA2. Na podlagi analiz raznolikosti molekule RNA2 je znano, da obstaja veliko število genotipskih različkov virusa GFLV, vendar do sedaj še niso naredili nobene raziskave na temo genetske raznolikosti molekule satRNA. Rezultati pridobljeni z molekularno hibridizacijsko metodo so pokazali prisotnost satRNA le v 5 izolatih od 34 testiranih rastlin vinske trte in nobene povezave med bolezenskimi znamenji in prisotnostjo ali odsotnostjo molekule satRNA. V diplomski nalogi bomo skušali dobiti vpogled v genetsko raznolikost satRNA z metodo dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in ugotoviti ali obstaja povezava med prisotnostjo in odsotnostjo satRNA GFLV in različnimi bolezenskimi znamenji, ki jih povzroča GFLV.

2 NAMEN IN HIPOTEZE

2.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil:

- uvesti metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) za določanje satRNA virusa GFLV;
- dobiti vpogled v prisotnost satRNA v z GFLV okuženih trsih iz vinorodne dežele Primorske (vinorodnih okolišev Vipavska dolina in Kras) z uporabo RT-PCR;
- najti primerne restrikcijske encime za cepitev satRNA GFLV;
- z metodo RFLP dobiti vpogled v raznolikost satRNA virusa GFLV;
- preveriti ali obstaja povezava med prisotnostjo in odsotnostjo satRNA virusa GFLV in različnimi bolezenskimi znamenji, ki jih povzroča GFLV.

2.2 HIPOTEZE

Predvidevamo:

- da bomo uspeli najti splošne začetne oligonukleotide s katerimi bomo lahko pomnoževali večino različnih molekul satRNA virusa GFLV;
- da nam bo z metodo RT-PCR uspelo analizirati delež prisotnosti satRNA GFLV v okuženih trsih iz vinorodne dežele Primorske;
- da bomo našli primerne restrikcijske encime za raziskave z metodo RFLP, ki nam bodo pokazali realen vpogled v variabilost satRNA;
- da bomo našli veliko število restrikcijskih tipov satRNA virusa, tudi v istem trsu;
- da bomo našli povezave med bolezenskimi znamenji in prisotnostjo ali odsotnostjo satRNA.

3 PREGLED OBJAV

3.1 VIRUS PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)

3.1.1 Taksonomska uvrstitev virusa GFLV

Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) uvrščamo v rod *Nepovirus* in poddružino *Comovirinae* iz družine *Secoviridae* (Sanfaçon in sod., 2009). Za rod *Nepovirus* je značilno, da zajema poliedrične viruse, ki se širijo s talnimi ogorčicami (*Nematoda*). Ti dve lastnosti sta zaznamovali tudi poimenovanje rodu (NEmatoda, POliedrični virusi). Nepovirusi so razširjeni predvsem v zmerno toplih območjih po vsem svetu. Lahko okužujejo le eno ali širok krog rastlinskih vrst, odvisno od virusa (Fauquet in sod., 2005). Med nepovirusi jih je veliko takih, ki povzročajo gopodarsko pomembne bolezni na različnih kulturnih rastlinah. Tipični predstavnik rodu je virus obročkaste pegavosti tobaka (*Tobacco ringspot virus*, TRSV), razširjen v Severni Ameriki, ki okužuje sojo, borovnice, fižol, kumare, jajčevce in lubenice.

Za nepoviruse je značilno, da okužujejo širok krog naravnih gostiteljev in testnih rastlin. Običajno so omejeni na določeno geografsko področje ali celino. Najbolj značilna znamenja okužbe z nepovirusi so obročkaste kloroze na listih, ki jih lahko opazimo spomladi, pa tudi duge oblike kloroz ter razbarvanja listov. Mnoge divje rastline ob okužbi z nepovirusi ne razvijejo bolezenskih znamenj, kar kaže na možnost prilagoditve rastline na virus. Pojav in vrsta bolezenskih znamenj sta odvisna od vrste rastline, virusa, letnega časa ter od mnogih drugih dejavnikov (Kurstak, 1981).

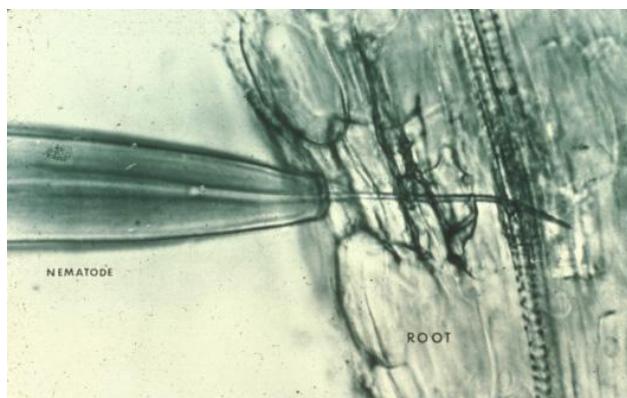
Genom nepovirusov je sestavljen iz dveh linearnih pozitivno usmerjenih enoverižnih molekul RNA (RNA1 in RNA2). Poleg teh lahko nekateri nepovirusi vsebujejo še linearno ali krožno satelitsko (satRNA) molekulo RNA (Fauquet in sod., 2005).

3.1.2 Splošne značilnosti virusa GFLV

GFLV je poleg virusa mozaika repnjaka (*Arabis mosaic virus*, ArMV) eden najpomembnejših virusov, ki okužujejo vinsko trto (*Vitis vinifera* L.) (Bovey in sod., 1980). Povzroča najstarejšo znano bolezen vinske trte, imenovano kužno izrojevanje vinske trte (Maček, 1986). Zaradi okužbe z GFLV so lahko letne izgube pridelka grozdja zmerne do zelo visoke, tudi do 80 %. To je odvisno od virulence virusnega izolata, občutljivosti sorte vinske trte in okoljskih dejavnikov (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980).

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

prostim očesom komajda vidna in v dolžino meri približno 3,5 mm (Urek in Hržič, 1998) (slika 1).



Slika 1: Ogorčica *Xiphinema index* (<http://www.nematode.net/Species.Summaries/Xiphinema.index/index.php>, 2010).

Ogorčice se hrano na koreninskih laskih vinske trte in živijo prosto v tleh. Njihova prehranjevalna naprava je sestavljena iz dolgega cevastega bodala (odontostileta), ki ga uporabljajo za vbadanje in izsesavanje tkiva mladih korenin. Na mestu vboda se v korenini razvije posebna zadebelitev, v kateri so vidne povečane, večjedrine celice z gosto citoplazmo. Izločki iz požiralnih žlez prebavijo rastlinske celične vsebine, ki jo ogorčice vsesajo. Med hranjenjem na okuženi trti poleg rastlinskih sokov zaužijejo tudi virus GFLV, ki se vežejo na specifična mesta na kutikuli v notranjosti požiralnika. Ko se okužena ogorčica hrani na koreninah zdrave trte, se skupaj z izločki iz požiralnih žlez preko odontostileta v rastlinsko tkivo prenesejo tudi virusi GFLV (Belin in sod., 2001; Urek in Hržič, 1998).

Bolezenska znamenja, kot so široko odprti sinus ob listnem peclju in nenormalna, skoraj vzporedna razporeditev glavnih žil, ki daje videz odprte pahljače, so prispevala k poimenovanju virusa (Pearson in Goheen, 1998). Za okužbo z GFLV pa je opisana še vrsta drugih bolezenskih znamenj, med katerimi so najznačilnejša: deformacije listov, kot so manjši, asimetrični in celo petršiljasti listi, različne oblike rumenenja medžilnih prostorov listov ter rumenenje žil, deformacije poganjkov v obliki krajanja medčlenkov, dvojnih členkov, zraslost poganjkov, bifurkacij ter posledično grmast ali metlast izgled trsa.

Prvi evropski opisi bolezni, ki jih povzroča virus GFLV, so stari vsaj 200 let. V herbarijih, ki so nastali pred začetkom uporabe hibridnih ameriških podlag odpornih na trtno uš, so našli liste trte z značilnimi bolezenskimi znamenji, ki jih pripisujemo GFLV. Danes je GFLV razširjen v vseh večjih vinorodnih regijah po vsem svetu, kar je v nasprotju z ostalimi nepovirusi, za katere je značilna geografska omejenost na določeno področje (Bovey in sod., 1980; Kurstak, 1981; Pearson in Goheen, 1998;).

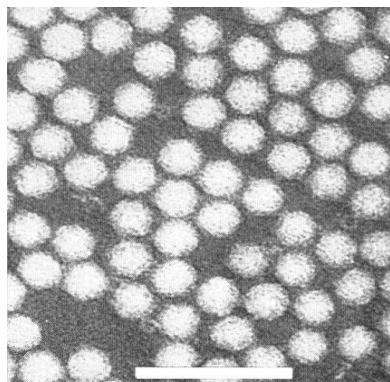
V naravi GFLV okužuje rastline iz rodu *Vitis*, njegovo prisotnost pa so z metodo RT-PCR dokazali tudi v vzorcih prstastega pesjaka (*Cynodon dactylon* L.) iz Irana (Maček, 1986; Izadphanaah in sod., 2003). GFLV lahko okuži vse žlahtne trte in podlage ter križance, z

mehansko inokulacijo pa ga lahko prenesemo še na nekatere zelnate rastline (Pearson in Goheen, 1998; Bovey in sod., 1980).

ArMV je serološko soroden virusu GFLV, vendar za razliko od GFLV okužuje širok krog naravnih gostiteljev. Prenašajo ga ogorčice *Xiphinema diversicatum*, *Xiphinema coxi* in *Longidorus caespiticola*. Bolezenska znamenja na okuženih trsih so zelo podobna tistim, ki jih kažejo trsi okuženi z GFLV: pogoste so kloroze listov v obliki mozaikov, pik ali lis, včasih se pojavijo tudi nekroze (Bovey in sod., 1980; Murant, 1985).

3.1.3 Zgradba virusa

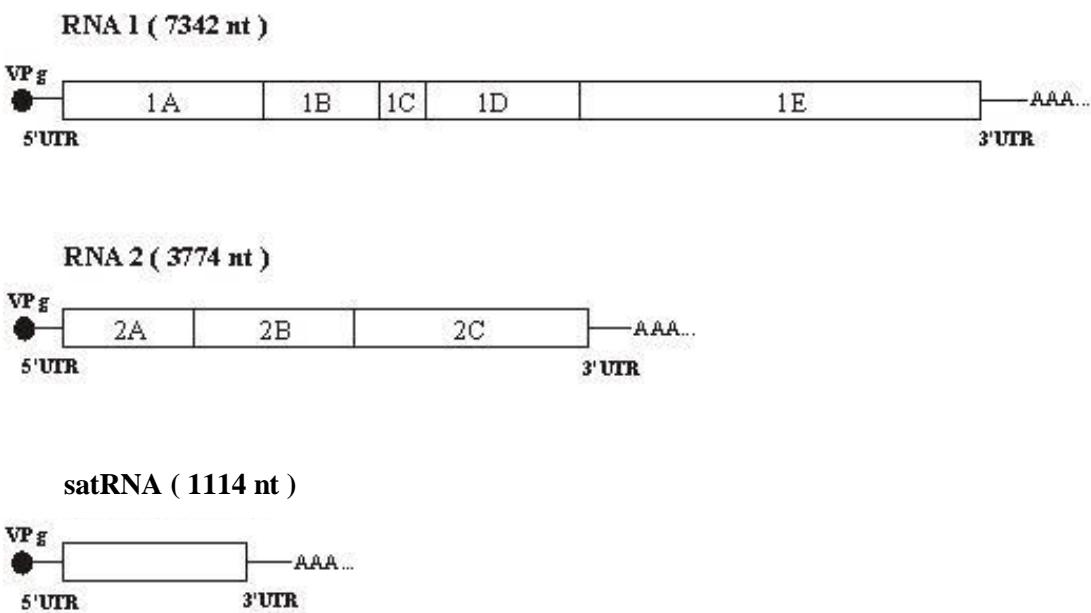
Virusni delci GFLV so izometrične oblike s premerom približno 28 nm (Pinck in sod., 1988) (slika 2). Kapsida je sestavljena iz 60 strukturnih enot oz. polipeptidov z molekulsko maso 56 kDa (Fauquet in sod., 2005; Serghini in sod., 1990).



Slika 2: Virusni delci GFLV. Merilo = 100 nm (Martelli in sod., 2001).

Genom virusa je sestavljen iz dveh genomskih linearnih pozitivno usmerjenih enoverižnih molekul RNA, RNA1 in RNA2. Pri genotipski različici F13, izolirani v Franciji, so odkrili in določili nukleotidno zaporedje še dodatne, satRNA. Vse tri RNA imajo na 5' koncu vezan virusni protein (VPg), na 3' koncu pa se zaključijo s poliA repom (Pinck in sod., 1988; Fuchs in sod., 1989) (slika 3). V svojo kapsido izometrične oblike je lahko spravljena posamezna molekula RNA2 ali se v kapsido spravita molekuli RNA1 in RNA2 ali pa kapsida ostane prazna (Quacquarelli in sod., 1976).

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



Slika 3: Shematski prikaz zgradbe genoma GFLV in razporeditve genov na RNA1, RNA2 in satRNA. UTR - nekodirajoča zaporedja, VPg – virusni protein (Belin in sod., 2001; Fuchs in sod., 1989).

RNA1 je sestavljena iz 7342 nukleotidov in kodira poliprotein P1 z molekulsko maso 253 kDa. P1 se razcepi v funkcionalne proteine: 1A (proteazni kofaktor), 1B (NTP vezavni protein, ki deluje kot helikaza), 1C (VPg), 1D (cisteinska proteaza) in 1E (od RNA odvisna RNA polimeraza) (Ritzenthaler in sod., 1991; Pinck in sod., 1991). Viry in sod. (1993) so *in vitro* sintetizirali RNA1 in RNA2 ter ju vnesli v testno rastlino *Chenopodium quinoa*. Ugotovili so, da se lahko RNA1 v celicah podvojuje neodvisno od RNA2, vendar slednjo nujno potrebuje za širjenje po rastlini. Nasprotno se RNA2, ob odsotnosti RNA1, ne more pomnoževati. Na RNA 1 je torej zapis za vse proteine, ki so potrebni za podvojevanje genetskega materiala GFLV (Ritzenthaler in sod., 1991).

RNA2 je dolga 3774 nukleotidov. Prepiše se v 122 kDa velik poliprotein P2, ki s proteolitičnim rezanjem razпадa na proteine: 2A (homing protein), 2B (gibalni protein) in 2C (plaščni protein) (Serghini in sod., 1990). Homing protein (HP) sodeluje s proteini molekule RNA1 pri procesu podvojevanja verige RNA2 (Gaire in sod., 1999). Gibalni protein (movement protein, MP) sodeluje pri širjenju virusa iz okužene v sosednje neokužene celice. Vpleten je v tvorbo tubularnih struktur, s katerimi virusni delci prehajajo iz ene celice v drugo (Ritzenthaler in sod., 1995). Plaščni protein (coat protein, CP) z molekulsko maso 56 kDa, je gradnik virusne kapside, odgovoren pa je tudi za enkapsidacijo genomske RNA, specifičnost prenosa GFLV z ogorčico in sistemsko širjenje po rastlini (Andret - Link in sod., 2004b; Belin in sod., 2001; Callaway in sod., 2001; Hewitt in sod., 1958; Serghini in sod., 1990). Prisotnost RNA ni pogoj za pravilno sestavljanje virusne kapside, saj ni nujno, da nastala kapsida vsebuje virusno RNA (Belin in sod., 1999).

SatRNA genotipske različice GFLV F13 je zgrajena iz 1114 nukleotidov. Na njej je zapis za protein P3 z molekulsko maso 37 kDa, ki je hidrofilne in bazične narave (Fuchs in sod.,

1989). P3 naj bi bil odgovoren za podvojevanje same molekule satRNA, ki za lastno podvojevanje in prenos potrebuje še molekuli RNA1 in RNA2 (Hans in sod., 1993; Andret - Link in sod., 2004a; Fuchs in sod., 1989).

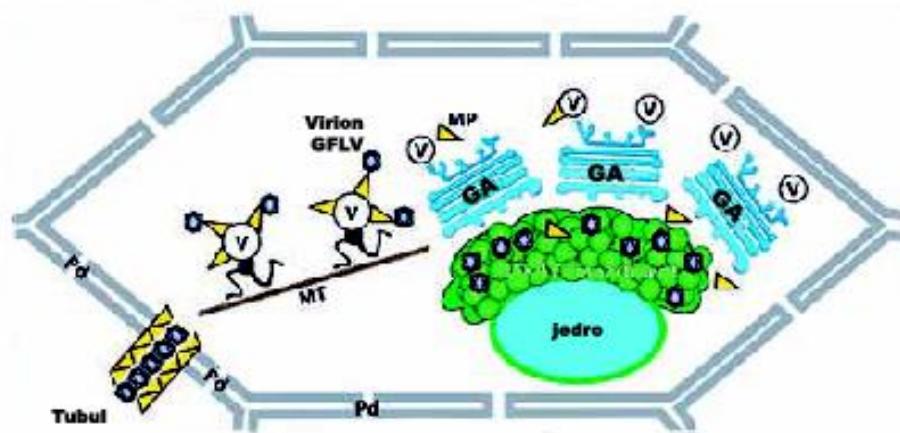
Za dokazovanje prisotnosti satRNA so v raziskavah uporabljali metodo molekularne hibridizacije s specifično sondjo (Mayo in sod., 1982; Pinck in sod., 1988; Fuchs in sod., 1989; White in Kaper, 1989, Fuchs in sod., 1991a; Hans in sod., 1992; Saldarelli in sod. 1993; Kreiah in sod., 1993; Saldarelli in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

3.1.4 Podvojevanje virusa in citopatološke spremembe v gostiteljski celici

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

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

Ker je HP potreben za podvojevanje RNA2, domnevajo, da je domena 2A na nastajajočem poliproteinu tista, ki privede kompleks P2-RNA2 do mesta podvojevanja (Gaire in sod., 1999). Znotraj virusa se zaradi procesiranja poliproteinov P1 in P2 s proteazo, kodirajočo z genom 1D, kopičijo funkcionalni virusni proteini. Izjema je MP, ki se po nastanku takoj prenese na celično površje (Ritzenthaler in sod., 2002).



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

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

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

3.2 SATELITI

Sateliti so manjši virusni delci, ki se brez drugega virusa, imenovanega »helper virus« (pomožni virus) ne morejo podvojevati znotraj gostiteljske celice. Glede na vir plaščnega proteina potrebnega za enkapsidacijo RNA ločimo: satelitski virus, čigar RNA kodira svoj lastni plaščni protein, ter satelitsko RNA (satRNA), ki se spakira v proteinsko kapsido pomožnega virusa (Astier in sod., 2007; Hu in sod., 2009; Kurath in Robaglia, 1995).

Pomožni virus omogoča satelitskim virusom in molekulam satRNA podvojevanje znotraj gostiteljske celice. Brez pomožnega virusa se sateliti ne morejo podvojevati, niso pa nujni za

življenjski cikel pomožnega virusa in z genomom pomožnega virusa v nukleotidnem zaporedju kažejo le malo ali nič podobnosti (Kurath in Robaglia, 1995).

Skupne lastnosti satelitov so, da:

- za svoje podvojevanje nujno potrebujejo pomožni virus;
- niso sestavni del genoma pomožnega virusa, niti del genoma gostiteljske rastline ter z genomom pomožnega virusa sploh nimajo ali imajo le majhno podobnost (na omejenih predelih, pogosto na terminalnih koncih) v nukleotidnem zaporedju;
- niso potrebni za normalno delovanje pomožnega virusa (Astier in sod., 2007; Roossinck in sod., 1992; Fritsch in Mayo, 1989; Kurath in Robaglia, 1995; Hu in sod., 2009).

Čeprav so sprva mislili, da je delta virus pri človeku satelit virusa hepatitis B, najdemo satelite le v rastlinskih gostiteljih, saj hepatitis delta virusa ni pravi satelit, ker se je sposoben podvojevati sam, pomožni virus pa potrebuje le za tvorbo kapside in prenos (Roossinck in sod., 1992; Kurath in Robaglia, 1995; Astier in sod., 2007).

Sateliti se obnašajo kot molekularni paraziti do svojega pomožnega virusa, saj lahko močno vplivajo na bolezenska znamenja, ki jih le-ta povzroča (Astier in sod., 2007). Pogosto ovirajo podvojevanje pomožnega virusa, zato se lahko bolezenska znamenja, ki jih povzročajo pomožni virusi in sateliti skupaj zelo močno razlikujejo od tistih, ki jih povzroča pomožni virus sam. V zadnjem desetletju so bile odkrite zelo zanimive biološke in molekularne značilnosti satelitskih sistemov (Kurath in Robaglia, 1995; Roossinck in sod., 1992).

Strokovni izraz satelitski virus je prvi uporabil Kassanis leta 1962, ko je opisal majhen, v premeru 17 nm velik delec, ki ga lahko najdemo pri nekaterih, a ne pri vseh izolatih virusa odmiranja tobaka (*Tobacco necrosis virus*, TNV) t.i. satelitski virus odmiranja tobaka (*Satellite tobacco necrosis virus*, STNV) (Fritsch in Mayo, 1989). Med to skupino satelitskih virusov štejemo tudi satelitski virus mozaika prosa (*Satellite panicum mosaic virus*, SPMV), satelitski virus belo črtastega mozaika koruze (*Satellite maize white line mosaic virus*, SMWLMV) in satelitski virus mozaika tobaka (*Satellite tobacco mosaic virus*, STMV). Ti satelitski virusi so povezani s pomožnimi virusi iz rodov *Aureusvirus*, *Panicovirus*, *Tobamovirus* in *Necrovirus*, za katere je značilno, da ne kažejo nobene podobnosti v nukleotidnem zaporedju med seboj, kar kaže na neodvisen razvoj v njihovi evolucijski zgodovini. V drugo skupino satelitskih virusov pa uvrščamo satelitski virus kronične čebelje paralize (*Satellite chronic bee-paralysis virus*, SCBPV) (Astier in sod., 2007; Hu in sod., 2009; ICTVdB Management, 2006).

3.2.1 Molekula satelitske RNA (satRNA)

SatRNA so kratke molekule RNA, ki so običajno sestavljene iz manj kot 1500 nukleotidov. Od svojega pomožnega virusa niso odvisne le za podvojevanje in premikanje ampak tudi za

enkapsidacijo in prenos, pri čemer uporabljajo plaščni protein svojega pomožnega virusa. S pomožnim virusom si delijo le malo ali nič podobnosti v nukleotidnem zaporedju (Astier in sod., 2007; Fritsch in sod., 1993; Hu in sod., 2009).

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

Raziskave kažejo na to, da se je vsaka satRNA razvijala skupaj s svojim pomožnim virusom tekom evolucije (Kurath in Robaglia, 1995). Hipoteze o izvoru satRNA se razlikujejo glede na to ali kodirajo zapis za protein ali ne. SatRNA molekula, ki kodira zapis za protein, se je lahko razvila iz nukleotidnih zaporedij virusov z izgubo funkcij. Majhne satRNA brez informacijske aktivnosti pa so bogate s sekundarnimi strukturami, zato predvidevajo, da so se razvile iz majhnih krožnih molekul RNA (Astier in sod., 2007).

Enoverižne satRNA so razdeljene v tri podskupine: velike satRNA, male linearne satRNA in krožne satRNA. Številni nepovirusi imajo velike satRNA ali krožne satRNA, medtem ko malih linearnih satRNA ne najdemo pri nobenemu predstavniku nepovirusov (Astier in sod., 2007; Hu in sod., 2009; ICTVdB Management, 2006).

3.2.1.1 Velike satelitske RNA

V to skupino uvrščamo satRNA linearne oblike, ki so dolge od 0,7 do 1,5 kb in kodirajo vsaj en nestruktturni protein, zato jim nekateri rečejo tudi informacijske satRNA (messenger satRNA) (Astier in sod., 2007; Hu in sod., 2009; Bos, 1999; Kurath in Robaglia, 1995; Fritsch in sod., 1993).

Podvojujejo se na podoben način kot genomska RNA pomožnih virusov (Kurath in Robaglia, 1995). Ugotovili so, da specifičnost interakcij med pomožnim virusom in velikimi satRNA ni povezana s produkтом genomske molekule RNA2, ki vključuje plaščni protein, ampak s produkti molekule RNA1, ki vplivajo na podvojevanje (Fritsch in Mayo, 1989). Ugotovili so, da izolat GFLV 24, ki je serološko podoben genotipski različici GFLV F13 iz Francije, ne more podvojevati satRNA GFLV F13 (Hans in sod., 1992), medtem ko se le-ta lahko podvojuje v pomožnem virusu ArMV S. V nasprotju pa so dokazali, da GFLV ni pomožni virus za satRNA ArMV S. Čeprav so vsi izolati ArMV serološko podobni, so ugotovili, da izolati ArMV iz bršljana in jesena niso pomožni virusi za satRNA ArMV iz španskega bezga, so pa pomožni virusi za satRNA ArMV iz hmelja in sladkorne pese (Liu in sod., 1991).

Kljub temu, da dejanske funkcije številnih nestruktturnih proteinov v velikosti od 38 do 48 kD, ki jih kodirajo satRNA niso znane, predvidevajo, da so ti proteini nujni a ne zadostni za podvojevanje satRNA. Takšne proteine so odkrili *in vivo* pri okužbi s satRNA virusa črne obročkavosti paradižnika (*Tomato black ring virus*, TBRV), satRNA ArMV in satRNA

GFLV (Astier in sod., 2007; Hu in sod., 2009, Kurath in Robaglia, 1995; Fritsch in sod., 1993; Liu in Cooper, 1993; Hans in sod., 1993; Hemmer in sod., 1993). Oncino in sod. (1995) so ugotovili, da 5' in 3' nekodirajoče regije satRNA TBRV sodelujejo pri podvojevanju satRNA, a niso vključene v specifičnost podvojevanja satRNA in pomožnega virusa, ampak le-to določa 48 kDa protein, ki ga kodira satRNA.

Pri GFLV F13 so protein, ki sodeluje pri podvojevanju velike satRNA, poimenovali P3. Takšen protein potreben za podvojevanje so našli tudi v rastlini okuženi s satRNA ArMV. V nasprotju pa so pri veliki satRNA virusa mozaika bambusa (*Bamboo mosaic virus*, BaMV) iz rodu *Potexvirus* našli protein P20, velik 20 kDa, ki pa ni nujen za podvojevanje satRNA, ampak sodeluje pri sistemskih premikih satRNA BaMV ter vpliva na interakcije med BaMV, satBaMV in gostiteljsko celico. P20 z vezavo na nekodirajoče regije satRNA BaMV vpliva na CP in MP pomožnega virusa ter tako sodeluje pri premikih satRNA BaMV na dolge razdalje (Astier in sod., 2007; Hu in sod., 2009; Lin in Hsu, 1994; Tsai in sod., 1999).

Največ študij o velikih nepovirusnih satRNA je bilo opravljenih na satRNA TBRV (Kurath in Robaglia, 1995). Podobne satRNA so našli tudi pri drugih nepovirusih, npr.: virusu obročaste pegavosti rdečelistne slive (*Myrobalan latent ringspot virus*, MLRSV), virusu obročaste pegavosti pese (*Beet ringspot virus*, BRSV), virusu prikrite obročaste pegavosti rdečih jagod (*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV), virusu rumene lisavosti cikorije (*Chicory yellow mottle virus*, ChYMV), prikritev virusu vinske trte iz Bolgarije (*Grapevine Bulgarian latent virus*, GBLV), ArMV in GFLV (ICTVdB Management, 2006).

S pomožnim virusom kažejo velike satRNA razen na terminalnih strukturah le majhno podobnost v nukleotidnem zaporedju (Astier in sod., 2007; Fritsch in Mayo, 1989). Našli so kratko nukleotidno zaporedje (UGAAAAA), verjetno povezano z VPg, na 5' koncih genomskih RNA virusov TBRV in GFLV ter na 5' koncih satRNA TBRV, satRNA GFLV, satRNA ChYMV in satRNA ArMV, medtem ko primerjave s 3' konci niso pokazale značilne podobnosti v nukleotidnem zaporedju (Fuchs in sod., 1989; Kurath in Robaglia, 1995).

Za satRNA TBRV in satRNA MLRSV so dokazali, da se lahko pakirajo v proteinske delce v različnih kombinacijah, z ali brez genomske RNA pomožnih virusov (Fritsch in Mayo, 1989).

V glavnem so spremembe bolezenskih znamenj, ki jih povzročajo pomožni virusi ob prisotnosti velikih nepovirusnih satRNA, majhne ali pa jih sploh ni. Vendar je to zelo odvisno tudi od posamezne gostiteljske rastline. Že Davies in Clark (1983) sta v svojih raziskavah pokazala, da satRNA ArMV igra pomembno vlogo pri izražanju bolezenskih znamenj v naravnih gostiteljskih rastlinih hmelju in testni rastlini *Chenopodium quinoa*. V ostalih študijah pa so ugotovili, da lahko satRNA ArMV povzroči povečanje bolezenskih znamenj na z ArMV okuženi gostiteljski rastlini *Nicotiana megalosiphon*, medtem ko satRNA TBRV na gostiteljski rastlini *C. amaranticolor* povzroči zmanjšanje lokalnih poškodb na listih (Fritsch in sod., 1993; Fritsch in Mayo, 1989; Murant in sod., 1973). Fuchs in sod. (1991b) pa so

delali raziskavo o vplivu satRNA GFLV F13 na izražanje bolezenskih znamenj v gostiteljski rastlini ter ugotovili, da satRNA zmanjša količino pomožnega virusa GFLV v gostiteljski rastlini, kar kaže na to, da lahko vpliva na patogenost pomožnega virusa.

3.2.1.2 Male linearne satelitske RNA

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

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

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

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

3.2.1.3 Krožne satelitske RNA

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

Krožne satRNA se podvojujejo podobno kot viroidi na način kotalečega se kroga, kjer prihaja do samocepitev v monomere z ribocimsko aktivnostjo glave kladiva (hammerhead) (Hu in sod., 2009; Kurath in Robaglia, 1995). Ribocim je molekula RNA, ki zaradi specifične terciarne strukture deluje kot encim, ki katalizira kemijsko reakcijo samocepitve RNA molekule na točno določenih mestih, RNA ligaza v celici pa verjetno sproži zvijanje krožne satRNA (Astier in sod., 2007). Večina krožnih satRNA ima ohranjeno nukleotidno zaporedje, ki leži blizu samocepitvenega mesta in tvori ohranjene sekundarne strukture (Kurath in Robaglia, 1995). Krožna satRNA TRSV ima 69 % od skupno 359 nukleotidov povezanih v sekundarne strukture (Astier in sod., 2007).

Znanih je osem krožnih satRNA, ki so prisotne pri rodovih *Sobemovirus*, *Nepovirus* in *Luteovirus*. Največ študij na krožnih satRNA pri rodu nepovirusov so naredili na TRSV (Kurath in Robaglia, 1995), njihovo prisotnost pa so potrdili tudi pri ChYMV in izolatu ArMV iz hmelja. Izolati ArMV imajo lahko torej prisotna dva tipa satRNA ali nobenega. Od ostalih rodov pa so krožne satRNA našli pri virusu rumene pritlikavosti žit (*Cereal yellow dwarf virus-RPV*; CYDV-RPV), virusu prehodne pegavosti lucerne (*Lucerne transient streak virus*, LTSV), virusu lisavosti pasjega zelišča (*Solanum nodiflorum mottle virus*, SNMoV), virusu lisavosti podzemne detelje (*Subterranean clover mottle virus*, SCMoV) in virusu žametne lisavosti *Velvet tobacco* (*Velvet tobacco mottle virus*, VTMoV) (Astier in sod., 2007; Hu in sod., 2009; ICTVdB Management, 2006).

3.2.2 Prisotnost satelitske RNA GFLV

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

Saldarelli in sod. (1993) pa so na podoben način analizirali naravno prisotnost satRNA pri 34 izolatih GFLV iz Italije in Jordanije. Rezultati so pokazali, da se majhne molekule RNA z enako velikostjo in nukleotidnim zaporedjem, podobnim francoški genotipski različici satRNA virusa GFLV F13, pojavljajo pri približno 15 % rastlin vinske trte, naravno okuženih z GFLV. SatRNA so odkrili v ekstraktih vinske trte in rastlin *C. quinoa*, ki so bile predhodno okužene z ekstrakti naravno okuženih rastlin, vendar so z metodo hibridizacije odtisa northern določili manj satRNA v vinski trti kot v *C. quinoa*. Tako so potrdili, da je satRNA pogosto prisotna pri virusu GFLV, kar je značilno tudi za ostale nepoviruse. Vendar niso potrdili prejšnjih raziskav, da naj bi imela prisotnost satRNA GFLV koristen vpliv na naravnega gostitelja, s tem da bi zmanjševala intenzitet bolezenskih znamenj povzročenih s strani virusa GFLV (Saldarelli in sod., 1993).

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

3.3 NAPREDKI V RAZISKAVAH SATELITOV

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

Objavljene so bile številne študije, v katerih so uporabili satRNA molekule v obliki klonov cDNA za okuževanje rastlin. Iz potomk teh rastlin so izolirali klone satRNA, jih analizirali in dokazali nastanek genetskih sprememb. Številne druge raziskave so vključevale podvojevanje satelitskih genomov, narejenih *in vitro* z manipulacijo okuženih klonov cDNA, ki so mutirali. Ugotovili so, da se lahko številne male substitucije, delecije ali insercije pogosto ohranjajo pri nekaterih satRNA, večje mutacije pa so ali letalne ali vodijo v genetske spremembe njihovih potomcev (Kurath in Robaglia, 1995).

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

Nedavne raziskave so pokazale, da je patogenost satRNA in pomožnega virusa določena z zapletenim tekmovanjem med gostiteljsko rastlino, pomožnim virusom in satRNA z utiševalnim sistemom RNA gostiteljske rastline. Predvidevajo, da utiševalni mehanizem RNA gostiteljske rastline igra pomembno vlogo pri patogenosti in evoluciji satRNA. Na ta način specifične strukture in nukleotidna zaporedja na nekodirajoči regiji satRNA verjetno uravnavajo patogenost pomožnega virusa, tako da preusmerijo utiševalne poti RNA gostitelja v svoj prid. Na katera tačna mesta deluje utiševalni mehanizem RNA in povzroča različne tipe bolezenskih znamenj pri gostiteljskih rastlinah, zaenkrat še ni znano. V novejših raziskavah so ugotovili, da lahko satRNA zmanjšujejo, povečujejo ali ne spreminja bolezenskih znamenj, ki jih povzročajo pomožni virusi. Pri večini rastlinskih vrst satRNA zmanjšuje podvojevanje in kopičenje pomožnega virusa, kar se kaže v manj izraženih bolezenskih znamenjih na gostiteljski rastlini. Zmanjšanje bolezenskih znamenj je največkrat opažen učinek ob prisotnosti satRNA. V nekaterih primerih pa satRNA, ki zmanjšuje bolezenska znamenja v številnih gostiteljih, poveča njihovo izražanje v določenih drugih gostiteljih, kot v primerih letalnega odmiranja paradižnika in močnih sistemskih kloroz pri tobaku, popru in paradižniku (Hu in sod., 2009).

Szittyá in sod. (2003) so ugotavljali vpliv temperature na utiševalni mehanizem RNA, ki omogoča osnovno obrambo evakriontskih celic pred virusi. Poizkuse so delali na protoplastih *Nicotiana benthamiana* predhodno okuženih s CymRSV pri temperaturah 15, 21, 24 in 27 °C. Ugotovili so, da nižje temperature zavrejo utiševalni mehanizem RNA. Mala (21 do 26

nukleotidov) interferenčna RNA (siRNA) je osnovna molekula utiševalnega mehanizma RNA, katere raven se pri nižjih temperaturah močno zmanjša, zato so rastline v hladnem bolj dovzetne za okužbe z virusi.

Pantaleo in Burgyan (2008) sta v raziskavah satRNA CymRSV dokazala, da je njen kopičenje močno odvisno od temperature in prisotnosti P19, ki deluje kot utiševalni zaviralni protein pomožnega virusa, kar kaže na pomembno vlogo utiševalnega mehanizma RNA pri tekmovanju satRNA in CymRSV v celici. Raziskave so pokazale nenavadno prilagoditev virusa na svojega gostitelja z uporabo protivirusnih utiševalnih odzivov gostitelja za kontrolo virusne parazitske satRNA.

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

3.4 GENETSKA RAZNOLIKOST RNA VIRUSOV

RNA virusi se zelo hitro spreminjajo oz. so genetsko raznoliki predvsem zaradi manjše natančnosti podvojevanja in neučinkovitih ali odsotnih popravljalnih mehanizmov. Razlog so tudi kratki generacijski časi, velika hitrost podvajanja in posledično velika populacija virusov v okuženem organizmu (Moya in sod., 2000; Jerman in Štern, 1999).

Najpogosteji genetski spremembi pri virusih sta mutacija (sprememba virusnega genetskega materiala) in rekombinacija (izmenjava genetskega materiala med dvema sorodnima virusoma ali genotipskima različicama istega virusa). Mutacije, kot so insercije, delecije ali zamenjave (substitucije) nukleotidov, so primarni vir raznolikosti. O verjetnosti za ohranitev mutacije odloča zlasti njen fenotipski učinek, ki bodisi zvišuje zmogljivost organizma (ugoden oz. pozitiven učinek), jo ohranja (nevtralna mutacija) ali jo zmanjšuje (neugodna oz. negativna mutacija) (Jerman in Štern, 1999: 55). Ni znano koliko je fenotipsko neugodnih mutacij, saj se s selekcijo izločijo iz populacije in nekatere že v osnovi onemogočijo razmnoževanje virusa (Jerman in Štern, 1999: 55; Drake in sod., 1998).

Pri rastlinskem RNA virusu TMV so na podlagi preučevanja gibalnega proteina hitrost mutacij ocenili na 1 nukleotidno zamenjavo na genom pri vsaki podvojitvi. 69 % mutacij so predstavljale insercije in delecije, večkrat celo treh ali več baz, nukleotidnih zamenjav pa je bilo le 31 %, kar je ravno obratno kot poročajo za virus z DNA. Tretjina vseh mutant je vsebovala več kot eno mutacijo (multiple mutante) (Malpica in sod., 2002). Ugotovitev podpira predvidevanja, da je velika hitrost mutacij RNA virusov prej posledica težnje po čimhitrejšem podvajanju kemijsko nestabilnega genoma RNA kot pa evolucijska strategija virusov (Drake in sod., 1999).

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

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

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

Pomembno je tudi zavedanje, da veliko število rekombinacij nastalih v eksperimentalnih pogojih ni realen odsev rekombinacij v naravi. Te so dokaj redke (Masuta, 2002; Lai, 1995). Rekombinacije RNA so za rastlinske viruse zagotovo pomemben mehanizem evolucije in prilagoditve na novo okolje. Po drugi strani pa imajo rekombinacije RNA v naravi verjetno pomembno vlogo pri popravljanju mutacij, ki so nastale zaradi nenatačnosti virusne replikaze (Masuta, 2002; Lai, 1992). To pa ne pomeni, da rekombinacije v osnovi ustvarijo funkcionalne molekule RNA brez napak, ki jih povzroči replikaza, saj ni nujno, da ravno mesta napak izzovejo rekombinacijo. Vsekakor pa z rekombinacijami nastane več različnih molekul RNA, izmed katerih je s selekcijo izbrana funkcionalna RNA, ki omogoča preživetje virusa (Lai, 1995; Masuta, 2002).

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

3.4.1 Genetska raznolikost virusa GFLV

Populacije rastlinskih virusov so genetsko heterogene. Potomci, ki se genetsko razlikujejo od svojih staršev se imenujejo mutante ali genotipske različice ali kvazivrste (quasispecies). Genetsko spremjanje skozi čas imenujemo evolucija virusa (Garcia - Arenal in sod., 2003).

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

Naraghi - Arani in sod. (2001) so z metodama lovljenja na protitelesa, obratno transkripcijo, verižno reakcijo s polimerazo in metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (IC-RT-PCR-RFLP) ter sekvenciranjem preučevali genetsko raznolikost gena 2C 14 izolatov GFLV, ki so kazali različna bolezenska znamenja, iz 8 vinogradov iz različnih lokacij v Kaliforniji. Dokazali so prisotnost več genotipskih različic GFLV v posameznih vzorcih, ki so se v nukleotidnem zaporedju razlikovale za 11 – 13 %, v aminokislinskem zaporedju pa za 4 – 9 %. V okviru iste študije so izbrane izolate GFLV z mehansko inokulacijo prenesli tudi na testne rastline *C. quinoa*. Ker se z vsako naslednjo mehansko inokulacijo poveča seleksijski pritisk, so se v novem gostitelju obdržale le na novega gostitelja najbolj prilagojene genotipske različice. Prišli so do ugotovitve, da je za bolj realne podatke o genomske raznolikosti potrebno delati takšne raziskave v primarnem gostitelju (Naraghi - Arani in sod., 2001).

Vigne in sod. (2004a,b) so z IC-RT-PCR-RFLP analizirali gen 2C pri 347 izolatih iz gensko spremenjenih in nespremenjenih trsov iz vinograda v Franciji. Dokazali so, da 55% vseh izolatov (191 od 347) vsebuje eno prevladujočo genotipsko različico virusa GFLV, pri ostalih izolatih pa so na podlagi kompleksnejših restrikcijskih vzorcev dobljenih z metodo RFLP sklepali, da jih vsebujejo več, vendar med izolati GFLV različnega izvora in njihovo nukleotidno oddaljenostjo niso našli jasnih povezav. Z določanjem nukleotidnega zaporedja 93 genotipskih različic so ugotovili, da je raznolikost zaporedij 2C gena na nukleotidnem nivoju znašala 0,2 do 13,8 %, na aminokislinskem nivoju pa 0,2 do 6,9 %. Gen za plaščni protein je torej precej gensko stabilen, saj pomembno sodeluje pri širjenju virusa med celicami in na daljše razdalje ter pri interakciji virusa z gostiteljsko rastlino in ogorčico (Andret – Link in sod., 2004b).

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

Tudi v severni Tuniziji so delali raziskave o genetski raznolikosti 20 izolatov virusa GFLV z metodo RT-PCR-RFLP, ki je pokazala, da so populacije GFLV iz tunizijskih vinogradov sestavljene iz dveh restriktivskih tipov. Le-ti ustrezajo različnim subpopulacijam, ki se razlikujejo v nukleotidnem zaporedju za 11 %. V primerjavi s francoskim izolatom GFLV-F13 je nukleotidno zaporedje teh dveh subpopulacij kazalo 93 % podobnost v nukleotidnem in 98 % podobnost v aminokislinskem zaporedju (Fattouch in sod., 2005a,b).

Pompe – Novak in sod. (2007) so raziskovali genetsko raznolikost GFLV na nivoju nukleinskih kislin na vseh treh genih molekule RNA2: 2A, 2B in 2C. Z metodo IC-RT-PCR-RFLP so dobili veliko število restriktivskih vzorcev (največ na genu 2C in najmanj na genu 2B), iz česar so sklepali na veliko število genotipskih različic GFLV v naravnih populacijah. Okužba posameznega trsa z več genotipskimi različicami GFLV, ki so jo odkrili, omogoča naravne rekombinacije med njimi. Analiza nukleotidnih zaporedij je pokazala več genotipskih različic v štirih od devetih izolatov virusa GFLV. Velikost gena 2A je v nasprotju z genoma 2B in 2C močno variirala. Ugotovili so tudi, da je znotraj gena 2A prišlo do rekombinacije na mestu med 220 in 225 nukleotidom v treh od devetih izolatov. To je prva objava rekombinacije na N – terminalnem delu RNA2 virusa GFLV. Skušali so tudi povezati bolezenska znamenja z genetsko raznolikostjo. Trsi okuženi z rekombinantami GFLV v genu 2A^{HP} niso kazali različnih ali bolj izraženih bolezenskih znamenj v primerjavi s trsi, ki so bili okužene z nerekombinantnimi izolati GFLV. Najdena ni bila nobena povezva med bolezenskimi znamenji pri sorti Volovnik in genetsko raznolikostjo ter pojavljanjem rekombinacij znotraj RNA2GFLV.

Vigne in sod. so leta 2008 odkrili več medvrstnih rekombinacij znotraj RNA2 med genotipsko različico GHu virusa GFLV (GFLV-GHu) in genotipsko različico Ta virusa ArMV (ArMV-Ta) s sekvenciranjem in analizo SISCAN. To je bila prva študija, ki je pokazala rekombinacijo na 5' nekodirajoči regiji nepovirusne genomske RNA. Ugotovili so, da je genotipska različica GHu-GFLV medvrstna rekombinantna med GFLV in ArMV s številnimi rekombinacijami na 5' nekodirajoči regiji. Medvrstne rekombinacije so odkrili na 5' nekodirajoči regiji, genih 2A^{HP} ter 2B^{MP}, ne pa na genu 2C^{CP} in 3' nekodirajoči regiji.

Mekuria in sod. so leta 2009 v štirih sortah vinske trte iz različnih vinogradov v vzhodnem Washingtonu ugotovili 89 % podobnost v nukleotidnem zaporedju znotraj molekule RNA1 iz testnih rastlin in 87 do 89 % podobnost med molekulo RNA1 iz testnih rastlin in genotipske različice GFLV F13. Znotraj molekul RNA2 različnih izolatov virusa GFLV pa so dokazali 85 do 99% podobnost v nukleotidnem zaporedju in 81 do 92 % podobnost izolatov RNA2 virusa GFLV z RNA2 različicami GFLV-F13 in GFLV-GHu, 72 do 74 % z virusom deformacije listov vinske trte (Grapevine deformation virus, GDefV) ter 66 do 72 % z različnimi izolati ArMV. Ti rezultati so pokazali, da imajo izolati GFLV iz Washingtona večjo podobnost v nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju z GFLV kot pa z drugimi nepovirusi iz skupine A. Filogenetska raznolikost izolatov z domnevнимi rekombinacijami na 2A^{HP} in 2B^{MP} pa kaže na to, da njihova genomska RNA2 izvira iz znotrajvrstnih in medvrstnih

rekombinacij med tremi sorodnimi nepovirusi iz skupine A, in sicer, GFLV, GDefV in ArMV. Rezultati študije so torej potrdili, da znotraj molekul RNA1 in RNA2 najbolj sorodnih nepovirusov skupine A lahko prihaja do rekombinacijskih dogodkov.

V zahodnem delu južne Afrike so Liebenberg in sod. (2009) raziskovali genetsko raznolikost gena 2C molekule RNA2 pri dvanajstih izolatih GFLV. Dokazali so 86 do 99 % podobnost v nukleotidnem zaporedju in 94 do 99 % podobnost v aminokislinskem zaporeju. Filogenetske analize gena 2C^{CP} so pokazale, da lahko južnoafriške izolate razdelimo v dve različni subpopulaciji. Med raznolikostjo nukleotidnega zaporedja gena 2C^{CP} in izražanjem bolezenskih znamenj ali geografskim izvorom subpopulacij niso našli povezav. Faktorji, ki vplivajo na izražanje bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah tako še vedno niso znani. Za bolj zanesljive analize genske raznolikosti bi bilo potrebno primerjeti celoten genom GFLV, kar bi omogočilo boljši vpogled v virusne faktorje odgovorne za izražanje bolezenskih znamenj in subpopulacijske evolucije.

Vigne in sod. (2009) so v vinogradih, okuženih z GFLV, testirali trse, ki so jih za obdobje 12 let navzkrižno zaščitili z manj virulentnima sevoma GFLV-GHu in ArMV-Ta. Proučevali so genetsko raznolikost populacij virusov na podlagi molekule RNA2 in pojav rekombinacij med izolati virusa GFLV in GFLV-GHu ter med izolati ArMV in ArMV-Ta. Z analizo SISCAN so ugotovili, da se pri ArMV-Ta in GFLV-GHu v obdobju 12 let nukleotidno zaporedje RNA2 ni kaj dosti spremenilo (0,1 - 1,1 % za ArMV-Ta in 0,1 - 1,2 % za GFLV-GHu). Pri izolatih GFLV je raznolikost RNA2 na nukleotidnem nivoju znašala 0,2 - 13 %. Rekombinacijo so dokazali med izolati GFLV, ne pa tudi med GFLV in GFLV-GHu ter izolati GFLV in ArMV-Ta. Rekombinacije niso zaznali tudi v gensko spremenjenih rastlinah (Vigne in sod., 2004a,b).

V najnovejši študiji so Oliver in sod. (2010) delali raziskave na celotnem kodirajočem nukleotidnem zaporedju RNA2 molekule (na genih 2A^{HP}, 2B^{MP} in 2C^{CP}) in nukleotidnem zaporedju 1E gena RNA1 molekule, ki kodira od RNA odvisno RNA polimerazo, na 14 izolatih GFLV iz treh Kalifornijskih vinogradov. Dokazali so medvrstno rekombinacijo med GFLV in ArMV v genu 1E in genih 2A^{HP}, 2B^{MP} ter znotrajvrstno rekombinacijo opaženo najpogosteje znotraj gena 2C^{CP}. Raziskava genetske raznolikosti med Kalifornijskimi izolati in izolati razširjenimi po celem svetu (za katere so znana 3 kodirajoča nukleotidna zaporedja RNA1 in 44 RNA2) je pokazala podobne modele molekularne evolucije različnih regij znotraj genoma GFLV in jasen selekcijski pritisk, najbolj izražen na genih 2C^{CP} in 2B^{MP} ter srednje izražen na genu 1E. S to študijo so dokazali, da sta selekcija in rekombinacija pomembna evolucijska mehanizma genetske raznolikosti GFLV.

3.4.2 Genetska raznolikost satelitske RNA

Tako kot pri pomožnih virusih tudi pri satRNA nenehno nastajajo genotipske različice ali kvazivrste. Primerjave nukleotidnega zaporedja so pokazale, da so substitucije ene baze,

insercije, delecije in rekombinacija pogosti mehanizmi genetskih sprememb med evolucijo satelitov. Seleksijski pritisk, ki vpliva na evolucijo satRNA, predstavljata gostiteljska rastlina, kjer poteka podvojevanje, in pomožni virus, katerega mehanizme za podvajanje in prenos izkoriščajo tudi satRNA (Kurath in Robaglia, 1995; Astier in sod., 2007).

S hibridizacijsko metodo sta Dood in Robinson (1984) primerjala nukleotidna zaporedija satRNA dveh različnih izolatov virusa TBRV, TBRV-S in TBRV-G, in dokazala le 25 % podobnost med njima. Fritsch in sod. (1984) so z oligonukleotidnim mapiranjem ugotovili veliko večjo podobnost satRNA znotraj izolatov TBRV, kot pa je podobnost med satRNA TBRV in satRNA MLRSV, čeprav oba virusa spadata v skupino nepovirusov.

Ko so primerjali med sabo satRNA genotipske različice GFLV-F13 s satRNA ArMV iz španskega bezga so Fuchs in sod. (1989) ter Liu in sod. (1990) ugotovili, da imata 83 % podobnost v nukleotidnem in 72 % podobnost v aminokislinskem zaporedju, z ostalimi nepovirusnimi satRNA, kot je satRNA TBRV, pa so te podobnosti veliko manjše razen na 5' koncih nukleotidnega zaporedja.

Največ raziskav je bilo narejenih na satRNA molekuli CMV. Ta satRNA je dolga 330 – 340 bp in ima 85 - 99 % podobnost v nukleotidnem zaporedju. Ne vsebuje ohranjenega odprtrega bralnega okvirja in do sedaj so odkrili, da ne kodira aktivnih proteinov *in vivo*, kar kaže na to, da na njen genom vplivajo drugačni seleksijski pritiski. Vsa nukleotidna zaporedja satRNA CMV se lahko zvijejo v stabilne sekundarne strukture, podobne tistim na 3' terminalnemu delu CMV genomske RNA in izgledajo kot t-RNA molekule. Razlike v nukleotidnem zaporedju med satRNA CMV kažejo na to, da je med evolucijo teh satRNA prihajalo do majhnih substitucij, delecij in insercij. Študije dvajsetih satRNA, izoliranih iz okuženega polja iz Španije so pokazale na to, da nastajajo razlike zaradi kopičenja mutacij že med eno evolucijsko linijo (Kurath in Robaglia, 1995).

V študiji nukleotidnega zaporedja satRNA SLRV so Kreiah in sod. (1993) primerjali nukleotidno in aminokislinsko zaporednje med velikimi satRNA: satRNA SLRV in satRNA TBRV, ArMV-L, GFLV in ChYMV, ki so jih dobili iz prejšnjih študij. Primerjave niso pokazale značilnih podobnosti v nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju.

Latvala - Kilby in sod. (2000) so z metodo RT-PCR detektirali prisotnost velike satRNA pri virusu atavizma črnega ribeza (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) in določili njegovo nukleotidno zaporedje. Nato pa so primerjali nukleotidna in aminokislinska zaporedja satRNA BRV z ostalimi nepovirusnimi satRNA. Ugotovili so 63 % podobnost v nukleotidnem zaporedju in 45 % podobnost v aminokislinskem zaporedju med velikima satRNA; BRV in ChYMV in ohranjenost 5' delov nukleotidnega zaporedja satRNA BRV, tako kot je znano pri ostalih nepovirusnih velikih satRNA.

Za določitev prisotnosti velikih satRNA in določitev genetske raznolikosti izolatov ArMV različnega geografskega izvora in iz različnih naravnih gostiteljskih rastlin iz jugozahodne Nemčije so Wetzel in sod. (2006) razvili metodo RT-PCR-delno kartiranje z restrikcijskimi encimi (partial restriction enzymatic mapping, PREM). Velike satRNA ArMV iz šestih izolatov vinske trte so klonirali in jih sekvencirali. Dobljene satRNA so kazale 75 % podobnost v nukleotidnem zaporedju s satRNA ArMV iz španskega bezga. Z delno restrikcijo so ločili šest različnih tipov satRNA. Z metodo PREM so lahko ločili nukleotidna zaporedja, ki so kazala 96 % podobnost v nukleotidnem zaporedju.

4 MATERIAL IN METODE

4.1 VINOGRADI

4.1.1 Opis vinogradov

V raziskavo smo vključili trse različnih sort iz vinogradov na različnih lokacijah na Primorskem. Rastlinski material vinske trte (*Vitis vinifera L.*) smo nabirali v koleksijskem vinogradu v Ložah, seleksijskem vinogradu v Komnu, koleksijskem vinogradu v Malinkovcih, vinogradih v Dutovljah, Tomaju, v Ampelografskem vrtu v Kromberku, dveh vinogradih v Vrhopolju ter vinogradu v Krajni vasi.

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

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

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

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

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

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

4.1.2 Nabiranje rastlinskega materiala

Junija 2008 smo nabrali mlade poganjke vinske trte 17 različnih sort in iz 11 različnih vinogradov na Krasu in Vipavski dolini. V analizo je bilo vključenih 60 rastlin vinske trte, na katerih je bila predhodno s testom ELISA dokazana prisotnost virusa GFLV in odsotnost virusa ArMV.

Za izbor teh trsov smo se odločili na podlagi opazovanj bolezenskih znamenj od leta 2004 do leta 2008, ko so pri večini trsov opazili znamenja, ki jih pripisujejo okužbi z GFLV ter trse s testom ELISA tudi testirali na prisotnost GFLV in najpogostejše viruse vinske trte: ArMV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA in GVB (Vojvoda, 2005; Blas, 2006; neobjavljeni rezultati NIB).

4.2 ANALIZA VZORCEV

4.2.1 Določanje prisotnosti satelitske RNA

4.2.1.1 Homogenizacija rastlinskega materiala

V ekstrakcijske vrečke z membrano na sredini (Bioreba) smo zatehtali po 500 mg mladih listov posameznega vzorca ter v razmerju 1:10 (masa : teža) dodali ekstrakcijski pufer za vinsko trto (5,0 ml). Homogenizirali smo s pomočjo homogenizatorja (Homex Bioreba) ter homogenat prenesli v 2 ml mikrocentrifugirke. Vzorce smo do uporabe shranili na -80 °C.

4.2.1.2 Lovljenje virusov na protitelesa (immunocapture, IC)

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

Sestava karbonatnega pufra (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	35 mM

Pufer za spiranje (pH 7,4)

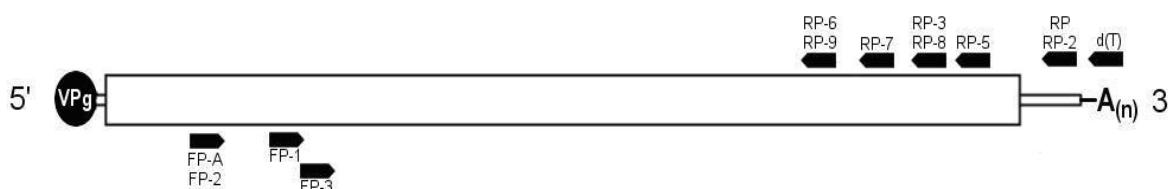
NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KCl	3 mM
Tween 20	0,05 %

4.2.1.3 Obratno prepisovanje (RT)

V 200 µl plastične mikrocenrifugirke smo dali 9 µl vzorca virusa GFLV, ki smo ga predhodno dobili z metodo IC. K 9 µl vzorca smo dodali 1 µl sterilne vode, 1 µl dNTP-jev (10 mM vsakega) in 1 µl oligo (dT)₂₁V (500 µg/ml). To reakcijsko mešanico smo zmešali s pipetiranjem in inkubirali 5 minut na 65 °C ter takoj ohladili na ledu za 2 minuti. Nato smo dodali 2 µl RNaznega inhibitorja (ABI) (20units/ µl), 4 µl 5X pufra in 2 µl 0,1 M DDT, zmešali s pipetiranjem in dali za 2 minuti na 42 °C. Na koncu smo dodali še 1 µl reverzne transkriptaze Superscript II (Invitrogene) in rahlo premešali (soft vortex) ter scentrifugirali, nato pa inkubirali 60 minut na 42 °C in takoj za tem mešanico dali za 15 minut na 70 °C. Tako dobljeno cDNA smo shranili v zmrzovalniku na – 20 °C.

4.2.1.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Začetni oligonukleotidi so bili izdelani tako, da smo pri pomnoževanju dobili čim večji del satRNA (slika 5). To smo naredili tako, da smo zaporedja začetnih oligonukleotidov iskali v ohranjenih regijah znanih nukleotidnih zaporedij (neobjavljeni rezultati NIB). Ohranjene regije smo določili iz poravnave znanih zaporedij med sabo, za kar smo uporabili računalniški program The Vector NTI Module (Infor Max). Pozorni smo morali biti na morebitna komplementarna zaporedja znotraj začetnih oligonukleotidov, saj bi lahko ta tvorila sekundarne strukture. Prav tako smo se morali izogibati komplementarnim regijam med začetnimi oligonukleotidi, kar bi povzročilo zlepjanje začetnih oligonukleotidov.



Slika: 5: Shematski prikaz naleganja začetnih oligonukleotidov na matrično satRNA molekulo med verižno reakcijo s polimerazo.

Naredili smo 12 začetnih oligonukleotidov, ki smo jih v kasnejših raziskavah uporabili v različnih kombinacijah (Preglednica1).

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi.

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje (5' – 3')	Položaj nukleotidov (nts) ^a
FP-A	TCGCATGCTTGyATTGTCGTG	122 - 142
FP1	ATGGGAGTAAAyAATGGGTCAAGG	202 - 225
FP2	CATGCTyGyATTGkCGTG	125 - 142
FP3	GTGGsCCCGCrAGTGT	237 - 252
RP	TAAwGAGCAACCAAAATCCCA	1086 - 1106
RP2	GAGCAACCAAAATCCArCTT	1082 - 1102
RP3	GyTGTCCACAArAGTGGGATC	933 - 953
RP5	CGCTGAGGAArACyGTC	980 - 997
RP6	TTTCwkCAGGrrCCCArAC	818 - 837
RP7	AGTGTCrCCACrTCGCA	876 - 892
RP8	TGTCCACrArAGTGGGrTC	933 - 951
RP9	TCwGCAGGAGCCCCrA	819 - 835

a... Pozicija začetnih oligonukleotidov glede na satRNA Francoskega izolata GFLV F13.

Degenerirani nukleotidi: Y = C ali T; W = A ali T; K = G ali T; S = G ali C; R = A ali G; V = A ali G ali C.

Za testiranje delovanja 32-ih kombinacij začetnih oligonukleotidov (Preglednica 2) smo izbrali dva vzorca (Ref DU 2/19 in Vol 2/47), katerima je bila prisotnost satRNA in njuno nukleotidno zaporedje že določeno. V nadaljevanju smo preizkusili vse kombinacije začetnih oligonukleotidov na 7 vzorcih (Vol 2/54, Ref 26 6/2, Ref 26 6/4, Ref 26 6/6, Ref 26 5/120, Ref 26 5/122, Ref DU 3/13.). S sedmimi pari začetnih oligonukleotidov (1, 2, 3, 24 26, 27, 30) smo uspeli dobiti fragment pri vseh 9 testiranih vzorcih. Izmed njih smo se za splošno določanje satRNA odločili za kombinacijo 26 (FP3/RP), ki je pomnoževala najdaljši segment satRNA GFLV. Z njo smo pretestirali prisotnost satRNA še v 53 vzorcih okuženih z GFLV.

Preglednica 2: Kombinacije vseh začetnih oligonukleotidov.

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

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 9,3 µl avtoklavirane vode, 4 µl 5X pufra Colorless Go Taq flexi, 1,20 µl MgCl₂, 0,4 µl dNTP-jev (10 mM vsakega), 0,1 µl polimeraze DNA Go Taq, 2 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 pmol/µl) in 1 µl cDNA (< 0,5 µg/50 µl). Vzorce smo inkubirali v aparaturi za PCR po naslednjem postopku:

94 °C	3 min
94 °C	30 s
54 °C	1 min
72 °C	2 min
	} 30 ciklov
72 °C	10 min

Do uporabe smo PCR produkte shranili v hladilnik na 4 °C.

Na 1,2 % agaroznem gelu s TAE pufrom smo preverili velikost pomnoženih fragmentov in prisotnost dobljenih PCR produktov. Elektroforeza je potekala 50 minut pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo iz fotografije gela ocenili količino DNA v posameznem vzorcu glede na lestvico z znanimi velikostmi in koncentracijami DNA (1kbp DNA Ladder, Promega). Čistost in koncentracijo satRNA v naših vzorcih smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop (Nano Drop Technologies Inc., USA). Po 1 µl vzorca smo nanesli na senzor spektrofotometra NanoDrop, ki nam je na ekranu izpisal količino DNA v vzorcu. Glede na izmerjeno koncentracijo smo preračunali, koliko produkta PCR je bilo potrebno uporabiti v nadaljnjih korakih.

4.2.1.5 Izolacija in čiščenje fragmentov iz gela

Ker so se z verižno reakcijo s polimerazo s kombinacijo začetni oligonukleotidov 26 (FP3/RP) poleg specifičnega fragmenta pomnožili še nespecifični fragmenti, smo produkte PCR nanesli na gel in specifične fragmente izrezali iz gela ter DNA očistili s kompletom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Rezine gela smo dali v predhodno stehtano sterilno mikrocentrifugirko in ponovno stehtali. Na vsakih 10 mg gela smo dodali 10 µl pufra za vezavo na membrano in inkubirali v termobloku 5 minut pri 60 °C. Ko se je rezina gela popolnoma stopila, smo vsebino mikrocentrifugirke prenesli na kolono nameščeno v mikrocentrifugirki in centrifugirali eno minuto pri 10000g. Nato smo dodali 750 µl pufra za spiranje, centrifugirali 1 minuto pri 10000 g, nanesli 500 µl pufra za spiranje in centrifugirali 5 minut pri 10000 g. Kolono smo prestavili v novo sterilno mikrocentrifugirko, dodali 35 µl sterilne vode in centrifugirali 1 minuto pri 10000 g.

4.2.2 RFLP z restriktivnim encimom MboII

4.2.2.1 Poravnava nukleotidnega zaporedja z Align X programom

Osem znanih nukleotidnih zaporedij vzorcev (neobjavljeni rezultati NIB) smo vstavili v bazo podatkov programa za poravnavo nukleotidnih zaporedij Align X hkrati z začetnimi oligonukleotidi FP3. Nato smo vsako posamezno znano nukleotidno zaporedje vzorca poravnali z začetnim oligonukleotidom FP3. Označili smo nukleotidna zaporedja vzorcev, kjer se je začel FP3, do predzadnjega nukleotida na nukleotidnem zaporedju vzorca. Tako smo dobili skrajšano nukleotidno zaporedje.

4.2.2.2 Iskanje restriktivskih encimov z internetnim programom Restriction Mapper

Skrajšana nukleotidna zaporedja, ki smo jih dobili s programom za poravnavo nukleotidnih zaporedij Align X, smo vstavili v internetni program Restriction Mapper (<http://www.restrictionmapper.org/>). S tem programom smo dobili vse restriktivske encime, ki cepijo ta nukleotidna zaporedja. Nato smo restriktivske encime primerjali med različnimi vzorci in iskali take encime, ki cepijo čim bolj različno pri vsakem vzorcu, tako da bi lahko po cepitvi teh nukleotidnih zaporedij z izbranimi restriktivskimi encimi ločili čim več restriktivskih tipov. Iskali smo takšne encime, ki bi najbolj ločili med zanimimi nukleotidnimi zaporedji satRNA GFLV iz sedmih trsov sort Volovnik in Refošk. S pomočjo virtualne restrikcije s programom Restriction Mapper smo našli 4 primerne restriktivske encime (SmuI (FauI), TspGWI, MboII in EcoRII). Restriktivska encima TspGWI in EcoRII sta ločila le satRNA GFLV iz sorte Refošk od satRNA GFLV iz sorte Volovnik, restriktivski tipi satRNA iz sorte Volovnik pa so si bili kljub različnim nukleotidnim zaporedjem skoraj enaki in jih na gelu ne bi mogli ločiti zaradi premajhnih razlik v velikosti restriktivskih fragmentov. Odločili smo se za uporabo encima MboII.

4.2.2.3 Virtualni RFLP

Ker program Vektor NTI v bazi podatkov ni imel restriktivskega encima MboII, smo izvedli virtualni RFLP ročno. Uporabili smo nukleotidna zaporedja dolga 863 bp. Mesta, na katerih je restriktivski encim cepil nukleotidno zaporedje našega vzorca smo vnesli v program Vektor NTI ter nato preračunali dolžine nukleotidnih zaporedij, ki so nastale po cepitvi. Na koncu smo si izrisali, kako bi izgledal gel po restrikciji.

4.2.2.4 Cepitev DNA z encimom MboII (Fermentas)

Nukleotidna zaporedja naših vzorcev smo cepili z encimom MboII. Encim MboII je restriktijska endonukleaza, ki prepozna tarčno zaporedjo dolgo pet baznih parov in cepi znotraj zaporedja GAAGA.

Iz koncentracije očiščenega PCR produkta izmerjene s spektrofotometrom Nano Drop smo preračunali, koliko produkta PCR ($0,2 \mu\text{g}$) je bilo potrebno dodati v restriktijsko mešanico in koliko μl sterilne vode je bilo potrebno dodati, da smo dobili na koncu $30 \mu\text{l}$ reakcijo.

Sestava restriktijske mešanice za restrikcijo (Fermentas):

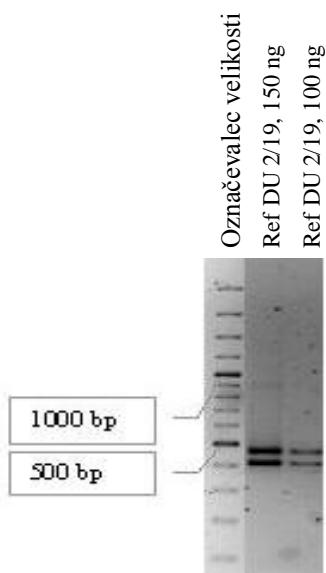
Sterilna voda	17,0 μl
10X pufer Fast Digest (Fermentas)	2,0 μl
PCR produkt ($0,2 \mu\text{g}$) (Fermentas)	10,0 μl
Encim MboII Fast Digest (Fermentas)	1,0 μl

Restriktijsko mešanico smo na rahlo zmešali in inkubirali v aparaturi za PCR eno uro pri 37°C za razrez DNA, nato pa še pet minut pri 65°C za inaktivacijo encima.

Po restrikciji smo vzorce nanesli na 2 % agarozni gel v TAE pufru. Elektroforeza je potekala dve uri pri 120 V. Med potekom restrikcije smo gel hladili. Gel smo naknadno obarvali v raztopini s Syber Safe ali etidijevim bromidom, ki smo jo naredili tako, da smo zmešali 300 ml 1 x TAE pufra in 40 μl barvila Syber Safe ali etidijevega bromida.

4.2.2.5 Optimizacija cepitve DNA z encimom MboII (Fermentas)

Za optimizacijo cepitve z encimom MboII smo preizkusili manjše koncentracije vzorca. Namesto $0,2 \mu\text{g}$ produkta PCR smo poizkusili narediti restrikcijo z $0,15 \mu\text{g}$ in $0,1 \mu\text{g}$ produkta PCR. Ptek restrikcije in inaktivacija encima sta ostala enaka. Ugotovili smo, da je že koncentracija $0,1 \mu\text{g}$ dovolj, da jo opazimo na gelu (slika 6). Odločili smo se za slednjo koncentracijo, da ne bi pri prevelikih koncentracijah ostajal produkt nerazrezan.



Slika 6: Fotografija elektroforetskega gela po cepitvi satRNA z encimom MboII v koncentraciji 150 ng in 100 ng v restrikcijski mešanici.

4.2.2.6 Obdelava podatkov z računalniškim programom Bionumerics in določanje števila restrikcijskih tipov

V računalniški program Bionumerics smo vnesli podatke o vzorcih, na katerih smo naredili virtualni RFLP. Nato smo v program vnesli še slike gelov, pridobljene z metodo RFLP. Program nam je podal oceno dolžin restrikcijskih fragmentov v primerjavi z lestvico fragmentov znanih dolžin (100 bp DNA Ladder, Promega). Program je samodejno poiskal proge, v katere smo nanesli vzorce DNA, in fragmente, ki so se po elektroforezi ločili med seboj. V rubriko za lestvico velikosti smo vnesli dolžine posameznih fragmentov naše lestvice, program je nato pripisal ustrezno vrednost k ustreznemu fragmentu lestvice. S primerjavo oddaljenosti fragmentov lestvice in oddaljenosti fragmentov vzorca od mesta nanašanja, je program določil dolžine dobljenih restrikcijskih fragmentov. V primerih, ko DNA med elektroforezo ni potovala na vseh progah enako hitro, nam je program omogočil normalizacijo. Označili smo fragmente, za katere smo vedeli, da imajo enako molekulsko maso, program jih je nato povezal z izravnalno krivuljo in upošteval zamik, ki je nastal zaradi neenakomernega potovanja fragmentov po gelu. Tako smo določili restrikcijske tipe.

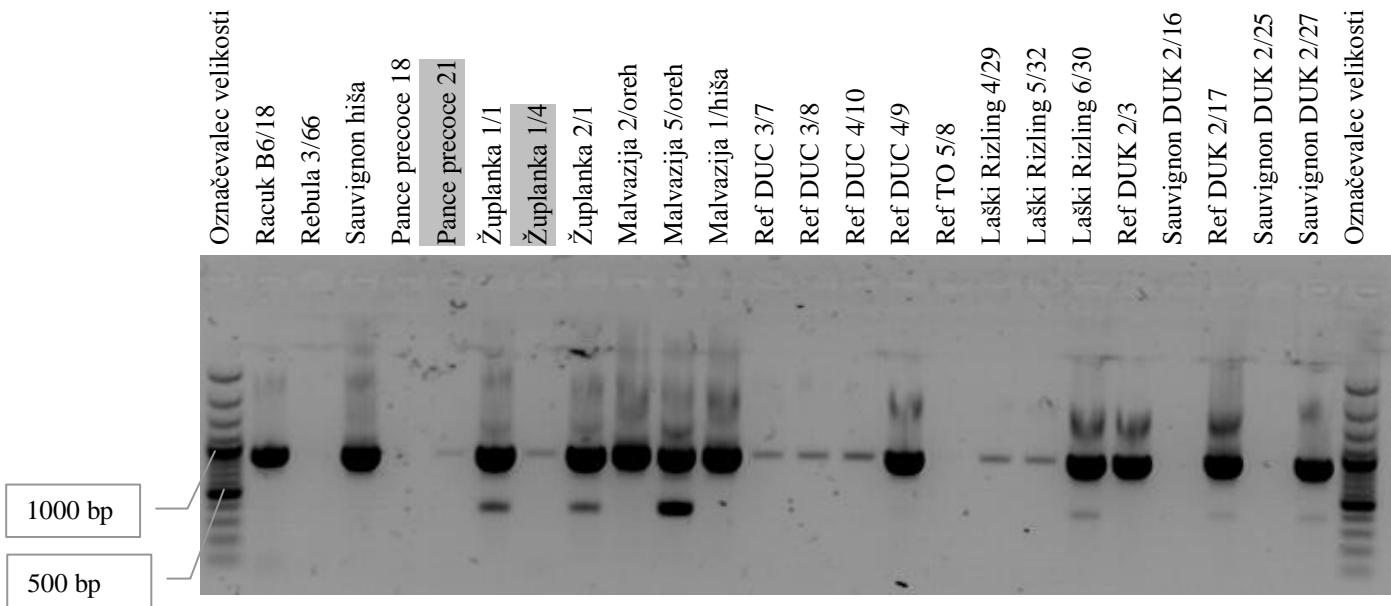
4.2.2.7 Iskanje povezave med bolezenskimi znamenji in prisotnostjo/odsotnostjo satRNA ter iskanje povezave med bolezenskimi znamenji in različnimi restrikcijskimi tipi

Za testiranje hipoteze ali bomo našli povezavo med bolezenskimi znamenji in prisotnostjo/odsotnostjo satRNA smo uporabili statistični program R in metodo hi-kvadrat.

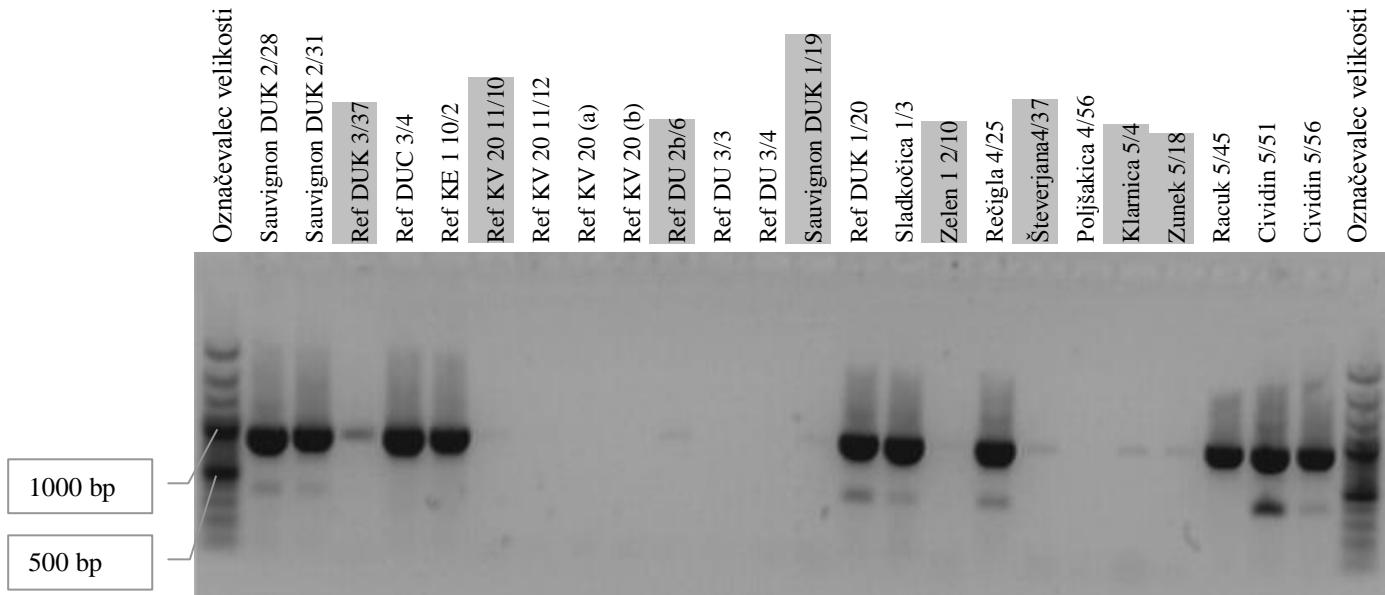
5 REZULTATI

5.1 DOLOČANJE PRISOTNOSTI MOLEKULE satRNA

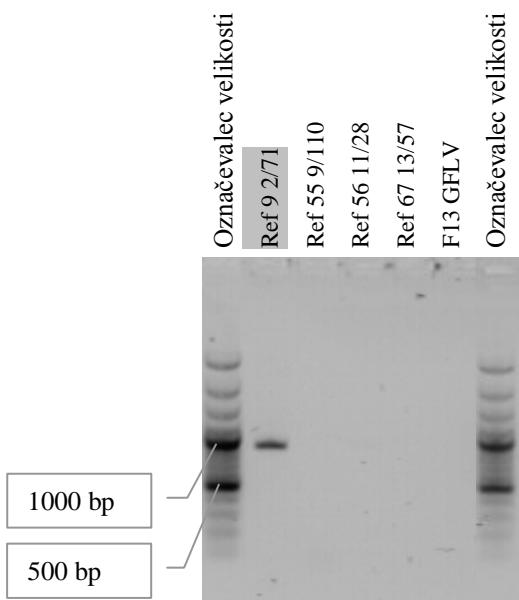
Z metodami IC-RT-PCR in uporabo začetnih oligonukleotidov FP3/RP smo uspešno pomnožili satRNA GFLV v 45 od skupno 60 vzorcev v katerih je bilo predhodno s testom ELISA dokazana prisotnost GFLV, torej v 75 % (slika 10). Dobili smo fragmente dolge 863 bp.



Slika 7: Elektroforetski gel. Ugotavljanje prisotnosti satRNA s kombinacijo začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP). S sivo označenimi vzorci smo ponovili gelsko elektroforezo.

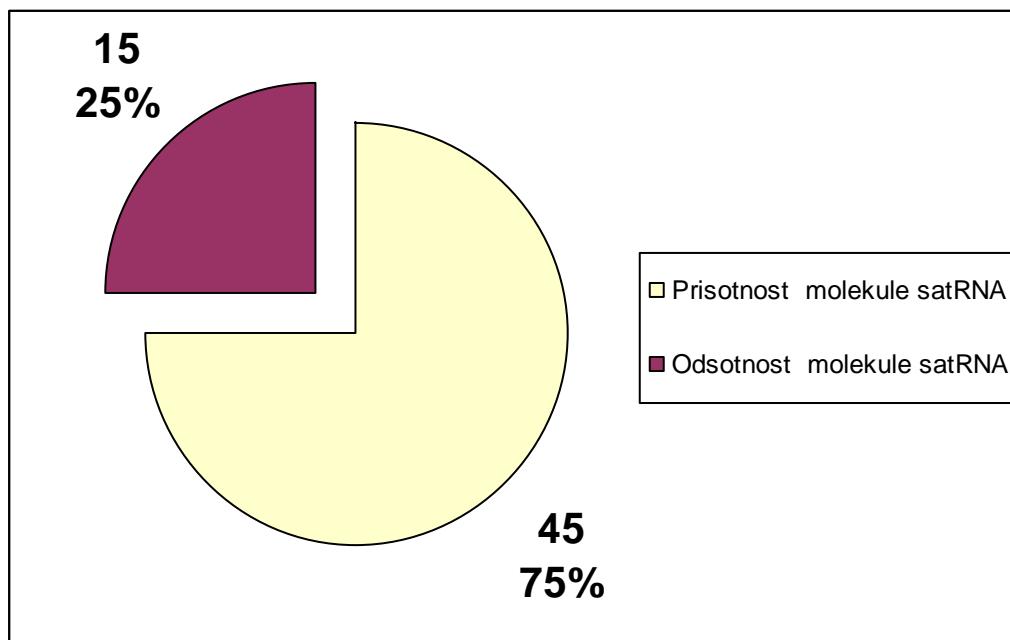


Slika 8: Elektroforetski gel. Ugotavljanje prisotnosti satRNA s kombinacijo začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP). S sivo označenimi vzorci smo ponovili gelsko elektroforezo.



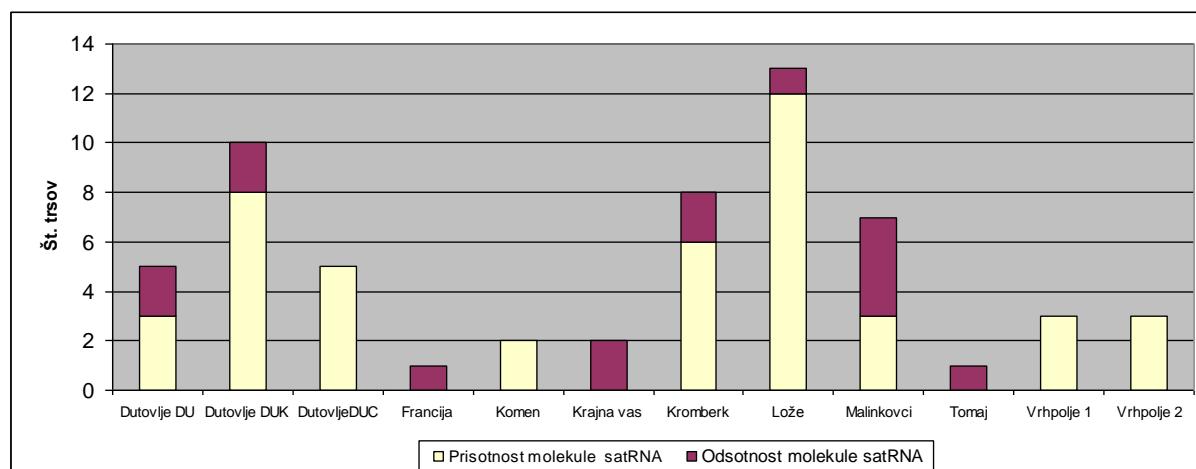
Slika 9: Elektroforetski gel. Ugotavljanje prisotnosti satRNA s kombinacijo začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP). S sivo označenimi vzorci smo ponovili gelsko elektroforezo.

Za 11 vzorcev s šibkimi lisami (označeni s sivo) smo gelsko elektroforezo ponovili in potrdili, da so res vsebovali satRNA virusa GFLV (slika 7, 8 in 9).



Slika 10: Grafični prikaz prisotnosti satRNA virusa GFLV v 60-ih vzorcih različnih sort iz različnih geografskih lokacij na Krasu in Vipavski dolini.

Med 5 vzorci, ki smo jih nabrali v vinogradu Dutovlje DU smo satRNA GFLV dokazali v 3 vzorcih, poleg tega pa v 8 od 10 vzorcev iz Dutovelj DUK, v vseh vzorcih iz Dutovelj DUC, v obeh vzorcih iz Komna, v 6 od 8 vzorcev iz Kromberka, v 12 od 13 vzorcev iz Lož, v 3 od 7 vzorcev iz Malinkovcev, v vseh treh vzorcih iz Vrhopolja 1 in vseh treh vzorcih iz Vrhopolja 2. V 1 vzorcu iz Francije, 2 vzorcih iz Krajne vasi in 1 vzorcu iz Tomaja prisotnost satRNA GFLV nismo potrdili (slika 11).



Slika 11: Grafični prikaz prisotnosti satRNA virusa GFLV na različnih geografskih vinogradniških lokacijah na Krasu in Vipavski dolini.

5.2 RFLP Z RESTRIKCIJSKIM ENCIMOM MboII

Po cepitvi satRNA GFLV z restriktijskim encimom MboII smo dobili 5 različnih restriktijskih tipov. Zaradi večje preglednosti rezultatov smo restriktijske tipe označili z zaporednimi črkami od A do E (slika 12).

Shematski prikaz restrikcijskih tipov po cepitvi z MboII

Restrikcijski tip A – nerazrezano

863

Restrikcijski tip B - nerazrezano

875

Restrikcijski tip C

527

527	348
-----	-----

Restrikcijski tip D

660

660	215
-----	-----

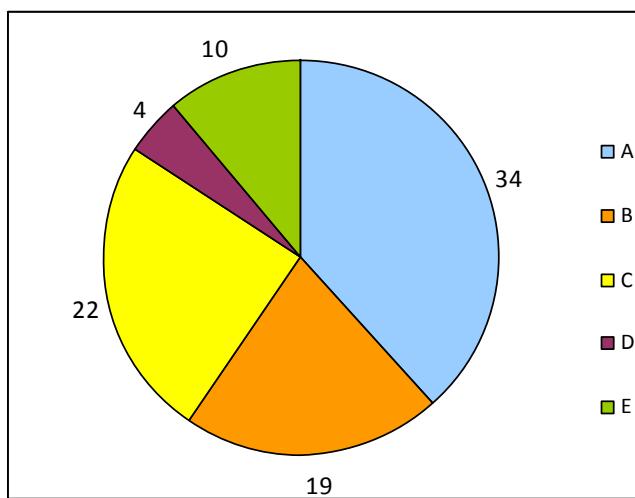
Restrikcijski tip E

456

456	407
-----	-----

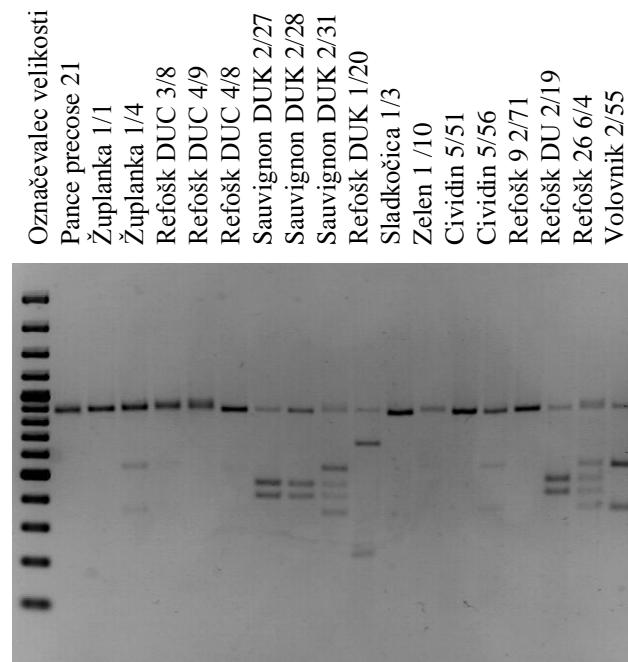
Slika 12: Shematski prikaz restrikcijskih tipov po cepitvi molekule satRNA GFLV z encimom MboII. Leva stran sheme ustreza 5' koncu, desna pa 3' koncu pomožnega fragmenta, ki vsebuje zapis satRNA GFLV. Z obebeljenimi številkami so označena restrikcijska mesta, izražena s številom baznih parov, ki ločijo restrikcijsko mesto od 5' konca pomožnega fragmenta. Številke znova okvirja označujejo velikost fragmentov izraženo v baznih parih (bp).

Po cepitvi satRNA GFLV z restrikcijskim encimom MboII je 16 od 45 (36 %) vzorcev vsebovalo en sam restrikcijski tip, ki ga MboII ni cepil, in sicer restrikcijski tip A smo dokazali v 9 od 45 (20 %) vzorcih ter restrikcijski tip B, ki smo ga dokazali v 7 od 45 (16 %) vzorcih (slika 12). Pri ostalih 29 od 45 (64 %) vzorcih smo po cepitvi dobili bolj kompleksne restrikcijske vzorce, pri katerih je bil seštevek velikosti fragmentov večji od velikosti nerazrezanega fragmenta satRNA GFLV. Iz tega smo sklepali, da je bilo v teh vzorcih prisotnih več različnih restrikcijskih tipov, ki so pripadali različnim genotipskim različicam molekule satRNA virusa GFLV. Šestnajst vzorcev je vsebovalo po 2 restrikcijska tipa, 11 vzorcev po 3 restrikcijske tipe in 2 vzorca po 4 restrikcijske tipe. Najpogosteje sta se pojavljala restrikcijska tipa A in C, sledili pa so jima restrikcijski tipi B, E in D (slika 13).

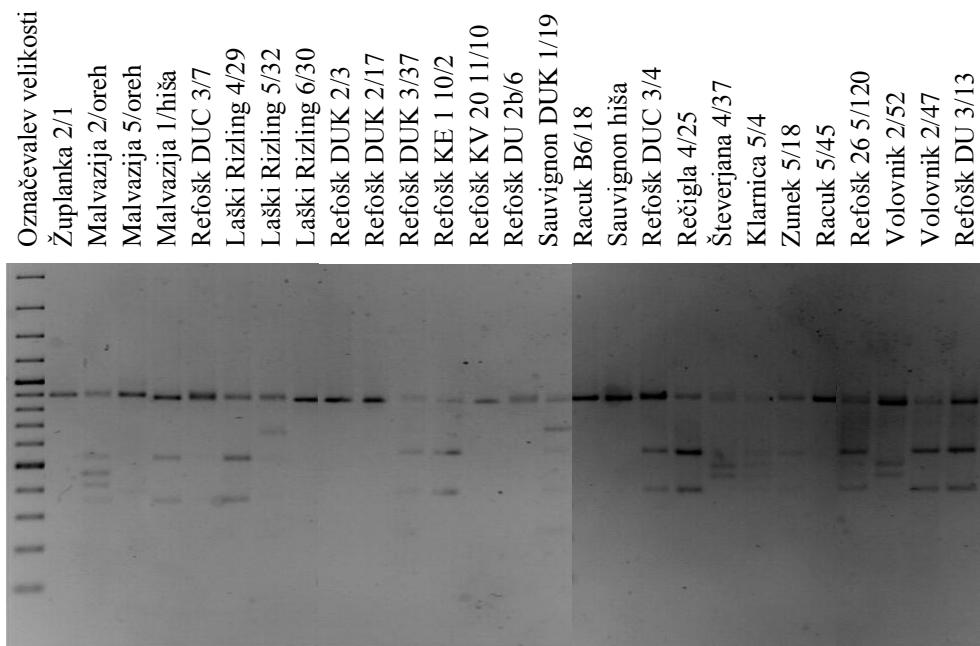


Slika 13: Grafični prikaz pogostosti posameznih restriktivnih tipov pri cepitvi satRNA GFLV z encimom MboII.

Po cepitvi satRNA GFLV z restriktivnim encimom MboII smo na elektroforetskem gelu razlikovali restriktivne fragmente (slika 14 in 15).



Slika 14: Fotografija elektroforetskega gela po rezanju molekule satRNA GFLV z encimom MboII.



Slika 15: Fotografija elektroforetskega gela po cepitvi molekule satRNA GFLV z encimom MboII.

Pri cepitvi z restrikcijskim encimom MboII smo dobili restrikcijske fragmente dolžine 875, 863, 660, 527, 456, 407, 348 in 215 bp (Preglednica 3).

Preglednica 3: Velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi satRNA pri vzorcih iz različnih lokacij po cepitvi z encimom MboII.

Lokacija	Vzorec	Restrikcijski fragmenti - MboII (bp)	Restrikcijski tip - MboII
Dutovlje 1	Refošk DU 2/19	863, 456, 407	A, E
	Refošk DU 2b/6	863	A
	Refošk DU 3/13	863, 527, 348	A, C
	Refošk DU 3/3	/	/
	Refošk DU 3/4	/	/
Dutovlje 2	Refošk DUC 3/4	875, 863, 527, 348	A, B, C
	Refošk DUC 3/7	875, 863, 527, 348	A, B, C
	Refošk DUC 3/8	875, 863, 527, 348	A, B, C
	Refošk DUC 4/9	863, 527, 348	A, C
	Refošk DUC 4/10	875	B
Dutovlje 3	Refošk DUK 1/20	863, 660, 215	A, D
	Refošk DUK 2/17	875, 863	A, B
	Refošk DUK 2/3	875	B
	Refošk DUK 3/37	863, 660, 527, 348, 215	A, C, D
	Sauvignon DUK 1/19	863, 660, 527, 348, 215	A, C, D
	Sauvignon DUK 2/27	863, 456, 407	A, E
	Sauvignon DUK 2/28	863, 456, 407	A, E
	Sauvignon DUK 2/31	863, 527, 456, 407, 348	A, C, E
	Sauvignon DUK 2/16	/	/
	Sauvignon DUK 2/25	/	/
Francija	F13	/	/
Komen	Refošk 26 5/120	875, 863, 527, 456, 407, 348	A, B, C, E
	Refošk 26 6/4	875, 863, 527, 456, 407, 348	A, B, C, E
Krajna vas	Refošk KV 20 (a)	/	/
	Refošk KV 20 (b)	/	/
Kromberk	Malvazija 1/hiša	863, 527, 348	A, C
	Malvazija 2/oreh	875, 527, 456, 407, 348	B, C, E
	Malvazija 5/oreh	875	B
	Pance precoce 21	863	A
	Racuk B6/18	875	B
	Sauvignon hiša	875	B
	Pance precoce 18	/	/
	Rebula 3/66	/	/
Lože	Cividin 5/51	863	A
	Cividin 5/56	863, 527, 348	A, C
	Klarnica 5/4	863, 527, 456, 407, 348	A, C, E
	Racuk 5/45	875	B
	Rečigla 4/25	875, 527, 348	B, C
	Sladkočica 1/3	863	A
	Števerjana 4/37	875, 863, 456, 407	A, B, E
	Volovnik 2/47	863, 527, 348	A, C
	Volovnik 2/52	875, 863, 456, 407	A, B, E
	Volovnik 2/55	863, 527, 348	A, C

Oznaka / pomeni, da v vzorcu nismo določili molekule satRNA.

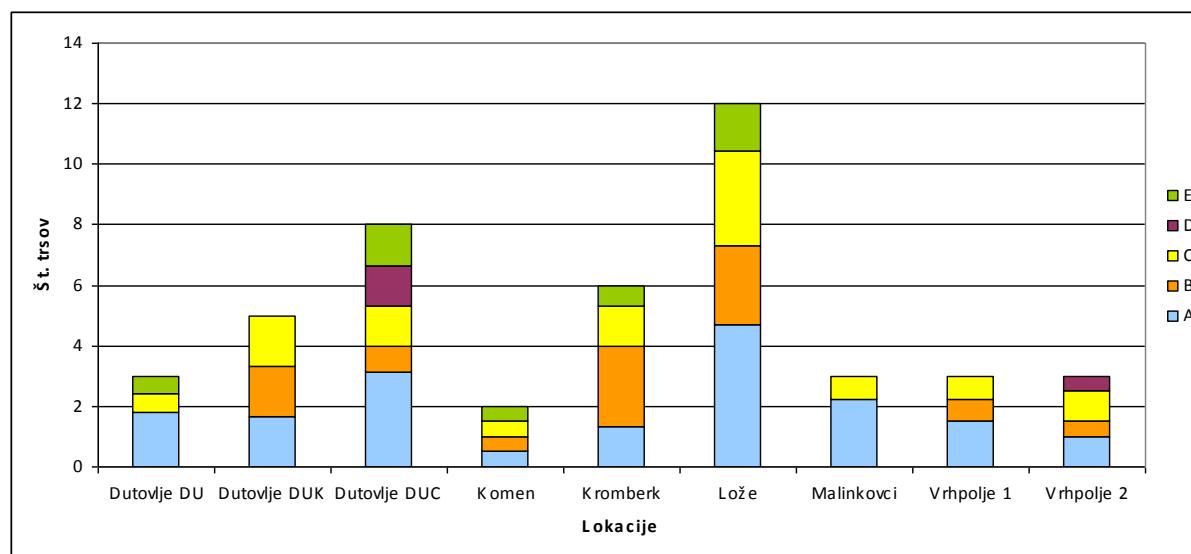
(se nadaljuje)

Preglednica 3 (nadaljevanje): Velikosti restriktijskih fragmentov in restriktijski tipi satRNA pri vzorcih iz različnih lokacij po cepitvi z encimom MboII.

Lokacija	Vzorec	Restriktijski fragmenti - MboII (bp)	Restriktijski tip - MboII
Lože	Zelen 1 2/10	863	A
	Zunek 5/18	875, 527, 348	B, C
	Poljšakica 4/56	/	/
Malinkovci	Refošk 9 2/71	863	A
	Refošk KE 1 10/2	863, 527, 348	A, C
	Refošk KV 20 11/10	863	A
	Refošk 55 9/110	/	/
	Refošk 56 11/28	/	/
	Refošk 67 13/57	/	/
	Refošk KV 20 11/12	/	/
Tomaj	Refošk TO 5/8	/	/
Vrhpolje 1	Župlanka 1/1	863	A
	Župlanka 1/4	875, 527, 348	B, C
	Župlanka 2/1	863	A
Vrhpolje 2	Laški Rizling 4/29	863, 527, 348	A, C
	Laški Rizling 5/32	875, 863, 660, 527, 348, 215	A, C, D
	Laški Rizling 6/30	875	B

Oznaka / pomeni, da v vzorcu nismo določili satRNA.

Ugotovili smo, da se restriktijska tipa A in C pojavljata na vseh devetih lokacijah kjer smo določili satRNA, restriktijski tip B na sedmih lokacijah, restriktijski tip E na petih lokacijah in restriktijskih tip D le na dveh lokacijah (slika 16).



Slika 16: Grafični prikaz porazdelitve in pogostosti pojavljanja posameznih restriktijskih tipov satRNA GFLV pri cepitvi z MboII na različnih vinogradniških lokacijah na Krasu.

5.2.1 Pogostost pojavljanja restrikcijskih tipov na različnih lokacijah

V vzorcih iz vinograda v Dutovljah DU smo pri rezanju satRNA GFLV z MboII zaznali 3 različne restrikcijske tipe: A, C in E. Restrikcijski tip A je bil prisoten v vseh testiranih trsih. Trs je poleg restrikcijskega tipa A vseboval še restrikcijski tip C, drugi pa restrikcijski tip E (slika 14). Pri molekuli satRNA GFLV so v predhodnih raziskavah na Refošk DU 2/19 in Refošk DU 3/13 pri cepitvi z restrikcijskima encimoma StyI in EcoRI zaznali po en sam restrikcijski tip. Pri opažanju bolezenskih znamenj smo opazili, da so se močna bolezenska znamenja na listih in na steblu izključevala, saj so trsi z opisanimi močnimi bolezenskimi znamenji na steblu kazali le šibka znamenja na listih ali jih sploh niso kazali, trsi s šibkimi bolezenskimi znamenji ali brez bolezenskih znamenj na steblu pa so kazali šibko ali močno rumenenje. Trsi, pri katerih je bila prisotna satRNA, so imeli različne restrikcijske tipe in različno izražena bolezenska znamenja. Vzorci s satRNA GFLV niso kazali bolj ali manj izrazitih bolezenskih znamenj od tistih, kjer satRNA GFLV nismo zaznali (Priloga A).

V vzorcih iz vinograda Dutovlje DUK smo zaznali 3 različne restrikcijske tipe: A, B in C. Trije od 5 testiranih trsov so vsebovali po 3 restrikcijske tipe, 1 od 5 po 2 restrikcijska tipa in 1 od 5 le 1 restrikcijski tip (slika 14). Na enemu testiranemu trsu so v predhodnih raziskavah RFLP na genu 2A in 2B z restrikcijskimi encimi StyI in EcoRI zaznali le po en restrikcijski tip (Priloga A). Trije testirani trsi, ki so imeli enake restrikcijske tipe so kazali različna bolezenska znamenja, pri enem pa ni bilo prisotnih bolezenskih znamenj, čeprav smo satRNA GFLV dokazali. Tudi tukaj so se izključevala močna bolezenska znamenja na steblu in listih (Priloga A).

V testiranih trsih iz Dutovlja DUC smo našli vse restrikcijske tipe: A, B, C, D in E. Štirje vzorci so vsebovali po 2 restrikcijska tipa, 3 vzorci po 3 restrikcijske tipe in 1 vzorec le 1 restrikcijski tip (slika 14). Podatkov iz prejšnjih raziskav o restrikcijskih tipih na genih 2A, 2B in 2C nimamo. V tem vinogradu so imeli trsi sorte refošk bolj izraženo rumenenje, medtem ko so imeli trsi sorte sauvignon iz tega vinograda močno izražena bolezenska znamenja na steblu, tudi tista dva trsa, pri katerih satRNA molekule nismo dokazali. Dva trsa iste sorte sta imela enaka restrikcijska tipa a drugačna bolezenska znamenja. Tudi dva trsa različnih sort sta imela enaka restrikcijska tipa, a sta kazala različna bolezenska znamenja (Priloga A).

V obeh testiranih trsih iz Komna smo zaznali 4 enake restrikcijske tipe: A, B, C in E (slika 14). Na obeh testiranih trsih v predhodnih raziskavah RFLP so na genu 2A in 2B z restrikcijskima encimoma StyI in EcoRI zaznali le po en restrikcijski tip, ki je bil pri obeh trsih enak (Priloga A). Trsa iz tega vinograda sta imela enake restrikcijske tipe in zelo podobna bolezenska znamenja, in sicer oba nista kazala bolezenskih znamenj na listih, sta pa kazala šibka bolezenska znamenja na steblu (Priloga A).

Čeprav pri obeh testiranih trsih v Krajni vasi (Ref KV 20 (a) in Ref KV 20 (b)) nismo dokazali prisotnost satRNA molekule, sta trsa kazala močno izražena bolezenska znamenja na steblu, na listih pa ni bilo opaziti bolezenskih znamenj (Priloga A).

V testiranih trsih iz Kromberka smo našli 4 restriktijske tipe: A, B, C in E. Štirje vzorci so vsebovali 1 restriktijski tip, 1 vzorec 2 restriktijska tipa in 1 vzorec 3 restriktijske tipe (slika 14). Pri cepitvi gena 2A in 2B pa so v predhodnih raziskavah zaznali 1, 2 ali 4 restriktijske tipe (Priloga A). Trsi v Kromberku razen enega trsa niso kazali bolezenskih znamenj na listih, večina trsov pa je kazala močna bolezenska znamenja na steblu. Tudi trsa kjer satRNA nismo dokazali sta kazala bolezenska znamenja le na steblu (Priloga A).

V testiranih trsih iz vinograda v Ložah smo našli 4 restriktijske tipe: A, B, C in E (slika 14). Po cepitvi gena 2A in 2B z restriktijskima encimoma StyI in EcoRI so v predhodnih raziskavah zaznali od 1 do 5 različnih restriktijskih tipov, pri nekaterih vzorcih, kjer so rezali gen 2C z enakima restriktijskima encimoma pa 1, 2 ali 4 restriktijske tipe (Priloga A). Osem od 12 testiranih trsov s prisotno satRNA je izražalo močna bolezenska znamenja na steblu. Bolezenska znamenja na listih, ki se kažejo kot kloroze ali rumenenja smo opazili le pri dveh vzorcih s prisotno satRNA molekulo. Vzorca Sladkočica 1/3 in Zunek 5/18, pri katerih smo dokazali prisotnost satRNA GFLV nista kazala nobenih bolezenskih znamenj, vzorec brez dokazane satRNA (Poljšakica 4/56) pa je kazal šibka bolezenska znamenja na listih in steblu. Trije trsi različnih sort z restriktijskim tipom A so kazali povsem različna bolezenska znamenja, in sice: Cividin 5/51 je imel prisotna močna bolezenska znamenja na steblu, Sladkočica 1/3 je bila brez izraženih bolezenskih znamenj, Zelen 1 2/10 pa je imel močno izražena bolezenska znamenja na listih in na steblu. Trije trsi (eden sorte cividin in dva sorte volovnik), pri katerih smo našli restriktijska tipa A in C so kazali enaka bolezenska znamenja, in sicer 1 močna bolezenska znamenja na steblu. Vsi trije trsi sorte volovnik so kazali enaka bolezenska znamenja, dva trsa različnih sort z enakimi restriktijskimi tipi A, B in E pa sta kazala različna bolezenska znamenja (Priloga A).

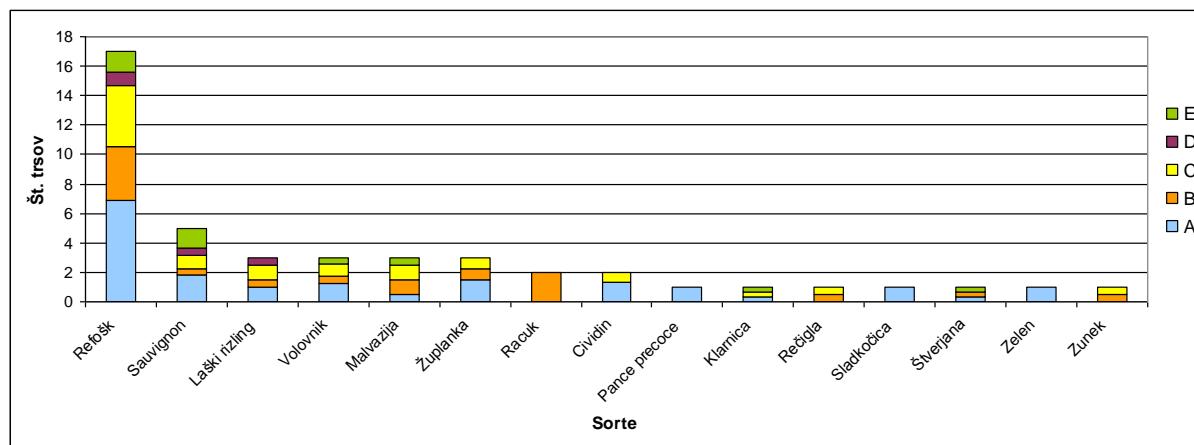
V testiranih vzorcih iz vinograda v Malinkovcih smo zaznali 2 restriktijska tipa: A in C. Dva testirana trsa sta imela po 1 restriktijski tip in 1 trs po 2 restriktijska tipa (slika 14). Po cepitvi z encimoma StyI in EcoRI pa so zaznali na genu 2A in 2B po 1, 2 ali 3 restriktijske tipe (Priloga A). Dva vzorca iste sorte, ki sta imela enak restriktijski tip sta kazala enaka bolezenska znamenja, ki so bila šibko izražena le na steblih. Vzorci, katerim satRNA molekule nismo dokazali so kazali bolezenska znamenja, in sicer močno ali šibko izražena na steblu, in le v enem primeru še šibko izražena na listih (Priloga A).

Pri le enem vzorcu iz vinograda v Tomaju, in sicer Refošk TO 5/8 satRNA molekule nismo dokazali, imel pa je ta trs prisotno rumenenje listov in kloroze žil (Priloga A).

V testiranih vzorcih iz vinograda v Vrhopolju 1 smo zaznali 3 restriktijske tipe: A, B in C. Dva testirana trsa sta vsebovala po 1 restriktijski tip in en trs po 2 restriktijska tipa (slika 14). Pri cepitvi genov 2A in 2B pa so v predhodnih raziskavah dobili 1, 2 ali 3 restriktijske tipe (Priloga A). Dva vzorca sta imela prisoten restriktijski tip A in močno izražena bolezenska znamenja na steblu, na listih pa je en trs imel šibko izražena bolezenska znamenja, drugi pa močno izražena (Priloga A).

V vzorcih iz vinograda v Vrhopolju 2 smo zaznali 4 restriktivne tipe: A, B, C in D. En testiran trs je vseboval po 1 restriktivnem tipu, 1 po 2 restriktivnih tipih in 1 po 3 restriktivnih tipih (slika 14). Pri cepitvi genov 2A in 2B z restriktivnimi encimoma StyI in EcoRI pa so v predhodnih raziskavah dobili 1, 2 ali 3 restriktivne tipe. Vsak trs je imel drugačen restriktivni tip, vsi pa so kazali šibka bolezenska znamenja na steblu, na listih pa sta dva trsa kazala rumenjenje, en trs pa le šibko izražena bolezenska znamenja na listih (Priloga A).

5.2.2 Pogostost pojavljanja restriktivnih tipov pri različnih sortah



Slika 17: Grafični prikaz in pogostosti pojavljanja posameznih restriktivnih tipov satRNA GFLV pri cepitvi z MboII pri različnih sortah.

Pri sortah refošk in sauvignon smo našli 5 restriktivnih tipov satRNA, pri čemer smo v posameznem trsu našli do 4 restriktivne tipe satRNA, pri sortah laški rizling, volovnik in malvazija smo našli 4 restriktivne tipe, pri sortah župlanka, klarnica in števerjana 3 restriktivne tipe, pri sortah cividin, rečigla, zunek 2 restriktivne tipe, pri sortah racug, pance precoce, sladkočici in zelen 1 restriktivni tip, pri sortah poljsakica in rebula pa satRNA nismo zaznali (slika 15).

5.2.3 Povezave med prisotnostjo/odsotnostjo satRNA in pojavljanjem bolezenskih znamenj na listih in steblu

S statistično metodo, hi-kvadrat test, smo ugotovili, da prisotnost/odsotnost molekule satRNA ne vpliva na pojavljanje bolezenskih znamenj na listih (χ^2 -test, $p=0,88$) in prav tako ne na steblu (χ^2 -test, $p=0,98$).

5.2.4 Povezave med restriktivnimi tipi in pojavljanjem bolezenskih znamenj na listih in steblu

Povezav med prisotnostjo posameznih restriktivnih tipov in pojavljanjem bolezenskih znamenj na listih in steblu nismo našli (χ^2 -test, $p>0,05$). Posamezni restriktivni tipi A (χ^2 -test, $p=0,58$), B (χ^2 -test, $p=0,33$), C (χ^2 -test, $p=0,57$), D (χ^2 -test, $p=0,029$) in E (χ^2 -test, $p=0,45$) ne vplivajo na pojavljanje bolezenskih znamenj na listih. Pri restriktivnemu tipu D je p-vrednost tako majhna

zaradi premajhnega vzorca, saj je bil ta restrikcijski tip prisoten le pri štirih trsih. Prav tako posamezni restrikcijski tipi A (χ^2 -test, $p=0,90$), B (χ^2 -test, $p=0,26$), C (χ^2 -test, $p=0,39$), D (χ^2 -test, $p=0,84$) in E (χ^2 -test, $p=0,31$) ne vplivajo na pojavljanje bolezenskih znamenj na steblu (Priloga B).

6 RAZPRAVA IN SKLEPI

6.1 RAZPRAVA

6.1.1 Določanje prisotnosti molekule satelitske RNA GFLV

Z metodami IC-RT-PCR in uporabo začetnih oligonukleotidov FP3/RP smo uspešno pomnožili satRNA GFLV v 45 od skupno 60 vzorcev, katerim je bila predhodno s testom ELISA dokazana prisotnost virusa GFLV, torej v 75 %. To je veliko več, kot so dokazali v predhodnih raziskavah Fuchs in sod. (1991a) s hibridizacijsko metodo s specifično sondou. Prisotnost satRNA so določili le pri enem od desetih izolatov GFLV iz različnih gostiteljskih rastlin in geografskega izvora in dveh od osmih izolatov ArMV . Tudi Saldarelli in sod. (1993) so na podoben način analizirali naravno prisotnost satRNA pri 34 GFLV izolatih iz Italije in Jordanije. Rezultati so pokazali, da se majhne molekule RNA z enako velikostjo in nukleotidnim zaporedjem, podobnim satRNA francoške genotipske različice virusa GFLV-F13, pojavlajo pri približno 15 % rastlin vinske trte (*Vitis vinifera* L.), naravno okuženih z GFLV. Z metodo RT-PCR, kot smo jo uporabili tudi v naših raziskavah, so Wetzel in sod. (2006) dokazali prisotnost velike satRNA ArMV le v 8 od 47 (17 %) izolatih ArMV iz vinske trte, španskega bezga in hmelja.

Verjetno je bil ključnega pomena za določitev satRNA GFLV v tako velikem deležu trsov (75 %) dovolj splošna metoda RT-PCR, ki je bila izbrana na podlagi preizkušanj številnih kombinacij začetnih oligonukleotidov (preizkusili smo 32 različnih kombinacij). Te smo najprej preizkusili na vzorcih z znanim nukleotidnim zaporedjem satRNA GFLV. Ker smo s kombinacijo začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP) dokazali prisotnost pri vseh izbranih testnih vzorcih, smo se odločili, da jo uporabimo za določanje prisotnosti satRNA GFLV v naših vzorcih.

Ker kljub velikemu številu določenih satRNA (45), le-ta ni stalno prisotna oziroma je nismo določili v vseh (60) z GFLV okuženih rastlinah, satRNA ni primerna za razvoj diagnostične metode za določanje virusa GFLV.

6.1.2 Genetska raznolikost molekule satelitske RNA GFLV

Z restrikcijskim encimom MboII smo pri molekuli satRNA GFLV v 45 vzorcih, ki so vsebovali satRNA GFLV, določili do pet restrikcijskih tipov, medtem ko so v predhodnih raziskavah Vojvoda in sod. 2005 pri cepitvi gena 2A genomske molekule RNA GFLV z encimom StyI v 88 vzorcih določili 14 restrikcijskih tipov, z encimom EcoRI pa 4 restrikcijske tipe in pri cepitvi gena 2B genomske molekule RNA GFLV z encimom StyI 8 restrikcijskih tipov, z encimom EcoRI pa 3 restrikcijske tipe. Blas in sod. 2006 pa so določili pri cepitvi gena 2C genomske molekule RNA GFLV z encimom StyI v 11 vzorcih 10 restrikcijskih tipov in z encimom EcoRI 2 restrikcijska tipa. Le trije vzorci so bili zajeti v vseh zgoraj omenjenih raziskavah, tako imamo le za tri vzorce podatke o raznolikosti vseh treh genov RNA2 in satRNA, pri katerih je bilo pri

genu 2C najdenih 5 restrikcijskih tipov pri cepitvi s StyI in 1 restrikcijski tip pri cepitvi z EcoRI, pri satRNA 4 restrikcijski tipi pri cepitvi z MboII, pri genu 2A 4 restrikcijski tipi pri cepitvi s StyI in 2 restrikcijska tipa pri cepitvi z EcoRI ter pri genu 2B le 1 restrikcijski tip pri cepitvi s StyI in 2 restrikcijska tipa pri cepitvi z EcoRI. Za 31 vzrocev pa so na voljo podatki o raznolikosti genov 2A, 2B in satRNA, pri katerih je bilo pri satRNA najdenih 5 restrikcijskih tipov pri cepitvi z MboII, pri genu 2A 13 restrikcijskih tipov pri cepitvi s StyI in 4 restrikcijski tipi pri cepitvi z EcoRI ter pri genu 2B 6 restrikcijskih tipov pri cepitvi s StyI in 3 restrikcijski tipi pri cepitvi z EcoRI (Priloga A).

Ker smo pri vseh vzorcih pri cepitvi satRNA z encimom MboII poleg drugih restrikcijskih tipov vedno dobili še nerazrezan produkt, ne vemo ali je bilo, kjub spektrofotometričnim meritvam količine PCR produkta, le-tega v restrikcijski mešanici preveč in ga restrikcijski encim ni mogel cepiti ali je restrikcijski tip brez restrikcijskih mest za encim MboII prisoten v vseh vzorcih.

Najpogosteji genetski spremembi pri RNA virusih sta mutacija (sprememba virusnega genetskega materiala) in rekombinacija (izmenjava genetskega materiala med dvema sorodnima virusoma ali genotipskima različicama istega virusa). Mutacije, kot so insercije, delecije ali zamenjave (substitucije) nukleotidov, so primarni vir raznolikosti (Jerman in Štern, 1999: 55). Zavedati se moramo, da z RFLP analizo pridobimo podatek o variabilnosti virusa na nukleotidnem nivoju, ne pa tudi o variabilnosti na aminokislinskem nivoju. Ta je lahko precej manjša, tako da se funkcija in zgradba proteinov ne spremenjata bistveno.

Virus GFLV ima teoretično velik potencial za genetsko raznolikost, saj okužuje vinsko trto, ki je trajnica in se lahko v rastlini obdrži dlje časa (Andret - Link in sod., 2004a). Vse to omogoča kopiranje mutacij in nastanek novih genotipskih različic. Posamezna rastlina lahko hkrati gosti večje število genotipskih različic istega virusa (Naraghi – Arani in sod., 2001; Vigne in sod., 2004b; Pompe - Novak in sod., 2005; Fattouch in sod., 2005; Pompe - Novak in sod., 2007). V zadnjih raziskavah so dokazali, da sta rekombinacija in selekcija pomembna evolucijska mehanizma genetske raznolikosti GFLV (Vigne in sod., 2008; Merkuria in sod., 2009; Oliver in sod., 2010).

Tako kot pri pomožnih virusih GFLV tudi pri satRNA GFLV nenehno nastajajo genotipske različice ali kvazivrste. Primerjave nukleotidnega zaporedja so pokazale, da so substitucije ene baze, insercije, delecije in rekombinacije pogosti mehanizmi genetskih sprememb med evolucijo satelitov. Seleksijski pritisk, ki vpliva na evolucijo satRNA, predstavljata gostiteljska rastlina, kjer poteka podvajanje, in pomožni virus, katerega mehanizme za podvajanje in prenos izkoriščajo tudi satRNA (Kurath in Robaglia, 1995; Astier in sod., 2007). Tako smo tudi v tej raziskavi dokazali prisotnost več (do 4) restrikcijskih tipov satRNA v isti rastlini.

6.1.3 Povezave med pojavljanjem molekule satRNA, restriktionskimi tipi in pojavljanjem bolezenskih znamenj

Jasnih povezav med restriktionskimi tipi satRNA in lokacijo ali sorto nismo našli, saj nam je to oteževalo premajhno in neenakomerno število vzorcev na preiskovanih lokacijah. Prav tako nismo našli povezav med restriktionskimi tipi satRNA in pojavljanjem bolezenskih znamenj, kar smo tudi statistično dokazali. Ugotovili smo, da so tudi trsi brez molekule satRNA GFLV kazali bolezenska znamenja značilna za GFLV, nekateri trsi s satRNA GFLV pa niso kazali značilnih bolezenskih znamenj (Priloga A1, Priloga A2). Sklepamo, da satRNA GFLV ne vpliva na izražanje bolezenskih znamenj, ki jih povzroča virus GFLV, torej ne obstaja povezava med prisotnostjo in odsotnostjo satRNA GFLV, genetsko raznolikostjo satRNA GFLV in pojavljanjem bolezenskih znamenj. Še vedno pa obstaja možnost, da v določenih rastlinah nismo zajeli različkov satRNA, ki se razlikujejo v nukleotidnem zaporednju, na katerega nalegajo naši začetni oligonukleotidi.

Naši rezultati se tako ne skladajo s predhodnimi raziskavami Fuchsa in sod. (1991b), ki so ugotavljeni vpliv satRNA GFLV F13 na izražanje bolezenskih znamenj. V svojih raziskavah so naredili klone cDNA satRNA in z njimi okužili izolate GFLV, ki prej niso vsebovale satRNA. Stopnjo pomnoževanja so ocenili z opazovanjem pojavljanja bolezenskih znamenj, testom ELISA in metodo hibridizacije. Ugotovili so, da je prisotnost satRNA v inokulumu zmanjšala vsebnost virusnih delcev v gostiteljski rastlini, zaradi česar so sklepali, da verjetno satRNA vpliva na patogenost pomožnega virusa.

Po drugi strani pa so do podobnih zaključkov kot v naši študiji prišli tudi drugi raziskovalci, ki niso potrdili vpliva satRNA na naravnega gostitelja in s tem na intenziteto bolezenskih znamenj povzročenih s strani virusa GFLV (Saldarelli in sod., 1993). Tudi Mayo in sod. (1982) so pri SLRV ugotovili, da izolati, ki vsebujejo satRNA SLRV ali so brez satRNA, ne kažejo razlik v bolezenskih znamenjih na testnih rastlinah. Liu in sod. (1991) so ugotovili, da je iz analiz nukleotidnega zaporedja težko sklepati kateri protein, ki ga kodira satRNA, naj bi bil odgovoren za izražanje bolezenskih znamenj na gostiteljski rastlini. Martelli in Savino (1990) sta predpostavila, da na izražanje bolezenskih znamenj vplivajo: virus sam, genotip gostitelja, večkratne okužbe z različnimi različki GFLV ter ostali virusi in okolje.

Do zdaj pa niso našli tudi nobene povezave med močjo izražanja bolezenskih znamenj in prisotnostjo rekombinacije na genomske RNA molekule virusa GFLV (Vigne in sod., 2004a, 2004b, 2005). Fattouch in sod. (2005a, 2005b) so v študiji raznolikosti izolatov GFLV iz Tunizije dokazali, da gen $2C^{CP}$ ne vpliva na izražanje bolezenskih znamenj. Našli niso nobene povezave med geografskim izvorom in bolezenskimi znamenji, niti med geografskim izvorom in raznolikostjo v nukleotidnem zaporedju ali med različnimi sortami in bolezenskimi znamenji. Predvideli so, da bi lahko na izražanje bolezenskih znamenj vplivale večkratne okužbe z različnimi genotipskimi različki virusa GFLV. Pompe Novak in sod. (2007) so ugotovili, da vinske trte okužene z rekombinantami GFLV v $2A^{HP}$ genu niso kazale različnih bolezenskih znamenj v primerjavi s tistimi, ki so bile okužene z nerekombinantnimi GFLV izolati. Najdena ni bila nobena povezva

med bolezenskimi znamenji pri sorti Volovnik in genetsko raznolikostjo ter pojavljanjem rekombinacij znotraj RNA2 GFLV. Predvidevali so, da so virusne determinante, ki povzročajo bolezenska znamenja, povezane z nekodirajočo regijo RNA2 in/ali RNA1. Liebenberg in sod. (2009) so dokazali, da ni povezave med raznolikostjo v nukleotidnem zaporedju gena 2C^{CP} GFLV in izražanjem bolezenskih znamenj ter prav tako ne med geografskim izvorom subpopulacij in izražanjem bolezenskih znamenj.

6.2 SKLEPI

Pri preizkušanju številnih kombinacij začetnih oligonukleotidov, ki so bili narejeni na ohranjenih regijah že znanih nukleotidnih zaporedij satRNA, smo ugotovili, da je kombinacija začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP) in metoda RT-PCR primerna za določanje molekule satRNA GFLV.

Prisotnost satRNA GFLV smo dokazali v 45 od 60 vzorcev v katerih je bilo predhodno s testom ELISA dokazana prisotnost GFLV (75 %), kar je veliko večji delež od 15 % vzorcev, kot so dokazali Saldarelli in sod. (1993) s hibridizacijsko metodo, ter 17 % vzorcev, kakršnega so dobili Wetzel in sod. (2006) z metodo RT-PCR.

Pri ocenjevanju genetske raznolikosti satRNA GFLV z analizo RFLP, smo uporabili restrikcijski encim MboII, ki nam je omogočil vpogled v raznolikost molekule satRNA GFLV. V enem trsu smo našli do 4 restrikcijske tipe molekule satRNA GFLV.

Ker je molekula satRNA GFLV zelo raznolika in ni stalno prisotna v trsih, ki kažejo bolezenska znamenja značilna za GFLV, ni primerna za diagnostiko.

Pri ocenjevanju vpliva satRNA GFLV na izražanje bolezenskih znamenj smo ugotovili, da ne glede na prisotnost ali odsotnost satRNA, z GFLV okuženi trsi kažejo primerljivo močna bolezenska znamenja. Zaradi tega lahko sklepamo, da satRNA GFLV ne vpliva na izražanje bolezenskih znamenj, ki jih povzroča virus GFLV.

POVZETEK

Na podlagi predhodnih raziskav smo izbrali 60 trsov različnih sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.) s popisanimi bolezenskimi znamenji iz 11 različnih vinogradniških lokacij na Krasu in Vipavski dolini, na katerih je bila predhodno s testom ELISA dokazana prisotnost virusa GFLV in odsotnost virusa ArMV.

V naši raziskavi smo želeli dobiti vpogled v prisotnost satRNA v z GFLV okuženih trsih iz vinorodne dežele Primorske (vinorodnih okolišev Vipavska dolina in Kras), za kar smo izbrali metodo RT-PCR. Ugotovili smo, da je kombinacija začetnih oligonukleotidov 26 (FP3/RP) in RT-PCR metoda primerna za določanje satRNA GFLV, saj smo prisotnost satRNA GFLV dokazali v 45 od 60 vzorcev (75 %), kar je veliko večji delež kot so ga v svojih vzorcih določili Saldarelli in sod. (1993) s hibridizacijsko metodo (15 %) ter Wetzel in sod. (2006) z metodo RT-PCR (17 %).

Na podlagi analiz raznolikosti molekule RNA2 je znano, da obstaja veliko število genotipskih različkov virusa GFLV, vendar do sedaj še niso naredili nobene raziskave na temo genetske raznolikosti molekule satRNA. Za oceno genetske raznolikosti satRNA GFLV z analizo RFLP, smo poiskali in uporabili najprimernejši restrikcijski encim (MboII), ki nam je omogočil enostavno interpretacijo podatkov in hkrati še vedno prikazal dovolj veliko raznolikost molekule satRNA GFLV. V enem trsu smo našli po več restrikcijskih tipov. Ker je molekula satRNA GFLV zelo raznolika in ni stalno prisotna v trsih, ki kažejo bolezenska znamenja značilna za GFLV, ni primerna za diagnostiko.

Želeli smo ugotoviti ali obstaja povezava med prisotnostjo in odsotnostjo satRNA GFLV in različnimi bolezenskimi znamenji, ki jih GFLV povzroča na listih (kloroze žil ter medžilnih prostorov v obliki rumenih pik, obročev ali lis in rumenenje listov) in na steblih (bifurkacije na členkih, medčlenkih, kratki medčlenki, nasproti ležeče oko, cik-cak rast, zraslost poganjkov, ploščata stebla, metlasta rast, manjši, gosti listi in grmast izgled trsa). Ugotovili nismo nobene povezave med močjo in raznolikostjo bolezenskih znamenj in prisotnostjo ali odsotnostjo satRNA. Tudi število prisotnih restrikcijskih tipov v določeni rastlini ni vplivalo na izražanje bolezenskih znamenj. Zaključimo lahko, da se je virus na genetskem oz. nukleotidnem nivoju z rekombinacijami in mutacijami precej spremjal, biološka raznolikost pa je ostala kljub temu podobna. Jasnih povezav med pojavljanjem restrikcijskih tipov in lokacijo ali sorte nismo našli.

7 VIRI

- Aaziz R., Tepfer M. 1999. Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *Journal of General Virology*, 80: 1339-1346
- Alejska M., Kurzynska - Kokorniak A., Broda M., Kierzek R., Figlerowicz M. 2001. How RNA viruses exchange their genetic material. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 2: 391-407
- Andret - Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi - Garaud C., Fuchs M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 3: 183-195
- Andret-Link P., Schmitt - Keichinger C., Demangeat G., Komar V., Fuchs M. 2004b. The specific transmission of grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320: 12-22
- Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C. in Lecog H. 2007. Subviral Pathogenic RNAs: Satellites and Viroides. V: Principles of Plant Virology. Genomes, Pathogenicity, Virus Ecology. Astier S., Albouy J., Maury Y. in Lecog H. (ur.). Science Publishers. USA:147-156
- Belin C., Schmitt C., Demangeat G., Komar V., Pinck L., Fuchs M. 2001. Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology*, 291: 161-171
- Belin C., Schmitt C., Gaire F., Walter B., Demangeat G., Pinck L. 1999. The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *Journal of General Virology*, 80: 1347-1356
- Blas M. 2006. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 104 str.
- Borja M., Rubio T., Scholthof H.B., Jackson A.O. 1999. Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 2: 153-162
- Bos L. 1999. Plant viruses, unique and intriguing pathogens-a textbook of plant virology. Backhuys Publishers, Leiden, 329-332
- Bovey R., Gartel W., Hewitt W.B., Martelli G.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like disease of grapevines. Colour atlas of symptoms. Lausanne, Editions Payot: 181 str.
- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillok E. T., Sit T. L. in Lommel S. A. 2001. The multifunctional capsid protein of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 39: 419-460
- Davies D. L. in Clark M. F. 1983. A satellite-like nucleic acid of arabic mosaic virus associated with hop nettlehead disease. *Annals of Applied Biology*, 103: 439-448
- Dodd S. M. in Robinson D. J. 1984. Nucleotide sequence homologies among RNA species of strains of Tomato black ring virus and other nepoviruses. *Journal of General Virology*, 65: 1731-1740
- Drake J. W., Charkeworth B., Charkeworth D., Crow J. F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148: 1667- 1686

- Drake J.W., Holland J.J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 13910- 13913
- Fattouch S., Acheche H, M'hirshi S., Marrakchi M. in Marzouki N. 2005a. Detection and characterization of two strains of Grapevine fanleaf nepovirus in Tunisia. OEPP/EPPO Bulletin. 35: 265-270
- Fattouch S., Acheche H, M'hirshi S., Meleouli L., Bejar S., Marrakchi M in Marzouki N. 2005b. RT-PCR-RFLP for genetic diversity analysis of Tunisian Grapevine fanleaf virus isolates in their natural host plants. Journal of Virological methods. 127: 126-132
- Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. 2005. Virus taxonomy. Clasification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Comittee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 1259 str.
- Fritsch, C in Mayo M. A., 1989. Satellites of plant viruses. V: Plant Viruses. Structure and replication. Mandahar, C. L. (ur.). CRC Press, Inc., Florida, 1, 289-321
- Fritsch C., Mayo M in Hemmer O. 1993. Properties of the satellite RNA of nepoviruses. Biochimie, 75: 561-567
- Fritsch C., Koenig I., Murant A. F., Raschke J. H. in Mayo M. A.1984. Comparisons among satellite RNA species from five isolates of Tomato black ring virus and one isolate of Myrobalan latent ringspot virus. Journal of General Virology, 65: 289-294
- Fuchs M., Pinck M., Serghini M.A., Ravelonandro M., Walter B., Pinck L. 1989. The nucleotide sequence of satellite RNA in Grapevine fanleaf virus, strain F13. Journal of General Virology, 70: 955-962
- Fuchs M., Pinck M., Etienne L., Pinck L. In Walter B. 1991a. Characterisation and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. Phytopathology, 81: 559-565
- Fuchs M., Pinck M., Serghini Ma., Pinck L., Walter B. 1991b. The satellite RNA associated with grapevine fanleaf virus strain F13. V: Proceedings of the 10th meeting of the international council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine ICVG. Rumbos I. C., Bovey R., Gonsalves D., Hewitt W. B. in Martelli G. P. (ur.). ORES publishing Ermon (GRC): 131-137
- Gaire F., Schmitt C., Stussi-Garaud C., Pinck L., Ritzenhaler C. 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. Virology, 264: 25-36
- Garcia - Arenal F., Fraile A., Malpica J. M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. International Microbiology, 6: 225-232
- Hans F., Fuchs M. in Pinck L. 1992. Replication of grapevine fanleaf virus satellite RNA transcripts in *Chenopodium quinoa* protoplasts. Journal of General Virology, 73: 2517-2523
- Hans F., Pinck M., Pinck L. 1993. Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf nepovirus (strain F13). Biochimie, 75: 597-603
- Hemmer O., Oncino C. in Fritsch C. 1993. Efficient replication of the *in vitro* transcripts from cloned cDNA of tomato black ring virus satellite RNA requires 48K satellite RNA-encoded protein. Virology 194: 800-806
- Hewitt W. B., Raski D. J. in Goheen A. C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. Phytopathology. 48: 586-595

- Hu C.-C., Hsu Y.-H. in Lin N.-S. 2009. Satellite RNAs and Satellite Viruses of Plants. *Viruses*, 1, 3: 1325-1350
- ICTVdB Management. 2006. 81.002.4.01. Large ssRNA satellites. V: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (ur.), Columbia University, New York, USA
- Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Zhang Y. P., Daubert S. D. in Rowhani A. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for Grapevine fanleaf virus. *Plant Disease*, 87: 1178-1182
- Jerman I., Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, Študentska založba: 129 str.
- Klarič M. 2004. Polimorfizem plaščnega proteina pri virusu pahljačaste deformiranosti lista vinske trte (GFLV). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 52 str.
- Kreiah S., Cooper J. I. in Strunk G. 1993. The nucleotide sequence of a satellite RNA associated with strawberry latent ringspot virus. *Journal of General Virology*, 74: 1163-1165
- Kurath G. in Robaglia C. 1995. Genetic variation and evolution of satellite viruses and satellite RNAs. V: *Molecular basis of virus evolution*. Gibbs A., Calisher, C. H., Garcia-Arenal, F. (ur.). Cambridge University Press: 385-403
- Kurstak E. 1981. *Handbook of plant virus infections comparative diagnosis*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier: 943 str.
- Lai M. M. C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews*, 56, 1: 61-79
- Lai M.M.C. 1995. Recombination and its evolutionary effects on viruses with RNA genomes. V: *Molecular basis of virus evolution*. Gibbs A., Calisher C.H., Garcia-Arenal F. (eds.) Cambridge, Cambridge University Press: 119-132
- Laporte C., Vetter G., Loudes A.M., Robinson D.G., Hillmer S., Stussi-Garaud C., Ritzenthaler C. 2003. Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, 15: 2058-2075
- Latvala-Kilby S., Lemmetty A. in Lehto K. 2000. Molecular characterisation of a satellite RNA associated with blackcurrant reversion nepovirus. *Archives of Virology* 145: 51-61
- Liebenberg A., Freeborongh M. J., Visser C. J., Bellstedt D. V. in Burger J. T. 2009. Genetic variability within the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. *Virus Research*. 142: 28-35
- Lin N. S in Hsu Y. H. 1994. A satellite RNA associated with bamboo mosaic potexvirus. *Virology* 202: 707-714
- Liu Y. Y., Hellen C. U. T., Cooper J. I., Bertioli D. J. Coates D. in Bauer G. 1990. The nucleotide sequence of a satellite RNA associated with arabis mosaic nepovirus. *Journal of General Virology*, 71: 1259-1263
- Liu Y. Y., Cooper J.I., Coates D. in Bauer G. 1991. Biologically active transcripts of a large satellite RNA from arabis mosaic nepovirus and the importance of 5' end sequence for its replication. *Journal of General Virology*, 72: 2867-2874

- Liu Y. Y in Cooper J I. 1003. The multiplication in plants of arabis mosaic virus satellite RNA requires the encoded protein. *Journal of General Virology*, 74: 1471-1474
- Maček J. 1986. Posebna fiopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Malpica J. M., Fraile A., Moreno I., Obies C. I., Drake J. W., Garcia – Arenal F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics*, 162: 1505- 1511
- Manfre A. J. in Simon A. E. 2008. Importance of coat protein and RNA silencing in satellite RNA/virus interactions. *Virology*, 379: 161-167
- Martelli G. P., Savino V. 1990. Fanleaf degeneration. V: Compendium Pearson R. C., Goheen A. C. 1998. Compendium of grape disease. 4th ed. St. Paul, The American Phytopathological Society Press: 48-49
- St. Paul, The American Phytopathological Society Press: 48-49
- Martelli G.P., Walter B., Pinck L. 2001. Descriptions of plant viruses. Grapevine fanleaf virus. Warwick, UK, Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385> (maj 2010): 15 str.
- Masuta C. 2002. Recombination in plant RNA viruses. V: Plant viruses as molecular pathogens. Khan J. A., Dijkstra J. (eds.). New York, Food Products Press: 203-224
- Mayo M. A., Barker H. In Robinson D. J. 1982. Satellite RNA in particles of Strawberry Latent Ringspot Virus. *Journal of General Virology*, 63: 417-423
- Merkuria, T. A., Gutha, L. R., Martin, R. R. in Naidu, R. A. 2009. Genome diversity and Intra- and Interspecies Recombination events in Grapevine fanleaf virus. *Phytopatology*, 99: 1394-1402
- Moya A., Elena S. F., Bracho A., Miralles R., Barrio E. 2000. The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13: 6967-6973
- Murant A. F., Mayo M. A., Harrison B. D. in Gold R. A. 1973. Evidence of two functional RNA species and a satellite RNA in Tomato black ring virus. *Journal of General Virology*, 19: 275-278
- Nagy P.D., Bujarski J.J. 1995. Efficient system of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: Sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. *Journal of Virology*, 69: 131-140
- Naraghi - Arani P., Daubert S., Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82: 1792-1795
- Oliver J. E., Vigne E. in Fuchs M. 2010. Genetic structure and molecular variability of grapevine fanleaf virus populations. *Virus Research*, doi:10.1016/j.virusres.2010.05.017
- Oncino C., Hemmer O. in Fritsch C. 1995. Specificity in the association of Tomato black ring virus satellite RNA with helper virus. *Virology*, 213: 87-96
- Pantaleo V in Burgyan J. 2008. Cymbidium ringspot virus harnesses RNA silencing to control the accumulation of virus parasite satellite RNA. *Journal of Virology*, 82: 11851-11858
- Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. Compendium of grape diseases. 4th ed. St.Paul, The American Phytopathological Society Press: 93 str.
- Pinck L., Fuchs M., Pinck M., Ravelonandro M., Walter B. 1988. A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. *Journal of General Virology*, 69: 233–239

- Pinck L., Reinbolt J., Loudes A.M., Le Ret M., Pinck L. 1991. Primary structure and location of the genome-linked protein (VPg) of grapevine fanleaf nepovirus. Federation of European Biochemical Societies, 284, 1: 117-119
- Pompe-Novak M., Korošec-Koruza Z., Tomažič I., Klarič M., Vojvoda J., Blas M., Ravnikar M., Fuchs M., Petrovič N. 2005. Biotična raznovrstnost virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Zbornik predavanj in referatov 7. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin: 239-243
- Pompe-Novak M., Guitierrez-Aguirre I., Vojvoda J., Blas M., Tomažič I., Vigne E., Fuchs M., Ravnikar M., Petrovič N. 2007. Genetic variability within RNA2 of Grapevine fanleaf virus. European Journal of Plant Pathology, 117:307-312
- Quacquarelli A., Gallitelli G., Savino V. in Martelli P. G. 1976. Properties of grapevine fanleaf virus. Journal of General Virology, 32: 349
- Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., Meredith C.P. 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. Plant Disease, 67: 335-339 Cit. po: Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. Journal of Plant Pathology, 86, 3: 183-195
- Ritzenthaler C. Laporte C., Gair F., Dunoyer P., Schmitt C., Duval S., Piequet A., Loundes A. M., Rohfritsch O., Stussi-Garaud C., Pfeiffer P. 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum- derived membranes. Journal of Virology, 76, 17: 8808-8819
- Ritzenthaler C., Schmit A.C., Michler P., Stussi-Garaud C., Pinck L. 1995. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules in vivo. Molecular Plant-Microbe Interactions. American Phytopatological Society, 8, 3: 379-387
- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M., Pinck L. 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. Journal of General Virology, 72: 2357-2356
- Roossinck, M. J., Sleat, D. in Palukaitis, P. 1992. Satellite RNAs of plant viruses: Structures and biological effects. Microbiological Reviews, 1, 265-279
- Saldarelli P., Minafra A. in Walter B. 1993. A survey of grapevine fanleaf nepovirus isolates for the presence of satellite RNA. Vitis, 32, 99-102
- Saldarelli P., Minafra A., Martelli G.P. in Walter B. 1994. Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus III by molecular hybridisation. Plant Pathology, 43: 91-96
- Sanfaçon H., Wellink J., Le Gall O., Karaser A., van der Vlugt in Wetzel T. 2009. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae* the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus Torradovirus. Archives of Virology, 154: 899-907
- Serghini M.A., Fuchs M., Pinck M., Reinbolt J., Walter B., Pinck L. 1990. RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. Journal of General Virology, 71: 1433-1441
- Szittya G., Silhavy D., Molnar A., Havelda Z., Lovas A., Lakatos L., Banfalvi Z. in Burgyan J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. The EMBO Journal, 22: 633-640

- Tomažič I. 1999. Določanje virusov in njihov vpliv na ampelografske lastnosti vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 96 str.
- Tsai M. S., Hsu Y. H. In Lin N. S. 1999. Bamboo mosaic potexvirus satellite RNA (satBaMV RNA) – encoded P20 protein preferentially binds to satBaMV RNA. Journal of Virology, 73: 3032-3039
- Urek G., Hržič A. 1998. Ogorčice - nevidni zajedalci rastlin, fitonematologija. Ljubljana, samozaložba: 240 str.
- Vigne E., Komar V., Fuchs M. 2004a. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of grapevine fanleaf virus. Transgenic Research, 13, 2:165-179
- Vigne E., Bergdoll M., Guyader S., Fuchs M. 2004b. Population structure and genetic variability within isolates of grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. Journal of General Virology, 85: 2435-2445
- Vigne E., Demangeat G., Komar V., Fuchs M. 2005. Characterization of naturally occurring recombinant isolate of Grapevine fanleaf virus. Archives of Virology, 150: 2241-2255
- Vigne, E., Marmonier, A. in Fuchs, M. 2008. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of Grapevine fanleaf virus and *Arabis* mosaic virus. Archives of Virology, 153: 1771-1776
- Vigne E., Marmonier A., Komar V., Lemaire O. in Fuchs M. 2009. Genetic structure and variability of virus population in cross-protected grapevines superinfected by Grapevine fanleaf virus. Virus Research. 144: 154-162
- Viry M., Serghini M.A., Hans F., Ritzenthaler C., Pinck M., Pinck L. 1993. Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. Journal of General Virology, 74: 169-174
- Vojvoda J. 2005. Raznolikost izbranih genov virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medodelčnega študija mikrobiologije: 74 str.
- Wetzel T., Bassler A., Amren M. A. W. In Krczal G. 2006. A RT/PCR-partial restriction enzymatic mapping (PREM) method for the detection and characterisation of the satellite RNAs of *Arabis* mosaic virus isolates. Journal of Virological Methods, 132, 1-2: 97-103
- White J. L. in Kaper J. M. 1989. A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. Journal of Virological Methods, 23: 83-94

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Maji Ravnikar za mentorstvo in hiter pregled diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem dr. Maruši Pompe-Novak za vse nasvete pri pisanju diplomske naloge in natančen pregled.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Darji Žgur-Bertok in predsednici komisije prof. dr. Marjijani Regvar za hiter pregled diplomske naloge in uporabne nasvete.

Še posebaj se zahvaljujem delovni mentorici Urški Čepin za mentorstvo pri uvajanju v laboratoriju, za pomoč pri opravljanju praktičnega dela in za številne nasvete ob nastajanju diplomske naloge. Hvala, ker si si vedno vzela čas zame.

Dr. Manci Pirc se zahvaljujem za pomoč pri uporabi programa Bionumerics.

Celotnemu osebju Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo NIB se zahvaljujem za prijaznost.

Najlepša hvala tudi staršema, ki sta mi omogočila študij, bratoma in fantu ter prijateljem za podporo, vzpodbudo, optimizem in potrpljenje v času študija in pisanja diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A1: Velikosti restriktijskih fragmentov in restriktijski tipi satRNA pri vzorcih iz različnih lokacij po cepitvi z encimom MboII, velikosti restriktijskih fragmentov in restriktijski tipi genov 2A, 2B in 2C molekule RNA2 GFLV po cepitvi z encimoma StyI in EcoRI ter popisana bolezenska znamenja.

		Raznolikost molekule satRNA		Raznolikost genomske molekule RNA2						Bolezenska znamenja*	
Lokacija	Vzorec	Restriktijski fragmenti - MboII (bp)	Restriktijski tip - MboII	Restriktijski tip 2A-StyI *	Restriktijski tip 2A-EcoRI *	Restriktijski tip 2B-StyI *	Restriktijski tip 2B-EcoRI *	Restriktijski tip 2C-StyI *	Restriktijski tip 2C-EcoRI *	A	B
Dutovlje DU	Refošk DU 2/19	863, 456, 407	A, E	C	N	A	N	/	/	-	m
	Refošk DU 2b/6	863	A	/	/	/	/	/	/	m	-
	Refošk DU 3/13	863, 527, 348	A, C	N	N	A	N	/	/	-	š
	Refošk DU 3/3	/	/	/	/	/	/	/	/	š	-
	Refošk DU 3/4	/	/	I	N	A	N	/	/	m	š
Dutovlje DUK	Refošk DUC 3/4	875, 863, 527, 348	A, B, C	I	N	A	N	/	/	š	m
	Refošk DUC 3/7	875, 863, 527, 348	A, B, C	/	/	/	/	/	/	š	š
	Refošk DUC 3/8	875, 863, 527, 348	A, B, C	/	/	/	/	/	/	-	-
	Refošk DUC 4/9	863, 527, 348	A, C	/	/	/	/	/	/	-	m
	Refošk DUC 4/10	875	B	/	/	/	/	/	/	š	-
Dutovlje DUC	Refošk DUK 1/20	863, 660, 215	A, D	/	/	/	/	/	/	š	-
	Refošk DUK 2/17	875, 863	A, B	/	/	/	/	/	/	m	-
	Refošk DUK 2/3	875	B	/	/	/	/	/	/	š	š
	Refošk DUK 3/37	863, 660, 527, 348, 215	A, C, D	/	/	/	/	/	/	m	m
	Sauvignon DUK 1/19	863, 660, 527, 348, 215	A, C, D	/	/	/	/	/	/	š	m
	Sauvignon DUK 2/27	863, 456, 407	A, E	/	/	/	/	/	/	-	m
	Sauvignon DUK 2/28	863, 456, 407	A, E	/	/	/	/	/	/	m	m
	Sauvignon DUK 2/31	863, 527, 456, 407, 348	A, C, E	/	/	/	/	/	/	m	m
	Sauvignon DUK 2/16	/	/	/	/	/	/	/	/	-	m
	Sauvignon DUK 2/25	/	/	/	/	/	/	/	/	š	m

(se nadaljuje)

Oznaka / pomeni, da v vzorcu nismo določili satRNA in/ali nimajo določenih restriktijskih tipov. * predstavlja rezultate diplom Marjance Blas in Jane Vojvoda, in sicer cepitev genov 2A, 2B in 2C z encimoma StyI in EcoRI ter popis bolezenskih znamenj od leta 2006 do 2008. Velikosti fragmentov so izražene v baznih parih (bp). Z A so označena **bolezenska znamenja na listih**, ki vključujejo rumenjenje listov, kloroze žil, kloroze medžilnih prostorov v obliki pik, obročev ali lis. Z B so označena **bolezenska znamenja na steblu**, ki vključujejo zraslost poganjkov, ploščata stebla, metlasto rast, manjše liste, goste liste, grmast videz trsa, bifurkacije na členku, bifurkacije na medčlenku, kratke medčlenke, dvojne členke (nasproti ležeče oko) in cik-cak rast. **Močno izražena bolezenska znamenja** so označena z m, **šibko izražena bolezenska znamenja** s š, **če ni izraženih bolezenskih znamenj** z -.

Priloga A1 (nadaljevanje): Velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi satRNA pri vzorcih iz različnih lokacij po cepitvi z encimom MboII, velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi genov 2A, 2B in 2C molekule RNA2 GFLV po cepitvi z encimoma StyI in EcoRI ter popisana bolezenska znamenja.

Lokacija	Vzorec	Raznolikost molekule satRNA		Raznolikost genomske molekule RNA2								Bolezenska znamenja*	
		Restrikcijski fragmenti - MboII (bp)	Restrikcijski tip - MboII	Restrikcijski tip 2A-StyI *	Restrikcijski tip 2A-EcoRI *	Restrikcijski tip 2B-StyI *	Restrikcijski tip 2B-EcoRI *	Restrikcijski tip 2C-StyI *	Restrikcijski tip 2C-EcoRI *	A	B		
Francija	F13	/	/	C	N	A	N	/	/	/	/		
Komen	Refošk 26 5/120	875, 863, 527, 456, 407, 348	A, B, C, E	C	N	A	N	/	/	-	š		
	Refošk 26 6/4	875, 863, 527, 456, 407, 348	A, B, C, E	C	N	A	N	/	/	-	š		
Krajna vas	Refošk KV 20 (a)	/	/	A, M	N	A	N	/	/	-	m		
	Refošk KV 20 (b)	/	/	A, M	N	A	N	/	/	-	m		
Kromberk	Malvazija 1/hiša	863, 527, 348	A, C	A, O	N, B	B, N	N	/	/	š	š		
	Malvazija 2/oreh	875, 527, 456, 407, 348	B, C, E	B	N, A	A	N, B	/	/	-	m		
	Malvazija 5/oreh	875	B	N, C, I	N, A	A, B, E, N	N	/	/	-	m		
	Pance precoce 21	863	A	A, G	N, B	A, B, E, N	N	/	/	-	m		
	Racuk B6/18	875	B	N, C	N, D	B, N	N	/	/	-	m		
	Sauvignon hiša	875	B	E	N	D, E	N	/	/	-	š		
	Pance precoce 18	/	/	N	N, A	A	N	/	/	-	m		
	Rebulka 3/66	/	/	N, A, O	N, A	A, H	N	/	/	-	š		

(se nadaljuje)

Oznaka / pomeni, da v vzorcu nismo določili satRNA in/ali nimajo določenih restrikcijskih tipov. * predstavlja rezultate diplom Marjance Blas in Jane Vojvoda, in sicer cepitev genov 2A, 2B in 2C z encimoma StyI in EcoRI ter popis bolezenskih znamenj od leta 2006 do 2008. Velikosti fragmentov so izražene v baznih parih (bp). Z **A** so označena **bolezenska znamenja na listih**, ki vključujejo rumenenje listov, kloroze žil, kloroze medžilnih prostorov v obliki pik, obročev ali lis. Z **B** so označena **bolezenska znamenja na steblu**, ki vključujejo zraslost poganjkov, ploščata steba, metlasto rast, manjše liste, goste liste, grmast videz trsa, bifurkacije na členku, bifurkacije na medčlenku, kratke medčlenke, dvojne členke (nasproti ležeče oko) in cik-cak rast. **Močno izražena bolezenska znamenja** so označena z **m**, **šibko izražena bolezenska znamenja** s **š**, **če ni izraženih bolezenskih znamenj** z **-**.

Priloga A1 (nadaljevanje): Velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi satRNA pri vzorcih iz različnih lokacij po cepitvi z encimom MboII, velikosti restrikcijskih fragmentov in restrikcijski tipi genov 2A, 2B in 2C molekule RNA2 GFLV po cepitvi z encimoma StyI in EcoRI ter popisana bolezenska znamenja.

Lokacija	Vzorec	Raznolikost molekule satRNA		Raznolikost genomske molekule RNA2						Bolezenska znamenja*	
		Restrikcijski fragmenti - MboII (bp)	Restrikcijski tip - MboII	Restrikcijski tip 2A-StyI *	Restrikcijski tip 2A-EcoRI *	Restrikcijski tip 2B-StyI *	Restrikcijski tip 2B-EcoRI *	Restrikcijski tip 2C-StyI *	Restrikcijski tip 2C-EcoRI *	A	B
Lože	Cividin 5/51	863	A	E	N	D, E	N	/	/	-	m
	Cividin 5/56	863, 527, 348	A, C	B, E, H, I, N	N	B, D, E	N	/	/	-	m
	Klarnica 5/4	863, 527, 456, 407, 348	A, C, E	N, H	N	B	N	/	/	-	š
	Racuk 5/45	875	B	H	N	B	N	/	/	-	m
	Rečigla 4/25	875, 527, 348	B, C	N	N	B	N	/	/	-	m
	Sladkočica 1/3	863	A	N	N	A	N	/	/	-	-
	Števerjana 4/37	875, 863, 456, 407	A, B, E	A	N	A	N	/	/	š	š
	Volovnik 2/47	863, 527, 348	A, C	B, I, N	N, A	A	N	O, T, V	N	-	m
	Volovnik 2/52	875, 863, 456, 407	A, B, E	H	N	A	N	T	N	-	m
	Volovnik 2/55	863, 527, 348	A, C	B, N	N, A	A	N, A	J, M, T, V	N	-	m
	Zelen 1 2/10	863	A	N, J	N	B, F	N, A			m	m
	Zunek 5/18	875, 527, 348	B, C	N	N	A	N	/	/	-	-
	Poljšakica 4/56	/	/	B	N	C	N	/	/	š	š
Malinkovci	Refošk 9 2/71	863	A	C	N	A	N	/	/	-	š
	Refošk KE 1 10/2	863, 527, 348	A, C	B, I	N	A	N	/	/	-	m
	Refošk KV 20 11/10	863	A	A, F, D	N	A	N	/	/	-	š
	Refošk 55 9/110	/	/	C	N	A	N	/	/	š	m
	Refošk 56 11/28	/	/	C	N	A	N	/	/	-	m
	Refošk 67 13/57	/	/	/	/	/	/	/	/	-	š
	Refošk KV 20 11/12	/	/	A, G	N	A	N	/	/	-	š
Tomaj	Refošk TO 5/8	/	/	/	/	/	/	/	/	m	-
Vrhpolje 1	Župlanka 1/1	863	A	/	/	/	/	/	/	š	m
	Župlanka 1/4	875, 527, 348	B, C	N, C, P	N, B	A, B, N	N	/	/	š	š
	Župlanka 2/1	863	A	C, P	N, B	B, E, N	N	/	/	m	m
Vrhpolje 2	Laški Rizling 4/29	863, 527, 348	A, C	N	N, A	B	N	/	/	m	š
	Laški Rizling 5/32	875, 863, 660, 527, 348, 215	A, C, D	D	N	B	N	/	/	š	š
	Laški Rizling 6/30	875	B	N, A	N	A, B, N	N	/	/	m	š

Oznaka / pomeni, da v vzorcu nismo določili satRNA in/ali nimajo določenih restrikcijskih tipov. * predstavlja rezultate diplom Marjance Blas in Jane Vojvoda, in sicer cepitev genov 2A, 2B in 2C z encimoma StyI in EcoRI ter popis bolezenskih znamenj od leta 2006 do 2008.. Velikosti fragmentov so izražene v baznih parih (bp). Z A so označena **bolezenska znamenja na listih**, ki vključujejo rumenjenje listov, kloroze žil, kloroz medžilnih prostorov v obliki pik, obročev ali lis. Z B so označena **bolezenska znamenja na steblu**, ki vključujejo zraslost poganjkov, ploščata steba, metlasto rast, manjše liste, goste liste, grmast videz trsa, bifurkacije na členku, bifurkacije na medčlenku, kratke medčlenke, dvojne členke (nasproti ležeče oko) in cik-cak rast. **Močno izražena bolezenska znamenja** so označena z **m**, **šibko izražena bolezenska znamenja** s **š**, **če ni izraženih bolezenskih znamenj** z **-**.

Priloga A2: Dendrogram. Prikaz podobnosti različnih sort vinske trte glede na prisotnost satRNA, njene restriktične tipe in bolezenska znamenja. A, B, C, D in E so posamezni restriktični tipi. Močno izražena bolezenska znamenja so označena z m, šibko izražena bolezenska znamenja s š, če ni izraženih bolezenskih znamenj z -.

