

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Andreja VESKOVIĆ

**GENSKA RAZNOLIKOST VIRUSA RAZRAŠČANJA IN PRITLIKAVOSTI
MALIN (RBDV)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

GENETIC DIVERSITY OF *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV)

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za virologijo na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bila za mentorja diplomskega dela imenovana prof. dr. Darja Žgur Bertok, za somentorico dr. Irena Mavrič Pleško ter za recenzentko prof. dr. Maja Ravnikar.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentorica: dr. Irena Mavrič Pleško

Recenzentka: prof. dr. Maja Ravnikar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Irena Mavrič Pleško

Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin

Članica: prof. dr. Maja Ravnikar

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Vesković

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.5.083+577.2.083:632.38(043)=163.6
KG	virusi/ virus razraščanja in pritlikavosti malin/ RBDV/ genska sestava RBDV/ plaščni proteini/ gibalni proteini/ filogenetska analiza/ molekularne metode/ bolezni malin/ bolezni vinske trte
AV	VESKOVIĆ, Andreja
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica) /MAVRIČ PLEŠKO, Irena (somentorica)/ RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	GENSKA RAZNOLIKOST VIRUSA RAZRAŠČANJA IN PRITLIKAVOSTI MALIN (RBDV)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 51 str., 13 pregl., 12 sl., 48 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Virus razraščanja in pritlikavosti malin (RBDV) okužuje različne sorte malin, robid in črnih malin, v zadnjih letih pa so potrdili tudi okužbe z RBDV na vinski trti. Pri malinah se okužba z RBDV kaže kot pritlikavost rastlin, prekomerno namnoževanje poganjkov, rumenenje listov in v deformaciji plodov. Obstajajo trije izolati virusa, ki se med seboj razlikujejo bodisi serološko ali pa v genski sestavi. Zanje je značilno, da okužujejo različne kultivarje iz rodu *Rubus*. Gensko raznolikost virusov lahko primerjamo z ugotavljanjem razlik v nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedjih njihovega genoma, v našem primeru virusnega plaščnega in gibalnega proteina. V nalogi smo se osredotočili na primerjavo genske sestave RBDV iz različnih sort malin in vinske trte. Med seboj smo primerjali nukleotidna in aminokislinska zaporedja plaščnega in gibalnega proteina šestih različnih sort vinske trte ter treh sort gojenih in dvema slovenskima avtohtonima sortama malin. V raziskavo smo za primerjavo vključili tudi že znana nukleotidna in aminokislinska zaporedja različnih sort vinske trte in malin iz prejšnjih študij. Z uporabo bioinformacijskih orodij smo izrisali filogenetska drevesa, ki prikazujejo gensko raznolikost virusa RBDV. Ugotovili smo, da so tako izolati iz malin kot iz vinske trte med seboj bolj podobni, vendar kljub temu, da oblikujejo dve jasno ločeni linji, med seboj kažejo visoko stopnjo sorodnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 578.5.083+577.2.083:632.38(043)=163.6

CX viruses/ *Raspberry bushy dwarf virus*/ RBDV/ genetic composition of RBDV/ coat proteins/ movement proteins/ phylogenetic analysis/ molecular methods/ raspberry diseases/ grapevine diseases

AU VESKOVIĆ, Andreja

AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor) / MAVRIČ PLEŠKO, Irena (co-advisor) / RAVNIKAR, Maja (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2011

TI GENETIC DIVERSITY OF *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV)

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 51 p., 13 tab., 12 fig., 48 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) infects different cultivars of raspberries, blackberries and black raspberries from genus *Rubus* and was recently found in grapevine. In raspberries RBDV causes irregular growth of plants, increased growth of shoots, leaf yellowing and deformation of drupelets. There are three different isolates of RBDV known, which differ in serological and genetical properties and in *Rubus* host range. Genetic composition of viruses can be studied through nucleotide and amino acid composition of viral coat and movement proteins. In this study, we compared nucleotide and amino acid compositions of RBDV coat and movement proteins from six cultivars of grapevine, three commercially grown cultivars of raspberries and two Slovenian autochthonous raspberry cultivars. For comparison we also included other nucleotide and amino acid sequences from previous studies. From analyzed sequences, we constructed phylogenetic trees, which represent genetic diversity of RBDV worldwide. Our results show that all isolates from raspberries are genetically very similar to each other, which is also the case with grapevine isolates. Both isolates form two distinct groups which are related to a certain degree.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV IN MORFOLOŠKA ZGRADBA VIRUSA RAZRAŠČANJA IN PRITLIKAVOSTI MALIN (RBDV)	3
2.1.1 Taksonomska uvrstitev virusa	3
2.1.2 Družina <i>Bromoviridae</i> in primerjava značilnosti RBDV z njenimi predstavniki	3
2.1.3 Morfološka zgradba RBDV	4
2.2 GENOM RBDV	5
2.3 GOSTITELJI	7
2.4 ŠIRJENJE VIRUSA IN KONTROLA ŠIRJENJA	8
2.5 IZOLATI	9
2.5.1 Navadni ali škotski izolati:	9
2.5.2 RB izolati (ang. Resistance breaking)	9
2.5.3 Izolati iz črnih malin (B)	10
2.5.4 Ostali izolati	10
2.6 BOLEZNI	11
2.6.1 Bolezni malin ob okužbi z RBDV	11

2.6.2	Virusne bolezni vinske trte	12
2.6.3	Okužba vinske trte z RBDV	13
2.7	METODE ZA DETEKCIJO IN IDENTIFIKACIJO RASTLINSKIH VIRUSOV	14
2.7.1	Mehanska inokulacija testnih rastlin z rastlinskim sokom	15
2.7.2	Serološka metoda DAS-ELISA	15
2.7.3	Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo s predhodno imunsko vezavo (IC RT-PCR)	16
2.8	MOLEKULARNA FILOGENIJA	17
2.8.1	Filogenetska analiza	18
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	VZORČENJE	20
3.2	IC RT-PCR	21
3.3	LIGACIJA POMNOŽKOV PCR V VEKTOR pGEM-T Easy	23
3.4	TRANSFORMACIJA REKOMBINIRANIH PLAZMIDNIH VEKTORJEV V KOMPETENTNE BAKTERIJSKE CELICE	24
3.4.1	PCR na osnovi kolonije	25
3.5	GOJENJE TEKOČIH KULTUR IN IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA	25
3.5.1	Sestava gojišč	25
3.6	ELEKTROFOREZA	26
3.7	OBDELAVA SEKVENC Z BIOINFORMACIJSKIMI ORODJI	26
4	REZULTATI	29
4.1	ANALIZA NUKLEOTIDNIH IN AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ PLAŠČNEGA PROTEINA RBDV	30
4.2	ANALIZA NUKLEOTIDNIH IN AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ GIBALNEGA PROTEINA RBDV	35
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1	RAZPRAVA	41
5.2	SKLEPI	44
6	POVZETEK	45

7 VIRI

47

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Seznam vzorcev za primerjavo genske raznolikosti virusa RBDV	20
Pregl. 2: Sestava ekstrakcijskega pufra	21
Pregl. 3: Sestava pufra za spiranje	21
Pregl. 4: Vsebina reakcijskih mešanic za RT	22
Pregl. 5: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za PCR reakcijo	22
Pregl. 6: Vsebina reakcijske mešanice za PCR reakcijo	23
Pregl. 7: Temperaturni program za PCR reakcijo	23
Pregl. 8: Uporabljeni reagenti in sestava ligacijske mešanice za PCR pomnožek ter pozitivno in negativno kontrolo	24
Pregl. 9: Sestava gojišč	25
Pregl. 10: Število sekvenc, uporabljenih za filogenetsko analizo	27
Pregl. 11: Objavljene sekvence RBDV iz prejšnjih študij (Valasevich in sod., 2011; Mavrič Pleško in sod., 2009; Natsuaki in sod., 1991)	28
Pregl. 12: Število razlik v nukleotidnih in aminokislinskih zaporedjih plaščnega proteina RBDV	33
Pregl. 13: Število razlik v nukleotidnih in aminokislinskih zaporedjih gibalnega proteina RBDV	38

KAZALO SLIK

Sl. 1: Elektronsko mikroskopski posnetek RBDV (Martin, 2000)	5
Sl. 2: Shematski prikaz genoma RBDV (SCRI, 2010)	7
Sl. 3: Bolezenska znamenja okužbe z RBDV na malinah: a - rumenenje listnih žil, b – deformacija plodov (a-Utah State University, 2009; b- SCRI, 2010)	11
Sl. 4: Bolezenska znamenja okužbe z RBDV na vinski trti sorte Laški Rizling: a in b – klorotični vzorci, c – rumenenje listov (Mavrič Pleško, 2011)	14
Sl. 5: Shematski prikaz testa DAS-ELISA (TFOT, 2006)	16
Sl. 6: Shematski prikaz poravnave nukleotidnih zaporedij pri filogenetski analizi (Baldauf, 2003)	19
Sl. 7: Prikaz dela nukleotidnih zaporedij za plaščni protein RBDV v programu BioEdit	31
Sl. 8: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij plaščnega proteina RBDV	34
Sl. 9: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi aminokislinskih zaporedij plaščnega proteina RBDV	35
Sl. 10: Prikaz dela nukleotidnih zaporedij za gibalni protein RBDV v programu BioEdit	37
Sl. 11: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij gibalnega proteina RBDV	39
Sl. 12: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi aminokislinskih zaporedij gibalnega proteina RBDV	40

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
AMV	virus mozaika lucerne (ang. <i>Alfalfa mosaic virus</i>)
Ap	ampicilin
ArMV	virus mozaika repnjaka (ang. <i>Arabidopsis mosaic virus</i>)
BMV	virus mozaika stoklase (ang. <i>Brome mosaic virus</i>)
bp	bazni par
CH	Chardonnay
CMV	virus mozaika kumar (ang. <i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	plaščni protein (ang. coat protein)
CW	Chilliwack
DA	Dane
Da	Dalton, enota za molekulsko maso
DAS-ELISA	metoda dvojnega sendviča ELISA (ang. double sandwich ELISA)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FG	Fall Gold
GFkV	flek virus (ang. <i>Grapevine fleck virus</i>)
GFLV	virus pahljačavosti vinske trte (ang. <i>Grapevine fanleaf virus</i>)
GLRaV	virus zvijanja listov vinske trte (ang. <i>Grapevine leafroll associated virus</i>)
GRGV	ang. <i>Grapevine red globe virus</i>
GVA	virus vinske trte A (ang. <i>Grapevine virus A</i>)
GVB	virus vinske trte B (ang. <i>Grapevine virus B</i>)
IC-RT PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo s predhodno imunsko vezavo
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid

kb	kilo baza (1000 baz)
kDa	kilo Da (1000 Da)
KR	Kraljevina
LB	gojišče Lauria-Bertani
MF	Modra Frankinja
M-MLV RT	Maloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MP	gibalni protein (ang. movement protein)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PEG	polietilen glikol
PVP K25	polivinil piridon
RBDV	virus razraščanja in pritlikavosti malin (ang. <i>Raspberry bushy dwarf virus</i>)
RNA	ribonukleinska kislina
RNasin	inhibitor ribonukleaze
RR	Renski Rizling
RSPaV	virus razbrazdanja lesa rupestrisa (ang. <i>Rupestris stem pitting associated virus</i>)
ŠI	Šipon
TAS-ELISA	metoda trojnega sendviča ELISA (ang. triple sandwich ELISA)
Taq	polimeraza iz organizma <i>Thermophilus aquaticus</i>
TI	Titan
TMV	virus mozaika tobaka (ang. <i>Tobacco mosaic virus</i>)
TRIS	tris hidroksimetil aminometan
Tween 20	polisorbat 20
T4	ligaza iz bakteriofaga T4
Vrt./sek	vrtljaj na sekundo
ZG	Zweigelt
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V Sloveniji so v letih 2001 in 2002 na rastlinah vinske trte, sorte Laški Rizling, odkrili bolezenska znamenja, ki niso bila značilna za običajne virusne okužbe na vinski trti. Na listih so se pojavljali rumeni ali klorotični vzorci, površina nekaterih listov pa je porumenela. V okviru raziskav o možnih povzročiteljih bolezni, so ugotovili, da so rastline okužene z virusom razraščanja in pritlikavosti malin (*Raspberry bushy dwarf virus* - RBDV), katerega naravni gostitelj so maline in robide ter druge vrste iz rodu *Rubus* (Mavrič in sod., 2003). Ker je bila to prva najdba naravne okužbe z RBDV zunaj rodu *Rubus* v svetu, je odkritje vodilo v nadaljnje raziskave na področju genske raznolikosti med izolati virusa, ki okužujejo maline in robide ter tistimi, ki okužujejo vinsko trto. Kasneje so RBDV našli tudi v drugih belih in rdečih sortah vinske trte v vseh vinorodnih deželah Slovenije. Leta 2009 je bila objavljena raziskava, v kateri so primerjali izolat RBDV iz sorte Laški Rizling z že znanimi izolati virusa iz malin in robid. Gensko raznolikost so določali na podlagi specifičnih aminokislinskih zaporedij plaščnega in gibalnega proteina virusa, ki sta kodirana na RNA-2 molekuli virusnega genoma. Rezultati so pokazali, da izolati iz vinske trte in robid oblikujejo dve sorodni, vendar filogenetsko jasno ločeni liniji (Mavrič Pleško in sod., 2009).

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Ker je najdba RBDV na vinski trti relativno nova, so podatki o njegovi genski sestavi skromni. Da bi razširili znanje o genski raznolikosti RBDV, ki okužuje vinsko trto, smo se v nalogi osredotočili na podrobnejšo raziskavo le-teh in določili nukleotidna in aminokislinska zaporedja plaščnega in gibalnega proteina šestih izolatov virusa, in sicer iz sort Chardonnay, Kraljevina, Modra Frankinja, Renski Rizling, Šipon in Zweigelt. Dobljene rezultate smo primerjali z nukleotidno in aminokislinsko sestavo virusa iz treh

gojenih sort malin (Chilliwack, Fall gold in Titan) ter iz dveh slovenskih avtohtonih malin (Dane in Rog), ki se vse nahajajo v kolekcijskem nasadu Kmetijskega inštituta Slovenije. Z opravljeno raziskavo smo želeli pridobiti dodatne podatke o genski raznolikosti RBDV v slovenskem rastlinskem materialu in na ta način dopolniti in potrditi rezultate prejšnje raziskave iz leta 2009 (Mavrič Pleško in sod., 2009).

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na rezultate prejšnje raziskave s področja genske raznolikosti RBDV iz vinske trte, smo predvidevali, da se bodo izolati, ki okužujejo različne sorte vinske trte gensko razlikovali od tistih, ki okužujejo maline in robide, vendar bodo med seboj kazali visoko stopnjo sorodnosti.

Domnevali smo tudi, da bo genska sestava izolatov, ki okužujejo različne sorte vinske trte med seboj podobna, večja podobnost v genski sestavi pa bi se naj kazala tudi med izolati, ki okužujejo maline.

Predvidevali smo, da bodo razlike v genski sestavi razdelile izolate iz različnih sort vinske trte in malin v dve skupini, ki pa bosta med seboj še vedno sorodni, saj gre še vedno za isti virus.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV IN MORFOLOŠKA ZGRADBA VIRUSA RAZRAŠČANJA IN PRITLIKAVOSTI MALIN (RBDV)

2.1.1 Taksonomska uvrstitev virusa

Virus razraščanja in pritlikavosti malin (*Raspberry bushy dwarf ideovirus* – RBDV) uvrščamo v rod *Idaeovirus*. Predstavlja edino znano vrsto tega rodu, saj ga glede na do sedaj objavljene podatke, nenavadna kombinacija značilnosti ločuje od vseh drugih virusov. Kljub posebnim značilnostim RBDV pa so virusni delci po izgledu in načinu prenosa preko peloda podobni ilarvirusom iz družine *Bromoviridae* (Ziegler in sod., 1993).

Poleg RBDV, ki za zdaj predstavlja edino znano vrsto tega rodu, so odkrili podoben *Idaeovirus* tudi pri limonovcu, ki pa še ni uvrščen v rod. Plaščni protein virusa Citrus *Idaeovirus* (CIV) kaže 65 odstotno podobnost s plaščnim proteinom RBDV, podobnost gibalnega proteina pa je 60 odstotkov (Derrick in sod., 2006).

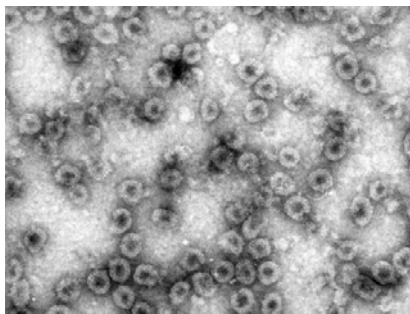
2.1.2 Družina *Bromoviridae* in primerjava značilnosti RBDV z njenimi predstavniki

V družino *Bromoviridae* uvrščamo 5 rodov, in sicer *Alfamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus* in *Oleavirus*. Vsi predstavniki omenjenih rodov imajo tripartitni genom, ki ga sestavlja enoverižna pozitivno orientirana RNA. Virioni rodov *Bromovirus*, *Cucumovirus* in *Ilarvirus* so kroglaste oblike, premera 26-36 nm z ikozaedrično simetrijo. *Alfalfa mosaic virus* (AMV), edini pripadnik rodu *Alfamovirus*, predstavljajo delci paličastih oblik s premerom 18 nm in različnih dolžin (30-57 nm). Paličaste oblike so tudi pripadniki rodu *Oleavirus* s premerom 19 nm, v dolžino pa merijo od 37 do 55 nm.

Genomi vseh virusov v družini *Bromoviridae* so tripartitni in podobnih velikosti. Razlike v velikosti obstajajo med samimi rodovi pa tudi med vrstami enega rodu. Za genome vseh predstavnikov družine je značilno, da vsebujejo genski zapis za N-metiltransferazo, helikazo in polimerazo ter za plaščni in gibalni protein. Virioni RBDV so izometrične oblike premera 33 nm. Pri RBDV se genski zapisi za vse prej omenjene proteine nahajajo na bipartitnem genomu (Scott, 2006). RNA-2 molekula virusa je glede na organiziranost in velikost produktov, ki jih kodirajo geni, podobna RNA-3 molekulam virusov iz družine *Bromoviridae*, evolucijske razdalje, izračunane preko multiplih poravnjav aminokislinskih zaporedij proteinov za pomnoževanje virusa pa prav tako nakazujejo podobnost med bipartitnim genomom RBDV in tripartitnim genomom virusov iz omenjene družine. Zaradi bioloških in molekularnih podobnosti RBDV z virusi iz družine *Bromoviridae*, so znanstveniki predlagali, da bi RBDV uvrstili vanjo (Ziegler in sod., 1993), vendar virus do sedaj še ni bil uvrščen v to družino.

2.1.3 Morfološka zgradba RBDV

Virusni delci RBDV so brez ovojnice, izometrične oblike in v premeru merijo 33 nm. Glede na razmerje izmerjenih absorbanc očiščenega virusa (A_{260}/A_{280}), so sestavljeni iz 24 % nukleinskih kislin in 76 % proteinov. Delci ob prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS) razpadejo, kar nakazuje, da so stabilizirani s povezavami med proteini in RNA. Redko se pojavljajo tudi kot delci premera 15 nm, ki pa jih serološko ni mogoče ločiti od delcev premera 33 nm (Barnett in Murant, 1970). Slika 1 prikazuje elektronsko mikroskopski posnetek RBDV.



Slika 1: Elektronsko mikroskopski posnetek RBDV (Martin, 2000)

2.2 GENOM RBDV

RBDV ima bipartitni genom, ki je sestavljen iz dveh enoverižnih, pozitivno orientiranih RNA molekul (RNA-1 in RNA-2), v okuženih rastlinah pa se pojavlja še RNA-3, ki je subgenomska RNA in ustreza genu za plaščni protein.

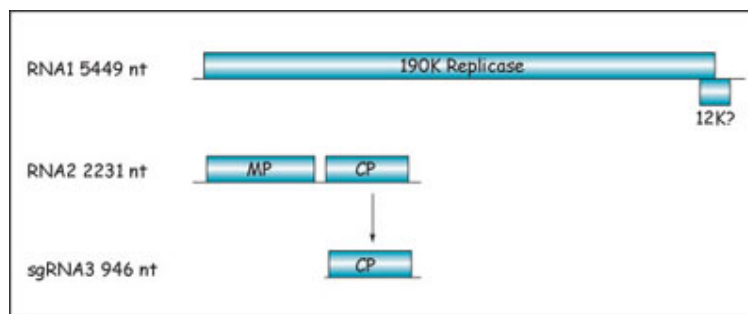
RNA-1 je sestavljena iz 5449 nukleotidov, ki so pod nadzorom dveh bralnih okvirjev. Pod nadzorom prvega bralnega okvirja je gen, ki kodira 190 kDa velik nestrukturni protein z aminokislinskimi zaporedji, ki so značilna za metiltransferazo, helikazo in polimerazo. V nasprotju z ostalimi rastlinskimi virusi iz družine *Bromoviridae*, ki kažejo visoko stopnjo homologije nestrukturnih proteinov z RBDV (virus mozaika lucerne - AMV, virus mozaika stoklase - BMV, virus mozaika kumar - CMV ter virusom mozaika tobaka - TMV), so zaporedja aminokislin, ki kodirajo omenjene proteine RBDV, združena v en multifunkcionalen protein, in niso razporejena med dve molekuli RNA kot pri prej omenjenih virusih. Nukleotidna zaporedja, ki sestavljajo RNA-1 molekulo nakazujejo, da ta multifunkcionalni protein sodeluje pri podvojevanju virusne RNA. Prav zaradi omenjene razlike v genovski sestavi z drugimi virusi je RBDV taksonomsko uvrščen v poseben rod *Idaeovirus* (Ziegler in sod., 1992). Pod nadzorom drugega bralnega okvirja na RNA-1 je gen, ki kodira 12 kDa velik polipeptid. Mesto, kjer se nahaja gen, odgovarja mestu v genomu CMV, ki kodira 10kDa velik protein (Wood in sod., 2001). 10kDa protein CMV virusa ni nujno potreben za infektivnost, sodeluje pa pri širjenju virusa na daljše razdalje v

okuženih rastlinah (Ding in sod., 1995) ter pri supresiji posttranskripcijskega utišanja genov (Brigneti in sod., 1998). Sekvenci obeh genov sicer ne kažeta podobnosti, vendar znanstveniki zaenkrat še niso izključili možnosti, da imata omenjena gena pri RBDV in CMV enako vlogo (Wood in sod., 2001).

RNA-2 molekula je dolga 2231 nukleotidov in vsebuje dva velika bralna okvirja. Na 5' koncu se pod nadzorom prvega bralnega okvirja nahaja 1074 baz z zapisom za gibalni protein, na 3' koncu pa pod nadzorom drugega, 822 baz z zapisom za plaščni protein. Nukleotidno zaporedje na 3' koncu je identično subgenomski RNA molekuli, ki ravno tako kodira 30 kDa velik plaščni protein virusa. Na 5' koncu pod nadzorom prvega bralnega okvirja RNA-2 molekula vsebuje gen, ki kodira 39 kDa velik gibalni protein virusa (Natsuaki in sod., 1991).

RNA-3 je subgenomska RNA molekula in vsebuje 946 nukleotidov. Kodirajoči del molekule tako kot pri RNA-2 predstavlja 822 nukleotidov, ki kodirajo plaščni protein virusa velikosti 30 kDa (Mayo in sod., 1991). Predstavlja le prepisano kopijo iz RNA-2, pri podvojevanju virusa pa ne služi kot transkripcijska matrica za podvojevanje (Natsuaki in sod., 1991). Raziskave RNA-3 molekule so pokazale, da prisotnost le-te znatno poveča stopnjo infektivnosti RBDV, prav tako pa vzpodbuja podvojevanje virusa. RNA-3 bi lahko glede na dosedanje raziskave imela vlogo tudi pri premikanju virusa in s tem vplivala na lažji prenos virusa v okuženem tkivu (MacFarlane in McGavin, 2009).

Slika 2 prikazuje shematski prikaz genoma RBDV.



Slika 2: Shematski prikaz genoma RBDV (SCRI, 2010)

2.3 GOSTITELJI

Prvotni gostitelji virusa so vrste iz rodu *Rubus*, vendar so raziskovalci uspeli virus mehansko prenesti na 55 različnih vrst rastlin iz 12 družin, pri čemer pri večini ni prišlo do pojava bolezenskih znamenj (Barnett in Murrant, 1970). Največ vrst, ki jih je mogoče mehansko okužiti pripada družini *Chenopodiaceae*. Pri vrsti *Chenopodium quinoa*, ki je splošno zelo uporabna in znana testa rastlina za dokazovanje rastlinskih virusov, se po štirih dneh od okužbe z RBDV razvijejo lokalne lezije, po sedmih dneh pa pride do sistemske okužbe s pojavom klorotičnih znamenj. Zatem se pojavijo svetlo in temno zeleni mozaični in obročkasti vzorci, ki kasneje izginjajo (Barnett in Murrant, 1970). Poleg *C. quinoa* se po mehanskem prenosu virusa bolezenska znamenja pojavijo tudi pri drugih predstavnikih omenjene družine, kot so *C. album*, *C. amaranticolor*, *C. botrys* ter *C. murale*. Pri vseh omenjenih predstavnikih družine *Chenopodiaceae* ob okužbi z RBDV pride do sistemske okužbe, razen pri *C. murale*, kjer se okužba kaže le lokalno. Desvignes in Savio (1975) sta dokazala tudi prenos RBDV na lesnate rastline, in sicer pri vrsti *Cydonia oblonga*, kasneje pa so Jones in sod. (1982) potrdili prenos virusa tudi pri vrsti *Pyronia veitchii*. Pri obeh vrstah prihaja do pojava bolezenskih znamenj, še posebej pa se le-ta kažejo pri vrsti *C. oblonga*, in sicer kot močno rumenenje listov, ki se širi od glavne listne žile po celotni površini lista (Jones in sod., 1982). Poleg vrst iz rodu *Rubus* je od leta 2003 znana tudi prva naravna okužba z RBDV pri vinski trti. Okužbo so najprej potrdili pri sorti Laški Rizling, kasneje pa tudi pri drugih sortah vinske trte (Mavrič Pleško in sod.,

2009), Jevremović in Paunović (2011) sta potrdila okužbo z RBDV na vinski trti tudi v Srbiji.

2.4 ŠIRJENJE VIRUSA IN KONTROLA ŠIRJENJA

RBDV se v naravi na potomke prenaša na dva načina, s pelodom ali s semenom. Okužena rastlina se razvije iz okuženega semena, ki nastane, kadar je okužena ženska ali moška rastlina (Martin, 2002). Prenos preko semen pri malinah je največji (77 %), kadar sta okuženi obe starševski rastlini (Murant in sod, 1974) in je odvisen tudi od genotipa rastline. Drug način prenosa virusa poteka s pelodom, pri čemer se s prenosom okuženega peloda lahko okuži tako oprášena rastlina kot tudi seme. Tak način prenosa omogoča izredno hitro širjenje okužbe znotraj nasadov. Točen mehanizem prenosa RBDV preko peloda do sedaj še ni natančno pojasnjen (Martin, 2002).

Virus se prenaša tudi z vegetativnim razmnoževanjem, predvsem z uporabo okuženega sadilnega materiala. V laboratorijskih pogojih pa lahko z mehansko inokulacijo virus prenesemo iz okužene rastline na neokužene zelnate testne rastline (Barnett in Murant, 1970) ter na nekatere lesnate rastline (Jones in sod., 1982). Naravni prenos virusa med rastlinami vinske trte do sedaj še ni pojasnjen, znano pa je, da se virus ne prenaša preko semena, oziroma je ta verjetnost izredno nizka (Mavrič Pleško in sod., 2009). Hitro širjenje virusa v nasadih jagodičja je mogoče omejiti z uporabo zdravega sadilnega materiala, z uporabo odpornih kultivarjev ter s fizično izolacijo novih nasadov od starih (Martin, 2002), pri vinski trti pa zaenkrat predvsem z uporabo zdravega sadilnega materiala.

2.5 IZOLATI

Izolate, ki okužujejo vrste iz rodu *Rubus*, glede na infektivnost in serološke značilnosti delimo v tri skupine:

2.5.1 Navadni ali škotski izolati:

Navadni izolat (S) je reprezentativni izolat, ki so ga potrdili v skoraj vseh državah, kjer pridelujejo maline. Izolat ob ugodnih razmerah povzroča značilna bolezenska znamenja na testnih zelnatih rastlinah in občutljivih kultivarjih malin. Zanj je značilno, da okužuje samo gojene vrste iz rodu *Rubus*, mnogi divji predstavniki tega rodu in kultivarji križancev malin pa so odporni na okužbo. Najbolj znane sorte odporne na okužbo z S izolati so Willamette, Haida, Glen Clova, Malling Jewel, Malling Admiral ter Malling Promise (Jones in sod., 1982). Podrobnejše raziskave več S izolatov so pokazale, da se le-ti tudi znotraj skupine razlikujejo po seroloških značilnostih, kar so dokazali z uporabo monoklonskih protiteles (Jones in sod., 2001). Izolati se med seboj razlikujejo tudi po nukleotidnem zaporedju ter glede na to, katere testne rastline so sposobni okužiti, kar nakazuje na to, da skupina ni homogena (Jones in sod., 2001). Odpornost na S izolate je posledica prisotnosti Bu gena za odpornost pri omenjenih kultivarjih (Jones in sod., 1982).

2.5.2 RB izolati (ang. Resistance breaking)

RB izolati se serološko ne razlikujejo od S izolatov, vendar pa se od S izolatov ločijo po tem, da lahko okužijo divje vrste iz rodu *Rubus* in kultivarje križancev, ki so odporni na S izolate. Po cepljenju so sposobni okužiti skoraj vse vrste iz rodu *Rubus*. Geografsko so omejeni na vzhodno Evropo, Rusijo in Sibirijo, v zahodno Evropo in Anglijo pa so se najverjetneje prenesli s prenosom okuženega materiala (Barbara in sod., 1984). Okužbo z

RB izolati so potrdili tudi na področju nekdanje Jugoslavije pri sortah Willamette in Malling Jewel (Dulić-Marković in Ranković, 1992).

2.5.3 Izolati iz črnih malin (B)

Serološko se B izolati ločijo od S in RB izolatov, zanje pa je značilno, da se težje ohranijo v testnih rastlinah ter da imajo nizko specifično infektivnost. B izolati se ločijo od S izolatov tudi glede na bolezenska znamenja, ki jih povzročajo na testnih rastlinah. Medtem ko S izolati lahko povzročijo sistemsko okužbo testnih rastlin, B izolati na njih povzročijo le lažja lokalna bolezenska znamenja. Za B izolate je značilno tudi, da je njihova življenjska doba *in vitro* znatno krajša od življenjske dobe S izolatov, hitreje pa so tudi podvrženi temperaturni deaktivaciji (Murant in Jones, 1976).

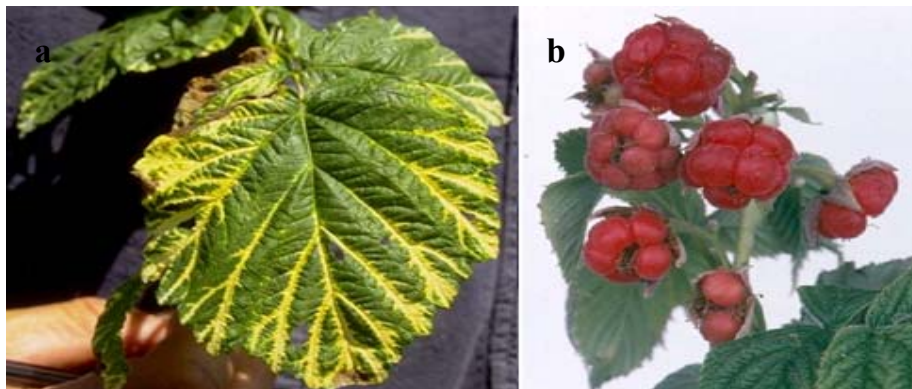
2.5.4 Ostali izolati

Na vrsti *Rubus multibracteatus* so našli poseben različek RBDV, ki ga na podlagi genske sestave in seroloških značilnosti ne moremo uvrstiti v nobeno izmed zgoraj omenjenih skupin. Gre za poseben različek virusa, ki je še najbolj podoben izolatom iz črnih malin, vendar nukleotidno zaporedje za plaščni protein kaže le 87,5 odstotno podobnost z ostalimi zaporedji iz črnih malin. Tudi serološko je virus iz *R.multibracteatus* drugačen od ostalih izolatov RBDV, saj so TAS-ELISA testi pokazali, da vsa monoklonska protitelesa proti RBDV virusa ne zaznajo (Chamberlain in sod., 2003).

2.6 BOLEZNI

2.6.1 Bolezni malin ob okužbi z RBDV

Kadar RBDV okužuje maline sam, brez prisotnosti drugih virusov, na okuženih rastlinah navadno ne povzroča bolezenskih znamenj. V mešani okužbi z drugimi virusi povzroča ti. »bushy-dwarf disease«, ki se kaže kot pritlikavost rastlin, prekomerno namnoževanje poganjkov in nagnjenost k jesenski rodnosti. V ugodnih pogojih, lahko sam pri občutljivih kultivarjih povzroči rumenenje listov (Cadman, 1952). Bolezen se najbolje pokaže pri mladih rastlinah pozno spomladi in zgodaj poleti kot rumenenje glavne listne žile ali stranskih listnih žil spodnjih listov rastline. Rumenenje se nato širi na druge žile ter medžilno listno lamino, včasih pa prizadene celotno površino lista. Nekateri kultivarji razvijejo tudi klorotične obroče ali linijske vzorce na listih (Daubeny in sod., 1978). Okužba z RBDV povzroča pri nekaterih kultivarjih tudi deformacijo plodov, kar se kaže kot nepravilna oblika plodov, ki razpadajo ob obiranju (Murant in sod., 1974). Nekateri izolati povzročajo tudi prezgodnje odpadanje listja, zmanjšanje arome, zvijanje listov, propad stranskih poganjkov, nekrozo in povečan propad rastlin med zimo (Jones in sod., 1982). Slika 3 prikazuje bolezenska znamenja okužbe z RBDV na malinah.



Slika 3: Bolezenska znamenja okužbe z RBDV na malinah: a - rumenenje listnih žil, b –deformacija plodov
(a-Utah State University, 2009; b- SCRI, 2010)

2.6.2 Virusne bolezni vinske trte

Vinska trta je rastlina, ki je zelo podvržena virusnim okužbam in jo okužuje vsaj 60 do sedaj odkritih virusov (Martelli, 2009). Najbolj škodljivi med njimi spadajo v rodove *Nepovirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Maculavirus*, *Vitivirus* in *Foveavirus* (Fauquet in sod., 2005). Bolezenska znamenja, ki se kažejo, so pogosto posledica mešane okužbe in so še jasneje izražena, kot ob okužbi s posameznim virusom.

V rod *Nepovirus* uvrščamo virus pahljačavosti listov vinske trte (ang. *Grapevine fanleaf virus*; GFLV) in virus mozaika repnjaka (ang. *Arabidopsis mosaic virus*; ArMV). GFLV povzroča bolezen, ki jo imenujemo kužno izrojevanje vinske trte (Maček, 1986) in se kaže v deformaciji listov, ki dobijo izgled pahljačavosti. Druga bolezenska znamenja, ki se kažejo v okviru okužbe z GFLV so še rumenenje medžilnih prostorov na listih ter deformacija poganjkov, zaradi česar dobijo trsi grmičast izgled (Pearson in Goheen, 1998).

Rodova *Closterovirus* in *Ampelovirus* uvrščamo v družino *Closteroviridae*. Predstavniki družine so virusi zvijanja listov vinske trte (ang. *Grapevine leafroll associated virus*; GLRaV). Do sedaj je odkritih devet različnih virusov GLRaV, pri čemer so nekateri uvrščeni v rod *Closterovirus*, drugi pa v rod *Ampelovirus* (Fauquet in sod., 2005). Bolezenska znamenja so najbolj opazna pri rdečih sortah vinske trte. Zaradi okužbe se poleti na vinski trti pojavljajo rdeče pike, rdečenje pa se nato širi po površini listov, pri čemer glavne listne žile ostanejo zelene. Pozno poleti in jeseni se listi začnejo zvijati, pojavlja pa se tudi zakasnjeno in neenakomerno dozorevanje jagod, zaradi česar so grozdi manjši (Bovey in sod., 1980).

V rod *Maculavirus* iz družine *Tymoviridae* uvrščamo virusa GRGV (ang. *Grapevine red globe virus*) in GFkV (ang. *Grapevine fleck virus*). Oba virusa sta v vinski trti latentna, razen na rupestrisu, kjer GFkV povzroča prosojne pike ali lise na mladih listih (Fauquet in

sod., 2005). Listi se zaradi okužbe gubajo in zvijajo, na njih pa so opazni 1-3 mm dolgi madeži (Martelli, 1993).

V rodova *Vitivirus* in *Foveavirus* uvrščamo viruse, ki na vinski trti povzročajo bolezen razbrazdanja lesa (Martelli, 1993). V rod *Vitivirus* spadata virusa vinske trte A in B (ang. *Grapevine virus A*; GVA ter *Grapevine virus B*; GVB), v rod *Foveavirus* pa virus razbrazdanja lesa rupestrisa (ang. *Rupestris stem pitting associated virus*; RSPaV). Okužene sorte velikokrat ne kažejo bolezenskih znamenj, zato posameznih boleznih razbrazdanja lesa zaradi pomanjkanja razlikovalnih bolezenskih znamenj za sedaj ne moremo ločevati med seboj (Martelli, 1993).

2.6.3 Okužba vinske trte z RBDV

Najznačilnejša znamenja okužbe z RBDV so do sedaj opazili pri sorti Laški Rizling. Na listih so se pojavljali klorotični rumeni vzorci nepravilnih oblik ali pa je porumenela celotna površina lista, kar prikazuje slika 4. Za okužbo z RBDV je značilno, da se bolezenska znamenja pojavljajo na manjšem številu listov ali pa se sploh ne kaže v obliki značilnih bolezenskih znamenj, zato jo je v vinogradih velikokrat težko odkriti. Virus je v trsu neenakomerno razporejen, zaradi česar je potrebno za odkrivanje okužbe odvzeti vzorce iz različnih delov trsa, saj lahko okužbo drugače hitro spregledamo. Interakcije z drugimi virusi so do sedaj še neznane, prav tako pa še ni natančno pojasnjeno, kako se virus širi po vinogradih ter kako okužba vpliva na količino in kakovost pridelka (Mavrič Pleško, 2011).



Slika 4: Bolezenska znamenja okužbe z RBDV na vinski trti sorte Laški Rizling: a in b – klorotični vzorci, c – rumenenje listov (Mavrič Pleško, 2011)

2.7 METODE ZA DETEKCIJO IN IDENTIFIKACIJO RASTLINSKIH VIRUSOV

Identifikacija virusnih povzročiteljev bolezni je praktično nemogoča izključno preko opazovanja bolezenskih znamenj. Različni virusi lahko povzročijo podobna bolezenska znamenja na isti rastlini, podobna znamenja pa se lahko pojavijo tudi zaradi fizioloških dejavnikov. Za nekatere okužbe je potrjevanje še posebej težavno, saj se bolezenska znamenja kažejo le v milih oblikah ali pa se sploh ne razvijejo.

Najpogosteje uporabljane metode za dokazovanje virusne okužbe so mehanska inokulacija testnih rastlin, različne oblike serološkega testa ELISA in različne molekularne metode. Najmanj primerna za identifikacijo je mehanska inokulacija testnih rastlin, saj je časovno in prostorsko zelo zahtevna, ob tem pa nam največkrat ne omogoči natančne identifikacije povzročitelja. Namesto tega se za identifikacijo večinoma uporabljajo hitrejše, občutljivejše v primerjavi z molekularnimi in tehnično manj zahtevne serološke metode (npr. DAS-ELISA) in molekularne metode (npr. IC RT-PCR).

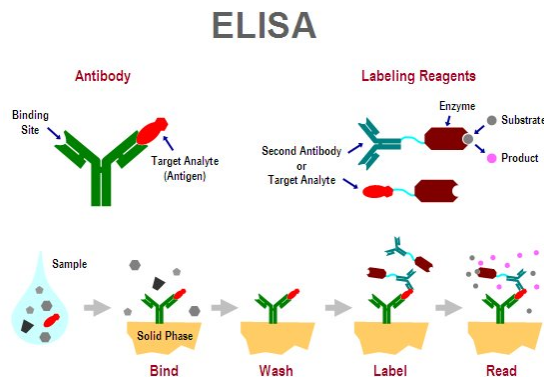
2.7.1 Mehanska inokulacija testnih rastlin z rastlinskim sokom

Ena izmed zamudnejših metod je mehanska inokulacija testnih zelnatih rastlin z rastlinskim sokom, kjer virusno okužbo potrdimo, če se na rastlini razvijejo značilna bolezenska znamenja. Posebej primerna testna rastlina za dokazovanje okužbe z RBDV je *Chenopodium quinoa*, ki 4 dni po inokulaciji razvije značilne lokalne lezije, po 7 dneh pa postane okužba sistemska. Razvijejo se značilna bolezenska znamenja v obliki svetlo in temno zelenih mozaičnih krožnih vzorcev. Poleg *C. quinoa* so za dokazovanje virusne okužbe primerne tudi *C. amaranticolor* in *C. murale* iz rodu *Chenopodium* ter *Phaenolus vulgaris* in *Nicotiana clevelandii* (Barnett in Murant, 1970).

2.7.2 Serološka metoda DAS-ELISA

Metoda dvojnega sendviča ELISA (DAS-ELISA) je najpogosteje uporabljen test za detekcijo in identifikacijo rastlinskih virusov. Metoda je lahko zelo specifična (kar je odvisno od uporabljenih protiteles), relativno hitra in cenovno ugodna.

Virusi v testnem vzorcu se ujamejo in imobilizirajo na specifična protitelesa, ki so adsorbirana na trdno površino, v našem primeru na mikrotitrsko ploščico. Na virus se v naslednjem koraku vežejo sekundarna protitelesa, na katera je vezan encim. Po dodatku substrata za encim poteče encimska reakcija, pri čemer iz substrata z encimsko razgradnjo nastane obarvan produkt, katerega lahko izmerimo spektrofotometrično. Intenziteta nastale barve je odvisna od koncentracije rastlinskega virusa v testnem vzorcu (Clark in Adams, 1977). Za uspešnost testa je potrebna dovolj visoka koncentracija virusa v testnem vzorcu, zato metoda ni primerna za detekcijo nizkih koncentracij virusov v vzorcih. Shematski prikaz metode DAS-ELISA prikazuje slika 5.



Slika 5: Shematski prikaz testa DAS-ELISA (TFOT, 2006)

2.7.3 Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo s predhodno imunsko vezavo (IC RT-PCR)

IC RT-PCR je molekularna metoda za detekcijo in identifikacijo rastlinskih virusov in združuje dve tehniki, ki se pogosto uporabljata v diagnostiki. Tehnika imunske vezave (IC) izkorišča značilnosti protiteles, da specifično prepoznajo in vežejo določeno makromolekulo ali skupino makromolekul. V ta namen lahko uporabljamo monoklonska ali poliklonska protitelesa, odvisno od razpoložljivosti in namena našega dela. Drugi del metode predstavlja PCR, ki je *in vitro* tehnika za pomnoževanje DNA do koncentracije, ki jo je mogoče zaznati. Različica PCR, ki se uporablja v omenjeni tehniki je RT-PCR, saj je v primeru virusnega RNA genoma potrebno najprej RNA prepisati v komplementarno cDNA, ki nato služi kot matrica za podvojevanje v reakciji PCR. Obratno transkripcijo (RT) izvaja reverzna transkriptaza, ki je RNA orientirana DNA polimeraza. Na splošno lahko metodo opišemo v 6 korakih: 1 - drobljenje rastlinskega materiala, 2 - vezava virusa na podlago prekrito s protitelesi, 3 - sprostitvev RNA, 4 - sinteza cDNA, 5 - pomnoževanje DNA, 6 - detekcija (Mulholland, 2009).

Metoda IC RT-PCR je razširjena metoda za potrjevanje virusnih okužb pri rastlinah, saj z uporabo protiteles uspešno zazna in veže rastlinske viruse, prav tako pa z uporabo vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov omogoča natančno identifikacijo virusa v okuženem rastlinskem materialu. Prednost metode pred ostalimi je tudi v tem, da omogoča analizo velikega števila vzorcev brez predhodnega čiščenja virusnih delcev ali virusne RNA, saj sta RNA in reakcija RT-PCR zelo občutljivi na prisotnost nečistoč v testnem vzorcu (Kokko in sod., 1995).

Za dokazovanje okužb z RBDV so Kokko in sodelavci (1995) razvili dve različici metode IC RT-PCR. Pri obeh je najprej potrebno vezati virusne delce na predhodno imobilizirana anti-RBDV protitelesa, v nadaljevanju pa lahko potekata reakciji obratne transkripcije in pomnoževanja nastale cDNA sočasno ali pa ločeno. V obeh primerih je predhodno čiščenje virusnih delcev in RNA nepotrebno. Zaradi hitre izvedbe in specifičnosti metode je za dokazovanje okužb z RBDV metoda IC RT-PCR zelo uporabna.

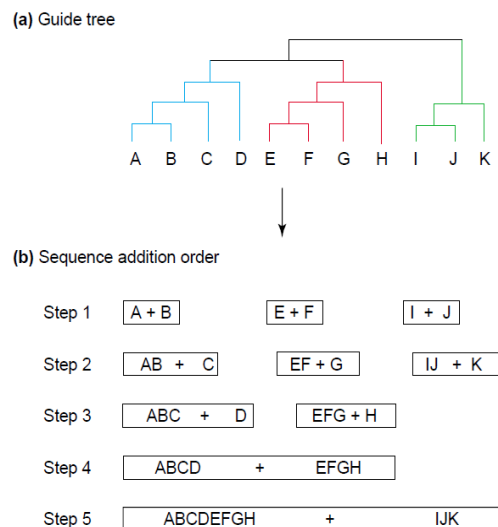
2.8 MOLEKULARNA FILOGENIJA

Molekularna filogenija je veda, ki se ukvarja s preučevanjem evlucijskih odnosov med organizmi na podlagi primarne strukture makromolekul. Prvotno so za preučevanje sorodstvenih odnosov med organizmi uporabljali primarne strukture proteinov (Zuckerland in Pauling, 1965), kasneje, z razvojem metode sekvenciranja nukleinskih kislin (Sanger in sod., 1997) pa se je vse bolj začelo uveljavljati preučevanje evlucijskih odnosov na podlagi strukture nukleinskih kislin.

2.8.1 Filogenetska analiza

Filogenetska analiza je način predstavitve evlucijskega razvoja in sorodstvenih odnosov med organizmi s filogenetskim ali evlucijskim drevesom. Filogenetsko drevo je sestavljeno iz razcepišč in vej, kjer veje povezujejo razcepišča, ki predstavljajo mesta, kjer se dve veji ločita v evlucijski zgodovini. Veje in razcepišča so lahko zunanja ali notranja, pri čemer notranja razcepišča ustrezajo domnevemu zadnjemu skupnemu predniku, zunanja razcepišča pa ustrezajo sekvencam, ki so bile vključene v filogenetsko analizo in jih imenujemo operacijske taksonomske enote. Skupina taksonov, ki pripada isti veji in ima skupnega prednika, ima monofiletski izvor in jo imenujemo klaster (Baldauf, 2003). Rezultate filogenetske analize lahko predstavimo s koreninjenimi ali nekoreninjenimi filogenetskimi drevesi. Nekoreninjeno drevo se imenuje kladogram in prikazuje samo razvejitveni vzorec (topologijo drevesa), dolžine posameznih vej pa nimajo pomena. Kladograme uporabljamo v primerih, ko želimo prikazati le sorodstvene odnose, ne pa tudi poteka evlucijske zgodovine. Koreninjena drevesa poleg sorodstvenih odnosov prikazujejo tudi smer evlucijskega razvoja. Na začetku takšnega drevesa se nahaja korenina, ki predstavlja najstarejšo točko v evluciji (najstarejšega skupnega prednika) in določa vrstni red razvejanja celotnega filogenetskega drevesa. Za izdelavo koreninjenih dreves je potrebno poleg sekvenc, ki jih analiziramo vpeljati tudi zunanjo skupino (ang. outgroup), ki je evlucijsko najbolj oddaljena od vseh drugih predstavnikov.

Prva stopnja molekularne filogenetske analize je poravnava zaporedij (ang. multiple sequence alignment), ki poravnava najbolj homologne dele posameznih zaporedij. Večina modelov poravnave zaporedij temelji na metodi progresivne poravnave zaporedij, pri čemer najprej primerjajo in poravnajo najbolj podobna zaporedja, nato pa progresivno dodajajo drugačna zaporedja. Postopek poravnave zaporedij se začne z izdelavo osnovnega drevesa, ki nato določa vrstni red progresivnega dodajanja ostalih zaporedij in ga prikazuje slika 6 (Baldauf, 2003).



Slika 6: Shematski prikaz poravnave nukleotidnih zaporedij pri filogenetski analizi (Baldauf, 2003)

Po poravnavi zaporedij se za izdelavo filogenetskega drevesa uporabljajo različne metode, ki pri analizi upoštevajo število zamenjav v nukleotidnem ali aminokislinskem zaporedju in pogostost pojavljanja posameznih nukleotidov oz. aminokislin. Delimo jih v dve skupini. V skupino distančnih metod uvrščamo metodo povezovanja sosedov (ang. neighbour joining), ki sta jo razvila Saitou in Nei (1987) in metodo UPGMA (Sokal in Michener, 1958). Med diskretne metode prištevamo metodo največjega verjetja (ang. maximum likelihood), Bayesovo analizo ter metodo varčnosti (ang. maximum parsimony).

Zaradi hitre analize in zmožnosti obdelave velikega števila podatkov se za izdelavo filogenetskih dreves, ki temeljijo na molekularnih podatkih, največkrat uporablja metodo povezovanja sosedov. Metoda temelji na določanju razdalj med posameznimi pari zaporedij, ki so definirane kot odstotek razlik med dvema zaporedjema. Predpostavlja, da so med seboj bolj sorodna zaporedja s krajšo razdaljo. Izračunane razdalje algoritem zapiše v matriko parnih razdalj, ki nato služi kot osnova za izris filogenetskega drevesa (Saitou in Nei, 1987).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČENJE

V Kolekcijskem nasadu jagodičevja Kmetijskega inštituta Slovenije na Brdu pri Lukovici smo nabrali liste malin z rastlin, ki so se v okviru predhodnih raziskav izkazale za okužene z RBDV. Vzorce smo od dneva odzema do nadaljnjih analiz hranili v hladilnici pri 4° C, oziroma v zamrzovalniku na -20 oziroma -80° C. Vzorce vinske trte smo pridobili iz obolelih rastlin v vinogradu v Vinski gori. Vsi vzorci vinske trte izhajajo iz istega vinograda, vendar je izvor rastlinskega materiala vinske trte, ki jo gojijo v vinogradu, zelo različen. Vzorce vinske trte smo hranili do dneva analize pri enakih pogojih kot vzorce malin. V preglednici 1 so zbrani podatki o vzorcih, okuženih z RBDV, ki smo jih uporabili v naših analizah.

Preglednica 1: Seznam vzorcev za primerjavo genske raznolikosti virusa RBDV

Sorta vinske trte oz. vrsta maline	Lokacija
Chardonnay 1	Vinska gora
Chardonnay 2	Vinska gora
Kraljevina 1	Vinska gora
Kraljevina 2	Vinska gora
Modra frankinja 1	Vinska gora
Modra frankinja 2	Vinska gora
Renski rizling 1	Vinska gora
Renski rizling 2	Vinska gora
Šipon 1	Vinska gora
Šipon 2	Vinska gora
Šipon 3	Vinska gora
Zweigelt	Vinska gora
Chilliwack	Brdo pri Lukovici
Divja Dane	Dane
Fall Gold	Brdo pri Lukovici
Rog	Brdo pri Lukovici
Titan	Brdo pri Lukovici

3.2 IC RT-PCR

Rastlinskemu materialu smo dodali ekstrakcijski pufer (pH 8,2) ter ga v vrečkah za pripravo rastlinskih ekstraktov (Bioreba) zdrobili. V 200 µl mikrocentrifugirke, ki so bile predhodno prekrte s protitelesi proti RBDV (Loewe Biochemica) smo dodali ekstrakte iz rastlinskega materiala in jih inkubirali pri 4° C čez noč. Za prepis virusne RNA v komplementarno DNA (cDNA) smo uporabili metodo obratne transkripcije (RT). Po inkubaciji smo mikrocentrifugirke sprali s pufrom za spiranje (pH 7,4) ter destilirano vodo. V tako pripravljene mikrocentrifugirke smo dodali mešanico za RT ter inkubirali 1 uro pri 50° C. Sestava pufrov in vsebina reakcijskih mešanic so navedeni v preglednicah 2, 3 in 4.

Preglednica 2: Sestava ekstrakcijskega pufra

Sestavina	Količina
TRIS	24 g
NaCl	8 g
PVP K25 (Mw 24.000)	20 g
PEG (Mw 6.000)	10 g
NaN ₃	0,2 g
Tween 20	0,5 g

Preglednica 3: Sestava pufra za spiranje

Sestavina	Količina
NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 g

Preglednica 4: Vsebina reakcijskih mešanic za RT

Sestavina	Količina
RNA 1,2 LO	0,5 µl
dH ₂ O	13 µl
RT pufer	5 µl
dNTP	5 µl
M-MLV RT point mutant (Promega)	1 µl
RNasin (RN-azni inhibitor)	0,5 µl

Po končani reakciji RT smo dele genoma z ORF za plaščni in gibalni protein virusa namnožili v reakciji PCR. Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za namnoževanje plaščnega in gibalnega proteina, sestava reakcijskih mešanic in temperaturni program so navedene v preglednicah 5, 6 in 7.

Preglednica 5: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za PCR reakcijo

Par začetnih oligonukleotidov za plaščni protein	Par začetnih oligonukleotidov za gibalni protein
CPUP 5'-CGGTACTGGTGAGGTGTATTT-3'	MPUP 5'-CTGGACATCTCGAGTTTGC-3'
RNA1.2LO 5'-GTTTGCTGAGCAAACCCC-3'	MPLO 5'-CGATTGGTGGAACAGCT-3'

Preglednica 6: Vsebina reakcijske mešanice za PCR reakcijo

Sestavina	Količina
PCR pufer	5 μ l
MgCl ₂	4 μ l
dNTP	1 μ l
dH ₂ O	35/38 μ l
Začetni oligonukleotid 1	0,5 μ l
Začetni oligonukleotid 2	0,5 μ l
Taq DNA polimeraza	1 μ l
cDNA	3 μ l/kolonija
Skupaj	50 μ l

Preglednica 7: Temperaturni program za PCR reakcijo

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija		94° C	5 min
40 ciklov	Denaturacija	95° C	1 min
	Prileganje	55° C	1,5 min
	Podaljševanje	72° C	1,5 min
Zaključno podaljševanje		72° C	10 min

3.3 LIGACIJA POMNOŽKOV PCR V VEKTOR pGEM-T Easy

Za ligacijo PCR pomnožkov v vektor smo uporabili komercialni kit za kloniranje pGEM-T Easy Vector (Promega). Ligacijske mešanice smo inkubirali 16 ur pri 4° C. Poleg ligacijskih mešanic za PCR pomnožke, smo pripravili še ligacijske mešanice za pozitivno in negativno kontrolo, za preverjanje uspešnosti ligacije in transformacije. V preglednici 8 so navedene sestavine za pripravo ligacijskih mešanic.

Preglednica 8: Uporabljeni reagenti in sestava ligacijske mešanice za PCR pomnožek ter pozitivno in negativno kontrolo

Sestavina	Koncentracija	Reakcija s PCR pomnožkom	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
Ligacijski pufer (Promega)	2X	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM-T Easy Vector (Promega)	50 ng/µl	1 µl	1 µl	1 µl
PCR pomnožek	/	1/2/3 µl	/	/
Kontrolni vključek(Promega)	4 ng/µl	/	2 µl	/
T4 DNA ligaza (Promega)	3 U/µl	1 µl	1 µl	1 µl
dH ₂ O	/	2/1/0 µl	1 µl	3 µl
Skupaj	/	10 µl	10 µl	10 µl

3.4 TRANSFORMACIJA REKOMBINIRANIH PLAZMIDNIH VEKTORJEV V KOMPETENTNE BAKTERIJSKE CELICE

Rekombinirane plazmidne vektorje smo transformirali v komercialno pripravljene visokokompetentne celice JM109 (Promega). Ligacijske mešanice smo najprej na kratko centrifugirali in odpipetirali po 2 µl vsake mešanice v 1,5 ml mikrocentrifugirke, ohlajene na ledu. Kompetentne celice smo odtajali na ledu, premešali, k vsaki ligacijski mešanici dodali po 50 µl celic in inkubirali na ledu 20 minut. Nato smo kompetentne celice transformirali s temperaturnim šokom pri 42° C za 45-50 sekund ter jih prenesli nazaj na led za 2 minuti. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 950 µl tekočega LB bujona ter jih inkubirali 90 minut pri 37° C. Med inkubacijo smo transformacijske mešanice večkrat premešali. Po inkubaciji smo po 100 µl mešanic nanesti na selektivna gojišča z ampicilinom, IPTG in x-gal, ki omogočajo ločevanje transformant na podlagi modro-belega testa. Preostanek mešanic smo centrifugirali 10 minut pri 5000 vrt./sek., odstranili 500 µl supernatanta, resuspendirali celice v preostanku supernatanta ter nanesti na selektivna gojišča po 100 µl. Plošče smo inkubirali čez noč pri 37° C.

3.4.1 PCR na osnovi kolonije

Za namnoževanje rekombinantnih plazmidov po transformaciji v kompetentne celice smo uporabili enake vsebine PCR mešanic in temperaturni program kot za namnoževanje cDNA z razliko, da smo v tem primeru v reakcijsko mešanico namesto cDNA dodali kolonijo.

3.5 GOJENJE TEKOČIH KULTUR IN IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA

Transformante v katerih se je DNA s PCR uspešno namnožila, smo najprej precepili na sveža selektivna gojišča in jih inkubirali 16 ur na 37° C. Zrasle kolonije smo nacepili v 5 ml tekočega LB bujona z dodanim Ap (20 g/l LB bujon, 150 mg/l Ap) ter inkubirali na stresalniku čez noč pri 37° C. Iz 4 ml zraslih bakterijskih kultur smo izolirali plazmidno DNA po priloženem protokolu s komercialnim kitom za izolacijo plazmidne DNA (JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit). Velikost in količino izolirane plazmidne DNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

3.5.1 Sestava gojišč

V preglednici je navedena sestava gojišč, ki smo jih uporabili pri transformaciji kompetentnih celic.

Preglednica 9: Sestava gojišč

Vrsta gojišča	Sestava
LB bujon	20 g/l LB bujon
LB agar/Ap/IPTG/X-gal	35 g/l LB agar 150 mg/l Ap 47,6 mg/l IPTG 40 mg/l X-gal

3.6 ELEKTROFOREZA

Uspešnost namnoževanja ustreznih produktov, njihovo velikost in količino smo preverili z elektroforezo na 1 % agaroznem gelu. Za primerjavo ustreznih velikosti PCR pomnožkov smo uporabili velikostno lestvico 100 bp Plus (Fermentas) oziroma 10 kb lestvico Mass Ruler (Fermentas).

3.7 OBDELAVA SEKVENC Z BIOINFORMACIJSKIMI ORODJI

Izolirane plazmidne DNA so nam sekvencirali s SP6 in T7 začetnima oligonukleotidoma (Macrogen). Identiteto tako dobljenih nukleotidnih zaporedij smo preverili z blast-n in blast-x algoritmoma (NCBI). Nukleotidna zaporedja plaščnega in gibalnega proteina smo sestavili v programu BioEdit (Hall, 1999), za nadaljnje analize pa smo uporabili le kodirajoče dele zaporedij. Vsa zaporedja, ki smo jih pridobili za posamezno rastlino vinske trte oz. maline smo s programom Cap contig v programskem paketu BioEdit združili v konsenzno zaporedje ter ga v nadaljevanju obravnavali kot eno zaporedje. Nukleotidna zaporedja smo poravnali v programu Clustal X. Za izdelavo filogenetskih dreves smo uporabili metodo povezovanja sosedov (neighbour-joining). Rekonstrukcijo dreves smo izvedli z metodo bootstrap s 1000 ponovitvami. Izdelavo in rekonstrukcijo dreves smo izvedli v programu Mega 4 (Tamura in sod., 2007). Enak postopek smo uporabili za izdelavo filogenetskih dreves na podlagi aminokislinskih zaporedij, pri čemer smo nukleotidna zaporedja predhodno v programu BioEdit prevedli v aminokislinska. Pri izdelavi filogenetskih dreves smo za primerjavo z našimi zaporedji za plaščne proteine uporabili nukleotidna in aminokislinska zaporedja iz prejšnjih študij. Kot filogenetsko najbolj oddaljeno skupino, smo za primerjavo uporabili zaporedje aminokislinske, pridobljeno iz maline *Rubus multibracteatus*.

V preglednici 10 so navedeni podatki o številu sekvenc, ki smo jih vključili v analizo, v preglednici 11 pa o objavljenih nukleotidnih zaporedjih, ki smo jih uporabili za primerjavo z našimi.

Preglednica 10: Število sekvenc, uporabljenih za filogenetsko analizo

Sorta vinske trte oz. maline	Plašni protein	Gibalni protein
Chardonnay 1	4	5
Chardonnay 2	2	5
Kraljevina 1	5	1
Kraljevina 2	0	5
Modra Frankinja 1	3	4
Modra Frankinja 2	2	1
Renski Rizling 1	0	3
Renski Rizling 2	5	5
Šipon 1	5	0
Šipon 2	4	2
Šipon 3	0	5
Zweigelt	4	4
Chilliwack	4	3
Dane	3	5
Fall Gold	5	1
Rog	1	1
Titan	5	1

Preglednica 11: Objavljene sekvence RBDV iz prejšnjih študij (Valasevich in sod., 2011; Mavrič Pleško in sod., 2009; Natsuaki in sod., 1991)

Izolat	Gostitelj	Država porekla	GenBank oznaka	Gen
BY 1	<i>Rubus Idaeus</i>	Belorusija	FR687354	CP MP
BY 3	<i>Rubus Idaeus</i>	Belorusija	FR687355	CP MP
BY 8	<i>Rubus Idaeus</i>	Belorusija	FR687350	CP MP
BY 22	<i>Rubus Idaeus</i>	Belorusija	FR687357	CP MP
CmGR-2	<i>Vitis vinifera</i>	Slovenija	EU796090	CP MP
CmRR-1	<i>Rubus idaeus</i>	Slovenija	EU796089	CP MP
Can S	<i>Rubus idaeus</i>	Kanada	AF259798	CP
D 1	<i>Rubus idaeus</i>	UK	AF259796	CP
D 200	<i>Rubus idaeus</i>	UK	AF259795	CP
GR-2	<i>Vitis vinifera</i>	Slovenija	EU796087	CP MP
GR-4	<i>Vitis vinifera</i>	Slovenija	EU796086	CP MP
GR-6	<i>Vitis vinifera</i>	Slovenija	EU796085	CP MP
RBDV RNA 2	<i>Rubus Idaeus</i>	UK	NC_003740	CP MP
<i>R. multibracteatus</i>	<i>Rubus multibracteatus</i>	Kitajska	DQ120126	CP MP
RR-1	<i>Rubus idaeus</i>	Slovenija	EU796088	CP MP
R 15	<i>Rubus idaeus</i>	UK	D01052	CP
SE 3	<i>Rubus idaeus</i>	Švedska	FR687358	CP MP
Z 13 a	<i>Rubus idaeus</i>	Finska	AY894678	CP
Z 13 b	<i>Rubus idaeus</i>	Finska	AY894679	CP

4 REZULTATI

V okviru diplomske naloge smo pridobili in analizirali nukleotidna ter aminokislinska zaporedja za plaščni in gibalni protein RBDV iz šestih sort vinske trte, treh gojenih sort malin ter dveh avtohtonih slovenskih malin. Že na podlagi rezultatov predhodnih raziskav smo pričakovali, da se bodo pokazale precejšnje razlike med virusi iz malin in trte, medtem ko bodo razlike znotraj vrste majhne. Predvidevali smo tudi, da bodo zaporedja iz različnih rastlin za posamezno sorto maline oz. vinske trte med seboj zelo podobna ali celo enaka. Ker smo imeli pri pridobivanju zadostnega števila klonov pri nekaterih rastlinah težave smo se odločili, da bomo analizirali od ena do pet zaporedij za vsako rastlino. Pri analizi smo ugotovili, da tudi med zaporedji iz rastline iste sorte prihaja do manjših razlik. Zato rezultati prikazani v nadaljevanju dobro opišejo gensko raznolikost RBDV v vinski trti in malinah, saj smo med seboj primerjali skupno 52 klonov. V primerih, kjer sta bili analizirani le eno ali dve zaporedji na rastlino, pa ta ne odražajo zanesljivo najpogosteje prisotnega zaporedja v tisti rastlini, saj bi bilo potrebno med seboj primerjati več zaporedij.

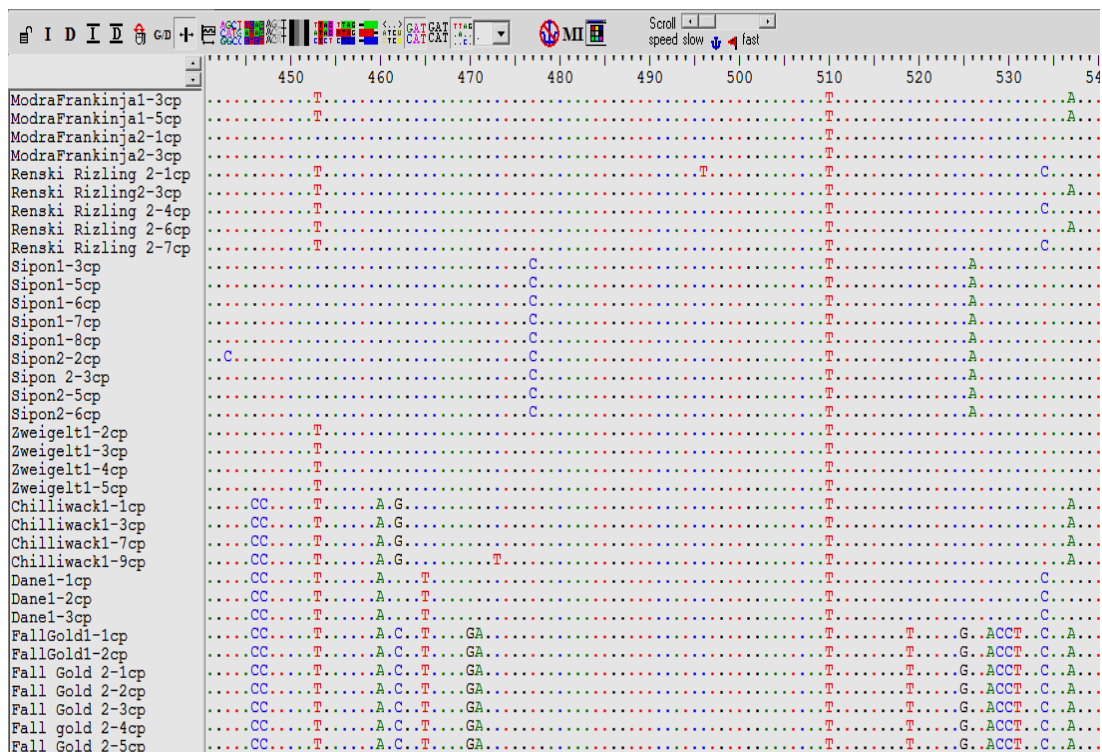
Pri analizi nukleotidnih zaporedij plaščnega in gibalnega proteina RBDV smo ugotovili, da razlike, ki se pojavljajo v nukleotidnih zaporedjih razdelijo le-ta v dve jasno ločeni skupini glede na gostitelja. V eno skupino lahko uvrstimo vsa zaporedja iz malin, v drugo pa zaporedja iz vinske trte, saj se na različnih mestih v zaporedjih kažejo razlike, ki so značilne le za posamezno vrsto gostitelja. Kljub temu, da obstaja veliko razlik v nukleotidnih zaporedjih obeh skupin pa smo pri analizi aminokislinskih zaporedij ugotovili, da večina teh zamenjav nukleotidov ne privede do sprememb v aminokislinski sestavi plaščnega in gibalnega proteina.

4.1 ANALIZA NUKLEOTIDNIH IN AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ PLAŠČNEGA PROTEINA RBDV

Pri primerjavi nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij plaščnega proteina RBDV smo ugotovili, da se na posameznih mestih zaporedja iz sort Chardonnay, Modra Frankinja 2 ter obeh rastlin Šipona razlikujejo od ostalih sort vinske trte, vendar gre v skoraj vseh primerih za spremembe, ki ne privedejo do zamenjave aminokislina v proteinu. V drugo ločeno skupino lahko glede na podobnost zaporedij uvrstimo zaporedja iz sort Kraljevina in Zweigelt. Med omenjenima zaporedjema smo prešteli 5 razlik v nukleotidnem zaporedju, vendar le ena razlika od petih privede tudi do zamenjave aminokislina v plaščnem proteinu. V manjši meri se v genski sestavi od ostalih sort vinske trte ločijo tudi zaporedja iz rastlin Šipona, ki so zelo podobna zaporedjem Modre frankinje 2 ter Chardonnaya, kot smo že omenili, nekaj posebnosti pa jih loči tudi od vseh ostalih zaporedij. Pri primerjavi zaporedij iz rastlin Šipona z ostalimi zaporedji smo prešteli štiri razlike, vendar le dve od teh privedeta do zamenjave aminokislina. Ugotovili smo tudi, da so zaporedja iz rastlin Chardonnay 1 in Chardonnay 2 identična, enako pa velja tudi za zaporedja iz rastlin Šipon 1 in Šipon 2.

Zaporedja CP malin so med seboj zelo podobna, v primeru malin Chilliwack in Titan pa smo ugotovili, da sta zaporedji celo identični. Nukleotidnima zaporedjema omenjenih sort malin je v 97 odstotkih podobno tudi zaporedje maline Rog. Glede na nukleotidno zaporedje se od ostalih sort najbolj loči malina Fall Gold, ki izstopa od ostalih in v primerjavi z ostalimi zaporedji malin kaže le od 86,9 do 88,7 odstotno podobnost. V nukleotidnem zaporedju za plaščni protein smo opazili 94 razlik, ki ločijo to sorto od vseh ostalih, za Fall Gold pa je značilno tudi, da se od ostalih analiziranih sort razlikuje tudi v seroloških značilnostih.

Slika 7 prikazuje del poravnave nukleotidnih zaporedij plaščnega proteina RBDV, kjer so predstavljene zgoraj omenjene razlike.



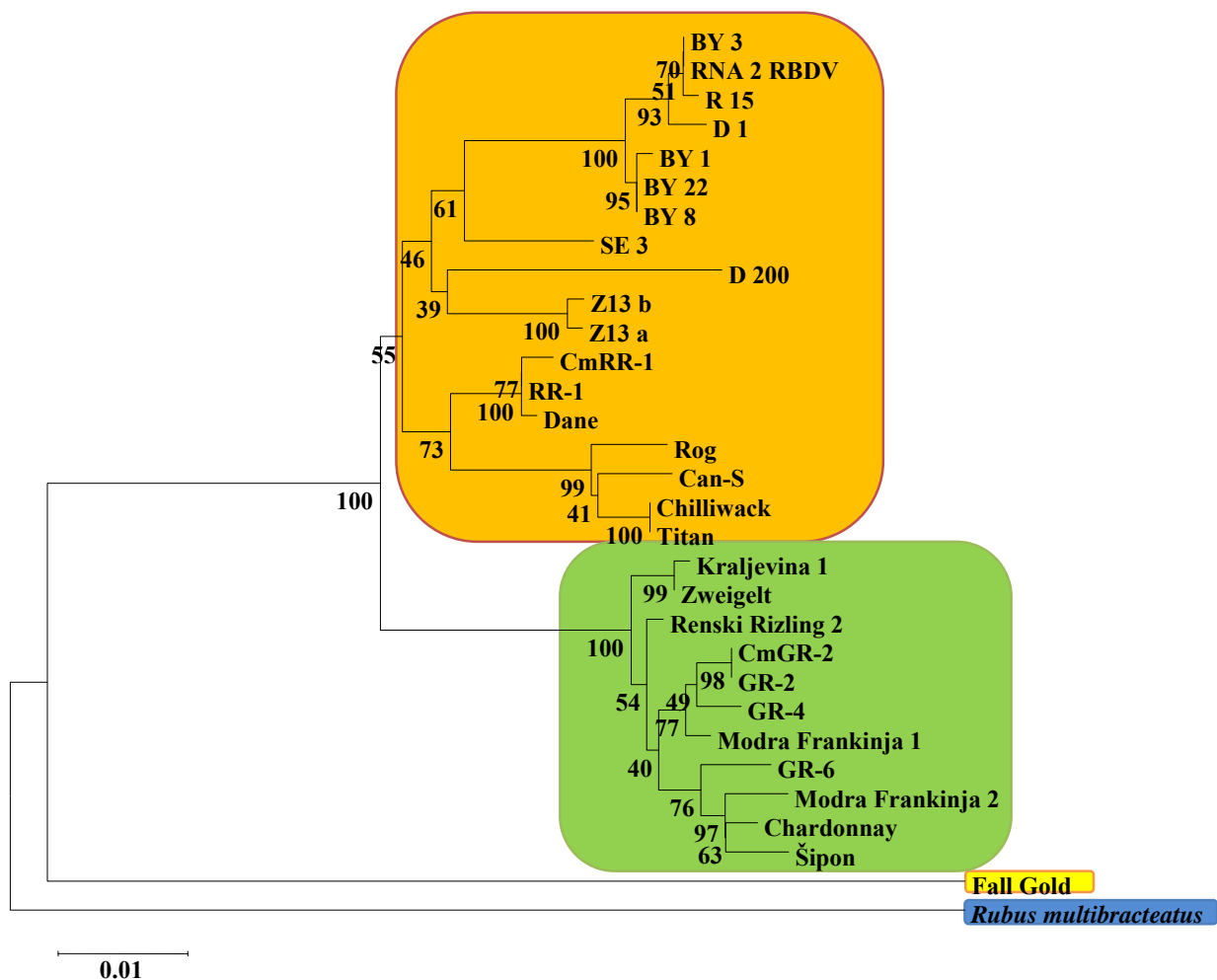
Slika 7: Prikaz dela nukleotidnih zaporedij za plaščni protein RBDV v programu BioEdit

Za lažjo obdelavo in preglednejšo predstavitev podatkov smo v nadaljevanju analize združili nukleotidna zaporedja pridobljena iz vsake rastline v eno zaporedje, in sicer s programom Cap contig, ki je del programskega paketa BioEdit. V kolikor so bila zaporedja iz večih rastlin iste sorte enaka, smo jih prav tako združili v eno zaporedje in ga obravnavali samostojno (Chardonnay 1 in Chardonnay 2 ter Šipon 1 in Šipon 2). Da bi ugotovili koliko mutacij v nukleotidnem zaporedju privede tudi do spremembe v aminokislinskem zaporedju, smo prešteli vse razlike v nukleotidnih in aminokislinskih zaporedjih za vsak par zaporedij oz. rastlin posebej. V preglednici 12 so predstavljeni podatki o vseh razlikah, pri čemer zgornja številka pomeni število razlik v nukleotidnem zaporedju, spodnja pa število razlik v aminokislinskem zaporedju za posamezni par zaporedij.

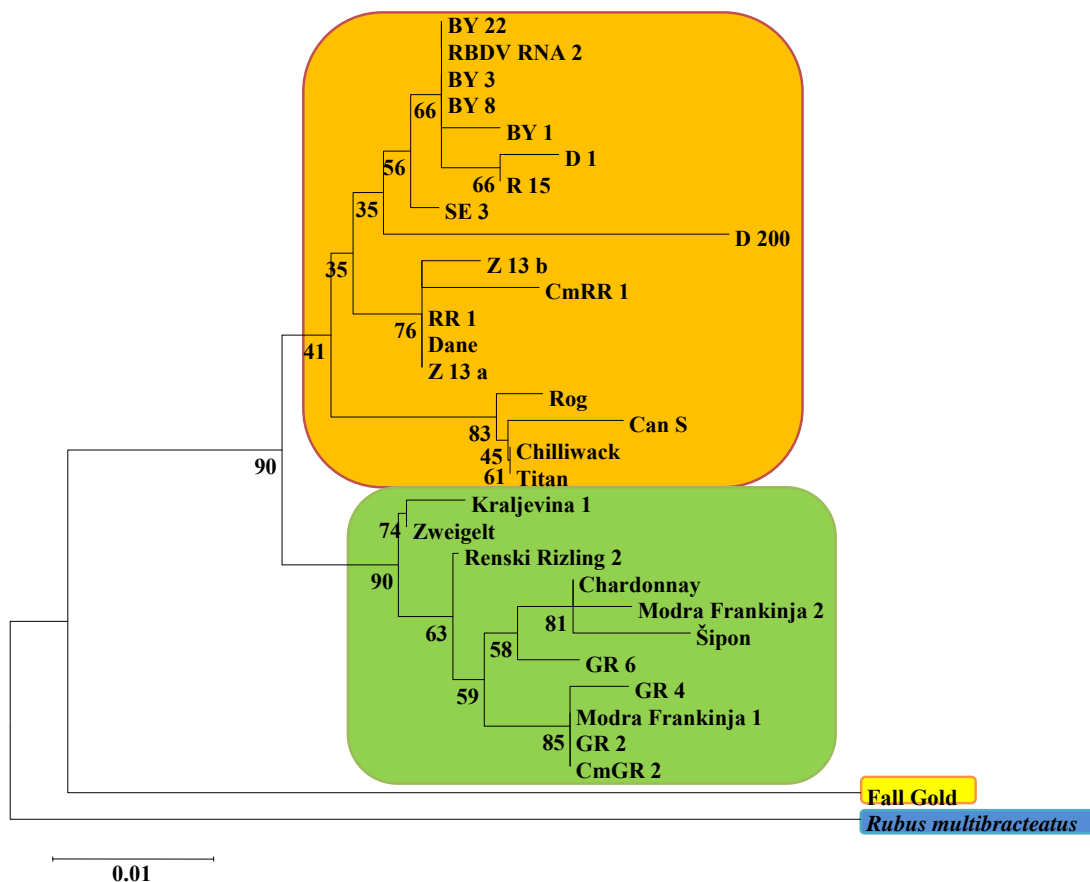
Preglednica 12: Število razlik v nukleotidnih in aminokislinskih zaporedjih plaščnega proteina RBDV

	CH	KR 1	MF 1	MF 2	RR 2	ŠI	ZG	CW	DA	FG	Rog
KR 1	10/4										
MF 1	10/3	11/4									
MF 2	6/1	12/5	12/4								
RR 2	7/2	7/2	6/2	9/3							
ŠI	6/2	12/6	12/5	8/3	9/4						
ZG	9/3	1/1	10/3	11/4	6/1	11/5					
CW	41/9	37/7	38/9	43/10	36/7	43/11	36/6				
DA	34/8	30/6	33/8	36/9	27/6	36/10	29/5	19/3			
FG	106/23	103/22	98/22	108/24	100/22	108/25	102/21	92/20	88/19		
Rog	42/9	38/7	41/9	44/10	35/7	44/11	37/6	9/1	18/4	93/21	
TI	41/9	37/7	38/9	43/10	36/7	43/11	36/6	0/0	19/3	92/20	9/1

V nadaljevanju analize smo izrisali tudi filogenetski drevesi, ki prikazujeta stopnjo raznolikosti posameznih nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij in s tem gensko raznolikost RBDV na nivoju plaščnega proteina. Za primerjavo z našimi zaporedji smo vključili tudi do sedaj objavljena zaporedja iz prejšnjih študij. Kot zunanjo skupino smo za primerjavo uporabili gensko najbolj drugačno zaporedje iz istega rodu, pridobljeno iz kitajskega izolata iz gostitelja *Rubus multibracteatus*. Dolžine vodoravnih črt so odvisne od števila razlik v nukleotidnih oz. aminokislinskih zaporedjih posameznih izolatov. Filogenetski drevesi sta bili izrisani z metodo povezovanja sosedov s 1000 bootstrap ponovitvami.



Slika 8: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij plaščnega proteina RBDV



Slika 9: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi aminokislinskih zaporedij plaščnega proteina RBDV

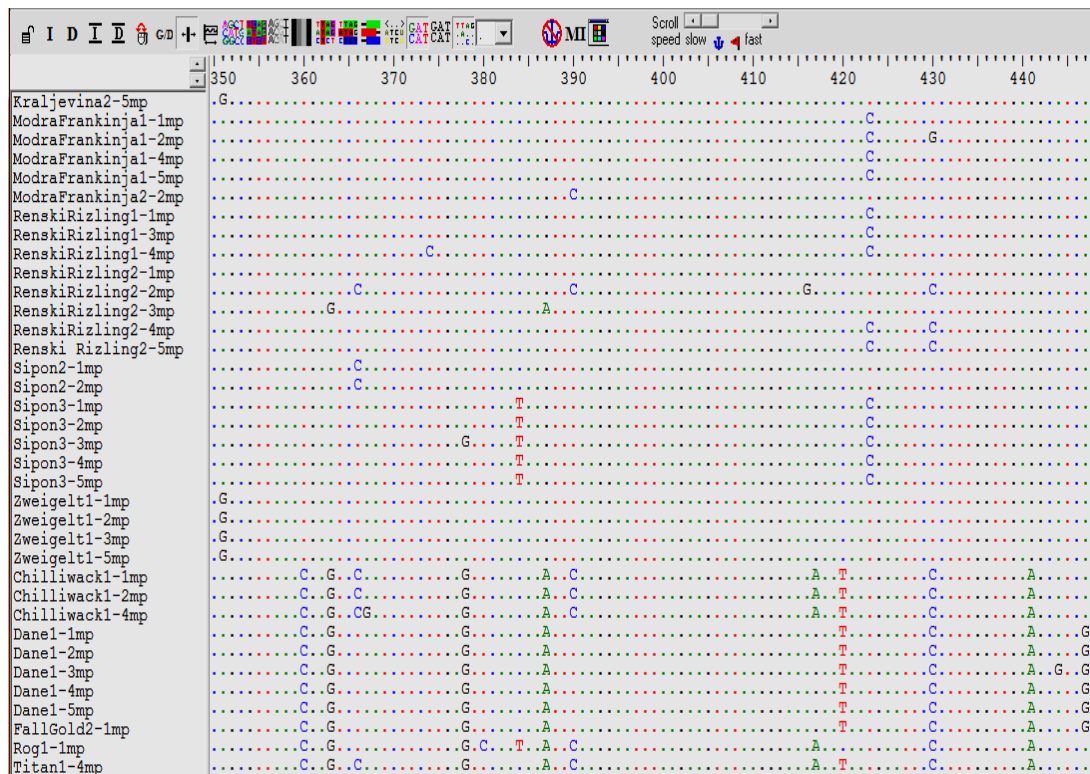
4.2 ANALIZA NUKLEOTIDNIH IN AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ GIBALNEGA PROTEINA RBDV

Pri analizi nukleotidnih zaporedij za gibalni protein RBDV smo ugotovili, da se med posameznimi zaporedji pojavlja manj razlik kot pri zaporedjih za plaščni protein. Poleg tega, da gre skupno za bolj homogeno skupino, pa v primerjavi s plaščnim proteinom tudi manjše število mutacij, ki se pojavljajo, privede do spremembe v aminokislinskem zaporedju oz. je to število skoraj zanemarljivo. Prav tako kot pri zaporedjih plaščnega proteina, lahko tudi zaporedja gibalnega proteina glede na sestavo razdelimo v dve skupini. V prvo skupino lahko združimo zaporedja malin, v drugo pa zaporedja vinske trte. Zaporedja iz malin so si med seboj zelo podobna, nadalje pa jih lahko razdelimo v dve

skupini. Višjo stopnjo podobnosti na eni strani predstavljajo zaporedja iz malin Chilliwack, Rog in Titan, pri katerih se pojavlja nekoliko več razlik z ostalimi malinami kot tudi z vinsko trto. Od vseh malin najbolj odstopa zaporedje iz maline Chilliwack. Kljub razlikam, pa gre v skoraj vseh primerih za tihe mutacije, ki ne povzročijo sprememb v aminokislinskem zaporedju, oz. sta taki le dve od desetih.

Pri drugi skupini zaporedij, ki združuje vsa zaporedja iz vinske trte smo opazili, da se tudi znotraj teh zaporedij oblikujejo posamezne skupine. Med seboj so bolj podobna zaporedja iz sort Kraljevina in Zweigelt, v drugo skupino pa lahko uvrstimo zaporedja iz sort Modra Frankinja 1, Renski Rizling 1 ter Šipon 3. Večina razlik tudi v omenjenih skupinah ne privede do sprememb v aminokislinskem zaporedju.

Slika 10 prikazuje del poravnave nukleotidnih zaporedij gibalnega proteina RBDV, kjer so predstavljene zgoraj omenjene razlike.



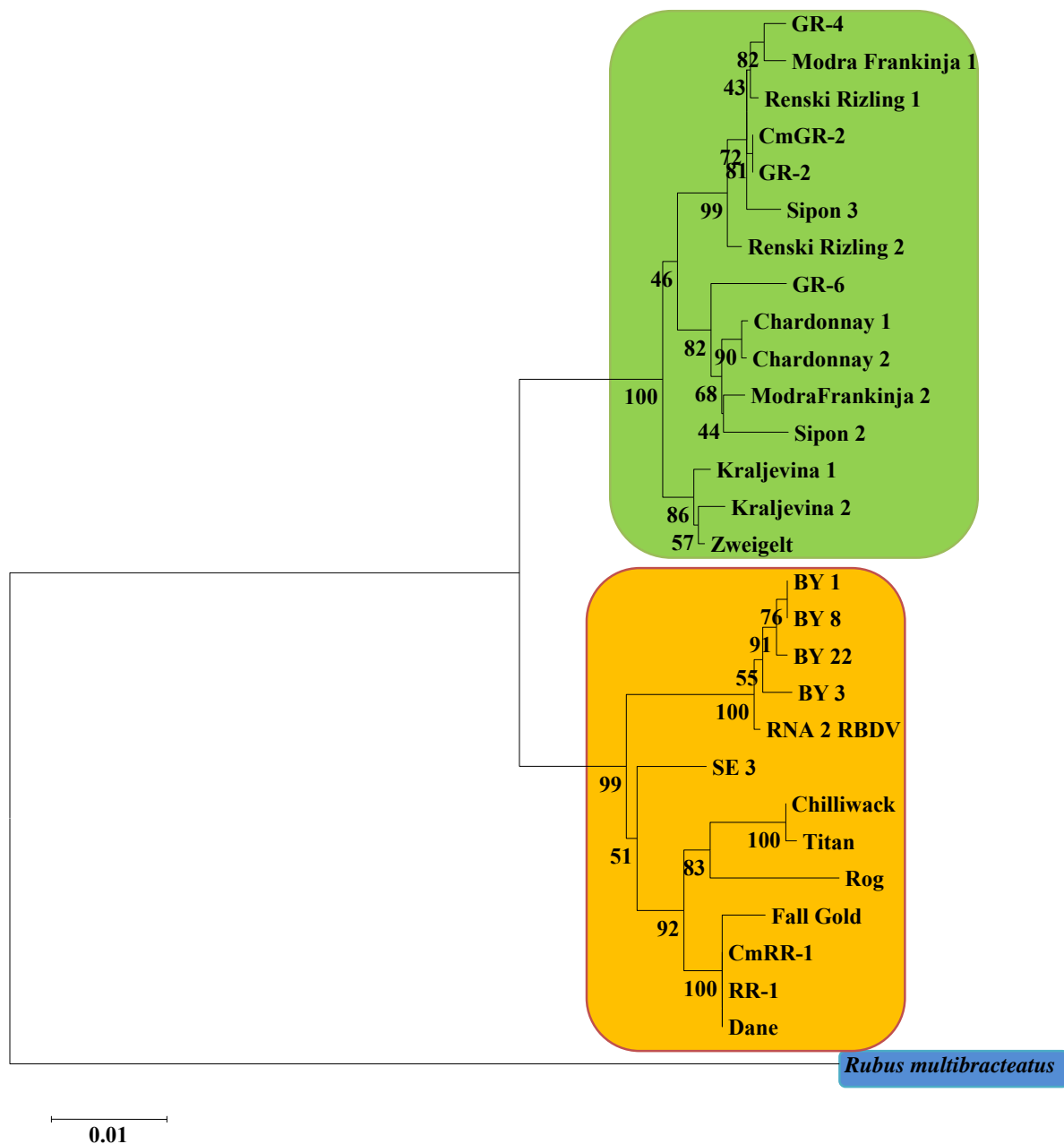
Slika 10: Prikaz dela nukleotidnih zaporedij za gibalni protein RBDV v programu BioEdit

Za ugotavljanje koliko razlik povzroči spremembo v sestavi proteina smo tudi za zaporedja gibalnega proteina RBDV prešteli število razlik med pari nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij. Podatki so zbrani v preglednici 13.

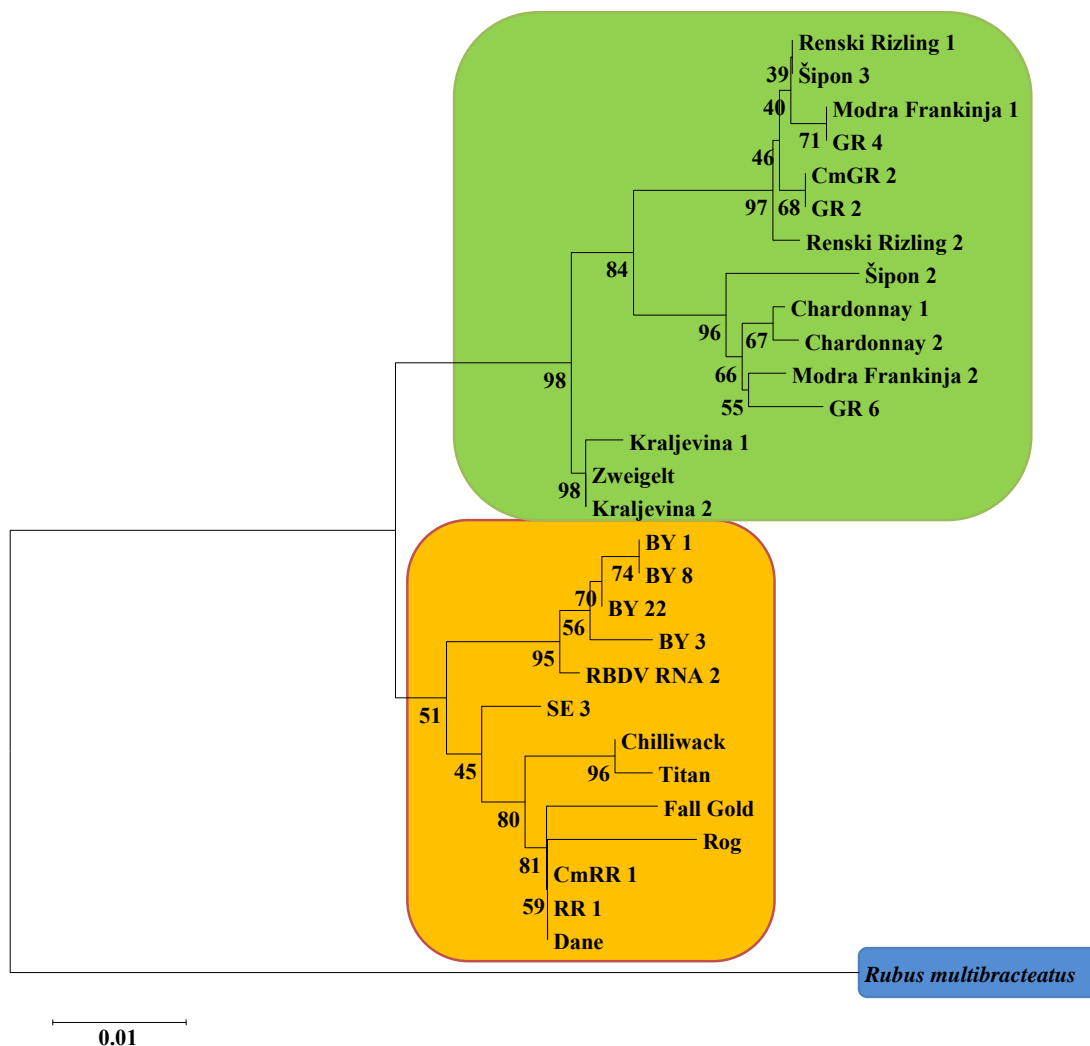
Preglednica 13: Število razlik v nukleotidnih in aminokislinskih zaporedjih globalnega proteina RBDV

	CH1	CH2	KR1	KR2	MF1	MF2	RR1	RR2	ŠI2	ŠI3	ZG	CW	DA	FG	Rog
CH2	1/1														
KR1	11/7	12/8													
KR2	14/6	15/7	5/1												
MF1	15/9	16/10	14/8	17/7											
MF2	4/2	5/3	11/7	14/6	15/9										
RR1	13/8	14/9	12/7	15/6	4/1	13/8									
RR2	13/9	14/10	12/8	15/7	6/2	13/9	4/1								
ŠI2	8/5	9/6	15/9	18/8	19/11	8/5	17/10	17/11							
ŠI3	15/8	16/9	14/7	17/6	6/1	15/8	4/0	6/1	19/10						
ZG	11/6	12/7	2/1	3/0	14/7	11/6	12/6	12/7	15/18	14/6					
CW	47/16	46/16	44/13	45/12	50/17	45/16	46/16	44/15	49/18	50/16	44/12				
DA	40/15	39/15	37/10	38/9	43/16	40/15	39/15	37/14	44/17	43/15	37/9	13/3			
FG	44/18	43/18	41/13	42/12	47/19	44/18	43/18	41/17	48/19	47/18	41/9	17/6	4/3		
Rog	52/19	51/19	49/14	50/13	55/20	50/19	51/19	49/18	56/21	53/19	49/13	19/7	18/4	22/7	
TI	48/17	47/17	45/14	46/13	51/18	46/17	47/17	45/16	50/19	51/17	45/13	1/1	14/4	18/7	20/8

V nadaljevanju analize smo izrisali tudi filogenetski drevesi na podlagi nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij gibalnega proteina RBDV. Parametri, uporabljeni za analizo so enaki kot pri filogenetskih drevesih za plaščni protein.



Slika 11: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij gibalnega proteina RBDV



Slika 12: Filogenetsko drevo izdelano na podlagi aminokislinskih zaporedij gibalnega proteina RBDV

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Virus razraščanja in pritlikavosti malin (RBDV) uvrščamo v rod *Idaeovirus* in predstavlja edino znano vrsto tega rodu. Naravni gostitelj virusa so vrste iz rodu *Rubus*, vendar lahko okuži tudi druge vrste iz 12 različnih družin. Leta 2003 so v Sloveniji potrdili prvo okužbo z RBDV na vinski trti, kasneje pa so virus na vinski trti odkrili tudi v Srbiji. Ker je najdba RBDV na vinski trti razmeroma nova, je do sedaj o genski raznolikosti virusa znano le malo. V okviru nadaljnjih raziskav o okuženosti malin in vinske trte v Sloveniji ter genski raznolikosti virusa, ki okužuje omenjena gostitelja, smo v okviru diplomske naloge testirali šest sort vinske trte, tri sorte gojenih malin ter dve vrsti avtohtonih slovenskih malin.

V seroloških testiranjih, ki so jih predhodno opravili na Kmetijskem inštitutu Slovenije so ugotovili, da se vsi izolati virusa, ki so bili najdeni na vinski trti serološko ne razlikujejo med seboj. Prav tako so bili serološko enaki vsi virusi iz malin, razen virusa iz gojene maline cv. Fall Gold (Mavrič Pleško I., Serološke značilnosti RBDV, januar 2010). V okviru diplomske naloge smo rezultate testa DAS-ELISA potrdili tudi z uporabo metode IC RT-PCR.

Za določanje genske raznolikosti RBDV smo namnožili gene za plaščni in gibalni protein virusa. Za vsako rastlino smo analizirali do pet nukleotidnih zaporedij. Predvidevali smo, da bodo zaporedja iz ene rastline enaka, vendar se je pri analizi izkazalo, da tudi znotraj posamezne skupine zaporedij lahko prihaja do razlik. Ker so se zaporedja, ki smo jih pridobili iz ene rastline v nekaterih primerih razlikovala med seboj, smo jih s programom Cap-contig v okviru programskega paketa BioEdit združili v eno zaporedje, pri čemer program kot rezultat poda zaporedje, ki na določenem mestu vsebuje nukleotide, ki se v vseh obravnavanih zaporedjih največkrat ponovijo. Za vsako sorto malin oz. vinske trte smo tako pridobili po eno zaporedje, ki smo ga uporabili za nadaljnjo analizo. Pri razlagi

rezultatov je potrebno upoštevati, da lahko o dejanski genski sestavi analiziranih zaporedij govorimo le v primerih, ko je bilo analiziranih štiri ali pet zaporedij, saj za primere, ko imamo le po eno zaporedje ne moremo z gotovostjo trditi, da so to zaporedja, ki v tisti rastlini prevladujejo.

Pri analizi nukleotidnih zaporedij za plašni in gibalni protein smo ugotovili, da zaporedja za maline in vinsko trto kažejo visoko stopnjo podobnosti, kar potrjuje našo hipotezo, saj gre za isti virus. Ugotovili smo tudi, da znotraj obeh skupin zaporedja kažejo določeno stopnjo razlik, ki pa so bolj pogosta pri zaporedjih za plašni protein. Ker je za sposobnost virusa za okužbo odgovoren plašni protein (McFarlane in McGavin, 2009), se rezultati skladajo s pričakovanji, saj se je moral virus za uspešno okužbo tako določenega gostitelja kot tudi sorte evolucijsko spreminjati. Prav tako smo ugotovili, da razlike v zaporedjih za plašni protein privedejo do več sprememb v aminokislinskem zaporedju, kar dokazuje, da se plašni proteini res bolj razlikujejo od gibalnih proteinov RBDV v posameznih sortah vinske trte in malin. Medtem ko zaporedja za plašni protein kažejo večjo stopnjo razlik, so si zaporedja za gibalni protein med malinami in vinsko trto bolj podobna, kar je morda posledica podobnih mehanizmov za premikanje virusa po rastlini, poleg tega pa o večji homogenosti skupine gibalnih proteinov pričajo tudi rezultati o aminokislinskih zaporedjih gibalnih proteinov, saj le posamezne razlike v nukleotidnih zaporedjih privedejo do sprememb aminokislin v proteinu.

Iz preglednic 12 in 13 je razvidno, da spremembe v nukleotidnih zaporedjih privedejo do večjega števila zamenjav aminokislin pri vinski trti kot pri malinah, kar je najbrž posledica hitrejšega evolucijskega razvoja virusa zaradi prilagajanja novemu gostitelju.

Ugotovili smo tudi, da je pri vinski trti mogoče opaziti večje razlike med posameznimi sortami kot pri malinah, kar pa najbrž lahko razložimo z dejstvom, da je sadilni material izhajal iz različnih lokacij.

Rezultati seroloških testov, ki so jih predhodno opravili na Kmetijskem inštitutu Slovenije so pokazali, da se RBDV iz maline Fall Gold razlikuje od virusov v ostalih malinah. To smo potrdili tudi z analizo nukleotidnih zaporedij plaščnega proteina ki je potrdila, da se RBDV iz maline Fall Gold močno razlikuje od vseh ostalih izolatov.

Pri analizi filogenetskih dreves smo ugotovili, da naši izolati med seboj kažejo večjo stopnjo sorodnosti v primerjavi z ostalimi izolati, kar je najbrž posledica istega geografskega izvora sadilnega materiala. Ugotovili smo tudi, da izolatov na osnovi nukleotidnih oz. aminokislinskih zaporedij RNA 2 ne moremo jasno razdeliti v skupine S, RB in B izolatov, saj so med seboj preveč podobni. Nekoliko jasneje ločene skupine so razvidne pri plaščnem proteinu, za katerega smo že prej ugotovili, da se znotraj zaporedij oblikujejo posamezne skupine, ki med seboj kažejo večjo stopnjo sorodnosti. V primeru plaščnega proteina se tudi iz filogenetske analize kaže, da se izolat iz maline Fall Gold močno loči od vseh ostalih izolatov.

V okviru diplomske naloge smo potrdili naše domneve, da bodo izolati iz vinske trte sorodni izolatom iz malin, saj gre za isti virus, vendar bodo zaradi posameznih razlik tvorili dve jasno ločeni liniji, znotraj katerih se bodo oblikovale posamezne skupine, ki pa bodo med seboj kazale visoko stopnjo sorodnosti.

5.2 SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo dokazali, da so izolati RBDV pridobljeni iz malin sorodni z izolati iz vinske trte, vendar se med seboj do določene stopnje razlikujejo v nukleotidni in aminokislinski sestavi genov za plaščni in gibalni protein. Pokazali smo tudi, da so izolati iz malin v nukleotidni in aminokislinski sestavi med seboj bolj podobni in da glede na izolate iz vinske trte oblikujejo ločeno skupino. Prav tako izolati iz vinske trte med seboj kažejo večjo stopnjo sorodnosti v primerjavi z izolati iz malin. Iz filogenetske analize je razvidno, da imajo izolati iz obeh gostiteljev isto gensko osnovo, vendar je v poteku evolucije pri izolatih iz vinske trte prišlo do sprememb v genskem zapisu, ki danes ločijo le-te v svojo skupino. Iz rezultatov je razvidno tudi, da mutacije v nukleotidnem zaporedju povzročijo več zamenjav aminokislin pri izolatih iz vinske trte kot pri izolatih iz malin, kar nakazuje na to, da je skupina izolatov iz malin bolj homogena.

6 POVZETEK

Virus razraščanja in pritlikavosti malin (RBDV) uvrščamo v rod *Idaeovirus* in predstavlja edino znano vrsto tega rodu. Virusni delci so brez ovojnice, izometrične oblike in v premeru merijo 33 ali 15 nm. Naravni gostitelj virusa so vrste iz rodu *Rubus*, vendar lahko okuži tudi druge vrste iz 12 različnih družin. RBDV se prenaša preko peloda in semen ter z mehansko inokulacijo rastlin. Zaradi podobnosti v načinu prenosa, izgledu in podobnosti virusnega genoma z genomom ilarvirusov iz družine *Bromoviridae*, znanstveniki predlagajo, da bi virus uvrstili v družino *Bromoviridae*.

Genom RBDV je bipartitni in je sestavljen iz dveh enoverižnih pozitivno orientiranih RNA molekul. RNA-1 molekula kodira multifunkcionalni protein za podvojevanje virusa in vsebuje gene za metiltransferazo, helikazo in polimerazo. Na RNA-2 molekuli se nahajajo geni za plaščni in gibalni protein virusa, zaradi česar je RNA-2 odgovorna za nastanek proteinov, ki zagotavljajo virusu obliko in omogočajo premikanje virusa po okuženem tkivu. RNA-3 predstavlja subgenomsko RNA, ki izhaja iz RNA-2 in vsebuje zapis za plaščni protein virusa, vendar le-ta ne služi kot matrica za prepisovanje. Vloga te molekule do sedaj še ni dobro raziskana, vendar bi naj pripomogla k večji infektivnosti virusa.

Obstajajo tri skupine izolatov virusa RBDV, ki se med seboj razlikujejo po seroloških značilnostih in infektivnosti. Naravni ali S izolat je reprezentativen in povzroča značilne bolezenske znake na testnih zelnatih rastlinah in občutljivih kultivarjih malin. RB izolati se serološko ne razlikujejo od S izolatov, vendar v nasprotju z njimi okužujejo tudi kultivarje, ki so odporni na S izolat. Serološko najbolj drugačen je izolat B, ki se razlikuje tako od S kot od RB izolatov. Za B izolate je značilno, da jih je težko ohraniti v kulturi in imajo nižjo specifično infektivnost.

RBDV povzroča tri znane bolezni malin. V mešani okužbi RBDV povzroča ti. »bushy dwarf disease«, ki se odraža kot pritlikavost rastlin, prekomerno namnoževanje poganjkov in nagnjenost k jesenski rodnosti. Virus lahko povzroča tudi rumenenje listov, ki se najprej pokaže kot rumenenje glavne listne žile, nato pa se razširi tudi na stranske žile ali celotno površino lista. Na listih se lahko pojavljajo klorotični obroči ali linijski vzorci. Okužba z RBDV povzroča tudi bolezen, ki se kaže v nepravilnih oblikah in deformaciji plodov, za okužbe pa je značilna tudi zmanjšana aroma, zvijanje in odpadanje listov ter nekroza.

Za dokazovanje okužbe z virusom RBDV poznamo več različnih metod. Zamudnejša in tehnično težje izvedljiva je mehanska inokulacija testnih rastlin, ki kot dokaz okužbe razvijejo značilne bolezenske znake. V zadnjem času se v laboratorijih vse bolj uporablja predvsem hitrejše metode za dokazovanje okužb, kot sta ELISA in IC-RT-PCR. Obe metodi sta zelo specifični, saj temeljita na serološki prepoznavi antigenov, ki so značilni za RBDV. Prednost metode IC-RT-PCR pred ELISA testom je v tem, da lahko z njo zaznamo tudi nižje koncentracije virusa v testnem vzorcu.

Leta 2003 so na vinski trti sorte Laški rizling odkrili bolezenska znamenja, ki so kazala na okužbo z RBDV. Rastlinski material so testirali na prisotnost virusa in okužbo tudi potrdili. Kasneje so potrdili okužbo z RBDV tudi na drugih sortah vinske trte tako v Sloveniji kot tudi v Srbiji, kar uvršča vinsko trto poleg vrst iz rodu *Rubus* med naravne gostitelje RBDV. Ker je okužba z RBDV na vinski trti relativno nova so podatki o genski raznolikosti virusa, ki okužuje vinsko trto skopi. V našem delu smo želeli razširiti znanje o genski naravi RBDV, zato smo testirali šest sort vinske trte in pet sort malin. Ugotovili smo, da so izolati RBDV, ki okužuje vinsko trto sorodni izolatom iz malin, vendar se med seboj razlikujejo do te mere, da tvorijo dve ločeni skupini.

V okviru naloge smo našli tudi izolat virusa na malini, ki se serološko in po zaporedju plaščnega proteina močno razlikuje od doslej znanih zaporedij izolatov iz malin v svetu.

7 VIRI

- Baldauf S.L. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19, 6: 345-351
- Barbara D.J., Jones A.T., Henderson S.J., Wilson S.C., Knight V.H. 1984. Isolates of *Raspberry bushy dwarf virus* differing in *Rubus* host range. *Annals of Applied Biology*, 105: 49-54
- Barnett O.W., Murant A.F. 1970. Host range, properties and purification of *Raspberry bushy dwarf virus*. *Annals of Applied biology*, 65: 435-449
- Bovey R., Gartel W., Hewitt W.B., Martelli G.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like disease of grapevines. V: Colour atlas of symptoms. Lausanne, Editions Payot: 181 str.
- Brigneti G., Voinnet O., Li W-X., Ji L-U., Ding S-W., Baulcombe D.C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, 17, 22: 6739-6746
- Cadman C.H. 1952. Studies in virus *Rubus* diseases. *Annals of Applied Biology*, 39, 3: 495-500
- Chamberlain C.J., Kraus J., Kohnen P.D., Finn C.E., Martin R.R. 2003. First report of *Raspberry bushy dwarf virus* in *Rubus multibracteatus* from China. *Plant Disease*, 87, 5: 603-603
- Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483
- Daubeny H.A., Stace-Smith R., Freeman J.A. 1978. The occurrence and some effects of *Raspberry bushy dwarf virus* in red raspberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103: 519-522

- Derrick K.S., Beretta M. J., Barthe G. A. 2006. Detection of an *Idaeovirus* in citrus with implications as to the cause of citrus blight. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 119: 69-72
- Desvignes J.C., Savio A. 1975. *Cydonia C7-1* and *Pyronia veitchii* two complementary indicators. *Acta Horticulturae*, 44: 139-146
- Ding S-W., Li W-X., Symons R.H. 1995. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO Journal*, 14, 23: 5762-5772
- Dulić-Marković I., Ranković M. 1992. The occurrence of *Raspberry bushy dwarf virus* in Willamette raspberry in Yugoslavia. *Acta Horticulturae*, 308: 109-112
- Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. 2005. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 1259 str.
- Genuth I., Fresco-Cohen L. 2006. BioPen Senses BioThreats. *The Future of Things*: 1.str. <http://thefutureofthings.com/articles.php?itemId=37/56/> (maj 2010)
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Series*, 41: 95-98
- Jevremović D., Paunović S. 2011. *Raspberry bushy dwarf virus* – a Grapevine pathogen in Serbia. *Pesticides and Pyitomedicine*, 26, 1: 55-60
- Jones A.T., Murrant A.F., Jennings D.L. 1982. Association of *Raspberry bushy dwarf virus* with raspberry yellows disease; reaction of *Rubus* species and cultivars, and the inheritance of resistance. *Annals of Applied Biology*, 100: 135-147
- Jones A.T., McGavin W.J., Mayo M.A., Angel-Diaz J.E. 2001. Some properties of variants of *Raspberry bushy dwarf virus*. *Acta Horticulturae*, 551: 27-32
- Kokko H.I., Kivineva M., Kärenlampi S.O. 1996. Single-Step Immunocapture RT-PCR in the detection of *Raspberry bushy dwarf virus*. *BioTechniques*, 20: 842-846

- Macfarlane S.A., McGavin W.J. 2009. Genome activation by *Raspberry bushy dwarf virus* coat protein. *Journal of General Virology*, 90: 747-753
- Maček J. 1986. Posebna fitopatologija: Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 276 str.
- Martelli G.P. 1993. Rugose wood complex. V: Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Martelli G.P. (ed). Rome, 45-53
- Martelli G.P. 2009. Grapevine virology highlights 2006-09. V: 16th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), 31 August - 4 September, 2009, Dijon, France. Extended abstracts vol. 126. Boudon-Padiou E (ed.). Montpellier, Le progres agricole et Viticole 15-23
- Martin B. 2000. Martin Lab, Small Fruit Virology. Oregon, United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service: 1 str.
www.oocities.org/martinrr_97330/RBDVweb/rbdvweb.htm (junij 2011)
- Martin R.R. 2002. Virus diseases of *Rubus* and strategies for their control. *Acta Horticulturae*, 585: 265-270
- Mavrič I., Viršček Marn M., Koron D., Žezlina I. 2003. First report of *Raspberry bushy dwarf virus* on red raspberry and grapevine in Slovenia. *Plant Disease*, 87, 9: 1148-1148
- Mavrič Pleško I. Viršček Marn M., Širca S., Urek G. 2009. Biological, serological and molecular characterisation of *Raspberry bushy dwarf virus* from grapevine and its detection in the nematode *Longidorus juvenilis*. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 261-268
- Mavrič Pleško I., 2011. Virus malin, ki okuži vinsko trto. *SAD*, 21, 3: 10-11
- Mayo M.A., Jolly C.A., Murrant A.F., Raschke J.H. 1991. Nucleotide sequence of *Raspberry bushy dwarf virus* RNA-3. *Journal of General Virology*, 72: 469-472
- Mullholand V. 2009. Immunocapture - PCR for plant virus detection. V: *Plant pathology: Techniques and protocols* vol. 508. Burns R. (ed.). New York, Humana: 183-192

- Murant A.F., Chambers J., Jones A.T. 1974. Spread of *Raspberry bushy dwarf virus* by pollination, its association with crumbly fruit, and problems of control. *Annals of Applied Biology*, 77: 271-281
- Murant A.F., Jones A.T. 1976. Comparison of isolates of *Raspberry bushy dwarf virus* from red and black raspberries. *Acta Horticulturae*, 66: 47-52
- Natsuaki T., Mayo M.A., Jolly C.A., Murant A.F. 1991. Nucleotide sequence of *Raspberry bushy dwarf virus* RNA-2: a bicistronic component of a bipartite genome. *Journal of General Virology*, 72: 2183-2189
- Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. Compendium of grape diseases. 4th ed. St.Paul, American Phytopathological Society Press: 93-93
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 4: 406-425
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467
- Scott S.W. 2006. *Bromoviridae* and Allies. V: Encyclopedia of life sciences: 7 str. <http://www.els.net/WileyCDA/>
- SCRI. 2010. Soft fruit pests and diseases. Dundee, The Scottish Crop Research Institute: 1.str. <http://www.fruitdisease.co.uk/raspberrybushydwarfvirus.asp> (april 2010)
- SCRI. 2010. VirusResearch Raspberry bushy dwarf virus. Dundee, The Scottish Crop Research Institute: 1.str. <http://webcache.googleusercontent.com/search?sourceid=navclient-ff&ie=UTF-8&q=cache%3Ahttp%3A%2F%2Fwww.fruitdisease.co.uk%2FVirusResearchPage2.asp> (april 2010)
- Sokal R.R., Michener C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin*, 38: 1409-1438

- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 8: 1596-1599
- Utah State University. 2009. Weekly Pest and Production Update, Utah State University Extension. Utah, Utah State University: 3.str.
<https://utahpests.usu.edu/ipm/files/uploads/Advisories-SFV/2009/sfv-05-15-09.pdf>
(januar 2011)
- Valasevich N., Kukharchyk N., Kvarnheden A. 2011. Molecular characterisation of *Raspberry bushy dwarf virus* isolates from Sweden nad Belarus. *Archives of Virology*, 156: 369-374
- Wood N.T., McGavin M.J., Mayo M.A., Jones A.T. 2001. Studies on a putative second gene in RNA-1 of *Raspberry bushy dwarf virus*. *Acta Horticulturae*, 551: 19-22
- Ziegler A., Natsuaki T., Mayo M.A., Jolly C.A., Murrant A.F. 1992. The nucleotide sequence of RNA-1 of *Raspberry bushy dwarf virus*. *Journal of General Virology*, 73: 3213-3218
- Ziegler A., Mayo M.A., Murrant A.F. 1993. Proposed classification of the bipartite-genomed *Raspberry bushy dwarf idaeovirus*, with tripartite-genomed viruses in the family *Bromoviridae*. *Archives of Virology*, 131: 483-488
- Zuckerland E., Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8: 357-366

ZAHVALA

Na tem mestu bi se rada zahvalila dr. Ireni Mavrič Pleško za prevzem somentorstva pri diplomskem delu, potrpežljivo vodenje pri mojem prvem večjem samostojnem projektu ter vse nasvete pri delu v laboratoriju in pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi mentorici prof. dr. Darji Žgur Bertok ter recenzentki prof. dr. Maji Ravnikar za hiter pregled diplomskega dela.

Posebna zahvala pa gre vsem mojim najbližjim, ki so me tekom študija bodrili in podpirali v najtežjih trenutkih ter se z mano veselili uspehov, saj ste mi s tem omogočili, da mi bodo študentska leta za vedno ostala v najlepšem spominu.