

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Anastazija JEŽ

**UGOTAVLJANJE VIRUSOV IN VIRUSNIH OKUŽB
VINSKE TRTE V REVIZIJI ZDRAVSTVENE
SELEKCIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Anastazija JEŽ

**UGOTAVLJANJE VIRUSOV IN VIRUSNIH OKUŽB VINSKE TRTE
V REVIZIJI ZDRAVSTVENE SELEKCIJE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE IN
THE REVISION OF SANITARY SELECTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za vinogradništvo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Zoro Korošec – Koruza.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. dr. Zora KOROŠEC – KORUZA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Lea MILEVOJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana 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.

Anastazija Jež

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 634.8:631.527.6:632.38 (043.2)
KG	vinogradništvo/vinska trta/zdravstvena selekcija/virusi/rastlinski virusi/bolezni rastlin
KK	AGRIS H01/H20
AV	JEŽ Anastazija
SA	KOROŠEC – KORUZA Zora (mentor)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2007
IN	UGOTAVLJANJE VIRUSOV IN VIRUSNIH OKUŽB VINSKE TRTE V REVIZIJI ZDRAVSTVENE SELEKCIJE
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 38, [7] str., 6 pregl., 10 sl., 9 pril., 37 ref.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Nacionalna shema zdravstvene selekcije za vinsko trto v Sloveniji vključuje testiranja klonskih kandidatov na vse znane viruse. Med leti 1993 in 2003 je Katedra za vinogradništvo BF, Ljubljana, opravila obširna testiranja kot del raziskovalnega programa. Testirali so 11.800 vzorcev 17-ih sort iz vinorodne dežele Podravje in Posavje ter 7.000 vzorcev 36 sort iz vinorodne dežele Primorska. Največ okužb je z virusom GLRaV-1(več kot 30 %) ter mešanih okužb pri neselecioniranih domačih sortah (40 %). Zaskrbljujoče so okužbe z virusom GFkV, ki so bile odkrite v množitvah klonskih kandidatov. V letu 2006 smo rezultate ELISA primerjali z morfološko selekcijo in indeksiranjem na indikatorje <i>Vitis rupestris</i> , LN 33, <i>V. riparia</i> in 'Modri pinot' za sorte 'Refošk', 'Rebula', 'Žametovka', 'Malvazija' in 'Zelen'. Z zdravstveno selekcijo uspešno opravljamo potrebno delo pri preprečevanju širjenja virusov s trtnim razmnoževalnim materialom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 634.8:631.527.6:632.38 (043.2)
CX	viticulture/grapevine/sanitary selection/viruses/plant viruses/plant diseases
CC	AGRIS H01/H20
AU	JEŽ Anastazija
AA	KOROŠEC – KORUZA Zora (supervisor)
PP	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY	2007
TI	VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF GRAPEVINE IN THE REVISION OF SANITARY SELECTION
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	X, 38, [7] p., 6 tab., 10 fig., 9 app., 35 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Slovenian national grapevine sanitary selection scheme includes a testing of known viruses for all grape clone candidates. During the years 1993 - 2003 the chair of viticulture, Biotechnical Faculty - Ljubljana, conducted the extent testing as a part of expert research program. In the analysis of the research results we revealed 11.800 samples of 17 varieties from Podravje and Posavje winegrowing regions and 7.000 samples of 36 varieties from Primorska winegrowing region. The most widely found virus was GLRaV-1 (more than 30 %) as well as mixed infectious of local varieties (40 %). The most concerning was the high percentage of GFkV infections at first and second level of clone propagation. In 2006 we revised results of ELISA by field selection and indexing on grapevine indicators <i>V. rupestris</i> , <i>V. riparia</i> , LN 33 and 'Pinot noir' for 'Refošk', 'Rebula', 'Žametovka', 'Malvazija' and 'Zelen'. Indexing and field selection results are partly covering the ELISA results. Sanitary selection scheme is serving its purpose i.e. to prevent the spread of virus diseases by grapevine propagating material.

KAZALO VSEBINE

	s.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Seznam okrajšav	X
1 UVOD	1
1.1 POVOD ZA RAZISKAVO	1
1.2 NAMEN IN CILJI	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 VIRUSI IN VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE	2
2.1.1 Klasifikacija virusov in virusnih bolezni	2
2.1.2 Kužna izrojenost vinske trte	4
2.1.2.1 Virus kužne izrojenosti – Grapevine fanleaf virus (GFLV)	4
2.1.2.2 Virus repnjakovega mozaika - Arabis mosaic virus (ArMV)	5
2.1.3 Predčasno rdečenje (rumenenje) in zvijanje listov (grapevine leafroll diseases)	5
2.1.4 Kompleks bolezni razbrazdanost lesa	7
2.1.5 Bolezen 'fleck' – GFkV	9
2.1.6 Manj znane in virozam podobne bolezni	10
2.2 SELEKCIJA VINSKE TRTE	11
2.2.1 Pozitivna množična selekcija	11
2.2.2 Klonska selekcija	12
2.2.3 Zdravstvena selekcija	14
2.2.3.1 Morfološka selekcija	14
2.2.3.2 Indeksiranje	14
2.2.3.3 Laboratorijski testi	15
2.2.3.3.1 Serološki testi – ELISA	16
2.2.3.3.2 Metoda PCR	17
3 MATERIALI IN METODE DE LA	18
3.1 KOLEKCIJSKI IN MATIČNI VINOGRADI	18

3.1.1	Lože pri Vipavi in Ampelografski vrt – Nova Gorica	18
3.1.2	Matična vinograda Komen in Slap pri Vipavi	18
3.1.3	Metoda morfološke selekcije	18
3.1.4	Indeksiranje	19
3.2	ARHIV PODATKOV TESTIRANJA KLONSKIH KANDIDATOV	20
4	REZULTATI	21
4.1	MORFOLOŠKA SELEKCIJA	21
4.1.1	Pregled vinograda starih trt (Lože) in Ampelografski vrt	21
4.1.2	Pregled vinograda Komen	22
4.2	OBDELAVA PODATKOV IZ ARHIVA TESTIRANJ	23
4.2.1	Vinorodni deželi Podravje in Posavje	24
4.2.2	Vinorodna dežela Primorska	25
4.2.2.1	Testiranja sorte 'Refošk' na Krasu	27
4.2.2.2	Testiranja sorte 'Rebula'	27
4.2.2.3	Testiranja sorte 'Zelen'	27
4.3	INDEKSIRANJE	28
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	32
5.1	RAZPRAVA	32
5.2	SKLEPI	33
6	POVZETEK	34
7	VIRI	36
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Taksonomska razvrstitev pomembnejših virusov vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.).	3
Preglednica 2: Shematski prikaz poteka klonske selekcije, introdukcije in certifikacije vinske trte.	13
Preglednica 3: Pregled kolekcijskega vinograda v Ložah po metodi PMS spomladi leta 2005.	21
Preglednica 4: Pregled testiranja klonskih kandidatov, vinorodne dežele Podravje in Posavje, testiranih s serološkim testom ELISA med letoma 1992 - 2003.	24
Preglednica 5: Razvrstitev klonskih kandidatov, vključenih v klonsko selekcijo vinorodna dežela Primorska, testiranih s serološkim testom ELISA.	25
Preglednica 6: Primerjava rezultatov testiranja klonskih kandidatov, ELISA 1999 - 2002 in indeksiranja 2005/2006.	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Znamenja razbrazdanja lesa A: na žlahtnem delu trsa; B: razbrazdanje lesa na podlagi.	8
Slika 2: Indeksiranje v loncih: levo 'Volovnik' cepljen na indikator <i>Vitis rupestris</i> z značilnimi znamenji bolezni, ki jo povzroča virus GFLV, desno: zdrav trs.	15
Slika 3: Prikaz strojnega cepljenja zeleno na zeleno.	19
Slika 4: Znamenja rumenega mozaika na listu sorte 'Refošk' Sveto, 2004.	22
Slika 5: Začetek rdečenja lista sorte 'Refošk', sum na okužbo z GLRaV.	22
Slika 6: Strukturni krog število vzorcev testiranih sort z ELISA v letih 1992 - 2003 v vinorodni deželi Podravje in Posavje.	25
Slika 7: Strukturni krog število vzorcev sort iz vinorodne dežele Primorska, testiranih med leti 1992 in 2003 z ELISA.	26
Slika 8: Strukturni krog število vzorcev domačih lokalnih sort vinske trte, testiranih med leti 1992 in 2003 z ELISA.	26
Slika 9: Nacepljeni indikatorji v loncih v prvem letu cepljenja, spomladi leta 2005, STS Vrhpolje.	28
Slika 10: Nacepljeni indikatorji v času mirovanja, februar 2006, STS Vrhpolje.	31

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A:** Razlaga oznak – dodatnih znamenj za vrste viroz in njim podobnih bolezni.
- PRILOGA B:** Testirani klonski kandidati in izbrani trsi v letih 1992 in 2003; z laboratorijsko metodo ELISA iz vinorodne dežele Podravje in Posavje in vinorodne dežele Primorska, vsote po letih in po sortah.
- Priloga B1: Razvrstitev klonskih kandidatov, vključenih v klonsko selekcijo, vinorodne dežele Podravje in Posavje testiranih s serološkim testom ELISA ter število testiranj po posameznih letih.
- Priloga B2: Razvrstitev klonskih kandidatov, vključenih v klonsko selekcijo, vinorodne dežele Primorska testiranih s serološkim testom ELISA in število testiranj po posameznih letih.
- PROLOGA C:** Škodljivi organizmi, ki povzročajo virusne in virozam podobne bolezni trte, na katere se testirajo rastline kandidatke za izvorne matične trse, izvorni matični trsi, bazni matični trsi ter matični trsi, iz katerih se reže certificiran razmnoževalni material; metode testiranja.
- PRILOGA D:** Testirani klonski kandidati iz vinorodnih dežel Podravje in Posavje ter Primorska.
- Priloga D1: Testirani klonski kandidati in izbrani trsi v letih 1992 in 2003; z laboratorijsko metodo ELISA iz vinorodne dežele Podravje in Posavje.
- Priloga D2: Testirani klonski kandidati in izbrani trsi v letih 1992 in 2003; z laboratorijsko metodo ELISA iz vinordne dežele Primorska.
- PRILOGA E:** Izpis rezultata testiranj z ELISA iz baze Arhiva Katedre za vinogradništvo.

SEZNAM OKRAJŠAV

An.	angleški
ArMV	virus repnjakovega mozaika - Arabis mosaic virus
ELISA	encimsko vezan imunosorbcijski test - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EU	Evropska unija
Fr.	francoski
GFkV	fleck virus - Grapevine fleck virus
GFLV	virus kužne izrojenosti vinske trte - Grapevine feanleaf virus
GLRaV	virusi povezani z boleznijo zvijanja in rdečenja listov vinske trte - Grapevine leafroll-associated viruses
GVA	Grapevine virus A
GAMaV	Grapevine asteroid mosaic-associated virus
GRGV	Grapevine red globe virus
GRN	Grapevine rupestris necrosis
GRVF	Grapevine rupestris vein feathering virus
GVB	Grapevine virus B
GVC	Grapevine virus C
GVD	Grapevine virus D
Ital.	italijanski
KIS	Kmetijski inštitut Slovenije
neg.	ni znamenj na indikatorju / ELISA je negativna
Nem.	nemški
NMS	Negativna množična selekcija
O. I. V.	Office International de la Vigne et du Vin - Mednarodni urad za trto in vino
PCR	Polymerase Chain Reaction - verižna reakcija polimerizacije
PMS	Pozitivna množična selekcija
Port.	portugalski
Raz. ↓	razbrazdanje lesa na podlagi
RKGP	Republiški komite za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
STS	Selekcijsko trsničarsko središče
Šp.	španski
ZTR	Zlata trsna rumenica

1 UVOD

Cilj zdravstvene selekcije je pridobivanje in vzdrževanje zdravega sadilnega materiala vinske trte ter stalni in sistematični nadzor nad zdravstvenim stanjem vinske trte. Zdravstvena selekcija je del programa klonske selekcije. V Sloveniji je njen koordinator že več let Kmetijski inštitut Slovenije. Delo poteka tudi v okviru programa Introdukcija in selekcija vinske trte, ki je v programu MKGP (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano). V delo so na različnih nivojih poleg inštituta vključeni še Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani (Katedra za vinogradništvo), Fakulteta za kmetijstvo Maribor, Seleksijsko trsničarski središči v Ivanjkočih pri Ormožu in v Vrhpolju pri Vipavi ter trsničarji-selekcionisti, izvajalci selekcije sort in podlag vinske trte (Koruza, 2002).

1.1 POVOD ZA RAZISKAVO

Virusi in virusne okužbe so razširjeni na obsežnem geografskem območju. Okužujejo različne rastlinske vrste, pomembnejši so tisti, ki ogrožajo gospodarsko pomembne gojene rastline, med njimi tudi vinsko trto (*Vitis vinifera* L.). Najpomembnejši virusi trte so nepovirusi in closterovirusi. Njihovo širjenje v vinograde preprečujemo s programi selekcije in pridelave zdravega sadilnega materiala. Po vstopu v EU moramo slediti direktivi za to področje. V Sloveniji se zaključuje prvo intenzivno obdobje sistematičnega dela klonske selekcije vinske trte, ki se je začela po letu 1982. Zdravstvena selekcija je program s katerim sistematično testiramo matične rastline vinske trte na najpomembnejše virusne okužbe (Korošec – Koruza in Tomažič, 2002; Topolovec in Gregorič, 2002).

1.2 NAMEN IN CILJI

Število virusov in njihovih medsebojnih interakcij se vsako leto povečuje, zato je sistematično delo zdravstvene selekcije trte toliko bolj pomembno. Z nalogo skušamo iz obsežnega arhiva Katedre za vinogradništvo povzeti celotno delo na tem področju od leta 1992 do leta 2003. Analiza podatkov naj bi dala napotke za obseg in vrsto dela v prihodnje.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Program zdravstvene selekcije v Sloveniji prikaže sliko zdravstvenega stanja trt in je dovolj za preskrbo z zdravim razmnoževalnim materialom.

V zdravstveno selekcijo je potrebno vključiti vse metode, ki jih uporabljamo pri selekciji vinske trte. Kombinacija laboratorijskih metod in indeksiranja je dobra izbira. Pri indeksiranju se pokažejo iste okužbe kot pri ELISA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VIRUSI IN VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE

Virusi in virusom podobne okužbe vinske trte (*Vitis* spp.) so razširjene povsod, kjer uspeva vinska trta. V naravi se glavni povzročitelji bolezni širijo preko različnih prenašalcev (nematode, uši, kobilice, škržati,...), a kljub temu je najbolj pomemben vzrok širjenja bolezni sajenje okuženega materiala. Zato je sajenje zdravega materiala, ki ga dobimo po predhodni selekciji, tako pomembno. Razlikujemo več tipov bolezni: prave virusne bolezni, bolezni, ki jih povzročajo določljivi virusi, ki so bili izolirani, identificirani ter v nekaterih primerih ponovno vneseni v vinsko trto in bolezni, ki jih povzročajo viroidi in virusom podobne bolezni. Te bolezni povzročajo še ne identificirani patogeni, ki so prisotni v gostiteljskem tkivu, ali neznani dejavniki, ki jih ne zaznamo z razpoložljivimi metodami (Martelli, 1993).

2.1.1 Klasifikacija virusov in virusnih bolezni

Po podatkih avtorjev Martelli in Boudon-Padieu (2006) je bilo odkritih in določenih več kot 70 povzročiteljev bolezni vinske trte, od tega je 58 virusov, 5 viroidov, 8 fitoplazem in ena ksilemska bakterija, prenosljiva z žuželkami. To predstavlja najvišje število intracelularnih patogenih organizmov, ki so bili kadarkoli odkriti v eni sami gojeni rastlini.

Na vinski trti so najpomembnejši virusi iz rodov *Nepovirus*, ki povzročajo izrojenost, sledijo virusi iz rodu *Closterovirus*, ki povzročajo zvijanje listov, iz rodu *Vitivirus*, ki povzročajo razbrazdanje lesa, virusi iz rodu *Maculavirus* (Grapevine flack virus - GFkV) ter virusi iz rodu *Ampelovirus* (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Za vinogradnika je priročna razvrstitev po znamenjih na trti, ki se razvijejo po okužbi in jih v vinogradu vidimo. To so tako imenovane morfološke spremembe, ki smo jih povzeli po pri nas veljavni terenski knjigi za selekcijo vinske trte. Znamenja zapisujemo kot (Terenska selekcijska knjiga)¹:

- M - mozaik
- P - peteršiljavost
- O - osipanje
- RL - rdečenje lista, rumenenje lista
- RAL - razbrazdan les
- ZI - zvijanje lista
- ZTR - zlata trsna rumenica
- ZIM - znaki izrojenosti na mladica
- BSV - drugo

Povzetek sistematike za rod *Vitis* grupira viruse v 3 skupine. Najpogostejši virusi in njihova taksonomska razvrstitev (Martelli in Boudon-Padieu, 2006) je v preglednici 1.

¹ Za podrobnejšo razlago oznak glej prilogo A.

Znane viruse uvrščata avtorja v skupino A, tiste brez potrjene razvrstitve v rod navajata v skupini B, v skupini C so taksonomsko neuvrščeni virusi.

Preglednica 1: Taksonomska razvrstitev pomembnejših virusov vinske trte (*Vitis vinifera* L.) (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

DRUŽINA	ROD	VRSTA (okrajšava virusa) ² – slovensko ime (FITO-INFO, 2007)
A. Virusi, s pripadajočim rodom in njihova uvrstitev v družino		
CLOSTEROVIRIDAE	<i>Closterovirus</i>	Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)* ³
		Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)*
	<i>Ampelovirus</i>	Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)*
		Grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4)*
		Grapevine leafroll-associated virus 5 (GLRaV-5)*
		Grapevine leafroll-associated virus 6 (GLRaV-6)*
		Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7)*
		Grapevine leafroll-associated virus 8 (GLRaV-8)*
		Grapevine leafroll-associated virus 9 (GLRaV-9)*
COMOVIRIDAE	<i>Nepovirus</i>	Artichoke italian latent virus (AILV) *
		Arabidopsis mosaic virus (ArMV) – virus repnjakovega mozaika
		Blueberry leaf mottle virus (BLMoV)
		Cherry leafroll virus (CLRV) – virusno zvijanje češnjevih listov
		Grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)*
		Grapevine Anatolian ringspot virus (GARSV)*
		Grapevine deformation virus (GDefV)*
		Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)*
		Grapevine fanleaf virus (GFLV) – virus kužne izrojenosti
		Grapevine Tunisian ringspot virus (GTRV)*
		Peach rosette mosaic virus (PRMV)*
		Raspberry ringspot virus (RpRV) – virusna obročkavost maline
		Tobacco ringspot virus (TRSV) – tobakova obročkavost
		Tomato ringspot virus (ToRSV) – virozno rumenenje listnih žil vinske trte
		Tomato blackring virus (TBRV) – obročkavost na fižolovih listih
		Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)*
		FLEXIVIRIDAE
Grapevine virus B (GVB)*		
<i>Vitivirus</i>	Grapevine virus C (GVC)*	
	Grapevine virus D (GVD)*	
	Grapevine fleck virus (GFkV)*	
TYMOVIRIDAE	<i>Maculavirus</i>	Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV)*
B. Virusi brez uvrstitve v družino.		
	<i>Idaeovirus</i>	Raspberry bushy dwarf idaeovirus (RBDV) – virusna grmasta pritlikavost malin
	<i>Sadwavirus</i>	Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) – latentna jagodna virusna obročkavost
	<i>Sobemovirus</i>	Sowbane mosaic virus (SoMV)*
	<i>Tobamovirus</i>	Tobacco mosaic virus (TMV) – tobakov mozaik Tomato mosaic virus (ToMV)*
C. Taksonomsko neuvrščeni virusi		
		Unnamed filamentous*
		Grapevine Ajinashika virus (GAV*)
		Grapevine stunt virus (GSV)*
		Grapevine labile rod-shaped virus (GLRSV)*

² V nadaljnjem besedilu uporabljamo to okrajšavo

³ oznaka * v tabeli pomeni, da za imenovani virus ni slovenskega poimenovanja (FITO-INFO, 2007)

2.1.2 Kužna izrojenost vinske trte

Iz rodu *Nepovirus* je več kot 10 predstavnikov, ki povzročajo obolenja vinske trte. Najpomembnejša sta povzročitelj kužne izrojenosti (GFLV) in virus repnjakovega mozaika (ArMV). Povzročata številne nepravilne oblike listov ali rozg, zato so bolezen imenovali tudi kužna izrojenost (Hrček, 1973; Tomažič, 1999).

Viruse iz rodu *Nepovirus* prenašajo talne ogorčice (nematode), virusni delci so poliedrične oblike (Nematode transmissible, POLyhedral shape). Večina prenašalcev je znana, spadajo v rodova *Xiphinema* in *Longidorus* (Martelli, 1993; Širca in sod., 2007).

2.1.2.1 Virus kužne izrojenosti – Grapevine fanleaf virus (GFLV)

GFLV je najstarejši znani virus in povzročitelj razširjeno virusno bolezen vinske trte. V Evropi je bil prisoten še predno so bili prineseni ameriški hibridi. Pri nas smo ga poznali pod imenom virus pahljačavosti ali virus kužne izrojenosti. Povzročitelj izrojenosti (GFLV) naj bi bil prisoten na območju Sredozemlja in na bližnjem Vzhodu, že od samega začetka gojenja vinske trte. Dandanes je bolezen poznana po vsem svetu (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Sinonimi in poimenovanja v tujih jezikih: court-noué, panachure, dégénérescence infectieuse (Fr.), roncet, arricciamento, mosaico giallo, degenerazione infettiva (Ital.), urticado (Port.), Reisigkrankheit (Nem.), Gelbmosaik (Nem.).

Znamenja bolezn:

Bolezen opredeljujejo trije sindromi. Za njihovo raznolikost so odgovorni različni sevi virusa (Pearson in Goheen, 1988; Martelli, 1993).

a) Sindrom kužne izrojenosti. Listi so zelo različne oblike in velikosti, pogosto so sortno neznačilni, izmaličeni in asimetrični. Imajo povečane in odprte peceljne sinuse, globoka ušesca in ostre zobce. Občasno se izmaličenosti listov pridružujejo še klorotične lise. Socvetja so krajša in manj številčna, jagode neenakomerno dozorevajo, so drobnejše in redkejše. Znamenja na listih se pojavijo zgodaj spomladi in proti poletju, skozi rastno sezono postajajo manj izrazita. Prav tako so prizadete tudi mladike, ki kažejo nenormalno razrast, podvojene oziroma zrasle nodije, krajše internodije, zraslost mladik in cik-cak rast mladik (Bovery in sod., 1980; Pearson in Goheen, 1988; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

b) Sindrom rumenega mozaika. Zgodaj spomladi se na listih pojavi svetlo živo rumeno razbarvanje, ki prizadene vse zelene dele rastline (liste, mladike, vitice). Včasih se na listih pojavijo krogi ali linije, ki se raztegnejo preko žil in v medžilni prostor, list popolnoma porumeni. Pogosto so okužbe vinske trte v manjših zaplatah v vinogradu. Višje temperature zraka poleti povzročijo, da rumenice hitro izginejo, listi lahko odpadejo in na mladih listih se razvije normalna zelena barva. Listna masa in poganjki so zelo malo iznakaženi oziroma sploh niso, mladik je manj (Pearson in Goheen, 1988; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

c) Sindrom obžilnega mozaika (Vein bandig). Okužba je omejena na določeno število listov. Okuženi listi kažejo rahlo izmaličenost. Rumena flekasta razbarvanja se najprej

razvijejo vzdolž glavnih žil odraslih listov in se širijo v medžilne prostore. Rozge slabo rastejo, kabrniki so slabo razviti, pridelek je lahko zelo zmanjšan. Znamenja obžilnega mozaika so posledica istočasne okužbe z Grapevine yellow speckle viroidom in virusom GFLV. Pojavljajo se od sredine do poznega poletja (Pearson in Goheen, 1988).

Prenašalci:

Glavni prenašalci virusa GFLV so nematode vrste *Xiphinema index*, te se prehranjujejo na koreninah vinske trte (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Odkrivanje:

Vizualni pregledi vinogradov so najpreprostejši in prvi načini odkrivanja te bolezni. Z uporabo seroloških testov ELISA lahko hitro, poceni in zelo natančno določimo okužbo z virusom GFLV. Za detekcijo so najprimernejši listi, nabrani spomladi, ali les nabran na odraslih spečih trsih. Indeksiranje na *Vitis* indikatorje s cepljenjem vzame več časa in vzgojo v rastlinjaku, vendar je še vedno priporočljivo pri določanju območja virusne okužbe. Detekcijo opravimo tudi z molekularnimi metodami: RT-PCR, immunocapture RT-PCR in druge (Martelli, 1993; Blas, 2006).

Preprečevanje širjenja okužb:

Širjenje virusa omejimo z uporabo materiala pridobljenega iz sheme certificiranih cepičev in podlag. Brezvirusni material dobimo s toplotno obdelavo (na 38 °C - 40 °C najmanj za štiri tedne) in z *in vitro* meristemsko kulturo oziroma s somatsko embriogenezo. V prihodnosti bo delo razširjeno na žlahtnjenje podlag ali kultivarjev odpornih na virus GFLV po metodi klasičnega žlahtnjenja ali z uporabo metod genske transformacije (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

2.1.2.2 Virus repnjakovega mozaika -Arabis mosaic virus (ArMV)

ArMV je tipičen nepovirus, ki ga uvrščamo v podskupino A rodu *Nepovirus* in je serološko povezan z virusom GFLV. ArMV se pogosto pojavlja v mešanih okužbah z virusom GFLV na določenih območjih v Franciji in Italiji ter še z ostalimi nepovirusi na zahodnem delu Nemčije. Virus je bil odkrit tudi v Švici, Bolgariji, v državah na območju bivše Jugoslavije, na Madžarskem, v Romuniji, Turčiji, Iranu, Izraelu, Kanadi, ZDA in na Japonskem. Okužuje veliko lesnatih in zelnatih rastlin, na vinsko trto se prenaša z nematodo *Xiphinema diversicaudatum* in ne z *X. index*. Poročila iz Nemčije kažejo 50 % izpad pridelka zaradi okužbe z virusom in pogosto propadanje sorte 'Kerner' zaradi bolezni, ki jo povzroča okužba z virusom ArMV. Pri drugih evropskih trtah so znamenja podobna kot pri GFLV (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

2.1.3 Predčasno rdečenje (rumenenje) in zvijanje listov (grapevine leafroll diseases)

Prvi zapisi o bolezni segajo v sredino 19. stoletja. Podatki opisujejo predčasno rdečenje listov, ki je posledica fizioloških motenj ter so ga poimenovani "Rugeau" ali "Rossore". Bolezen predčasnega rdečenja ni prav nič manj pomembna od bolezni kužne izrojenosti in

je povzročiteljica najbolj razširjene boleznine vinske trte. Pojavlja se povsod po svetu, kjer raste vinska trta⁴ (Hrček, 1973; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

V zadnjih letih so izolirali več sevov virusa GLRaV in jih označili kot GLRaV (Grapevine leafroll-associated viruses), virusi povezani z boleznijo zvijanja in rdečenja listov vinske trte. Do sedaj je bilo v okuženih trsih najdenih devet različnih virusov, ki so jih poimenovali grapevine leafroll-associated viruses (GLRaV), in jih za ločevanje oštevilčijo od 1 do 9 (npr. GLRaV-1). Vendar lahko obstaja še več takih virusov oziroma njihovih tipov, rekombinantov in podobno (Korošec - Koruza in Tomažič, 2002; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Sinonimi in poimenovanja v tujih jezikih: White Emperor disease (An.) (Bovey in sod., 1980), Rollkrankheit, Blattrollkrankheit (Nem.), enrroulement (Fr.), accartocciamento, accartocciamento fogliare (Ital.), enrollamiento de la hoja, enrollado (Šp.), Enrolamento de la folha (Port.)

Znamenja boleznine:

Rdeče sorte evropske trte razvijejo predčasno rdečkasto obarvanje na starejših listih že pozno spomladi ali poleti, odvisno od tipa virusa, klime in geografske lege. S časom se rdečenje oziroma rumenenje poveča in zajame ves list. Značilen je ozek zelen pas vzdolž primarnih in sekundarnih žil. Grozdje pogosto zori pozno in neenakomerno, pri večini sort je zmanjšana količina in kakovost, vsebnost sladkorjev se zmanjša. Pri belih sortah so znamenja nekoliko drugačna, listi postanejo klorotični in rumenkasti, listi ne rdečijo (Bovey in sod 1980; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Stopnja izraženosti znamenj je odvisna tudi od sorte. Rdeče sorte imajo bolj izražena znamenja zaradi rdečenja listov, zato uporabljamo nekatere kot indikatorske rastline. Ameriške podlage okužene z virusi GLRaV so običajno brez znamenj, razen upada bujnosti v različnih stopnjah rasti. Možnost širjenja okužbe se poveča, če ne uporabljamo testiranih podlag. Bolezen, predčasno rdečenje listov, povzroča zmanjšanje pridelka (od 15-20 % v povprečju) in negativno vpliva na ukoreninjenje, cepljenje in vigor rastline (Martelli, 1993; Tomažič, 1999).

Prenašalci:

GLRaV se prenašajo pri cepljenju in virusi ostajajo v razmnoževalnem materialu (cepič, podlaga in trsna cepljenka), kar je v veliki večini posledica širjenja na srednje in dolge razdalje. Na krajše razdalje se virus širi z žuželkami (kaparji in drugimi sesajočimi žuželkami). Pri GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-5, GLRaV-9, so znani prenašalci, pri ostalih pa ne. GLRaV-1 se v naravi prenaša z vrsto *Heliococcus bohemicus* in *Pheanacoccus aceris* ter *Pulvinaria vitis*, *Parthenolecanium corni*, *Neopulvinaria innumerabilis*. GLRaV-3 prenašajo kaparji: *Planococcus ficus*, *Pl. citri*, *Pseudococcus longispinus*, *Ps. calceolariae*, *Ps. maritimus*, *Ps. affinis*, *Ps. viburni* in *Ps. comstocki* ter *Pulvinaria vitis*, *Neopulvinaria innumerabilis*. GLRaV-5 in GLRaV-9 prenaša *Ps. longispinus*. Vendar so ti prenašalci dokazani kot prenašalci le v nekaterih ožjih območjih (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

⁴ V nadaljnjem besedilu govorimo skrajšano o boleznine zvijanja listov.

Odkrivanje:

V vinogradu se pri rdečih sortah znamenja lepo vidijo in jih lahko določimo morfološko. Indeksiranje na rdeče sorte, kot na primer na 'Cabernet sauvignon', 'Cabernet Franc', 'Modri pinot', 'Merlot', ali na LN 33⁵ je še vedno zelo uporabna metoda, vendar med seboj ne razlikuje različnih vrst GLRaV, hkrati je metoda manj občutljiva kot ELISA (Bovey in sod., 1980; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Pri seroloških testih so najprimernejši za uporabo: listno tkivo ali pecljevina odraslih okuženih listov *Vitis* sp. ali les odraslih trsov oziroma podlag v času mirovanja (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Preprečevanje širjenja okužb:

Pridelava in uporaba klonsko selekcioniranega in zdravstveno pregledanega reprodukcijskega materiala je uspešna in edina preventivna metoda, ki je na voljo pri nadzoru te bolezni. Znanih ni virov, ki bi poročali o odpornosti vrste *V. vinifera*. Prav tako ni nobenih informacij, kako zavarovati zdrave rastline pred okužbo znotraj vinograda (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

2.1.4 Kompleks bolezni razbrazdanost lesa

Razbrazdanost lesa je bila prvič identificirana in opisana v Italiji v zgodnjih šestdesetih letih 20. stoletja, kot bolezen prenosljiva s cepljenjem. Menili so, da je le lokalni problem, vse dokler ni bila odkrita še drugje po svetu (Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Minafra, 2000).

Kompleks razbrazdanosti lesa je sestavljen iz večih bolezni, ki so jih poimenovali po sortah trte, ki značilno reagirajo na določeno okužbo, med tem ko so na drugih latentne; izjema je bolezen Corky bark, ki na različnih trtah povzroča plutavost lubja. To so: Grapevine rupestris stem pitting, Grapevine kober stem grooving, Grapevine corky bark, Grapevine LN 33 stem grooving. Običajno so latentne pri necepljenih trtah *Vitis vinifera*, ameriških *Vitis* vrstah in hibridnih podlagah. Znamenja vseh vrst se razvijejo pri cepljenih trtah (Minafra, 2000; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Sinonimi in poimenovanja v tujih jezikih: Stem pitting, stem grooving, corky bark, rough bark, (An.); legno riccio, suberosi corticale (Ital.), bois strié, cannelures du tronc, écorce liégeuse (Fr.), madera rizada (Šp.); lehno rugoso (Port.); Korkrindenkrankheit, Holzrunzeligkeit (Nem.).

Znamenja bolezni:

Na listih ni vidnih posebnih znamenj, kljub temu lahko na nekaterih sortah vidimo zvijanje, rumenenje ali rdečenje listov, podobno tistemu, ki se razvije pri bolezni zvijanja listov. Rozge so krajše, pridelek je lahko zmanjšan za 20 - 30 % (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Okuženi trsi kažejo manjši vigor in spomladi kasneje brstijo. Nekateri trte lahko nazadujejo in propadejo v nekaj letih po saditvi. Cepljene trte pogosto kažejo nabreklino nad cepljenim mestom in označujejo mesto med cepičem in podlago. Pri nekaterih sortah,

⁵ LN 33 križanec Couderc 1613 x *Vitis berlandieri*

lubje nad linijo cepljenja zelo odebeli in opluteni. Ima gobasto strukturo in hrapav videz, znan je kot "corky rugose wood". Lesni obroč ima značilne brazgotine in/ali zarastline, ki so podobne grebenastim izrastkom na zunanji strani lubja. Pojavljajo se na cepiču, podlagi ali na obeh (slika 1). Različnost znamenj variira glede na kombinacije cepič/podlaga. Znamenja so manj izražena ali jih ni v hladnejših in mokrejših krajih. Primeri latentnih okužb pri cepljenih trsih niso redki (Martelli in Boudon-Padieu, 2006; Minafra, 2000; Pearson in Goheen, 1988).



Slika 1: Znamenja razbrazdanja lesa A: na žlahtnem delu trsa; B: razbrazdanje lesa na podlagi (Arhiv..., 2006).

S cepljenjem na indikatorje ločijo štiri bolezni razbrazdanosti lesa: (Minafra, 2000; Martelli in Boudon-Padieu, 2006):

- ❖ **Rupestris stem pitting** Izrazita razbrazdanost na spodnjem delu debla indikatorja trt *Vitis rupestris*, ki je omejena na raztegnjen pas pod točko inokulacije na indikator *Vitis vinifera*. Indikatorji LN 33, Kober 5BB in Cabernet frank ne kažejo znamenj (Petrovič in sod., 2003).
- ❖ **Kober stem grooving** Značilne vidne zarastline na podlagi Kober 5BB, brez znamenj na podlagi *Vitis rupestris* in LN 33.
- ❖ **LN 33 stem grooving** Zarastline, razširjene na podlagi LN 33 so podobne plutavosti lubja, le da ni prisotnih internodijskih zadebelitev poganjkov ali razbarvanja listov. Na *V. rupestris* in Kober 5BB ni vidnih znamenj.
- ❖ **Plutavost (Corky bark)** Bolezen je imenovana po značilnih plutavih odebelitvah na mladikah. Zarastline in razbrazdanja lesa po vsem deblu podlage *V. rupestris* in LN 33, na podlagi Kober 5BB⁶ ni znamenj.

⁶ Kober 5BB je križanec *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*.

Povzročitelje boleznih razbrazdanosti lesa uvrščamo v družino Flexiviridae in znotraj imamo rodova *Vitivirus* in *Foveavirus*. Razširjeni so v Evropi (območje Sredozemlja), bližnji in daljni Vzhod, Avstralija in Azija, Južna Afrika, Severna in Južna Amerika. Virusi GVA, GVB, GVC in GVD spadajo v rod *Vitivirus* (Minafra, 2000; Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Rezultati laboratorijske identifikacije posameznih virusov se delno pokrivajo z rezultati indeksiranja.

- GVA povzroča bolezen 'Grapevine kober stem grooving'.
- GVB povzroča bolezen Grapevine corky bark. Povezana je tudi z zakrnelostjo mladih trsov, neskladnost podlage in cepiča.
- GVC je zelo slabo znan in opisan.
- GVD povzroča bolezen corky rugose wood, v vinogradu se kažejo znamenja na prizadetih trsih tik nad linijo cepljenja, kot izrazita plutavost (Minafra, 2000; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Prenašalci:

Znani so prenašalci virusa GVA: *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *Ps. affinis*, *Heliococcus bohemicus*, *Neopulvinaria innumerabilis*. Virus GVB prenašajo *Ps. longispinus*, *Ps. affinis* ter *Pl. ficus*.

Odkrivanje:

Cepljenje na indikatorske rastline (*Vitis rupestris*, Kober 5BB, in LN 33) je veljalo kot edina zanesljiva metoda pri odkrivanju in razvrščanju boleznih. Posamezni virusi so lahko določljivi z ELISA (Minafra, 2000).

Preprečevanje širjenja okužb:

Uporaba testiranega razmnoževalnega materiala, ki ga pridelamo po potrjeni certifikacijski shemi je najvažnejši ukrep proti vnosu okuženih trt v vinograd (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

2.1.5 Bolezen 'fleck' – GFkV

Bolezen poimenovana 'fleck' spada v kompleks boleznih (Fleck complex) ter povzroča latentne oziroma maskirane okužbe na žlahtni evropski trti, na večini ameriških trt in na križancih podlag. Kljub prikriti naravi boleznih imamo podatke o vplivu na bujnost rasti, na sposobnost ukoreninjenja podlag in na izplen cepljenja (Boscia in sod., 1991).

Poleg GFkV spadajo v 'complex fleck' še virusi GAMaV, GRN, GRVF in GRGV.

Sinonimi in poimenovanja v tujih jezikih: grapevine fleck (An.), Marbrure (Fr.), maculatura infettiva, screziatura (Ital.). Marmorierung der Rebe (Nem.).

Znamenja boleznih:

Bolezen je latentna v evropski trti in v večini ameriških podlag. Znamenja se izrazijo na trtah *Vitis rupestris*. Listi z močno okužbo so nagubani, zviti in se lahko zvijajo navzgor.

Nastanejo lokalna znamenja, ki se razvijejo ob listnih žilah tretjega ali četrtega reda. Različni sevi povzročajo različno stopnjo izraženosti bolezní. Fleck je zelo razširjena bolezen, odkrita je bila v večini vinorodnih deželah sveta (Boscia in sod. 1991; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Prenašalci:

Ni znanih prenašalcev. Znan je le prenos z okuženim sadilnim materialom (Boscia in sod., 1991).

Odkrivanje:

Indeksiranje na *V. rupestris* dovoljuje s sprejemljivo stopnjo zanesljivosti razvrstitev različnih virusov kompleksa glede na različne reakcije na indikatorju. Virusi so določljivi tudi z laboratorijskimi metodami. Z ELISA določimo le GFkV, ker za ostale ni na voljo antiserumov (Boscia in sod., 1991; El Beaino in sod., 2001; Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Preprečevanje širjenja okužb:

Zdravstvena selekcija evropske trte in večine ameriških podlag in njihovih križancev je zaradi prikritega stanja neizvedljiva. GFkV zatremo s toplotno obdelavo in tkivnimi kulturami. Podobno velja tudi za vse ostale viruse kompleksa fleck (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

2.1.6 Manj znane in virozam podobne bolezni

Na cepljenkah sorte 'Laški rizling' so leta 2001 in 2002 opazili manj znane linijske vzorce in rumenenje na listih. Na okuženih trsih so našli RBDV (Raspberry bushy dwarf ideovirus). Virus navadno okužuje maline in robide in druge vrste iz rodu *Rubus*. S testiranjem so do konca leta 2004 ugotavljali geografsko razširjenost virusa. Ugotovili so, da je virus razširjen predvsem na Štajerskem in da je z njim okuženih več belih sort. Podatkov o gospodarskem pomenu še ni (Mavrič, 2005).

Po starejših zapisih in po metodi negativne zdravstvene selekcije se v morfološki selekciji opisujejo tudi znamenja rumenic (ZRT). Povzročitelje so najprej opisovali kot virusom podobne ali mikoplazmam podobne organizme. Zdaj so bolezni opisane kot rumenice, kot posebna skupina bolezni s povzročitelji iz skupine fitoplazem in jih v našem delu ne obravnavamo (Koruza, 1996; Seljak in Petrovič, 2001).

Citiramo opis po Terenski selekcijski knjigi:» ZTR – zlata trsna rumenica je znamenje okužbe z mikoplazmam podobnim organizmom. Prizadeti trs ima najprej zlato rumene liste, kovinskega leska, ki se vihajo navzdol in navznoter, kasneje se na njih pojavijo nekrotične pege ali lise, ki izpadejo, list dobi luknjice. Listi so zelo krhki in mehurjasti. Prizadeti so tudi kabrniki ali grozdiči, ki se lahko popolnoma posušijo ali je mladica popolnoma nerodna. Prizadeti del trsa ali celoten trs kaže kržljivo rast. Ker okužba ni sistemčna, se včasih trs lahko obnovi, če smo ob rezi odstranili vse prizadete dele in trs ni bil ponovno okužen preko škržata, ki prenaša povzročitelja bolezni. Znamenja opazimo po cvetenju ali v poznem poletju, odvisno od razvoja prenašalca (škržat) ter od stadija bolezni«.

2.2 SELEKCIJA VINSKE TRTE

V Sloveniji poteka selekcija vinske trte po priporočilih mednarodnega urada za vinsko trto in vino – O.I.V. (Office International de la Vigne et du Vin). S pozitivno množično selekcijo so konec šestdesetih let 20. stoletja dobili okoli 200.000 selekcioniranih trsov. Dobili so prve potrjene matične nasade. Temu je sledila individualna ali klonska selekcija, ki jo je začel selekcionist S. Matekovič. Virusnim okužbam smo začeli posvečati več pozornosti šele po letu 1962. Med leti 1968 in 1973 so v okviru ameriškega projekta pregledali 750.000 trsov (Hrček, 1973). V letih 1984 in 1988 so obsežno testirali lokalne sorte vinorodne dežele Primorske ('Refošk', 'Rebula') in stare klonske linije iz Podravja. V letu 1988 so začeli obsežneje uporabljati serološko metodo pri določevanju in odkrivanju okužb z virusi, za trte v programu klonske selekcije (Korošec-Koruza in Tomažič, 2002).

Prva stopnja selekcije je osnovna ali množična selekcija. Pregleduje se fenotip ter zdravstveno stanje trsov v vinogradu. S tem pridobimo potrjene matične trse za pridelavo standardnega cepilnega materiala, hkrati se odkriva elitne trse. Elite nato vključimo v nadaljevalno ali klonsko selekcijo. Klonska selekcija traja približno 20 let, vendar je nujno potrebna za pridobivanje kakovostnejšega materiala (Pravilnik o trženju,... 2005; Korošec-Koruza in sod., 2004).

2.2.1 Pozitivna množična selekcija

Metoda pozitivne množične selekcije (PMS) se uporablja pri odbiru rastlin kandidatki za matične trse ali pri odbiranju matičnih trsov kategorije standard v rodni vinogradih. Odbira matičnih trsov kategorije standard se lahko izvede v rodni vinogradih, posajenih s certificiranimi trsnimi cepljenkami ali s standardnimi trsnimi cepljenkami. Pozitivna množična selekcija se izvaja 5 let, in sicer od zaključene četrte rastne dobe dalje. Naloga selekcije je določiti pozitivne lastnosti, na katere bo posamezna vinska trta selekcionirana. V selekcijski nalogi se posebno pozornost posveti slabim lastnostim sorte (npr. osipanje, izmenična rodnost, nagnjenje k preveliki rodnosti, neenakomerno dozorevanje in barvanje jagod, občutljivost za bolezni, občutljivost na stresne razmere itn.) (Pravilnik o trženju..., 2005).

Trsi, ki so vključeni v pozitivno množično selekcijo, morajo biti vizualno pregledani najmanj 2-krat letno. Prvi pregled se opravi v juniju (predvsem motnje rasti, mozaiki, osipanje; bolezni iz kompleksa kužne izrojenosti vinske trte), drugi neposredno pred trgatvijo (fenotipske lastnosti trsa, bolezni predčasnega zvijanja in rdecenja listov vinske trte, trsne rumenice). Trse, pri katerih so bila opažena vizualna znamenja bakterijskih, virusnih ali virozam podobnih bolezni, se odstrani iz vinograda pod nadzorom selekcionista (Pravilnik o trženju..., 2005). Z usmeritvijo v pridelavo sadilnega materiala, klonskega izvora, je v prometu vse manj sadik standardnega razreda, s tem PMS izgublja na pomenu in obsegu.

V pozitivno množično selekcijo je v Sloveniji vsako leto vključenih prek 200.000 trsov (Koruza, 2002).

2.2.2 Klonska selekcija

Klonska selekcija je genetsko in zdravstveno preverjanje odbranih elitnih trsov skozi najmanj dve vegetativno razmnoženi generaciji potomcev (Koruza in sod, 2003). Z njo pridobimo klonske kandidate, kot je predpisano v shemi za selekcijo in certifikacijo sadilnega materiala vinske trte, preglednica 2 (Pravilnik o trženju..., 2005; Direktiva Sveta..., 2002).

V povezavi z obema selekcijskima središčema sta za genetski del zadolžena KIS in Fakulteta za kmetijstvo v Mariboru, zdravstveno delo so vodili sodelavci Katedre za vinogradništvo BF v Ljubljani. Vsi rezultati zdravstvene selekcije in testiranja so od leta 1992 do 2003 hranjeni na katedri (Arhiv..., 2006).

Središče STS Ivanjковci pri Ormožu je na pobudo Kmetijskega inštituta Slovenije in Biotehniške fakultete v Ljubljani (Katedra za vinogradništvo) uredilo kolekcijo sort Vinorodne dežele Podravje in Posavje ter vodi selekcijo vinske trte za to območje (Topolovec in Gregorič, 2002). Sorte, ki so v postopkih selekcije so 'Beli pinot', 'Chardonnay', 'Laški rizling', 'Modra frankinja', 'Radgonska ranina', 'Renski rizling', 'Sauvignon', 'Šipon', 'Dišeči traminec', 'Žametovka'.

Izmed naštetih sort je 20 klonov šestih vinskih sort ('Laški rizling' (4), 'Radgonska ranina' (3), 'Sauvignon'(3), 'Šipon'(6), 'Dišeči traminec'(3), 'Žametovka'(1) vključenih v zadnjo fazo klonske selekcije, ki se konča s postopkom uradnega priznavanja (Topolovec in Gregorič, 2002).

Prvo zdravstveno stanje so trsom določili po vizualnem pregledu z morfološko metodo PMS. Tako so izločili trse, ki so kazali znamenja bolezní.

V STS Vrhpolje pri Vipavi, ki pokriva vinorodno deželo Primorska, so največ selekcije opravili s sortami 'Refošk', 'Rebula', 'Zelen', 'Malvazija' in 'Barbera'. Za navedene sorte imajo tudi že posajene potomce prve množitve v kolekcijskem vinogradu Slap pri Vipavi (Topolovec in Gregorič, 2002).

Za sorto 'Refošk' je specifičen visok odstotek okužb z virusi iz družine Closteroviridae, zlasti virus GLRaV-1 je kljub klonski selekciji prisoten v 27 % pregledanih trt, to je za 10 % več kot pri starih sortah. Temu gre pripisati morebiten prenos virusa s podlagami oziroma prisotnost prenašalca v naravnem okolju. Virus GFkV je prav tako za trikrat bolj pogost (9 % vseh trsov) v selekcioniranih trsah kot pri starih trtah. V tem primeru bi bil vzrok enak kot pri GLRaV-1. Pri slednjem virusu je maskiranost okužbe še eden izmed vzrokov prenosa virusa v nov krog selekcije. V postopkih morfološke selekcije vinske trte so znamenja rdečenja listov pripisovali sortni značilnosti ali drugi fiziološki motnji (Tomažič, 1999).

Preglednica 2 : Shematski prikaz poteka klonske selekcije, introdukcije in certifikacije vinske trte, (Koruza, 2002; Vršič in Lešnik, 2005).

SELEKCIJSKA NALOGA	IZVAJALEC	TRAJANJE	
Pozitivna množična selekcija vinske trte in negativna množična selekcija podlag (numerično vizualno ocenjevanje fenotipa in zdravstvenega stanja po posameznem trsu)	Selekcionisti v osnovni selekcijski mreži	5 let (PMS ⁷) 3 leta (NMS ⁸)	Predklonska selekcija
Predklonska selekcija – odbira elitnih trsov na podlagi pozitivne množične selekcije (meritev pridelka, ocena tehnoloških vrednosti, laboratorijsko preverjanje zdravstvenega stanja ali indeksiranje v rastlinjaku)	Strokovne inštitucije (KIS, BF) STS Ivanjkovci, STS Vrhopolje	3 leta (od polne rodnosti)	
Klonska selekcija – klonski kandidati (meritev pridelka, ocena tehnoloških vrednosti, mikroviniifikacije grozdja, laboratorijsko preverjanje zdravstvenega stanja ali indeksiranje v rastlinjaku)	Strokovne inštitucije (KIS, BF) STS Ivanjkovci, STS Vrhopolje	5 let od polne rodnosti	Klonska selekcija
Klonska selekcija – potrjevanje klonov (domači kloni) (meritev pridelka, ocena tehnoloških vrednosti, mikroviniifikacije grozdja, laboratorijsko preverjanje zdravstvenega stanja ali indeksiranje v rastlinjaku)	Strokovne inštitucije (KIS, BF) STS Ivanjkovci, STS Vrhopolje Urad za varstvo in registracijo sort	3 leta (od polne rodnosti)	
Introdukcija tujih klonov (meritev pridelka, ocena tehnoloških vrednosti, mikroviniifikacije grozdja, laboratorijsko preverjanje zdravstvenega stanja ali indeksiranje v rastlinjaku)	Strokovne inštitucije (KIS, BF) STS Ivanjkovci, STS Vrhopolje Urad za varstvo in registracijo sort	3 leta (od polne rodnosti)	
Končni rezultat: priznani kloni v baznem vinogradu (genska banka, kolekcija klonov)	Za bazni material skrbijo (genska in zdravstvena kontrola) in ga posredujejo trsničarjem v razmnoževanje: pooblaščen strokovne inštitucije (KIS, BF) STS Ivanjkovci, STS Vrhopolje (razmnožujejo)		
Razmnoževanje priznanih klonov (certificirane trsne cepljenke)	Certificirane trsne cepljenke Pridelovanje: registrirani trsničarji Kontrola pridelave: STS Zdravstvena kontrola: pooblaščen strokovna inštitucija		

⁷ PMS okrajšava za pozitivno množično selekcijo

⁸ NMS okrajšava za negativno množično selekcijo

2.2.3 Zdravstvena selekcija

Povod zdravstveni selekciji je spoznanje, da se virusi največ in najbolj uspešno prenašajo s sadilnim materialom. Zaradi številnih maskiranih in latentnih okužb nikoli ni dovolj preverjanja in testiranja matičnih trt. Zaradi velikega napredka tehnik odkrivanja virusov je njihov seznam vedno daljši in govorimo o nikoli končani zgodbi zdravstvene selekcije (Korošec-Koruza in Tomažič, 2002).

Naloga zdravstvene selekcije je pridobivanje trsov, ki niso okuženi s škodljivimi virusi. Elitni trsi, odbrani v fazi triletno predklonske selekcije, so izvorni matični trsi, ki jih s cepljenjem na zdravo bazno podlago razmnožujejo v klonske linije. Pred tem moramo elitne trse toplotno obdelati, da uničimo fitoplazme. Potrjeno morajo negativno reagirati v postopkih indeksiranja in pri laboratorijskem preverjanju - ELISA (Frison in Ikin, 1991).

Govorimo o pridelavi cepljenk brez znanih virusov in brez ekonomsko pomembnih virusov (Korošec – Koruza in Tomažič, 2002).

2.2.3.1 Morfološka selekcija

Morfološka selekcija je prva stopnja pregleda bolezenskih znamenj v vinogradu. Z njo lahko na enostaven način pregledamo trse večkrat v sezoni ter vidna znamenja zapisujemo v Terensko selekcijsko knjigo. Tako lahko hitro in z nizkimi stroški izločimo ali odberemo trse za nadaljnjo delo. Pomanjkljivost metode je v tem, da je metoda manj zanesljiva (latentne okužbe), na ameriških podlagah je praktično neuporabna, znamenja virusnih bolezni pa lahko zamenjamo z drugimi znamenji (Hrček, 1973).

Morfološke spremembe, ki so posledica viroz, se lahko pojavijo v različni intenzivnosti in obliki tekom leta, lahko so maskirane zaradi fiziološkega stanja trte ali zaradi mehanskih poškodb (Korošec – Koruza in Tomažič, 2002).

2.2.3.2 Indeksiranje

Indeksiranje temelji na spoznanju, da nekatere rastline vedno značilno reagirajo na določeno virusno okužbo ter da je okužba v večini primerov prenosljiva s cepljenjem (Martelli, 1993).

Indeksiranje opravimo s suhim ali zelenim cepljenjem proučevanih trsov na določene sorte vinske trte. Dobra stran testa je enostavnost, ker se opravi z običajnim cepljenjem. Obenem je tudi edini veljavni test za ugotavljanje določenih bolezni pri prometu s sadilnim materialom v EU. Slabost je v tem, da prve rezultate odčitamo šele tri leta po cepljenju. Na izražanje znamenj vplivata tudi okolje ter agrotehnični ukrepi, kar zmanjša veljavnost testa, kadar ga ne opravljamo v varovanem prostoru (Grabovac, 1993; Tomažič, 1999; Pravilnik o trženju ..., 2005).

Indeksiranje poteka na znane indikatorje:

- *Vitis rupestris* 'St. George' pri ugotavljanju bolezni kužne izrojenosti – GFLV, razbrazdanja lesa na podlagi *Vitis rupestris*- Rupestris stem pitting (RSP) in okužbe z virusom Grapevine fleck virus (GFkV);

- Rdeče sorte ('Modri pinot'), LN 33 pri ugotavljanju virusnega zvijanja listja - GLRaV;
- 'Kober 5BB' pri ugotavljanju boleznih razbrazdanja lesa na 'Kober 5BB'- Kober stem grooving (KSG) in inkompatibilnosti pri cepljenju;
- 'LN 33' za bolezen plutavosti lubja – Corky bark (CB) in bolezen tipa LN 33 stem grooving (LNSG).



Slika 2: Indeksiranje v loncih levo: 'Volovnik' cepljen na indikator *Vitis rupestris*, z značilnimi znamenji boleznih, ki jo povzroča virus GFLV, desno: zdrav trs (Korošec – Koruza Z.).

2.2.3.3 Laboratorijski testi

Pri večini virusnih boleznih so znamenja vidna in določljiva samo v določenem času v rasti dobi. Velikokrat gre za maskirane ali latentne okužbe z majhno ali različno razporejeno koncentracijo virusa po rastlini in takrat si lahko pomagamo le z laboratorijskim testom. Koncentracija povzročiteljev boleznih je lahko tako nizka, da se ne razvijejo nobena znamenja ali pa je okužba prisotna pri sorti, ki je lahko tolerantna na specifično bolezen. Latentnost so opazili predvsem pri podlagah (Bovey in sod., 1980; Golino in Rowhani, 2002).

Laboratorijske metode nam omogočajo natančno in časovno neomejeno delo (nismo vezani na določeno fenofazo). So ponovljive in zanesljive. Laboratorijska metoda, ki jo najpogosteje uporabljamo je ELISA, je enostavna, cenovno sprejemljiva, testiramo lahko zelo veliko število vzorcev v kratkem času (Martelli, 1993).

Z vstopom v EU smo sprejeli direktivo sveta (iz leta 2002), v kateri so navedeni pogoji za razmnoževalni material. Direktiva Sveta EU... (2002) z aneksom I narekuje odstranjevanje vseh škodljivih virusnih boleznih, zlasti boleznih povzročenih zaradi okužbe z virusi GFLV in GLRaV. Ne določa pa število in pogostost testiranj. S pravilnikom o trženju materiala za vegetativno razmnoževanje trte iz leta 2005 je predpisano obvezno testiranje izvornih matičnih trsov na pet virusov (Priloga C).

2.2.3.3.1 Serološki testi - ELISA

ELISA testi temeljijo na spoznanju, da so virusi s svojim beljakovinskim plaščem dobri antigeni (povzročitelji nastanka protiteles v telesu živali). S temi protitelesi lahko dokažemo prisotnost virusa v soku okuženih trt. Prednost je velika občutljivost in specifičnost, možnost testiranja velikih serij vzorcev, rezultate lahko že v dveh dneh odčitamo, delamo lahko čez vse leto (Frison in Ikin, 1991; Martelli, 1993; Golino in Rowhani, 2002). Osnovna metoda je po Clark in Adamsu povzeta po Martelli-ju 1993; ELISA za nepoviruse, ki so prisotni v pregledovani regiji; ELISA za closteroviruse, ki jih prenašajo žuželke; ELISA za rod *Vitivirus*, ki jih prenašajo ravno tako žuželke (Tomažič, 1999). Za naše programe selekcije so preverjali različne izvedbe ELISA, najbolj uporabna je bila das-ELISA (Korošec - Koruza, 1992; Tomažič, 1999).

S postopki ELISA so v letih 1992 – 2003 na Katedri za vinogradništvo, BF Ljubljana preverjali klonske kandidate iz vinorodne dežele Podravje in Posavje ter iz vinorodne dežele Primorska (Arhiv..., 2006).

V Ljutomersko-Ormoških gorah (vinorodna dežela Podravje) so v letih 1996 - 1999 potekala testiranja klonske selekcije sort: 'Šipon', 'Renski rizling', 'Sauvignon', 'Laški rizling', 'Radgonska ranina'. Testi na okužbo z virusom GFLV so bili negativni. Le en trs sorte 'Sauvignon' je bil okužen z virusom ArMV. Najbolj razširjen virus je bil GLRaV-1 okužba se pojavlja pri vseh naštetih sortah v vseh pregledanih letih. Prisotna sta tudi virusa GLRaV-3 (samo pri sortah 'Sauvignon' in 'Laški rizling') in GLRaV-6 ('Šipon' in 'Laški rizling') vendar v manjšem številu trsov. Prav tako so ugotovili okuženost z virusom GVA pri vseh razen pri sorti 'Radgonska ranina'. Okužba z virusom GFkV se je pri sortah 'Sauvignon' in 'Laški rizling' pojavila v letih testiranja 1998 in 1999 (Rakovec, 2001).

V letu testiranja 1999 so z ELISA določili 35 % okužbo pri sorti 'Sauvignon' (subklona: 15/15 in 14/70) okužbo z GLRaV-1, pri sorti 'Laški rizling' 14 % (subkloni: 22/1/31, 10/8, 34/2/15, 2/22). V letih 1996 - 1998 je bila okužba z virusom manjša od 5 %. Vzrok za tako velik odstotek okužbe v letu 1999 je bil razmnožitev okuženih trsov. Prav tako je pri sorti 'Sauvignon' (subklona 15/15, 14/70) bila okužba z virusom GVA v letu 1999 pogostejša kot v predhodnih letih, vzrok so množitev okuženih trsov. Večji odstotek okužbe trsov z virusom GFkV v letu 1999 je posledica morebitnega prenosa okužbe z okuženimi podlagami (Rakovec, 2001).

V letih 1996 – 1999 so z ELISA testirali 477 trsov iz selekcijskega vinograda v Komnu in starejše kolekcije. Za vrednotenje zdravstvenega stanja so klonsko selekcijo primerjali s starimi neselekcioniranimi trsi sorte 'Refošk'. S testiranjem so ugotovili okuženost z virusi GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-6, GVA, GFkV. Trsi so negativno reagirali na viruse GLRaV-3, ArMV, GVB. Pokazalo se je, da je med starimi neselekcioniranimi trsi velik delež okuženih trt, saj je bilo virusov prostih le 25 % trsov. Velik delež (44 %) je tudi mešanih okužb (okužbo povzroča različno število virusov) in je za štirikrat višji kot pri klonskih kandidatih. Manjši delež mešanih okužb že v prvem krogu selekcije gre pripisati dejstvu, da mešane okužbe na trsah lažje odkrijejo že z vizualnim pregledom znamenj (Tomažič, 1999).

V vinorodni deželi Primorska so leta 1999 z ELISA testirali 73 trsov domačih sort iz kolekcijskega vinograda Lože. Ugotovili so 29 % neokuženih trsov, ostali trsi so pozitivni na viruse GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFkV, ArMV. Velik delež je mešanih okužb 34 %, sledijo posamezne okužbe z virusi GFLV (11 %), GFkV (12 %), GLRaV-3 (9%), ArMV (3 %), GLRaV-1 (1%) (Arhiv..., 2006; Tomažič, 1999).

2.2.3.3.2 Metoda PCR

Poleg ELISA poznamo in uporabljamo tudi druge metode: Polymerase Chain Reaction (PCR), metoda lovljenja delcev immunosorbent electron microscopy (ISEM); testiranja s temi metodami so sicer natančnejša in zadostuje jim nizka koncentracija virusnih delcev, vendar je njihova uporaba veliko dražja, potrebni so visoko kvalificirani sodelavci in zahtevna laboratorijska oprema (Martelli, 1993; Tomažič, 1999; Gugerli, 2000; Golino in Rowhani, 2002; Petrovič in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 KOLEKCIJSKI IN MATIČNI VINOGRADI

Trsi, ki so v postopku selekcije in revizije izhajajo iz različnih vinogradov. Te razvrstimo po namenu v kolekcijske (genska banka, introdukcija) in selekcijske vinograde (osnovne matične, vinogradi prve in druge množitve klonskih kandidatov).

3.1.1 Lože pri Vipavi in Ampelografski vrt – Nova Gorica

V kolekciji Lože je bilo leta 1985 posajenih 21 starih sort, 10 trsov na sorto, z namenom ohraniti najstarejše vipavske sorte kot so: 'Bela glera', 'Briška glera', 'Cividin', 'Cundra', 'Dolga petlja', 'Klarnica', 'Planinka', 'Pergolin', 'Pinela', 'Poljšakica', 'Racuk', 'Rečigla', 'Rožca', 'Sladkočrn', 'Števerjana', 'Verbena', 'Vrtovka', 'Volovnik', 'Zelen', 'Zelenika' in 'Zunek'. Gojitvena oblika je dvokraki guyot, trsi so cepljeni na zdravstveno pregledano podlago 'SO4' (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*). Sorte je opisal že Matija Vertovc leta 1844 v monografiji Vinoreja za Slovence (Vertovc, 1992; Tomažič, 1996).

Del trsov iz kolekcije Lože in kolekcije starih sort iz Dobrovega v Goriških Brdih je bilo precepljeno in posajeno v Ampelografskem vrtu v Novi Gorici. Tako služi ta vinograd za gensko banko vinske trte, poleg tega je bil tudi vir klonskih kandidatov sort 'Rebula' (2.200 trsov), 'Malvazija' in 'Zelen' ter kolekcija podlag in indikatorjev.

3.1.2 Matična vinograda Komen in Slap pri Vipavi

Selekcija sorte 'Refošk' se je na Krasu začela leta 1954 in trajala do leta 1970, ko je bila zaradi nezanimanja za to sorto prekinjena. Zadruga Vinakras je ponovno začela s selekcijo leta 1980. Odbrali so 70 zelo starih trsov sorte 'Refošk', od njih pobrali cepiče ter v letu 1989 v Komnu posadili kolekcijski nasad njihovih potomcev. Namen kolekcije je bil odbrati različne tipe. Kot je predpisano v postopku za klonsko selekcijo so bili vsi trsi ob začetku selekcije testirani na virusne bolezni. Iz tega vinograda izvirajo naši trsi za indeksiranje (Tomažič, 1999; Žiberna, 2000).

V nadaljevanju so bili v letih 1990 in 1991 posajeni izbrani trsi sorte 'Refošk' na lokacijah "Malinkovci" in "Divči". Osnovni namen posaditve vinogradov je bil izbrati ustrezne elite za klonsko selekcijo in ohranitev starega tipa sorte 'Refošk' (Žiberna, 2000).

Podobno selekcijsko nalogo ima kolekcijski vinograd na Slapu pri Vipavi. Posajen je bil leta 1992 za namene STS Vrhpolje pri Vipavi. V kolekciji so posajeni klonski kandidati sort 'Barbera', 'Malvazija', 'Zelen', 'Pinela', 'Refošk', 'Rebula', 'Laški rizling', 'Zeleni sauvignon' ('Furlanski tokaj'), ki so že v postopku priznavanja (Topolovec in Gregorič, 2002).

3.1.3 Metoda morfološke selekcije

Spomladi leta 2005 smo po metodi PMS opravili pregled kolekcije Lože in Komen. Znamenja virusnih obolenj smo vpisovali po navodilih terenske selekcijske knjige

(Terenska selekcijska knjiga). Popisovali smo znamenja bolezni kot so: mozaik, petršiljavost, osipanja in druga kot jih priporočajo avtorji Bovey in sod. (1980), Pearson in Goheen (1988), Koruza (2002), Terenska selekcijska knjiga (1990) in Pravilnik o trženju materiala za vegetativno razmnoževanje trte (2005).

3.1.4 Indeksiranje

Indeksiranje uporabljamo kot metodo za določevanje prisotnosti okužbe z virusi oziroma virusom podobnim organizmom na trti in za potrebe selekcije (Martelli, 1993).

V februarju 2005 smo iz kandidatov in indikatorjev v STS Vrhpolje opravili indeksiranje. Mladike debeline 3-5 mm smo strojno cepili (slika 3). Cepljeni del smo zaščitili s tekočim parafinom in tako dosegli boljši izpleni cepljenja. Cepljenke smo posadili v meglilnik v pripravljen substrat (vermikulit), ki smo ga predhodno toplotno obdelali. V substrat so položeni grelci s katerimi dosežemo 22–24 °C. Vlažnost zraka v meglilniku (80 %) smo vzdrževali s pršilniki, ki so se vklopili 1 krat/minuto. Opisano metodo smo povzeli po Martelli (1993).

Za STS je bilo opravljeno cepljenje po metodi zeleno na zeleno v STS Vrhpolje pri Vipavi; cepljeni indikatorji so bili po enem letu iz rastlinjaka preneseni v mrežnjak v Ampelografski vrt. Tu smo v sezoni 2006/07 spremljali pojav znamenj. Za indikatorje smo uporabili *Vitis rupestris* E (vir Ampelografski vrt), *V. rupestris* St. George (TRANSVIR, 2002) in *V. rupestris*, LN 33, 'Modri pinot', *V. riparia* (iz programa selekcije 1978 - 1985 STS). Klonski kandidati (29) iz preglednice 7 so bili cepljeni na več indikatorjev (a, b, c...) v petih ponovitvah. Skupaj smo imeli v poskusu za spremljanje indeksiranja 275 cepljenk.



Slika 3: Prikaz strojnega cepljenja zeleno na zeleno (Gregorič J.).

S pripravo kandidatov in indikatorjev iz ključev ukoreninjenih v rastlinjaku dobimo cepilni material v isti fenofazi, kar da večji izplen cepljenja. Po 21 dneh v meglilniku požene 'zelena cepljenka', na cepljenem mestu se tvori kalus in rastlina je pripravljena za posaditev v lonce s substratom (1/3 šota, 1/3 vermikulit in 1/3 pesek). Pri tako pripravljenih rastlinah (nacepljeni indikatorji) smo opazovali razvoj bolezenskih znamenj v letu 2006/2007. Spremljali smo tudi 45 nacepljenih indikatorjev iz prejšnjih let indeksiranja (Koruza in sod., 2003).

3.2 ARHIV PODATKOV TESTIRANJA KLONSKIH KANDIDATOV

V reviziji zdravstvene selekcije smo obdelali podatke iz arhiva testiranj vinske trte v Sloveniji v letih od 1992 do 2003. Arhiv hrani Katedra za vinogradništvo, rezultati testiranja so del poročila strokovne naloge o introdukciji in selekciji vinske trte, ki ga pripravlja KIS letno. V arhivskih dokumentih so zbrani podatki testiranj vinske trte z ELISA. Zbrani so podatki o kandidatu, lokaciji, kjer so bili vzorci nabrani, število vzorcev in odčitki testiranj ter serološki pripravki, ki so bili uporabljeni pri testiranjih (Arhiv..., 2006).

Obsežno testiranje vinske trte na viruse s serološkim testom ELISA in indeksiranje na indikatorje je zajelo več kot 70 *Vitis* sort ali križancev. Za določitev nadaljnjega obsega dela zdravstvene selekcije je bilo potrebno obdelati podatke iz baze arhiva.

S trsi – klonskimi kandidati, ki so bili na testiranju negativni so nadaljevali klonsko selekcijo. Bili so ponovno cepljeni in v drugi množitvi preverjeni na sortne in kakovostne lastnosti. Pozitivni okuženi trsi so bili v naslednjem letu indeksirani. Del tega indeksiranja je tudi predmet te diplome.

4 REZULTATI

Rezultate prikazujemo po pridobljenih podatkih na posamezni stopnji zdravstvene selekcije od morfološke selekcije v vinogradih do indeksiranja.

4.1 MORFOLOŠKA SELEKCIJA

Znamenja virusnih obolenj se pojavljajo različno glede na letni čas oziroma na rastno dobo. Spomladi se na trsih pokažejo predvsem znamenja okužb z virusi GFLV in ArMV. Na trsih se razvijejo razne anomalije in biforkacije, ki jih pripisujemo povzročiteljem kužne izrojenosti vinske trte. Pred trgatvijo smo opazovali predčasno rdečenje in zvijanje listov ter razbrazdanje lesa (Bovey in sod., 1980).

4.1.1 Pregled vinograda starih trt (Lože) in Ampelografski vrt

Spomladi leta 2005 smo pregledali trse v kolekcijskem vinogradu v Ložah. Znamenja povezana z GFLV smo opazili na sortah 'Poljšakica', 'Števerjana', 'Volovnik' in 'Zelen'. Sorta 'Volovnik' kaže vedno zelo značilna znamenja boleznih kužne izrojenosti, predvsem se na trsu opazi zelo zbita pritlikava rast (Reisigkrankheit). Okužb z virusom Fleck nismo opazili. Prav tako nismo opazili na listih in mladikah znamenj, ki jih povzročajo virusi iz rodu *Closterovirusi*. Pri sorti 'Klarnica' smo na deblu opazili razbrazdanost lesa. Ker gre za bele sorte so bila znamenja vezana z GLRaV slabše vidna, maskirana s poškodbami zaradi burje in posledicami suše. Samo na sorti 'Zunek' so bili za GLRaV tipični, navzdol uvihani listi (preglednica 3).

Preglednica 3: Pregled kolekcijskega vinograda v Ložah po metodi PMS spomladi leta 2005.

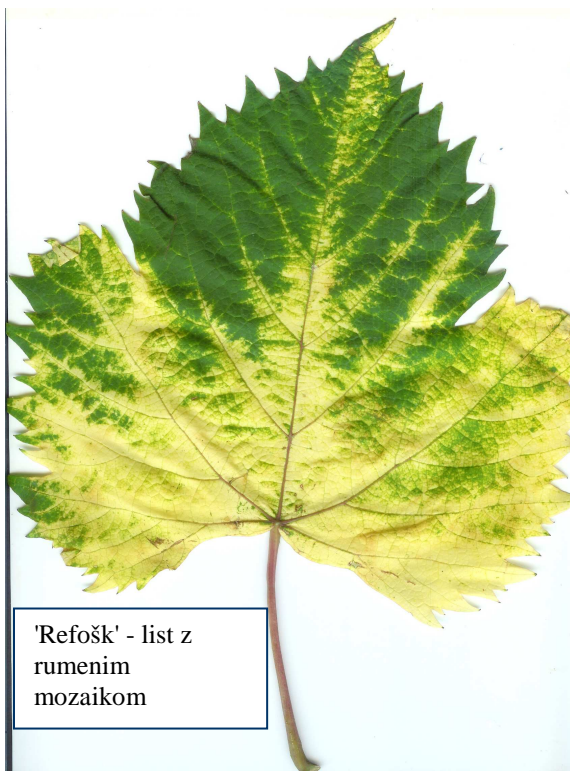
Sorta	Znamenja				
	Mozaik	Peteršiljavost	ZIM ⁹	Razbrazdan les	Zvijanje lista
'Klarnica'				+	
'Poljšakica'	+	+			
'Racuk'					
'Rečigla'					
'Sladkočrn'					
'Števerjana'			+		
'Volovnik'	+	+	+		
'Zelen'			+		
'Zunek'					+

V Ampelografskem vrtu smo pregledali matične trse sorte 'Rebula' in pri dveh trsih 1/12, 6/31 smo našli moški cvet – nepravilen, ki povzroča osipanje podobno znamenjem okužbe z GFLV. Na nekaj trsih smo opazili znamenja ZTR, ki pa so tipično drugačna od znamenj na sorti 'Chardonnay'. Ni tipičnega kovinskega leska na listih in ni neenakomerno dozorelega lesa.

⁹ ZIM – znaki izrojenosti na mladikah

4.1.2 Pregled vinograda Komen

V letu 2005 smo spomladi pregledali matične vinograde sorte 'Refošk'. V PMS so vidna tipična znamenja mozaika (slika 4) v standardnem vinogradu. V vinogradu klonskih kandidatov, ki so že prešli nekaj stopenj osnovne morfološke selekcije bolezenskih znamenj nismo našli.



Slika 4: Znamenja rumenega mozaika na listu sorte 'Refošk' Sveto, 2004.



Slika 5: Začetek rdečenja lista sorte 'Refošk', sum na okužbo z GLRaV.

Pred trgatvijo smo v selekcijskem vinogradu v Komnu (»Pod veterinarjem«) pregledovali trse sorte 'Refošk'. V tem času so se pri okuženih trsah razvila znamenja boleznih zvijanja listov na trsah 6 II/18,¹⁰ 43 VII/113, 44 VIII/124, 44a X/84, 50a XI/59, 51 IX /69, 52 IX/76. Znamenja lahko pogosto zamenjujemo z znamenji ZTR, ki jih je bilo v tem vinogradu veliko. Pri tistih trsah, pri katerih smo opazili znamenja boleznih, smo v času mirovanja nabrali les za indeksiranje. Ugotavljali smo tudi znamenja razbrazdanja. Potrdili smo jih na trsah elit 20, 37 in 51, kjer je že v predhodnih selekcijah bilo zaznanih veliko znamenj razbrazdanja. Od 59 trsov z znamenji razbrazdanja je v rastni dobi 2004 propadlo 14 trsov (19,40 %).

4.2 OBDELAVA PODATKOV IZ ARHIVA TESTIRANJ

Zdravstvena selekcija vinske trte je pomemben in učinkovit program pri preprečevanju širjenja boleznih. V Sloveniji poteka že od leta 1968, po letu 1990 so vključili serološke teste in indeksiranje. Analiza arhiva testiranj Katedre za vinogradništvo (BF-Ljubljana) zajema pregled stanja po sortah in izbranih klonskih kandidatih med leti 1992 - 2003.

Rezultati revizije so pregled po vinorodnih deželah ter zdravstveno stanje testiranih trsov. Izmed teh je 15 sort vključenih v nadaljnjo klonsko selekcijo. Trse se testira po EU direktivi (Direktiva Sveta..., 2002).

Letno se je na Katedri za vinogradništvo v povprečju z ELISA testiralo približno 3.000 trsov klonskih kandidatov in starih lokalnih sort. V preglednicah 4 in 5 so izbrane sorte pri katerih poteka nadaljevalna klonska selekcija.

¹⁰ oznaka trsa: elita vrsta / trs v vrsti

4.2.1 Vinorodni deželi Podravje in Posavje

V obdobju 1992 – 2003 so z ELISA pregledali več kot 11.800 vzorcev iz omenjenih vinorodnih dežel za viruse: GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV.

Preglednica 4: Pregled testiranja klonskih kandidatov, vinorodne dežele Podravje in Posavje, testiranih s serološkim testom ELISA med leti 1992 -2003.

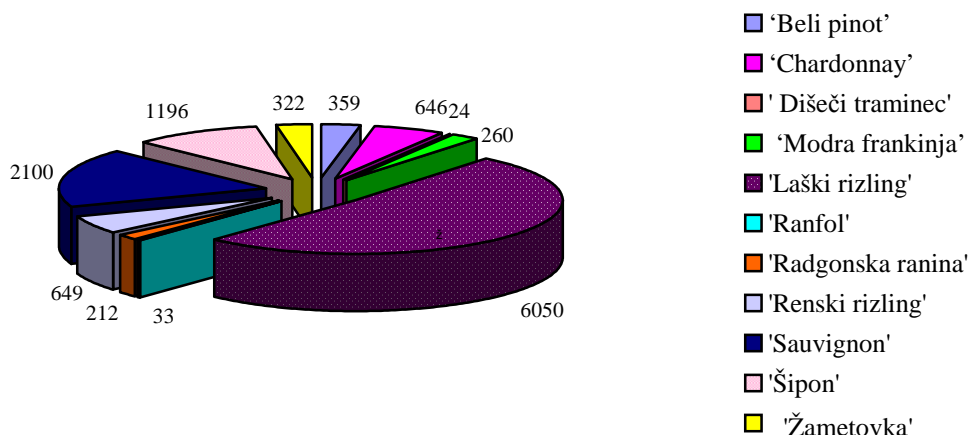
	SORTA	Oznaka klonskega kandidata ¹¹	Število pregledanih klonskih kandidatov										
			1992	1993	1994	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
1	'Beli pinot'	46/2, 51/39, 50/65,...		3	2	4		5	317	28			
2	'Chardonnay'	8/66, 9/26, 16/30,...		37	12			419	2	176			
4	'Laški rizling'	178/29, 178/36, 22/1, ...	459	3381	310	11	655	30	976	60	144		6
3	'Modra frankinja'	20/54, 19/3, 29/21,...		22					236	2			
5	'Radgonska ranina'	10/2, 16/33, 12/19,...		10	3			195		3		1	
6	'Renski rizling'	10/50, 10/52, 22/131,...	80	59	19	1		49	393	33			
7	'Sauvignon'	20/21/2, 20/28/3,14/19,...	335	150	12	95	738	433	252	40			
8	'Šipon'	26/13, 15/140, 15/6,...		29	17	20	19	616	355	140			
9	'Žametovka'	2/23 in standard							77		120		125
	SKUPAJ		874	3691	375	131	1412	1747	2608	482	264	1	131

V letu 1993 se je v vinorodni deželi Podravje in Posavje preverilo 3.691 trsov devetih najpomembnejših sort vinske trte: 'Beli pinot', 'Chardonnay', 'Modra frankinja', 'Laški rizling', 'Radgonska ranina', 'Renski rizling', 'Sauvignon', 'Šipon' in 'Žametovka'. V letih 1994 in 1996 so opravljali le manjkajoča testiranja. V letih 1997 do 1999 so množitve teh trsov ponovno testirali. Poleg tega so vključili dva nova virusa GLRaV-6 in GFkV.

Na sliki 6 niso prikazani podatki o številu testiranj sort 'Muškat', 'Muškat medeni', 'Muškat zeleni', 'Muškat žlahtni', iz kolekcije starih sort v Ivanjkovcih, ker so te sorte šele na začetku selekcije in je bil testira za sorto le en trs, tako še ne moremo govoriti o klonskih kandidatih.

Za Posavje bi morali testirati še sorte 'Kraljevina' (pomembna za pridelavo cvička), 'Rumeni plavec', 'Belina' in 'Portugalka' kot pomembne lokalne sorte. Tudi za te sorte je selekcija šele na začetku. Po shemi klonske selekcije (preglednica 2) bodo v testiranju v letu 2006/2007.

¹¹ Poleg izbranih kandidatov se je testiralo tudi druge sorte, za podrobnejši pregled glej prilogi B in D.



Slika 6: Strukturni krog število vzorcev testiranih sort z ELISA v letih 1992 - 2003 v vinorodni deželi Podravje in Posavje (Arhiv..., 2006).

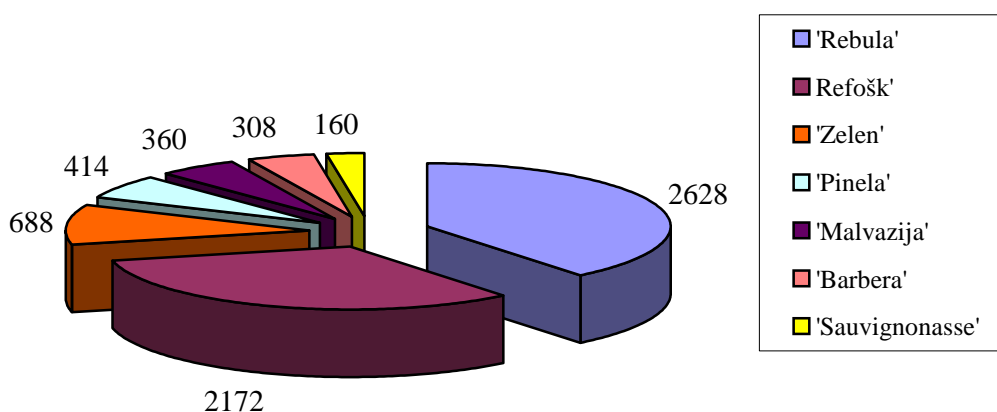
4.2.2 Vinorodna dežela Primorska

V letih 1992 – 2003 je bilo pregledanih 7.000 vzorcev 36 sort vinske trte z ELISA za naslednje viruse: GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-6, GLRaV-8, GVA, GFkV. Za sorte 'Refošk', 'Rebula', 'Barbera', 'Malvazija', 'Zelen', 'Pinela' poteka nadaljevalna klonska selekcija. Največ testiranj je bilo opravljenih za sorti 'Refošk' (2.167 vzorcev) in 'Rebula' (2.628 vzorcev) (slika 7).

Preglednica 5: Razvrstitev klonskih kandidatov, vključenih v klonsko selekcijo vinorodna dežela Primorska, testiranih s serološkim testom ELISA.

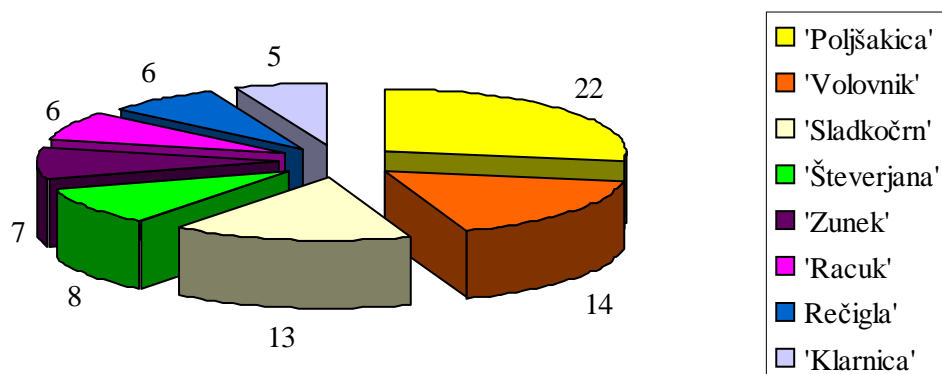
SORTA	Oznaka klonskega kandidata* ¹²	Število pregledanih klonskih kandidatov										
		1992	1993	1994	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
1 'Barbera'	18/20, 9/17, 2/19,...		129			138	11		2	5		23
2 'Malvazija'	3/56, 5/33, 4/19		2	1		345	9		3			
3 'Rebula'	2/54, 2/51, 2/13,...	46	1483	17		844	95	5	5	81	7	43
4 'Refošk'	2, 4, 7,...	180	170	7	230	827	16	273	222	87	49	37
5 'Zeleni sauvignon'	3/24, 1/8, 1/26,...		5					98	57			
6 'Zelen'	66, 49, 20, 22, 45, 38, 1	10	10	369	13	13		100	56	27	20	63
SKUPAJ		236	1799	394	243	2167	131	476	345	202	76	166

¹² Podrobnejši seznam sort in klonskih kandidatov je v prilogi B in D.



Slika 7: Strukturni krog število vzorcev sort iz vinorodne dežele Primorska, testiranih med leti 1992 in 2003 z ELISA (Arhiv..., 2006).

Veliko je starih domačih in udomačenih sort iz Vipavskega vinorodnega okoliša, večina teh je bilo testiranih v letu 1999. V nadaljnjih letih so bili ti trsi uporabljeni tudi kot pozitivni kontrolni trsi, zaradi obsežnih okužb z vso paleto virusov (slika 8).



Slika 8: Strukturni krog število vzorcev domačih lokalnih sort vinske trte, testiranih med leti 1992 in 2003 z ELISA (Arhiv..., 2006).

4.2.2.1 Testiranje sorte 'Refošk' na Krasu

Prvo testiranje trsov z ELISA je bilo narejeno leta 1992. Pregledali so 55 klonskih kandidatov (180 vzorcev). V letih do 2003 so opravili skupno 1.879 vzorčenj, največ jih je bilo v letih 1996 in 1999; skupno 1.085 vzorcev.

Za sorto 'Refošk' je bilo opravljenih veliko testiranj na viroze in obsežna selekcija. Problem so bile mešane okužbe in veliko znamenj razbrazdanja lesa ter predčasnega rdečenja listov. Zato smo posamezne kandidate še dodatno indeksirali. Primerjava testov iz prejšnjih let in našega indeksiranja je v preglednici 6 (Tomažič, 1999).

Zdravstveno stanje množitev klonskih kandidatov sorte 'Refošk', se preverja v selekcijskem vinogradu na Slapu (STS). Leta 1997 je bilo testiranih z ELISA 263 trsov; treh klonskih kandidatov 'Refošk' 2, 'Refošk' 4 in 'Refošk' 17. Pri vseh potomcih enega kandidata so našli okužbo z GLRaV-1 in kandidat je bil izključen iz nadaljnjega razmnoževanja. Zaradi več nerazjasnenih znamenj rdečenja listov in razbrazdanja lesa so ponovili testiranja trsov iz Komna in testirali še na viruse GLRaV-5 in GLRaV-6 in GVB) (Arhiv..., 2006).

Poleg omenjenih območij klonska selekcija poteka še v vinorodnem okolišu Slovenska Istra; ('Refošk' Bonin). Prvi pregled z ELISA je bil leta 1993; pregledali so 30 trsov. Zaradi pojavov razbrazdanja lesa v PMS trsi, niso bili izbrani za nadaljnje množitve (Arhiv..., 2006).

4.2.2.2 Testiranje sorte 'Rebula'

Tako kot pri ostalih sortah se je selekcija sorte tudi začela leta 1968 s PMS, vendar na manj selekcioniranem materialu. V Podravju je bila namreč v letih 1960-1980 (Hrček, 1973) že opravljena predklonska selekcija in prva množitev klonov, medtem ko so za sorte iz Primorske v 1980 letih začeli s prvo odbiro elit. Namen genetske selekcije je bil tudi odbrati pravi tip 'Rebule'. Po končani PMS so posadili izbrane trse v matičnem vinogradu na Slapu. Izvor različnih tipov oziroma različkov sorte 'Rebula' je iz Ampelografskega vrta in Goriških Brd. Prva množitev klonskih kandidatov je tudi vinograd Bovcon – Selo. Zaradi več trsov pozitivnih na GFkV je bil ta matični vinograd izključen iz nadaljnjega razmnoževanja in testiranja. V letih 1992 do 2003 so pregledali skupno 2.628 vzorcev. Pri sorti 'Rebula' je bilo mnogo manj okužb z GLRaV-1 kot pri sorti 'Refošk'. Več je bilo okužb z GFLV in GFkV (Arhiv..., 2006).

4.2.2.3 Testiranje sorte 'Zelen'

Sorta 'Zelen' je avtohtona sorta v vinorodnem okolišu Vipavska dolina. Z ELISA so pregledali 688 vzorcev. S selekcijo so iz začetnih 30 trsov prišli do dveh klonskih kandidatov, ki sta posajena v kolekciji Slap. V reviziji so bili potomci dveh klonskih kandidatov 66/6 in 20/6. Glede na velik pomen dveh lokalnih sort 'Zelen' in 'Pinela' bi bilo potrebno postaviti širšo bazo matičnih trsov (Arhiv..., 2006).

4.3 INDEKSIRANJE

Izbira kandidatov za indeksiranje najpogosteje poteka glede na predhodne rezultate laboratorijskih testov, glede na sporne rezultate morfološke selekcije in druge posebne selekcijske naloge. Program indeksiranja je za vsako leto posebej določen s programom dela STS (Topolovec in Gregorič, 2002).

Indeksiranje kot metodo preverjanja zdravstvenega stanja vinske trte v mrežnjaku v Ampelografskem vrtu smo uporabili za preverjanje okuženosti z virusi, predvsem z virusi iz kompleksa razbrazdanja lesa (slika 9). Za ta kompleks testi do leta 2003 niso dali odgovorov na vprašanja, kateri virus povzroča razbrazdanje (Korošec – Koruza in Tomažič, 2002).

V preglednici 6 smo rezultate našega indeksiranja primerjali s predhodnimi rezultati morfološke selekcije in seroloških testov za izbrane klonske kandidate.



Slika 9: Nacepljeni indikatorji v loncih v prvem letu cepljenja, spomladi leta 2005, STS, Vrhpolje (Gregorič J.).

Preglednica 6: Primerjava rezultatov testiranja klonskih kandidatov, ELISA, 1999 - 2002 in indeksiranja 2005/2006.

Za. Št.	Trs / kandidat	Cepljenka	Indikator	Znamenja v vinogradu - PMS	Znamenja na indikatorju	Okuženost z virusom / leto testiranja 1999 – 2002	
1	Rebula 1/2	a	<i>V. rupestris</i>	Osipanje GFLV ?	neg	GFLV ?	neg
2	Rebula 1/12	b	LN 33	Osipanje GFLV ?	neg	GFLV ?	neg
3	Rebula 3/14		<i>V. rupestris</i>	neg	neg	neg	neg
4	Rebula 4/14		<i>V. rupestris</i>	neg	neg	neg	neg
5	Rebula 6/31	a	<i>V. rupestris</i>	neg	neg	neg	neg
	Rebula 6/31	b	LN 33	Osipanje (fleck)	neg	GFkV	neg
6	Rebula 5/13	a	<i>V. rupestris</i>	neg	neg	GFkV	neg
	Rebula 5/13	b	LN 33	neg	neg	neg	neg
7	Refošk 6II/18		<i>V. rupestris</i>	GLR	neg	GFLV	GVA
8	Refošk 20 IV/110	a	<i>V. rupestris</i> 12	Raz ↓	Stem pitting?	GFkV	GLRaV-2 ?
	Refošk 20 IV/110	b	<i>V. rupestris</i> 5	Raz ↓	neg	GFkV	GLRaV-2 ?
	Refošk 20 IV/110	c	'Modri pinot'	Raz ↓	rdečenje	GFkV	GLRaV-2 ?
9	Refošk 23 V/50		<i>V. rupestris</i>	neg	neg	GLRaV-1	-
10	Refošk 38 VIII/44	a	<i>V. rupestris</i> 8	GFLV?	neg	neg	-
	Refošk 38 VIII/44	b	<i>V. rupestris</i>	GFLV?	neg	neg	-
	Refošk 38 VIII/44	c	<i>V. rupestris</i> 5	GFLV?	neg	neg	-
11	Refošk 43 VII/113		<i>V. rupestris</i> 8	neg	neg	neg	-
12	Refošk 44 VII/124	a	<i>V. rupestris</i> 5	neg	neg	GLRaV-1	-
	Refošk 44 VII/124	b	<i>V. rupestris</i> E	neg	neg	GLRaV-1	-
13	Refošk 44a X/84	a	<i>V. rupestris</i> 8	GLRaV	neg	GLRaV-1	GVA
	Refošk 44a X/84	b	<i>V. rupestris</i> 12	GLRaV	Stem pitting?	GLRaV-1	GVA
	Refošk 44a X/84	c	<i>V. rupestris</i> 5	GLRaV	neg	GLRaV-1	GVA
14	Refošk 48 IX/43	a	<i>V. rupestris</i> 8	neg	neg	neg	-
	Refošk 48 IX/43	b	<i>V. rupestris</i> E	neg	neg	neg	-
15	Refošk 50 IX/59		<i>V. rupestris</i>	neg	neg	neg	-
16	Refošk 50a XI/59	a	<i>V. rupestris</i> 8	neg	neg	GLRaV-1	-
	Refošk 50a XI/59	b	<i>V. rupestris</i> 5	neg	neg	GLRaV-1	-
17	Refošk 51 IX/68		<i>V. rupestris</i> 8	neg	neg	GLRaV-1	-
18	Refošk 51 IX/69	a	<i>V. rupestris</i> 5	Raz ?	Stem pitting	GLRaV-1	GVA
	Refošk 51 IX/69	b	<i>V. rupestris</i> E	Raz ?	neg	GLRaV-1	GVA

Se nadaljuje...

Za. št.	Trs / kandidat	Cepljenka	Indikator	Znamenja v vinogradu - PMS	Znamenja na indikatorju	Okuženost z virusom/leto testiranja 1999 - 2002	
19	Refošk 52 IX/76	a	V. rupestris E	neg	neg	GLRaV-1	-
	Refošk 52 IX/76	b	V. rupestris 5	neg	neg	GLRaV-1	-
20	Refošk 52a X/70		V. rupestris 5	neg	neg	GLRaV-1	GVA
21	Refošk 52 IX/76	a	V. rupestris 12	neg	neg	GLRaV-1	GVA + GFLV
	Refošk 52 IX/76	b	V. rupestris 5	neg	neg	GLRaV-1	GVA + GFLV
22	Refošk 61 XII/68	a	V. rupestris 12	neg	neg	GLRaV-2	-
	Refošk 61 XII/68	b	Refošk 61 XII/68	neg	neg	GLRaV-2	-
23	Refošk 61 XII/77	a	V. rupestris 12	neg	neg	GLRaV-2	-
	Refošk 61 XII/77	b	V. rupestris 5	neg	neg	GLRaV-2	-
	Refošk 61 XII/77	c	V. rupestris 8	neg	neg	GLRaV-2	-
	Refošk 61 XII/77	d	LN 33	neg	neg	GLRaV-2	-
24	Refošk 62 XII/110	a	LN 33	GLRaV + Raz↓	rdečenje	GLRaV-1	GFkV
	Refošk 62 XII/110	b	V. rupestris	GLRaV + Raz↓	rdečenje	GLRaV-1	GFkV
25	Zametovka A.V.		V. riparia	Neg	neg	/	/
26	Zametovka 2.23		LN 33	neg	neg	/	/
27	Zelen 66/6	a	LN 33	neg	neg	neg	neg
	Zelen 66/6	b	V. rupestris 12	neg	neg	neg	neg
	Zelen 66/6	c	V. riparia	Raz ?	neg	Raz ?	neg
28	Zelen 20/6	a	LN 33	neg	neg	neg	neg
	Zelen 20/6	b	V. rupestris 12	neg	neg	neg	neg
	Zelen 20/6	d	V. riparia	neg	neg	neg	neg
	Zelen 20/6	e	'Modri pinot'	neg	neg	neg	neg
29	Malvazija 4/19	a	V. rupestris 12	neg	neg	neg	neg
	Malvazija 4/19	b	V. riparia	neg	neg	neg	neg
	Malvazija 4/19	c	'Modri pinot'	neg	neg	neg	neg

Legenda: kandidat/indikator

- *) neg ni znamenj na indikatorju / EISA je negativna *) a, b, c.... kombinacija trs / kandidat
 *) - negativen ELISA test na druge vir use *) / ni podatka
 *) Raz ↓ razbrazdanje lesa na podlagi

Kljub obsežnemu seznamu uporabljenih indikatorjev smo dokazali le povezavo treh primerov pozitivne ELISA reakcije in znamenj razbrazdanja na indikatorju (7/a, 12/b in 17/a). V treh primerih smo z indeksiranjem potrdili predčasno rdečenje (23/a in b, 7/c). Dvakrat je šlo za povezavo z GLRaV-1 in enkrat za povezavo GLRaV-2 in GFkV v ELISA. Številna znamenja razbrazdanja, ki jih vidimo v vinogradu se pri nacepljenih indikatorjih niso pojavila. Po podatkih indeksiranja drugih avtorjev (Martelli, 1993) smo pričakovali več znamenj razbrazdanja na lesu indikatorja, predvsem tam kjer so podobna znamenja v morfološki selekciji v vinogradu. Pokazalo se je, da sta ELISA in morfološka selekcija bolj zanesljivi metodi.

Iz primerjave metod morfološkega pregleda vinograda, indeksiranja na indikatorje in ELISA vidimo, da je slednja metoda tista, ki je bila v naši selekciji najbolj zanesljiva; z njo lahko določimo prisotnost virusa, kljub temu da znamenja niso vidna.

Od prvotnih 320 nacepljenih indikatorjev v lončkih nam je po dveh letih spremljanja ostalo 272 lončkov z indikatorji. Vzroki za velik izpad nacepljenih indikatorjev so predvidoma slabši cepilni material, saj gre za virusne trte, pomanjkljiva tehnika oskrbe v rastlinjaku, vendar nam je pri petih ponovitvah ostalo dovolj materiala za rezultate (slika 10).



Slika 10: Nacepljeni indikatorji v času mirovanja, februar 2006, STS Vrhpolje (Jež A).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V več kot desetletnem obdobju zdravstvene selekcije se je naredilo veliko testov in pridobili smo koristne informacije o okužbah in zdravstvenem stanju razmnoževalnega materiala vinske trte v Sloveniji.

5.1 RAZPRAVA

Zdravstvena selekcija je bila dovolj obsežna in je že od leta 1992 potekala na način kot ga predvideva EU.

Zaradi različne stopnje selekcije v treh vinorodnih deželah Slovenije je bil obseg dela različen. V Podravju so testirali potomce klonskih kandidatov, na Primorskem so obenem s prvo izbiro klonskih kandidatov že vzporedno testirali stare lokalne sorte. Za stare lokalne sorte se je mnogo več naredilo na Primorskem, kjer so bile pravočasno postavljene kolekcije trt. Najmanj je bilo narejenega za vinorodno deželo Posavje, ki nima svojega STS in tudi ne ustreznih kolekcijskih vinogradov.

V morfološki selekciji pogosto pride do zamenjav znamenj iz kompleksa rdečenja listov z znamenji okužb z ZTR, zamenjujemo jih s fiziološkimi motnjami. Sistematično delo v PMS v veliki meri izključi okužen material, kar je razvidno iz majhnega odstotka okužb v naslednjih krogih selekcije.

V zadnjih letih je bilo zaradi novih serumov, odkritij novih virusov in dopolnitev laboratorijskih metod, opravljenih veliko ponovitev testiranja izbranih trsov. Delno je problematično določevanje virusov GLRaV (1 do 9) predvsem GLRaV-5 in 6. V Sloveniji so bili testirani le: GLRaV-1, GLRaV-3 in GLRaV-6.

Problem predstavlja virus GFkV. Okužba v vinogradu oziroma na trsu je velikokrat maskirana in je ne vidimo. Po podatkih tujih raziskav (Boscia in sod., 1991) povzroča virus slabo ukoreninjenost podlag in s tem posredno vpliva na količino in kakovost pridelka ter na odpornost vinske trte na stres. Vprašanje vpliva virusa na žlahtno trto postaja vse bolj aktualno, ker je prisotnost virusa večja v mlajših nasadih. Verjetnost, da se je virus prenesel z okuženim razmnoževalnim materialom je veliko večja, predvsem gre za prenos s podlagami.

Evropska zakonodaja predpisuje obvezno testiranje na pet obveznih virusov, ostala testiranja priporoča po potrebi (Direktiva sveta., 2002). V Sloveniji so testirali trse na sedem virusov. Veliko izhodiščnega materiala za klonsko selekcijo so pridobili s PMS. Zaradi ukinjenega trgovanja s standardnim materialom v državah članicah EU osnovna množična selekcija izgublja na pomenu. Vendar se pojavlja problem, kje in kako bomo našli dober izhodiščni material za nadaljnjo množično selekcijo oziroma klonske kandidate za nov cikel selekcije (Tomažič, 1999).

5.2 SKLEPI

V več kot desetletnem obdobju (1992 - 2003) zdravstvene selekcije v Sloveniji se je naredilo veliko testov. Zbranih je veliko podatkov o virusih, virusnih in njim podobnih boleznih, o pojavnosti po naših sortah in vinorodnih deželah.

Ugotovili smo, da je zdravstvena selekcija vinske trte nujen ukrep pri preprečevanju vnosa novih virusnih okužb v vinograde. Pri reviziji selekcije smo našli nekaj primerov vnosa novega virusa (GFKV) v naš klonski material. Virus smo prenesli z okuženo podlago.

Indeksiranje je dobra metoda, ki nam lahko dopolni laboratorijske teste. Pomanjkljivosti te metode so potrebni zavarovani prostori (rastlinjak, mrežnik, indeksna trsnica), malo število vzorcev, čas trajanja opazovanj (3 leta), kar podraži postopek. Indikatorske rastline moramo zaščititi pred okužbami. Več okužb odkritih z ELISA nismo odkrili z indeksiranjem po dveh letih, kar zmanjšuje pomen postopka in jo podaljša. Hipotezo, da se pri indeksiranju pokaže vse kar se pri ELISA, ovržemo.

Obseg obveznih testiranj na število virusov se naj ne bi zmanjšal. Potrebno bo spremljati širjenje novih virusov (RBDV- Raspberry bushy dwarf idaeovirus) in virusov, ki so v vinogradu v latentnem stanju in maskirani.

Ob ponovni reviziji selekcije predlagamo delo v več ločenih sklopih, ker je v sedanjem obsegu pregled opravljenega dela zelo obsežen in včasih že nepregleden.

6 POVZETEK

Število virusov in virusnih okužb se vsako leto povečuje. S pozitivno množično selekcijo izločimo trse na katerih se pojavijo znamenja bolezní. Vendar so okužbe z virusi lahko maskirane oziroma jih zamenjujemo s fiziološkimi motnjami. Metoda množične selekcije ni dovolj zanesljiva, ker lahko prenesemo okužbe s cepiči še preden se pokažejo znamenja okužbe z virusom na matični trti. Vrednost PMS je v tem, da zajema veliko število vinogradov in je enostavna metoda.

Množično selekcijo dopolnjujejo programi zdravstvene selekcije. V Sloveniji jih vodi KIS, sodelujejo še Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani; Fakulteta za kmetijstvo Maribor in STS Vrhopolje pri Vipavi in STS Ivanjkovci pri Ormožu. Program poteka od leta 1973, ameriški projekt Proučevanje virusnih bolezní v zvezi s selekcijo vinske trte (Hrček, 1973). Z razvojem laboratorijskih metod, ki so zanesljive, ponovljive in učinkovite, so programi selekcije dobili pomembno orodje, s katerim lahko pravočasno odkrijemo in določimo povzročitelja bolezní ter tako preprečimo vnos virusa v razmnoževalni material (Arhiv..., 2006)

V arhivu Katedre za vinogradništvo - BF v Ljubljani so shranjeni podatki laboratorijskih testov ELISA od leta 1992 do 2003, ki so jih opravljali sodelavci Katedre za vinogradništvo, za potrebe klonske selekcije. Naša naloga je bila pregled podatkov. Podatke smo pregledali po območjih, katere smo razdelili na dva dela, glede na vinorodne dežele oziroma na delo dveh STS v Sloveniji.

Za zdravstveno selekcijo v dveh vinorodnih deželah Podravje in Posavje (STS Ivanjkovci pri Ormožu), je bilo v omenjenem obdobju narejenih 11.800 vzorcev 17-ih sort žlahtne trte. Testi so bili narejeni na viruse: GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV. 11 sort je vključenih v nadaljnjo klonsko selekcijo. V postopku potrjevanja je 20 klonov šestih sort: 'Dišeči traminec', 'Radgonska ranina', 'Laški rizling', 'Sauvignon', 'Šipon' in 'Žametovka'.

Največ okužb z virusom GLRaV-1 (35 %) in z virusom GVA (22 %) so odkrili leta 1999 pri sorti 'Sauvignon'. Vzrok je bila okužba z osnovnim razmnoževalnim materialom. Tukaj se je pokazalo, kako pomembno je dosledno spremljati zdravstveno stanje vinske trte. Revizija je leta 1999 pokazala tudi višji odstotek okužb z virusom GFkV (8 %) v nadaljnjih množitvah (Rakovec, 2001)

V vinorodni deželi Primorska (STS Vrhopolje pri Vipavi) so pregledali 7.000 trsov. Največ testov je bilo narejenih na sortah 'Refošk' (2.170 vzorcev) in 'Rebula' (2.450 vzorcev). V zadnjih letih se poleg klonskih kandidatov ('Barbera', 'Rebula', 'Refošk', 'Zelen', 'Malvazija', 'Zeleni sauvignon' in 'Pinela') pregleduje tudi domače lokalne sorte. Te postajajo zanimive zaradi trženja njihovega vina in vinogradniki iščejo ustrezen sadilni material. Vse sorte so bile testirane na viruse GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GVB, GFkV. Pregledanih je bilo več kot 30 sort do razširitve selekcije. Sedem jih je vključenih v nadaljnjo klonsko selekcijo, ostale so domače lokalne sorte in služijo kot kolekcijski material.

Največji odstotek okužb je mešanih (več kot en virus povzroča znamenja bolezní). V klonski selekciji sorte 'Refošk' je takih okužb 11 %, pri starih neselekcioniranih trsah sorte 'Refošk' jih je 44 %. Tudi pri sortah, ki so posajene v kolekcijskem vinogradu v Ložah je odstotek mešanih okužb velik (34 %).

Največ okužb s posameznimi virusi pri selekcioniranih trsih je z virusom GLRaV-1 (27 %). Tako velik odstotek pripisujemo nepravilni razlagi predčasnega rdečenja listov, ki naj bi bilo značilno za sorto 'Refošk'. Vinogradniki menijo, da gre za sortno značilnost ne pa za virozo. Rezultati pokažejo okužbo z virusom.

Virus GFLV je v nadaljnjih krogih selekcije manj prisoten kot pri neselekcioniranih trsih. To nam dokazujejo podatki, ki kažejo manj kot 1 % okužb pri odbranih kandidatih ter 5 - 10 % okuženost pri neselekcioniranih lokalnih sortah.

Okužba z GFkV je pri selekcioniranih trsih sorte 'Refošk' višja tudi za trikrat. Vzrok temu je lahko dejstvo, da so okužbe s tem virusom pogosto na trsu maskirane in največkrat se tako prenese virus z okuženimi podlagami, ki so brez znamenj bolezni.

Preverili smo tudi v več ponovitvah metodo indeksiranja. Cepili smo 29 trsov na indikatorje *V. rupestris* in LN 33. Po dveh letih spremljanja nismo odkrili pravih znamenj razbrazdanja lesa in le malo primerov predčasnega rdečenja. Torej se podatki indeksiranja ne pokrivajo s podatki ELISA, potrebno je triletno spremljanje.

Metode zdravstvene selekcije spoznavamo kot učinkovite pri odkrivanju okužb. Množična selekcija izloči vse trse, ki vidno kažejo znamenja virusnih bolezni. Laboratorijske metode predvsem ELISA in indeksiranje se dopolnjujejo in nam veliko pomagajo pri določevanju povzročitelja. Temu je dokaz število odkritih virusov pri vinski trti v Sloveniji. ELISA je praktična za uporabo, naredimo lahko veliko število serij vzorcev. Pomanjkljivost metode je, da nimamo serumov za določevanje vseh virusov, takrat smo še odvisni od drugih metod od zamudnega indeksiranja.

Za nadaljnje delo v zdravstveni selekciji je pomembno, da z njo preprečujemo vnos virusov z okuženim razmnoževalnim materialom in v prihodnje s sistematičnim testiranjem spremljamo matične trte.

7 VIRI

- "Arhiv Katedre za vinogradništvo, 1992-2003. Rezultati ELISA". 2006. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za vinogradništvo (izpis iz baze podatkov).
- Blas M. 2006. Genska raznolikost virusa pahljačavosti listov vinske trte in opis bolezenskih znamenj na okuženih rastlinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 103 str.
- Boscia D., Martelli G.P., Savino V., Castellano M.A. 1991. Identification of the agent of grapevine fleck disease. *Vitis*, 30: 97-105.
- Bovey R., Gärtel W., Hewitt Wm. B., Martelli G.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like diseases of grapevines. Colour atlas of symptoms. Lausanne, Pariz, Stuttgart, Ed. Payot: 181 str.
- Direktiva sveta EU. 2002/EC/ z dne 14. februarja 2002. Dopolnjuje Direktivo 68/193/EEC o prometu z materialom za vegetativno razmnoževanje rastlin rodu *Vitis* in nadomešča Direktivo 74/649/EEC.
- El Beaino T., Sabanadzovic S., Digiario M., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Rowhani A., Kyriakopoulou P.E., Martelli G.P. 2001. Molecular detection of Grapevine fleck virus-like viruses. *Vitis*, 40, 2: 65-68.
- FITO-INFO. 2007. Šifrant imen organizmov z Bayer kodami, oznakami rabe, slikovnim gradivom in potnimi listi.
<http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/cirsium/FITOINFO/SifrantOrg.htm>. (november, 2007).
- Frison E. A., Ikin R. 1991. FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of grapevine germplasm. Food and agriculture organisation of the United nations, Rome, International Board for Plant Genetic Resources: 54 str.
- Golino D., Rowhani A. 2002. Laboratory testing for grapevine diseases, PW grape growing <http://www.practicalwinery.com/janfeb02p13.htm>.
- Gugerli P. 2000. Diagnosis of grapevine virus diseases: an overview and practical implementation. V: 13th Meeting of the international council for the study of viruses and virus-like diseases of the grapevine (ICVG), Adelaide: 121-122.
- Grabovac B. 1993. Indeksiranje trt na virusne bolezni vinske trte v trsničarski pridelavi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 63 str.
- Hrček L. 1973. Proučevanje virusnih bolezni v zvezi s selekcijo vinske trte. Zaključno tehnično poročilo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 198 str.
- Korošec-Koruza Z. 1992. Istraživanje pogodnih metoda za otkrivanje virusnih zaraza u selekciji vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Poljoprivredna znanstvena smotra – Agriculturae Conspectus Scientificus, 57, 1:125-139.
- Korošec-Koruza Z., Tomažič I. 2002. Poti in stranpoti zdravstvene selekcije vinske trte. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2. Slovenski vinogradniško-vinarski kongres, 31.1. –

- 2.2.2002. Puconja M. (ur). Nova Gorica, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije in Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 62-66.
- Korošec-Koruza Z., Tomažič I., Gregorič J. 2004. Selekcija domačih sort vinske trte. *Sodobno kmetijstvo*, 37, 6: 30-32.
- Koruza B. 1996. Rezultati preučevanja razširjenosti rumenic vinske trte v Sloveniji. Results of the study of grapevine yellows disease dispersal in Slovenia. *Sodobno kmetijstvo*, št.10, 29: 403-406.
- Koruza B. 2002. Klonska selekcija vinske trte in pridelava certificiranih trsnih cepljenk v Sloveniji. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2. Slovenski vinogradniško-vinarski kongres, 31.1. – 2.2.2002. Puconja M. (ur). Nova Gorica, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije in Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 47-55.
- Koruza B., Lokar V., Lavrenčič P., Korošec-Koruza Z., Topolovec A., Gregorič J. 2003. Introdukcija in selekcija vinske trte v letu 2002. Ljubljana, KIS: 74 str.
- Martelli G. P. 1993. Graft transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Rome, FAO: 261 str.
- Martelli G. P., Boudon-Padiou E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine. Bibliographic report 1998-2004. Bari, CIHEAM: 279 str.
- Mavrič I., Viršček Marn M., Žežlina I. 2005. Pojav novega virusa na vinski trti. V: Zbornik predavanj in referatov. 7. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin. 8.-10. marec, Zreče. Maribor. Društvo za varstvo rastlin Slovenije. Ljubljana: 236-238.
- Minafra A. 2000. Ruogose wood of grapevines. V: 13th. Meeting of the international council for the study of viruses and virus-like diseases of the grapevine (ICVG), Adelaide: 30-34.
- Pearson R., Goheen A. 1988. Compendium of grape diseases. St. Paul, Minnesota, APS press ZDA. The American Phytopathological Society: 93 str.
- Petrovič N., Meng B., Ravnikar M., Mavrič I., Korošec-Koruza Z., Tomažič I., Gonsalves D. 2003. Prva detekcija virusnih delcev Rupestris stem pitting associated virus 1 (RSPAV-1) povezanih z boleznijo razbrazdanja lesa vinske trte. V: Zbornik predavanj in referatov, 6. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin. Zreče. Društvo za varstvo rastlin Slovenije. Ljubljana: 289-299.
- Pravilnik o trženju materiala za vegetativno razmnoževanje trte. 2005. Ur. l. RS št. 93-9719-9735/05.
- Rakovec H. 2001. Zdravstvena selekcija vinske trte (*Vitis vinifera* L.), kot del selekcije v Ljutomersko-Ormoške gorice. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 47 str.
- Seljak G., Petrovič N. 2001. Pregled razširjenosti in stanje raziskovanosti fitoplazmatskih bolezni vinske trte in sadnega drevja v Sloveniji. An overview on the presence and research of phytoplasma diseases of grapevine and fruit trees in Slovenia. *Sodobno kmetijstvo*, št. 11-12, 34,: 466-471.

- Širca S., Gerič Stare B., Mavrič Pleško I., Viršček Marn M., Javornik B., Urek G. 2007. Študije prenosa nepovirusov v Sloveniji. V: Izvlečki referatov 8. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, 6.-7.marec. 2007. Radenci: 62.
- Terenska selekcijska knjiga.1990. Ljubljana RKGP in Kmetijski inštitut Slovenije (interno gradivo).
- Tomažič I. 1996. Zbiranje in opisovanje starih sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.) v primorskem vinorodnem rajonu. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 99 str.
- Tomažič I. 1999. Določanje virusov in njihov vpliv na ampelografske lastnosti vinske trte (*Vitis vinifera* L.). – Magistrsko delo. Ljubljana, BF, Oddelek za agronomijo: 96 str.
- Topolovec A., Gregorič J. 2002. Seleksijsko - trsničarska središča – 10 let načrtnega dela v trsničarstvu in pri klonski selekciji vinske trte. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2. Slovenski vinogradniško-vinarski kongres, 31.1. – 2.2.2002. Puconja M. (ur). Nova Gorica, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije in Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 164-167.
- Transvir. 2002. Evropski projekt Transvir.
<http://ec.europa.eu/research/quality-of-life/cell-factory/volume2/projects/qlk3-2002-02>
(julij, 2007).
- Vertovc M. 1992. Vinoreja za Slovence. (Ponatis 1884), Ljubljana: 287 str.
- Vršič S., Lešnik M. 2005. Vinogradništvo. ČZD Kmečki glas, d.o.o., Ljubljana: 360 str.
- Žiberna M. 2000. Revizija selekcije vinske trte (*Vitis vinifera* L.), cv. 'Refošk' v Kraškem vinorodnem okolišu. Dipl. delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 74 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Zori Korošec-Koruza na vse nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Hvala za vse nasvete in pomoč pri študiju.

Hvala mojim domačim za vso podporo in spodbudo.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi kakorkoli pomagali v času študija.

PRILOGA A

Razlaga oznak – dodatnih znamenj za vrste viroz in njim podobnih boleznih (Terenska selekcijska knjiga).

a) Znamenja boleznih kužne izrojenosti (GFLV, nepovirusi).

M – mozaik / rumeni mozaki ali panašira, živo rumene barve po vsem listu ali po delu lista, zelo nesimetrično. Lahko je mozaik le ob žilah (vein banding – obžilni mozaik) ali v obliki peg in pegic (yellow speckle, fleck – rumena pegavost). Opaziti ga je spomladi pred ali po cvetenju, pozneje se maskira, izgine, mozaični listi porjavijo in odpadejo. Rumenenje je enako pri rdečih in belih sortah.

P – peteršiljavost listov se pojavi zaradi globokih nenormalnih zarez (sinusov) na listu, zobci so izdolženi, pojavi se nepravilno nesortno povečanje števila listnih krp in nesimetričnost lista. Znamenje opazimo čez vso rastno dobo.

O – osipanje grozdov, ki je sortna genetska lastnost, v grozdu ostanejo drobne zelene jagode, ali samo nekaj normalno razvitih jagod, grozd je redek, prestreljen. Velik osip opazimo že ob cvetenju po velikem odstotku neodpadlih kapic, ali ob razvitem zaprtem grozdu. Osipanje je lahko v zelo različnem obsegu in v obliki v posameznih letih.

ZIM – izrojenost (deformacija mladice) kamor štejemo biforkacije (metličeva rast na konici mladice) dvojne členke, skrajšane medčlenke ali cik-cak rast. Neenakomerna dolžina posameznih medčlenkov je lahko tudi posledica različne hitrosti rasti. Najlažje znamenja opazimo v času mirovanja, pred ali ob rezi.

b) Znamenja kompleksa boleznih zvijanja listov in razbrazdanja lesa (GLRaV, GVA, closterovirusi).

RL – rdečenje ali rumenenje listov, predčasno obarvanje listov, preden fiziološko dozori in odpadejo. Rdečenje (pri rdečih sortah) in rumenenje (pri belih sortah) zajame del ali večino listne ploskve, pas ob glavnih žilah ostane zelen, prizadeti listi so včasih mehurjasti in krhki.

Od fizioloških motenj, ki nastanejo zaradi pomanjkanja elementov (P, K/Mg) se ta motnja loči po tem, da listni rob ne nekrotizira. Motnji opazimo v drugi polovici poletja, včasih tudi prej se ne maskira.

ZL – zvijanje listov navzdol in navznoter, predvsem se zvijajo spodnji listi mladice, večkrat spremlja znak RAL, tudi uviti listi so krhki in mehurjasti.

RAL – razbrazdan les opazimo če odstranimo skorjo. Pojavi se ob cepljenem mestu ali samo na podlagi, samo na žlahtnem delu ali na obeh. Opazimo majhne vdolbinice, jamice, žlebičke ali globlje vdrtine v lesu, ki se združujejo v vzdolžne brazde ali kanale (stem pitting, stem grooving,...). Podlaga je lahko mnogo tanjša od žlahtnega dela debela, če podlaga propada, si trta pomaga s koreninami iz žlahtnega dela debela. Na prizadetem delu debela se skorja težko lušči, več je plasti plute, ki je globoko zajedena v brazde. Znamenje lahko opazujemo skozi vse leto.

PRILOGA B

Testirani klonski kandidati in izbrani trsi v letih 1992 in 2003; z laboratorijsko metodo ELISA iz vinorodne dežele Podravje in Posavje in vinorodne dežele Primorska, vsote po letih in po sortah.

Priloga B1: Razvrstitev klonskih kandidatov vključenih v klonsko selekcijo vinorodne dežele Podravje in Posavje testiranih s serološkim testom ELISA ter število testiranj po posameznih letih.¹³

SORTA/ KLON	Oznaka klonskega kandidata* ¹	Število pregledanih klonskih kandidatov											Σ	
		1992	1993	1994	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003		
1	'Beli pinot'	46/2, 51/39, 50/65,...		3	2	4		5	317	28				359
2	'Belina'											1		1
3	'Chardonnay'	8/66, 9/26, 16/30,...		37	12			419	2	176				646
4	'Dišeči traminec'	4/94				6	3		15					24
5	'Modra frankinja'	20/54, 19/3, 29/21,...		22					236	2				260
6	'Laški rizling'	178/29, 178/36, 22/1, ...	459	3381	310	11	655	30	976	60	144		6	6050
7	'Muškat'											1		1
8	'Muškat medeni'											1		1
9	'Muškat zeleni'											1		1
10	'Muškat žlahtni'											1		1
11	'Ranfol'									24	9			33
12	'Radgonska ranina'	10/2, 16/33, 12/19,...		10	3			195		3		1		212
13	'Renski rizling'	10/50, 10/52, 22/131,...	80	59	19	1		49	393	33				649
14	'Sauvignon'	20/21/2, 20/28/3,14/19,...	335	150	12	95	738	433	252	40				2100
15	'Šipon'	26/13, 15/140, 15/6,...		29	17	20	19	616	355	140				1196
16	'Traminec beli'											1		1
17	'Žametovka'	2/23 in standard							77		120		125	322
SKUPAJ			874	3760	384	137	1415	1747	2623	478	273	7	131	11829

¹³ Podrobnejši seznam klonskih kandidatov je v prilogi D1 in v prilogi D2.

Priloga B2: Razvrstitev klonskih kandidatov vključenih v klonsko selekcijo vinorodne dežele Primorska testiranih s serološkim testom ELISA in število testiranj po posameznih letih.

	SORTA/ KLON	Oznaka klonskega kandidata	Število pregledanih klonskih kandidatov											Σ
			1992	1993	1994	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	
1	'Barbera'	18/20, 9/17, 2/19,...		129			138	11		2	5		23	
2	'Bela glera'			1					8					308
3	'Birška glera'			1					5					9
4	'Cundra'	3/5, 3/3							5					6
5	'Danijela'		2	3		2	6		1	8	6	1	20	5
6	'Klarnica'								5					49
7	'Laški rizling'	178	24											5
8	'Malvazija'	3/56, 5/33, 4/19		2	1		345	9		3				24
9	'Modri pinot'			2				1			37			360
10	'Pergolin'								4					40
11	'Pikolit'	Dunaj							3				2	4
12	'Pinela'	3/4, 5/24, 1/87,...		7	18	8	353		3	18			9	5
13	'Planinka'	10/4					2		5	2			3	414
14	'Poljšakica'				20				2					12
15	'Racuk'								3			3		22
16	'Rebula'		46	76					5					6
17	'Rebula'	B1-B22		22										127
18	'Rebula'	2/54, 2/51, 2/13,...		1369	5		844	95	2	5	81	7	43	22
19	'Rebula' Selo	6/28, 6/46, 7/19,...		16	12									2451
20	'Rečigla'								2			4		28
22	'Refošk' KOMEN	1, 2, 3, 4	180	140	7	230	224	16	273	222	87	49	37	6
23	'Refošk' SLAP	2, 4, 17					263							1879
24	'Refošk' Bonin	9/44, 9/148, 9/116,...		30										263
25	'Rožica'								3			2		30
26	'Sladkočrn'	1/10	1						5			7		5
27	'Števerjana'								2			6		13
28	'Zeleni sauvignon'	3/24, 1/8, 1/26,...		5					98	57				8
29	'Vitovska grganja'								3		18			160
30	'Viognier'			2										21
31	'Vrtovka'	1/10, ½							5	2		3	3	2
32	'Volovnik'								1			13		13
33	'Zelen'	66, 49, 20, 22, 45, 38, 1		10		13	15		97	56	27	20	63	14
34	'Zelen' Žgur		10		369				3					304
35	'Zelenika'								4			5		384
36	'Zunek'								2			5		9
SKUPAJ			263	1815	504	253	2530	132	554	375	261	125	203	7015

PRILOGA C

Škodljivi organizmi, ki povzročajo virusne in virozam podobne bolezni trte, na katere se testirajo rastline kandidatke za izvorne matične trse, izvorni matični trsi, bazni matični trsi ter matični trsi, iz katerih se reže certificiran razmnoževalni material; metode testiranj.

Virusi ali virusom podobni organizmi		Testiranje rastlin kandidatke za izvorne matične trse	Ponovno testiranje		
Ime	Oznaka		Izvorni matični trsi	Bazni matični trsi	Matični trsi certificiranih mat. nasadov
1. Kompleks kužne izrojenosti vinske trte (Grapevine degeneration complex):					
Grapevine fanleaf nepovirus	GFLV	2, 3 / d	2 / a	2 / b	2 / c
Arabis mosaic nepovirus	ArMV	2, 3 / d	2 / a	2 / b	2 / c
Raspberry ringspot nepovirus	RRV	1, 2, 3 / d	/	/	/
Tomato black ring nepovirus	TBRV	1, 2, 3 / d	/	/	/
2. Kompleks predčasnega rdečenja in zvijanja listov vinske trte (Grapevine leafroll complex):					
Grapevine leafroll associated closterovirus -1	GLRaV - 1	1, 2, 3 / d	1, 2 / a	1, 2 / b	1, 2 / c
Grapevine leafroll associated closterovirus -2	GLRaV- 2	1, 2, 3 / e	/	/	/
Grapevine leafroll associated closterovirus -3	GLRaV- 3	1, 2, 3 / d	1, 2 / a	1, 2 / b	1, 2 / c
Grapevine leafroll associated closteroviruses 4 - 9	GLRaV4-9	1, 2, 3 / e	/	/	/
3. Kompleks bolezni razbrzdanja lesa vinske trte (Grapevine rugose vine complex):					
Grapevine vitivirus A	GVA	1, 2, 3 / d	/	/	/
Grapevine vitivirus B	GVB	1, 2, 3 / d	/	/	/
Grapevine rupestris stem pitting	GRSPV	1, 2, 3 / d	/	/	/
4. Bolezen 'fleck' (Grapevine fleck disease):					
Grapevine fleck virus	GFkV	2, 3 / d *	2 / a *	/	/
Rumenice vinske trte, ki jih povzročajo fitoplazme (Grapevine yellows):					
Grapevine flavescence doreé phytoplasma	/	1 / d	/	/	/
Bois noir in druge evropske rumenice	/	1 / d	/	/	/

Opombe:

Metode testiranja: 1. Testiranje na <i>Vitis</i> indikatorjih – ali 2. serološki testi (ELISA) – ali 3. molekularni testi (PCR)	Pogostnost testiranja: a) vse rastline vsakih 5 let b) vse rastline vsakih 6 let, začenši pri 3 leta starih rastlinah c) vzorčno vsakih 10 let, začenši pri 5 let starih rastlinah d) obvezno začetno testiranje rastlin kandidatke e) priporočeno začetno testiranje rastlin kandidatke * - velja samo za podlage
---	---

Vsi matični nasadi se vsako leto vizualno uradno pregledajo na vse viruse in virusom podobne organizme, ki povzročajo bolezni, navedene v 1. stolpcu gornje preglednice. V primeru suma na prisotnost zgoraj naštetih virusov in virusom podobnih organizmov, se izvede vzorčenje in testiranje tudi, če ponovna (periodična) testiranja matičnih trsov niso predpisana (oznaka » / «).

Testiranja se izvedejo v skladu z EPPO standardi (EPPO standards – Schemes for the production of healthy plants for planting; Certification scheme for grapevine – PM 4/8. (Pravilnik o trženju materiala za vegetativno razmnoževanje trte, UL RS 2005).

PRILOGA D

Testirani klonski kandidati iz vinorodnih dežel Podravje in Posavje ter Primorska.

Priloga D1: Testirani klonski kandidati in izbrani trsi v letih 1992 in 2003; z laboratorijsko metodo ELISA iz vinorodne dežele Podravje in Posavje.

	SORTA/ KLON	Oznaka klonskega kandidata
1	'Beli pinot'	46/2, 51/39, 50/65, 209/46/2, 209/51/39, 209/48/2 54/17/11, 54/17/26, 72/18/118, 72/18/144
2	'Belina'	
3	'Chardonnay'	8/66, 9/26, 16/30, 6/24, 15/217, 14/20, 13/13, 9/41, 6/47, 15/9, 14/48, 13/15, 9/81, 123/3/11, 13/5
4	'Dišeči traminec'	4/94
5	'Modra frankinja'	20/54, 19/3, 29/21, 25/73, 20/79, 13/19, 23/13, 18/13, 27/40, 20/33, 21/57, 29/17, 21/51, 21/59, 13/38, 17/35, 21/33, 19/13, 23/63
6	'Laški rizling'	178/29, 178/36, 22/1, 178/30, 178/31, 178 mt., 22/1/90, 22/1/85, 22/1/77, 178/30/2, 22/1/18, 34/2/37, 22/1/22, 22/1/32, 22/1/31, 22/1/89, 2/22, 22/1/79, 11/37, 2/15, 10/8, 11/37, 22/1/30, 34/2/12, 34/2/15, 34/2/37, 3/2, 196/17, 22/1/12, 22/1/15, 35/3, 34/2
7	'Muškat'	
8	'Muškat medeni'	
9	'Muškat zeleni'	
10	'Muškat žlahtni'	
11	'Ranfol'	
12	'Ranina'	10/2, 16/33, 12/19, 15/45, 8/42
13	'Renski rizling'	10/50, 10/52, 22/13, 22/9, 6/20, 2/5, 18/58, 13/3, 14/3, 24/17, 28/7, 28/34, 239, 269, 28/20, 38/7, 28/2, 18/5, 18/46, 13/13
14	'Sauvignon'	20/21/2, 20/28/3, 20/21/13, 20/21/14, 20/21/15, 20/21/16, 20/21/17, 43/19, 43/51, 43/91, 43/93, 43/144, 43, 20, 178/30, 178/29, 22/1/78, 20/27/5, 20/28/3, 13/27, 14/70, 14/90, 15/15, 19/34, 22/54, 14/17, 13/27, 14/19
15	'Šipon'	26/13, 15/140, 15/6, 18/37, 18/42, 18/49, 18/46, 4/24, 20/137, 20/181, 9/26, 16/30, 23/181, 3/3, 14, 313/4/21, 19/14, 313/2/15, 313/2/18, 313/4/40, 313/1/54, 313/1/60
16	'Traminec beli'	
17	'Žametovka'	2/23 in standard

Priloga D2: Testirani klonski kandidati in izbrani trsi v letih 1992 in 2003; z laboratorijsko metodo ELISA iz vinorodne dežele Primorska.

	SORTA / KLON	Oznaka klonskega kandidata
1	'Barbera'	18/20, 9/17, 2/19, 2, 3, 5, 12
2	'Bela glera'	
3	'Birška glera'	
4	'Cundra'	3/5, 3/3
5	'Danijela'	
6	'Klarnica'	
7	'Laški rizling'	178
8	'Malvazija'	3/56, 5/33, 4/19
9	'Modri pinot'	
10	'Pergolin'	
11	'Pikolit'	dunaj
12	'Pinela'	3/4, 5/24, 1/87, 5/42, 4/19, 2/12, 4/26, 4/24, 4/45, 4/69, 1/79, 4/30, 1/50, 1/38, 1/87, 1/2
13	'Planinka'	10/4
14	'Poljšakica'	
15	'Racuk'	
16	'Rebula'	
17	'Rebula'	B1-B22
18	'Rebula'	2/54, 2/51, 2/13, 1/32B, 3/77, 1/27, 2/35, 3/13B, 2/43, 3/15, 6/46B, 2/74B, 2/57, 2/21, 1/31B, 1/24, 4/40B, 6/28, 3/3B, 1/60, 4/26, 1/50, 1/15, 5/14B, 3/2, 4/9, 3/16, 1/50B, 4/39B, 4/71B, 3/65, 3/79, 5/35, 4/88, 3/71, 1/74B, 4/26B, 3/68, 1/32, 1/31B, 5/53, 3/2B, 1/40, 1/33, 4/27, 2/81, 3/44, 2/55, 1/61, 3/53, 1/39, 318, 5/16, 3/11, 4/20, 4/37, 3/84B, 2/38B, 1/74, 3/49, 5/7
19	'Rebula' Selo	6/28, 6/46, 7/19, 1/13, 1/31, 1/32, 1/50, 1/60, 2/38, 2/74, 3/3, 3/13, 3/68, 3/84, 4/39, 5/14
20	'Rečigla'	
22	'Refošk' KOMEN	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 42a, 43a, 44a, 45a, 46a, 47a, 47b, 49a, 50a, 51a, 55a,
23	'Refošk', (stare oznake)	A, B, C, D, E, F, G
24	'Refošk' Bonin	9/44, 9/148, 9/116, 9/118, 5/13, 5/113, 7/66, 7/110, 7/84, 7/130, 7/134, 11/141, 11/129, 11/156, 8/127, 8/53, 8/50, 8/129, 8/137, 12/141, 12/131, 12/26, 2/4, 2/109, 4/114, 1/3, 3/72, 1/5, 1/2, 2/109
25	'Rožca'	
26	'Sladkočrn'	1/10
27	'Števerjana'	
28	'Zeleni sauvignon'	3/24, 1/8, 1/26, 2/33, 8/38
29	'Vitovska grganja'	
30	'Viognier'	
31	'Vrtovka'	1/10, 1/2
32	'Volovnik'	
33	'Zelen'	66, 49, 20, 22, 45, 38, 1
34	'Zelen' Žgur	

PRILOGA E

Izpis rezultata testiranj z ELISA iz baze Arhiva Katedre za vinogradništvo.

PLOŠČICA ŠT.: 9												DATUM: 10. marec 1999	
TEST NO.	: 05			W/L MODE	: DUAL			DATE	: 11.03.99				
TEST NAME	: GLRaV1			TEST FILTER	: 405 nm			TIME	: 14:40				
PLATE	: 9			REF. FILTER	: 490 nm			OPERATOR	: <i>L. Uršič</i>				
+++ EQN =NC*3 = 0.236 ++ EQN =NC*2.5 = 0.196 + EQN =NC*2 = 0.157 - EQN =NC*2 = 0.157													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.085 C1	0.081	0.080	0.080	0.099	0.084	0.081	0.079	0.083	0.086	0.083	0.087	A
B	0.079	0.082	0.077	0.081	0.078	0.079	0.080	0.075	0.078	0.080	0.079	0.085	B
C	0.079	0.077	0.077	0.078	0.079	0.079	0.081	0.074	0.080	0.085	0.079	0.084	C
D	0.081	0.083	0.077	0.078	0.077	0.077	0.221 ++	0.080	0.235 ++	0.229 PC1	0.174 +	0.134	D
E	0.655 +++	0.130	0.308 +++	0.198 ++	0.153	0.289 +++	0.199 PC2	0.277 +++	0.195 +	0.200 ++	0.104	0.683 +++	E
F	0.316 +++	0.219 ++	0.201 ++	0.085	0.159 +	0.137	0.370 PC3	0.082	0.133	0.086	0.093	0.092	F
G	0.081	0.079	0.082	0.080	0.080	0.079	0.079 NC1	0.077	0.080	0.087	0.077	0.092	G
H	0.083	0.075	0.076	0.084	0.080	0.081	0.078 NC2	0.082	0.080	0.082	0.076	0.091	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
***** INDICATES VALUE OUT OF RANGE ##### INDICATES COMBINED DATA +++ INDICATES A VERY STRONG POSITIVE REACTION ++ INDICATES A STRONG POSITIVE REACTION + INDICATES A POSITIVE REACTION													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	P	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	A
B	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	B
C	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	C
D	756	757	758	759	760	761	762	763	764	NK	765	766	D
E	767	768	769	770	771	772	NK	773	774	775	776	777	E
F	778	779	780	781	782	783	+	784	785	786	787	788	F
G	789	790	791	792	793	794	-	795	796	797	798	799	G
H	800	801	802	803	804	805	-	806	807	808	809	810	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NK-naša kontrola, NK za GLRaV 6 je pufer													

Prikaz izpisa rezultatov iz čitalca Dynatech MR 5000 in program Biolinx 2.20 - zgornja preglednica. Spodnja preglednica je načrt nanašanja šifiranih vzorcev od št. 721 do št. 810 (ekstrakcija trtnega soka) na testno ploščico, ki je označena s polji o 1-12 in od A-H.

10. marca 1999 so na ploščico št. 9 nanesti vzorce sumljive na virus GLRaV-1. Oznaka P ali C1 na polju A1 pomeni pufer, PC so trije pozitivni kontrolni vzorci (1-3), NC 1 in NC 2 sta dva negativna kontrolna vzorca. Primer: oznaka na polju E10 je ++, to pomeni, da je vzorec št. 775 (spodnja preglednica) okužen z virusom GLRaV-1.