

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET POLJOPRIVREDNIH ZNANOSTI

ZORA KOROŠEC-KORUZA

PROUČEVANJE USTREZNIH METOD  
ZA ODKRIVANJE VIROZ V SELEKCIJI  
VINSKE TRTE (*Vitis vinifera*)

ISTRAŽIVANJE POGODNIH METODA  
ZA OTKRIVANJE VIRUSNIH ZARAZA  
U SELEKCIJI VINOVE LOZE (*Vitis vinifera*)

DISERTACIJA

Ljubljana-Zagreb, 1990

2/2/20

SV  
F&F

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET POLJOPRIVREDNIH ZNANOSTI**

**ZORA KOROŠEC - KORUZA**

**PROUČEVANJE USTREZNIH METODA ZA ODKRIVANJE**  
**VIROZ V SELEKCIJI VINSKE TRTE ( *Vitis vinifera* )**

**ISTRAŽIVANJE POGODNIH METODA ZA OTKRIVANJE**  
**VIRUSNIH ZARAZA U SELEKCIJI VINOVE LOZE ( *Vitis vinifera* )**

**DISERTACIJA**

**Ljubljana - Zagreb, 1990**

Predložena disertacija je predana na oceno Fakulteti poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu z namenom pridobitve znanstvene stopnje doktorja poljoprivrednih znanosti iz področja zaščite bilja.

Disertacija je opravljena delno na Zvodu za zaščito bilja Fakultete poljoprivrednih znanosti v Zagrebu in delno v laboratoriju in na poskusnem posestvu Biotehniške fakultete (Ljubljana - Nova Gorica).

Delo obsega 74 strani in vključuje 18 tabel, 5 grafov, ..... strani prilog in 4 fotografije, ter citira 98 referenčnih bibliografskih del.

Ob tej priliki se iskreno zahvaljujem prof. dr. Ani Šarić, ki mi je kot mentor te disertacije pomagala pri pripravi in izpeljavi dela, ter me uvedla v čudoviti svet virologije.

Hvala tudi kolegom iz proizvodnje, ki so mi z materialom in delom na terenu pomagali pri izpeljavi poskusov, ter kolegom iz Kmetijskega inštituta Slovenije za uporabo njihovih aparatov.

UDK

IZVLE

Koraki

V primeru  
preizku-  
sa ind. k  
asociate  
stani pit  
GPV, za  
naslednje  
tja 345  
Vidna re  
je preplet.  
ELISA test  
tipov II  
ovsem  
vinograd

Doktorska disertacija je bila zagovarjana na Fakulteti poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu 29.IV.1991 pred komisijo:

dr. Ana Šarić, redni profesor

dr. Ranko Licul, redni profesor

dr. Slava Doberšek-Urbanc, redni profesor Biotehniške fakultete v Ljubljani

dr. Bogdan Cvjetković, redni profesor

(grapevine  
grapevine  
results of  
ELISA sh  
other an  
incidence  
the infect  
reverse pr  
intermixe  
revealed th  
II and III  
of the g  
out comp  
viticultur  
CEE coun

UDK

IZVLEČEK

Korošec - Koruza Z.: Proučevanje ustreznih metod za odkrivanje viroz v selekciji vinske trte (*Vitis vinifera*)

V primerjavi z rezultati opravljene selekcije vinske trte v Sloveniji je bila preizkušena in standardizirana metoda ELISA (enzimsko imunosorpcijski test) in indeksiranje za GFV (grapevine fanleaf virus), GLRaV's (grapevine leafroll associated viruses) in za kompleks bolezni razbrazdanja lesa, GSP (grapevine stem pitting complex). Zanesljivost ELISA je velika od 88% do 98% pri odkrivanju GFV, za ostale bolezni mora biti metoda kombinirana z indeksiranjem. V neselekcioniranem materialu cv. 'rebula' in starih trt je veliko okužb z GFV (do 34%) in tudi od 2% - 12% okužb v trsah, odbranih za razmnoževanje. Višina odkritih okužb je obratno sorazmerna s stopnjo selekcije. Ugotovljena je prepletenost pojava deformacije plodnice v cvetu z okužbo GFV. Preliminarni ELISA testi za GLRaV so odkrili tip I pri cv. 'refošk' in 'zametovka', manj je tipov II in III, nikoli v mešani okužbi. Etiologija bolezni GLR in GSP ni povsem pojasnjena. Podana je shema zdravstvene in klonske selekcije za vinograde v Sloveniji, ki sledi podobnim shemam v državah EGS.

UDC 632.38:576.858.8:634.835

Korošec - Koruza Z.: The study of adequate methods for virus diseases diagnosis in the selection of grapevine (*Vitis vinifera*)

Enzyme immunosorbent assay (ELISA) and the indexing procedure for GFV (grapevine fanleaf virus), GLRaV's (grapevine leafroll associated viruses) and grapevine wood disorders diseases were standardised and compared with the results of the grapevine selection work in Slovenia. The accuracy of the ELISA showed to be high in detecting GFV (88% to 98%). In the case of the other non selected vines of cv. 'rebula' and some old grapevine varieties the incidence of the GFV is high up to 34%, in the group of the selected vines the infections are less frequent from 2% to 12%. The incidence of the GFV is reverse proportional to the degree of the selection work. The GFV is often intermixed with the staminate flower. The preliminary ELISA for the GLRaV revealed the infections with the type I for cvs. 'refošk' and 'zametovka', type II and III are rare, they never occurred in the mixed infections. The etiology of the grapevine leafroll and wood disorders diseases has not been cleared out completely. The scheme for the clonal and sanitary selection work in viticulture in Slovenia have been proposed following the programmes in the CEE countries.

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	<b>OBRAZLOŽITEV TEME</b>	<b>2</b>
1.2	<b>VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE IN NJIHOVI POVZROČITELJI</b>	<b>4</b>
1.2.1	<b>NEPO virusi</b>	<b>4</b>
1.2.2	<b>Clostero virusi</b>	<b>6</b>
1.2.3	<b>Kompleksne in virozam podobne bolezni z nepojasnjeno etiologijo</b>	<b>7</b>
1.3	<b>DIAGNOSTIKA VIRUSOV IN VIROZ</b>	<b>9</b>
1.3.1	<b>Prenos virusov na zeljaste rastline</b>	<b>9</b>
1.3.2	<b>Dokazovanje bolezni s trtnimi indikatorji</b>	<b>9</b>
1.3.3	<b>Imunokemijske metode odkrivanja virusov</b>	<b>11</b>
1.3.3.1	Imunodifuzija v gelu	12
1.3.3.2	Enzimsko-immunosorbcijski test (ELISA)	12
1.4	<b>ZDRAVSTVENA SELEKCIJA VINSKE TRTE</b>	<b>14</b>
1.4.1	<b>Pridelava zdravega trsnega materiala v svetu</b>	<b>14</b>
1.4.2	<b>Zdravstvena slika matičnih vinogradov v Sloveniji</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA</b>	<b>17</b>
2.1	<b>TESTIRANI MATIČNI TRSI</b>	<b>18</b>
2.1.1	<b>Cv. 'rebula'</b>	<b>18</b>
2.1.2	<b>Cv. 'refošk'</b>	<b>19</b>
2.1.3	<b>Trsi iz programa klonske selekcije in genske banke</b>	<b>19</b>
2.1.4	<b>Cv. 'malvazija'</b>	<b>20</b>
2.1.5	<b>Podlage in indikatorji</b>	<b>21</b>
2.2	<b>METODE ZA VREDNOTENJE MATIČNIH TRSOV</b>	<b>22</b>
2.2.1	<b>Pozitivna množična selekcija (P)</b>	<b>22</b>
2.2.2	<b>Odbira tipov in elit</b>	<b>22</b>
2.3	<b>DOKAZOVANJE VIRUSOV Z BIOTESTI</b>	<b>23</b>
2.3.1	<b>Prenos na zeljaste rastline</b>	<b>23</b>
2.3.2	<b>Indeksiranje</b>	<b>23</b>
2.4	<b>ELISA TEST</b>	<b>24</b>
2.4.1	<b>Tehnična izvedba: kemikalije, serumi in oprema</b>	<b>24</b>
2.4.2	<b>Metode za interpretacijo rezultatov</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>28</b>
3.1	<b>UPORABNOST ELISA TESTA ZA ODKRIVANJE GFV</b>	<b>29</b>
3.1.1	<b>Tehnične zahteve testa in njegova zanesljivost</b>	<b>29</b>
3.1.2	<b>Interpretacija rezultatov</b>	<b>31</b>
3.1.3	<b>Čas vzorčenja in vrsta materiala za ELISA teste</b>	<b>37</b>
3.2	<b>SELEKCIJA MATIČNIH TRSOV cv. REBULA</b>	<b>39</b>
3.2.1	<b>Vrednotenje rezultatov pozitivne selekcije z ELISA testi na GFV</b>	<b>39</b>
3.2.2	<b>Zastopanost posameznih znakov kužne izrojenosti v E+ in E- skupini</b>	<b>39</b>
3.2.3	<b>Razlike v pridelku med selekcijskimi skupinami</b>	<b>40</b>
3.2.4	<b>Primerjava rezultatov biotestov in testov ELISA za GFV</b>	<b>41</b>
3.2.5	<b>Ugotavljanje in vrednotenje tipov cv. rebula</b>	<b>42</b>

3.3	<b>ODKRIVANJE GFV V MATERIALU KLONSKE SELEKCIJE, STARIH SORT IN PRI VZORČENJU V TRSNICI - ELISA TEST</b>	45
3.4	<b>ODKRIVANJE ArMV Z ELISA TESTOM</b>	46
3.5	<b>UGOTAVLJANJE BOLEZNI RAZBRAZDANJA LESA (GSP) IN ZVIJANJA LISTOV (GLR)</b>	47
3.5.1	<b>Znaki in obseg bolezni pri cv. 'refošk' -morfološka selekcija</b>	47
3.5.2	<b>Povezave GSP z boleznijo kužne izrojenosti (GFV)</b>	48
3.5.3	<b>Znaki in obseg bolezni pri cv. zametovka - morfološka selekcija</b>	48
3.5.4	<b>Indeksiranje na GSP in GLR bolezni</b>	48
3.6	<b>ODKRIVANJE CLOSTEROVIRUSOV Z ELISA TESTOM</b>	50
4	<b>RAZPRAVA</b>	55
4.1	<b>UPORABNOST IN REZULTATI ENZIMSKO-IMUNSKEGA TESTA ELISA</b>	56
4.2	<b>USPEŠNOST METOD ZDRAVSTVENE SELEKCIJE</b>	59
4.3	<b>PROGRAM VKLJUČEVANJA ZDRAVSTVENE SELEKCIJE V SELEKCIJO VINSKE TRTE V SLOVENIJI</b>	60
5	<b>SKLEPI</b>	62
6	<b>LITERATURA</b>	64
7	<b>POVZETEK</b>	73
8	<b>SAŽETAK</b>	74
9	<b>SUMMARY</b>	75
10	<b>PRILOGE</b>	76
	<b>ŽIVLJENJEPIS</b>	



**KAZALO TABEL**

<b><u>Tabela 1:</u></b>	Seznam indikatorjev za določanje viroz vinske trte, ICVG 1987 OIV, 1987 (60)	10
<b><u>Tabela 2:</u></b>	Reakcije posameznih indikatorjev na bolezen zvijanja listov in kompleks razbrazdanja lesa, diferencialno indeksiranje (56).	11
<b><u>Tabela 3:</u></b>	Razpored, obseg in namen ELISA testov - zbirni podatki po serijah (1 - 12), glej tudi prilogo 1	25
<b><u>Tabela 4:</u></b>	Zbirni prikaz rezultatov ponovljenih ELISA testov za GFV, po posameznih trsih in serijah testov (1983-1985)	30
<b><u>Tabela 5:</u></b>	Primerjava spektrofotometričnega odčitavanja ELISA testov za GFV ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) in vizuelnega odčitka po rumeni barvi (viz +; viz -; viz + -), ter izračun praga, serija 7, 1985	32
<b><u>Tabela 6:</u></b>	Spektrofotometrično odčitavanje rezultatov ELISA za GFV ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) pri podlagah vzorčenih iz trsnice in izračun praga, serija 7, 1985	34
<b><u>Tabela 7:</u></b>	Spektrofotometrično odčitavanje rezultatov ELISA za GFV ( $\lambda = 405 \mu\text{m}$ ) pri rebuli (elite) in pozitivnih (E) trsih, serija 8, 1988	36
<b><u>Tabela 8:</u></b>	Primerjava rezultatov testiranja (ELISA) za GFV ob vzorčenju maj - junij vs. september, v istem letu in/ali kasnejših letih	38
<b><u>Tabela 9:</u></b>	Prekrivanje rezultatov pozitivne selekcije in testov ELISA za GFV, grupiranje po pozitivni selekciji.	39
<b><u>Tabela 10:</u></b>	Zastopanost posameznih znakov boleznih kužna izrojenost v E <sup>+</sup> in E <sup>-</sup> skupini, rebula, Ampelografski vrt, 1983-1986	39
<b><u>Tabela 11:</u></b>	Povprečne vrednosti treh elementov rodnosti (za n št.trsov v skupini), rebula Ampelografski vrt, 1983	40
<b><u>Tabela 12:</u></b>	Primerjava rezultatov biotestov in ELISA testov za GFV pri cv. 'rebula', Ampelografski vrt (1983 - 1985) za 25 trsov in njihove povprečne ocene v pozitivni selekciji (P)	41
<b><u>Tabela 13:</u></b>	Podatki o pridelkih pri različnih tipih rebule, Ampelografski vrt, 1988	43
<b><u>Tabela 14:</u></b>	Prekrivanje okužb GFV in ArMV pri cv. rebula, Ampelografski vrt, 1985, ELISA test	46
<b><u>Tabela 15:</u></b>	Trsi z znaki razbrazdanja, cv. 'refošk', Tomaj (Vodopivec M.), 1985-1988 po podlagah.	47
<b><u>Tabela 16:</u></b>	Zbirni rezultati indeksiranja na GLR - GSP kompleks za refošk in zametovko, 1984-1988	49
<b><u>Tabela 17:</u></b>	Rezultati ELISA testov za liste trt z znaki zvijanja in rdečenja - GLR in z znaki razbrazdanja lesa GSP (Gugerli, 1987 os. inform.)	50
<b><u>Tabela 18:</u></b>	Rezultati ELISA za GLRaV tip I. (zametovka, laški rizling, refošk), 1989	52



## 1.1 OBRAZLOŽITEV TEME

Vinogradništvo se v iskanju kakovostne in racionalne proizvodnje vse bolj obrača k selekciji. Trto sadimo in odbiramo za 20 let ali več in mnogokrat kasnejši agrotehnični ukrepi ne presežejo rezultatov pravilno zastavljene in opravljene selekcije.

Ker se trta za proizvodnjo razmnožuje le vegetativno, je selekcija osnovni način zlahtnenja, po katerem se dobre lastnosti najdejo, prenašajo in ohranjajo.

V selekciji vinske trte, ki traja odkar človek goji trto, se je v zadnjih letih poleg genetske t.i. klonske selekcije uveljavil še pojem zdravstvene selekcije. Pri vegetativnem razmnoževanju trte se enako in obenem z genetskimi lastnostmi prenašajo tudi virusi in njim podobni organizmi. Njihova prisotnost lahko izzove motnje, ki povsem prekrijejo dobre genetske lastnosti trte. Odkrivanje in preučevanje teh motenj je naloga zdravstvene selekcije. Tako kot v drugih vejah rastlinske proizvodnje so se tudi v vinogradništvu začele uveljavljati sodobne metode za prepoznavanje in odpravljanje virusnih in njim podobnih bolezni.

V Sloveniji ima vinogradništvo še vedno pomemben delež tako po površini, kakor tudi po gospodarskem deležu proizvodnje, čeprav so se vinogradi od 39.000 ha pred drugo svetovno vojno zmanjšali na sedanjih 21.000 ha. Krizo, v kateri se je znašlo vinogradništvo obenem z ostalim gospodarstvom in še posebej s kmetijstvom, lahko prebrodi le z visoko kvaliteto in čimboljšim izkoristkom naravnih danosti. To nudi domač, visoko selekcioniran sadilni material.

Množična pozitivna selekcija, predvsem zlahtnih trt, manj pa podlag, se v Sloveniji opravlja zakonsko že vrsto let in iz tega osnovnega dela izhajajo tudi že prvi rezultati klonske selekcije. Kar tej selekciji manjka, je zdravstvena selekcija, kot jo opravljajo v ostalih vinogradniško pomembnih dezelah Evrope in v svetu.

Pri opravljanju pozitivne množične selekcije sem opazila veliko virusnih obolenj in spoznala, da okužbe ostajajo v mladih vinogradih kljub temu, da so bili izhodiščni matični trsi zanje že vizuelno pregledani. Z začetki klonske selekcije je bilo nujno vpeljati nove metode za odkrivanje virusov in jih tudi prilagoditi oziroma povezati z vsem selekcijskim delom v program, primeren za proizvodnjo brezvirusnega ali testiranega trsnega materiala.

Enzimske - imunosorbcijske metode, predvsem ELISA test, so uspešno vpeljane pri proizvodnji brezvirusnih rastlin pri mnogih kulturah. Ker je bil tudi nam potreben test, ki bi lahko vključil večje serije materiala, sem se odločila, da ga preizkusim.

Najprej sem ga uporabila za odkrivanje najbolj znane bolezni, kužne izrojenosti (povzročitelji NEPO virusi), nato pa še za kompleks bolezni zvijanja listov in razbrazdanja lesa (povzročitelji closterovirusi). V mejah možnosti zastavljenega dela sem izbrani enzimsko - imunosorpcijski test preizkusila v primerjavi z biotesti, predvsem z indeksiranjem, ki je za nekatere bolezni edini rutinski test.

Z rezultati prvih testiranj sem želela dobiti podatke o tehničnih zahtevah testa, kasneje pa iz dobljene zdravstvene slike testiranih skupin napotek za izbiro metode ali njihove kombinacije. Že v množični selekciji sem se pri negativni odbiri srečala z zelo različno zdravstveno sliko odvisno od tega, kako različna je bila pot do sadilnega materiala, kakšen je bil izvor materiala in stopnja selekcije. Zelo me je zanimalo ali z izpopolnjenimi metodami lahko postavimo ostrejšo sliko med genetsko in zdravstveno pogojenimi lastnostmi.

Največ testov sem opravila s trsi iz primorskega vinorodnega rajona (cvs. 'rebula', 'refošk', 'zelen'). Iz posavskega in podravskega rajona sem testirala manj trsov, ki pa niso nič manj pomembni, saj gre za material, ki je že na visoki stopnji klonske selekcije (cvs. 'laški rizling', 'zametovka'). Za osnovni objekt sem izbrala selekcijski vinograd rebule v Ampelografskem vrtu v Novi Gorici, ki je poskusno posestvo Biotehniške fakultete Ljubljana. Za rebulo sem se odločila zato, ker je avtohtona sorta, dovolj razširjena in zanimiva za pridelavo v briškem in vipavskem okolju, vendar premalo selekcionirana. Enak pomen in vlogo ima v preostalem delu rajona, to je v koprsko - kraskem okolju, refošk.

Prve enzimsko - imunosorpcijske teste sem opravila l. 1983 v laboratoriju Instituta za zaščito bilja Fakultete poljoprivrednih znanosti v Zagrebu, kasnejše pa na Katedri za sadjarstvo in vinogradništvo Biotehniške fakultete v Ljubljani in v selekcijskem centru za krompir Kmetijskega inštituta Slovenije v Komendi. Indeksiranje in selekcijsko delo mi je omogočila trsnica Vrhpolje, KK Vipava.

## 1.2 VIRUSNE BOLEZNI VINSKE TRTE IN NJIHOVI POVZROČITELJI

V zadnjih tridesetih letih je poznavanje virusnih bolezni vinske trte zelo napredovalo in tovrstne raziskave se širijo v vseh vinogradniških deželah. Najpomembnejši mejniki v zgodnjih raziskavah so bili:

- dokaz, da se bolezen kužne izrojenosti prenaša z nematodo *Xiphinema index*, Hewitt s sod., 1958 (42)
- mehanični prenos povzročitelja kužne izrojenosti in rumenega mozaika s sokom obolele trte na zeljaste rastline, Cadman s sod., 1960 (11)
- izolacija, purifikacija in identifikacija virusa kužne izrojenosti (Grapevine fanleaf virus GFV), Dias, 1963 (20)
- uporaba toplotne terapije in meristemske kulture za vzgojo zdravih trt, Gifford in Hewitt, 1961 (29), Galzy, 1964 (26).

Poleg virusov so bili kot povzročitelji bolezni odkriti še drugi organizmi:

- mikoplazmam podobni (mycoplasma-like organism MLO) povzročitelji zlate trsne rumenice (Flavescence dorée - FD), Caudwell s sod., 1971 (14),
- rickettsiam podobne bakterije kot povzročitelji Pierce-ve bolezni, Goheen s sod., 1973 (34).

Seznam virusov odkritih na trti je vse daljši, po Martelli-ju, 1988 (56) jih je 28, vendar še vedno ostaja veliko bolezni z oznako "virozam podobne". Veliko je še kompleksov bolezni, pri katerih ni pojasnjena vloga posameznih povzročiteljev in interakcije med njimi. Po pomenu in razširjenosti prevladujejo pri trti virusi dveh skupin in sicer NEPO virusi in closterovirusi.

### 1.2.1 NEPO virusi

To je dobro znana in razširjena skupina rastlinskih virusov poliedrične oblike, ki jih v tleh prenašajo nematode rodov *Xiphinema Cobb* in *Longidorus (Micoletzky) Filipjev* (Nematode transmissible, Polyhedral), Harrison in Murant, 1977 (11). Tipični predstavnik skupine je virus obročkaste pegavosti tobaka (Tobacco ringspot virus, TobRSV). Virus pahljačavosti listov vinske trte - grapevine fanleaf virus GFV in virus mozaika repnjaka - arabis mosaic virus ArMV glede na lastnosti delcev predstavljata svojo podskupino, Quacquarelli s sod., 1979 (62). Na trti je bilo do zdaj odkritih 12 NEPO virusov (56). V Evropi sta pogosta in ekonomsko pomembna le GFV in ArMV, v severni Ameriki na krizancih ameriških in evropskih vrst rodu *Vitis* povzročajo propadanje vinogradov tudi: virus obročkaste pegavosti tobaka (TobRSV), virus obročkaste pegavosti paradiznika (TomRSV), virus rozetastega mozaika breskve (PRMV) in virus lisavosti listov borovnic (BBLMV).

GFV - Grapevine fanleaf nepo virus - virus pahljačavosti listov vinske trte.

V starejši literaturi je omenjen kot eden od virusov boleznih kužne izrojenosti ali infekcijske degeneracije.

Osnovni opis virusa povzemam po Hewitt-u s sod. (43).

Trta reagira na okužbo z GFV zelo različno. Najpogostejše so deformacije listov in mladice, mozaik, slaba rast trsov in osipanje cvetov. Bolezen poznamo pod mnogimi imeni - panachura, court-noué, Reisigkrankheit, arricciamento, ipd. Ime virusa so prevzeli po pahljačastih listih, ki jih po okužbi z GFV dobi trtni indikator *Vitis rupestris* var. St. George. Na okuženi trti se namreč koti med listnimi žilami zmanjšajo in list dobi obliko pahljače.

Motnje v cvetenju in oplodnji po katerih ima trta osipane in slabo dozorele grozde so gospodarsko najbolj škodljive in merljive posledice okužb z GFV (8). Često smo jih ugotavljali tudi v naših vinogradih (45).

Virus je povsod razširjen, menijo celo, da je trtin naravni spremljevalec, ki se je tisočletja uspešno širil z introdukcijo trt in kasneje še s cepljenjem (32, 44).

V naravi je GFV omejen na rod *Vitis*, vendar ga mehanično lahko prenesemo na številne zeljaste rastline. Prenos na *Chenopodium quinoa* Willd in *C. amaranticolor* Coste et Reyn je pomemben v proučevanju in diagnostiki virusa.

V vinogradu se virus prenaša z nematodo *Xiphinema index* Thorne et Allen, dokazali so tudi prenos s *X. italiae* Meyl(10). Vendar je glavna pot širjenja boleznih in virusa z uporabo okuženih cepičev in podlag pri razmnoževanju trte. Neposredne odpornosti med žlahtnimi trtami niso odkrili (95), znane pa so razlike v odpornosti podlag in ameriških trt na nematodo prenašalko (16, 57, 65, 72).

GFV je srednje imunogen in so ga že zgodaj dokazovali serološko (6, 35). Biokemična identifikacija virusa je bila opravljena tudi glede na posamezne izolate iz trte ali iz *C. quinoa*, ki kažejo različne znake in stopnje boleznih (62, 81, 92).

ArMV - Arabis mosaic nepo virus - virus mozaika Arabis-a.

Osnovni opis povzemam po Murant-u, 1970 (59).

Na trti se okužba z ArMV ne kaže z izrazitimi znaki, lahko pride do rahlega rumenenja listov, ki pa ga zlahka prezremo. V naravi je najden le v Evropi, tu pa ima širok krog gostiteljev in povzročča več znanih boleznih. Na hmelju povzročča deformacijo "koprivina glava" (nettle head), na malinah rumenenje in kržljivost rastlin, na kumaricah mozaik in pritlikavost, na solati in zeleni klorozo in

prilikavost, najti ga je na sladkorni pesi, hrenu, rabarbari, beli detelji in ške. Prenaša se s sokom okuženih rastlin, v tleh z nematodo *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne. Pri mnogih zeljastih rastlinah med katerimi so številni pleveli je dokazan prenos s semenom. ArMV prenašajo tudi vrste predenice (*Cuscuta sp.*).

ArMV je dober imunogen in prav z novjšimi imunokemijskimi metodami ga bolj pogosto odkrivajo tudi na trti. Zanimiva a nepojasnjena je njegova vloga v mešanih okužbah (78).

V primeru propadanja sorte vinske trte "Kerner", je Stellmach, 1987 (79) v podlagi obolelih trt praviloma odkril ArMV.

### 1.2.2 Closterovirusi

Glavne značilnosti skupine povzemam po Bar-Joseph-u in Murant-u, 1982 (4). Virusi te skupine imajo dolge vretenasto nitaste in zelo fleksibilne delce. Po dolžini jih razvrščajo v tri skupine, 730 nm, 1250-1450 nm in 1650-2000 nm. Tipski predstavnik je virus rumenenja repe (Beet yellows virus, BYV).

Krog gostiteljev za posamezne closteroviruse, razen za BYV, je razmeroma ozek, v glavnem povzročajo rumenenja zaradi nekroze floema, tam je tudi najti značilne skupke virusnih delcev in akumulacije mešičkov.

Closterovirusi niso prenosljivi z dotikom ali s semenom. V naravi jih prenašajo uši in tudi ščitaste uši.

#### GVA - grapevine closterovirus A - trtni virus A

Iz tobaka okuženega s sokom trte, ki je imela bolezen razbrazdanja lesa je Conti s sod., 1.1980, (18) izoliral in identificiral closterovirus in ga imenoval GSP-AV - grapevine stem-pitting associated virus. Na podlagi izdelanih serumov je Milne s sod. 1984 (58) z metodo ISEM (= imunisorbent electronmicroscopy) ugotavljal pogostost virusa v trtah. Virus so takrat preimenovali v GVA - grapevine virus A, ker je bila najdena večja korelacija z GLR kot z znaki razbrazdanja. Okuženost trt različnega izvora in različne zdravstvene slike z GLR je bila zelo pogosta.

Dolžina delca je 800 nm. Krog gostiteljev je zelo ozek, od 24 testnih rastlin sta reagirala le *Nicotiana clevelandii* Gray in *N. megalosiphon* L. Virus se ne prenaša s semenom ali z ušjo *Myzus persicae*, ki je pogosti prenašalec ostalih closterovirusov. Dokazan je prenos s *Pseudococcus longispinus* Targioni, Tozetti, *Planococcus ficus* Signoret in *Planococcus citrii* Risso (68,69,71).

### 1.2.3 Kompleksne in virozam podobne bolezni z nepojasnjeno etiologijo

Zvijanje listov - grapevine leafroll disease (GLR) je zelo razširjena in že dolgo znana bolezen vinske trte. Po tem, da se prenaša pri vegetativnem razmnoževanju in cepljenju so sklepali na virozo (30).

Oboleli trsi dobijo v drugi polovici poletja močno navzdol uvihane liste, ki se predčasno barvajo in sicer rdeče pri rdečih in rumeno pri belih sortah, obzilni pas lista ostane zelen. Grozdje se slabše obarva, neenakomerno dozoreva in ima manj sladkorja (8, 30).

S termoterapijo so dobili zdrave trse z normalno obarvanimi grozdi. To je bil še en dokaz, da gre za virozo (33). Povzročitelja bolezni niso uspeli mehanično prenesti na zeljaste rastline in ga izolirati. V programih proizvodnje zdravih trt so bolezen odkrivali s trsnimi indikatorji.

Razbrazdanje lesa - grapevine stem pitting - (GSP) je bolezen, ki so jo intenzivno raziskovali v preteklih 10 letih. Poškodbe v obliki večjih ali manjših jamic, žlebičkov ali brazd se pojavijo na lesu (deblu) podlage in/ali zlahtnega dela trte. Zaradi zmanjšanja obsega ksilema, trta trpi sušo, zaostaja v rasti in propade. Bolezen so l.1979 natanko opisali v Italiji (1), marsikje v literaturi za to bolezen še uporabljajo italijanski izraz "legno riccio". Pri nas smo jo v večjem obsegu prvič registrirali leta 1976 v vinogradih sorte cv. 'refošk' na Krasu (51) in na cv. 'kardinal' v Makedoniji (61). Tudi to bolezen so dokazovali in v selekciji odkrivali le s trsnimi indikatorji (27,28).

Plutavost lubja - corky bark (CB) je po znakih na listju bolezen podobna GLR, a je lahko za trto bolj usodna. Obarvani listi v jeseni dolgo ostanejo na trti. Les nekaterih kultivarjev pokaže globoke brazde, prekrite z več sloji plute. Les na osnovi rožg lahko rahlo nabrekne in lub počí. Lesni cilindri, kambij in pluta pri mnogih sortah zelo degenerirata. Pri mnogih zlahtnih trtah je bolezen latentna. Pojavi pa se že v obliki inkompatibilnosti pri cepljenju na nekatere ameriške podlage (31). O bolezni je pri nas manj znanega kot v Ameriki, Teliz s sod., 1980 (87) je poročal celo o hitrem širjenju v vinogradih v Mehiki.

Kakor se po znakih na indikatorjih bolezni ločijo med seboj, pa njihova etiologija ni razčiščena. V povezavi z njimi so našli različne virusne delce, največkrat podobne onim iz skupine closterovirusov, manjše izometrične - sferične celice in celo viroide.

V iskanju povzročiteljev GLR je Tanne s sod., 1977 (84) purificirala in opisala potyvirus (grapevine poty virus - GPV). Namba s sod., 1979 (cit. po Tanne, 1985) (85) je prvi poročal o prisotnosti closterovirus-like delcev pri trtah z znaki GLR. To povezavo je potrdil tudi Faoro s sod., 1981 (25).



### 1.2.3 Kompleksne in virozam podobne bolezni z nepojasnjeno etiologijo

Zvijanje listov - grapevine leafroll disease (GLR) je zelo razširjena in že dolgo znana bolezen vinske trte. Po tem, da se prenaša pri vegetativnem razmnoževanju in cepljenju so sklepali na virozo (30).

Oboleli trsi dobijo v drugi polovici poletja močno navzdol uvihane liste, ki se predčasno barvajo in sicer rdeče pri rdečih in rumeno pri belih sortah, obzilni pas lista ostane zelen. Grozdje se slabše obarva, neenakomerno dozoreva in ima manj sladkorja (8, 30).

S termoterapijo so dobili zdrave trse z normalno obarvanimi grozdi. To je bil še en dokaz, da gre za virozo (33). Povzročitelja bolezni niso uspeli mehanično prenesti na zeljaste rastline in ga izolirati. V programih proizvodnje zdravih trt so bolezen odkrivali s trsnimi indikatorji.

Razbrazdanje lesa - grapevine stem pitting - (GSP) je bolezen, ki so jo intenzivno raziskovali v preteklih 10 letih. Poškodbe v obliki večjih ali manjših jamic, zlebičkov ali brazd se pojavijo na lesu (deblu) podlage in/ali žlahtnega dela trte. Zaradi zmanjšanja obsega ksilema, trta trpi sušo, zaostaja v rasti in propade. Bolezen so l.1979 natanko opisali v Italiji (1), marsikje v literaturi za to bolezen še uporabljajo italijanski izraz "legno riccio". Pri nas smo jo v večjem obsegu prvič registrirali leta 1976 v vinogradih sorte cv. 'refošk' na Krasu (51) in na cv. 'kardinal' v Makedoniji (61). Tudi to bolezen so dokazovali in v selekciji odkrivali le s trtnimi indikatorji (27,28).

Plutavost lubja - corky bark (CB) je po znakih na listju bolezen podobna GLR, a je lahko za trto bolj usodna. Obarvani listi v jeseni dolgo ostanejo na trti. Les nekaterih kultivarjev pokaže globoke brazde, prekrite z več sloji plute. Les na osnovi rozg lahko rahlo nabrekne in lub počí. Lesni cilindri, kambij in pluta pri mnogih sortah zelo degenerirata. Pri mnogih žlahtnih trtah je bolezen latentna. Pojavi pa se že v obliki inkompatibilnosti pri cepljenju na nekatere ameriške podlage (31). O bolezni je pri nas manj znanega kot v Ameriki, Teliz s sod., 1980 (87) je poročal celo o hitrem širjenju v vinogradih v Mehiki.

Kakor se po znakih na indikatorjih bolezni ločijo med seboj, pa njihova etiologija ni razčiščena. V povezavi z njimi so našli različne virusne delce, največkrat podobne onim iz skupine closterovirusov, manjše izometrične - sferične celice in celo viroide.

V iskanju povzročiteljev GLR je Tanne s sod., 1977 (84) purificirala in opisala potyvirus (grapevine poty virus - GPV). Namba s sod., 1979 (cit. po Tanne, 1985) (85) je prvi poročal o prisotnosti closterovirus-like delcev pri trtah z znaki GLR. To povezavo je potrdil tudi Faoro s sod., 1981 (25).

Conti s sod., 1980 (18). je iz trt z znaki razbrazdanja lesa izoliral closterovirus in ga imenoval GSP-AV-grapevine stem pitting associated virus. Antiserum na ta virus, ki so ga kasneje preimenovali GVA je Milne s sod., 1984 (58) uporabil, da je z metodo imunosorpcijske elektronske mikroskopije (ISEM) dokazal povezavo teh delcev z znaki razbrazdanja lesa in zvijanja listov. Povezavo med GVA in boleznijo GLR sta potrdila tudi Engelbrecht in Kasdorf, 1985 (24), ter obenem dokazala prenos clostero-delcev v naravi. Virusne delce dveh dolzin (clostero-like, 700 nm in 1300 nm), ter specifične delce sta Corbett in Wid, 1985 (19) našla na trtah z znaki GLR, GSP in CB, ter tudi na trtah brez znakov teh bolezni. Še najmanj potrditev so bile deležne povezave bolezni z viroidi, Pena-Iglesias s sod. (63), Semancik s sod., 1987(77).

Iz obolelih trt so poleg closterovirusov in njim podobnih dolgih nitastih delcev često našli manjše specifične delce, ki pa niso bili že znani in na trti odkriti NEPO virusi (5, 13).

Gugerli s sod., 1984 (40) je opisal dva tipa clostero-like delcev drugačnih od GVA in je zanje razvil ELISA test. Rosciglione in Gugerli, 1986 (70) sta z mikroskopskimi in serološkimi raziskavami te delce povezala z GLR in GSP.

Zee s sod., 1987 (94) je s SDS imunodifuzijo, ELISA testi in IEM testi na closteroviruse dokazal vlogo teh delcev v bolezni zvijanja listov. Barba s sod., 1987 (2) je v izolatih trt z GLR odkril closteroviruse, ki niso reagirali na tipe I., II. ali na GVA tip.

Slika kompleksa bolezni je dopolnilo odkritje, da *Planococcus ficus* ne prenaša samo delcev GVA, ampak tudi closteroviruse, povezane z boleznijo GLR - serotip III (86).

Vse več avtorjev je potrdilo, da je ločevanje bolezni v osnovi možno z indeksiranjem in Martelli (56) je postavil ločitveno shemo indeksiranja, po kateri določimo naslednje štiri tipe bolezni - zvijanja listov - GLR.

- plutavost lubja - CB
- jamičavost lesa tipa Rupestris - RSP
- zlebičavost lesa tipa Kober 5BB.

### 1.3 DIAGNOSTIKA VIRUSOV IN VIROZ

Vizuelna diagnoza boleznj po znakih na okuženi trti (morfološka zdravstvena selekcija) je lahko le osnovna orientacija za nadaljne preiskave. Te se opravijo na posredovalnih rastlinah (biotesti), serološko ali z elektronsko mikroskopijo.

#### 1.3.1 Prenos virusov na zeljaste rastline

Viruse, ki so mehanično prenosljivi s sokom okužene rastline lahko dokazujemo, razmnožujemo in ločujemo na različnih zeljastih rastlinah. Te rastline stalno in specifično reagirajo na določeno okužbo. Za vsak mehanično prenosljiv virus je znan krog gostiteljev z značilno reakcijo.

Pri trti tako dokazujemo predvsem NEPO viruse. Dobra testna rastlina je *Chenopodium quinoa*. Na GFV reagira z lokalnimi lezijami in sistemičnim mrežastim mozaikom (43).

Slaba stran testa je v tem, da ni povsem zanesljiv, tako se npr. pri temperaturi nad 22°C znaki maskirajo in test postane neuporaben.

Zaradi enostavnosti in kratkotrajnosti postopka je biotest z zeljastimi rastlinami lahko prvi izločilni (screening) test (52). Lahko je tudi ločilni test v mešanih okužbah, kjer pa se zahteva čim širši krog gostiteljev - zeljastih test rastlin.

#### 1.3.2 Dokazovanje boleznj s trtnimi indikatorji

Te vrste biotestov slone na dveh predpostavkah:

- okužba (=virus) se prenese s cepljenjem, ne glede na način cepljenja.
- trta - indikator, ki mora biti brez znanih viroz, stalno in za posamezno bolezen značilno reagira na okužbo po cepljenju z virusnim materialom.

Zahtevane lastnosti indikatorjev so: dobro ukoreninjanje, enostavna oskrba (odpornost za glivične boleznj) in dobra kompatibilnost z evropskimi trtami (17, 21, 55).

Indikator mora odkriti predvsem maskirane ali latentne okužbe ter take, kjer povzročitelj se ni definiran in zanj nimamo ustreznih imunokemijskih metod.

Prvotna tehnika cepljenja je bila "chip budding", kjer je oko trte - kandidata pri katerem ugotavljamo okužbo, cepljeno na ukoreninjen indikator (55). Mladica indikatorja pokaže okužbo v dveh ali treh letih. Hitrejša je metoda cepljenja na zeleno, ali strojnega cepljenja, kjer je trta kandidat v vlogi podlage, indikator pa cepič. Uveljavljajo se tudi postopki mikrocepljenja (7).

Seznam indikatorjev so v zadnjih letih zelo razširili predvsem zaradi kompleksnih boleznj. Po priporočilu OIV in ICVG iz l. 1987 (60) je potrebno indeksirati osem boleznj vinske trte, tab. 1.

Tabela 1: Seznam indikatorjev za določanje viroz vinske trte, ICVG 1987 OIV, 1987 (60)

zap. st.	Bolezen	Indikator
1.	Kužna izrojenost (fanleaf)	<i>Vitis rupestris</i> var. St. George
2.	Zvijanje listov (leafroll)	* <i>V. vinifera</i> cv. 'modri pinot', 'cabernet franc', 'Mission'
3.	Razbrazdanje lesa (stem pitting)	<i>V. rupestris</i> var. St. George, ( <i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> ) Kober 5BB <sup>x</sup> ) (Couderc 1613 x <i>V. vinifera</i> cv. 'Thompson Seedless') - LN 33 <sup>xx</sup> )
4.	Plutavost lubja (corky bark)	LN 33
5.	Mozaik lucerne (alfalfa mosaic)	<i>V. vinifera</i> cv. 'chardonnay'
6.	Flek (fleck)	<i>Vitis rupestris</i> var. St. George
7.	Obžilni mozaik (vein mosaic)	<i>Vitis riparia</i> Gloire de Montpellier
8.	Žilna nekroza (vein necrosis)	( <i>V. rupestris</i> x <i>V. berlandieri</i> ) - 110 Richter

\* Med indikatorji za zvijanje listov priporočajo izbiro glede na klimatske razmere kraja, kjer se indeksiranje opravlja.

x) v nadaljnjem besedilu Kober 5BB

xx) v nadaljnjem besedilu LN 33

Še bolj natančno razdelitev indeksiranja je napravil Martelli za kompleks bolezni GLR - GSP (56), tab. 2.

Tabela 2: Reakcije posameznih indikatorjev na bolezen zvijanja listov in kompleks razbrazdanja lesa, diferencialno indeksiranje (56).

bolezen	i n d i k a t o r / z n a k i			
	LN 33	<i>V. rupestris</i>	<i>V. vinifera</i> *	Kober 5BB**
zvijanje listov (leaf roll - GLR)	0	0	- zvijanje in rdečenje listov - zeleni obžilni pas	0
jamičavost lesa tipa rupestris (rupestris stem pitting)	0	- jamičast les izpod ceplje- nega mesta	?	0
plutavost lubja (corky bark)	- rdečenje listov - zlebičast les - odebelitve in razpoke na mladici - pritlikava rast	- zlebičast les	?	0
zlebičavost lesa tipa Kober	0	0	?	- zlebičast les, brez znakov na listju

\* - glede na različne geografske lege priporočajo cvs. 'Cabernet franc', 'Cabernet sauvignon', 'Mission', 'modri pinot'

\*\* - velja tudi za ostale križance ameriških trt (podlage)

0 - ni znakov - odsotnost znakov je ena od glavnih potrditev bolezn

? - znaki niso definirani

### 1.3.3 Imunokemijske metode odkrivanja virusov

Virusni delci so s svojim velikostnim razredom in zunanjim beljakovinskim plaščem, ki je sestavljen iz mnogih identičnih podenot, v glavnem dobri antigeni. Serološki testi so lahko odločilni v končni identifikaciji nekega neznanega virusa in pri proučevanju povezav med sorodnimi izolati ali soji (96).

Osnova seroloških testov je imunogena reakcija virusov pri pridobivanju seruma in zmožnost vezave, ki jo imajo posamezna antitelesa (=serum) do njim lastnih specifičnih (homolognih) antigenov, to je virusov.

Ko se vežeta ustrežna količina antigenov in antiteles v netopno obliko, pride do vidne precipitacijske reakcije ali obarjanja. To vidno obarjanje se lahko izvede v tekočem ali v gel sistemu. Slednje teste imenujemo imunodifuzijski testi.

### 1.3.3.1 Imunodifuzija v gelu

Reakcija antitelo - antigen se opravi v agar gelu. Skozi njegovo mrežasto strukturo pronicajo reagenti, na mestu vezave zaznamo precipitacijski krog ali linije.

Med različnimi oblikami imunodifuzije v gelu se najčesče uporablja test dvojne difuzije, znan kot Ouchterlony test. Uporabljali so ga predvsem za proučevanje in dokazovanje sferičnih virusov, ki zlahka prodirajo skozi gel, ter jih ni potrebno posebej tretirati.

Pri trti so tako identificirali in določevali sorodnost raznim NEPO virusom (6, 35, 55). Ena od prednosti je tudi v tem, da lahko uporabljamo neprečiščen rastlinski sok, ter majhne količine seruma.

### 1.3.3.2 Enzimsko-imunosorbcijski test (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Enzyme Linked Immunospecific Assay)

V rastlinsko virologijo so bile te metode prenešene iz medicine in veterine. Osnovne značilnosti testa za določanje rastlinskih virusov sta postavila Clark in Adams, 1977 (15).

Predvsem je ta test uporaben za dokazovanje virusov, ki so v rastlini v zelo majhni koncentraciji. Uveljavil se je kot test za rutinsko preverjanje zdravstvenega stanja sadilnega materiala pri rastlinah, ki jih razmnožujemo vegetativno.

Glavne prednosti enzimsko-imunosorbcijskega testa so:

- velika občutljivost in specifičnost,
- zanesljivost rezultatov, ki so merljivi,
- možnost testiranja velikih serij vzorcev in
- možnost avtomatizacije postopka ter obdelave podatkov.

V grobem razlikujemo tri oblike testov, kompetitivni, indirektni in test dvojnega sendviča. Slednjega v fitopatologiji največkrat uporabljajo.

Princip testa dvojnega sendviča je v tem, da neko trdno podlago (polistirenske, mikrotitrirne plošče, paličice ali kroglice) najprej obložimo oziroma prevlečemo s specifičnimi antitelesi (=serum). Nanje se vežejo antigeni, to je virusi, ki jih dobimo v neprečiščenem soku rastline, ki jo testiramo. Na kompleks antitelo - antigen vežemo spet antitelesa, ki so tokrat markirana z enzimom. Po dodatku enzimskega substrata dobimo reakcijo s hidrolizo substrata, ki je obenem barvna reakcija. To obarvanje ugotavljamo na oko ali merimo spektrofotometrično. Najpogosteje uporabljene mikrotitrirne plošče imajo oblikovane bazenčke - luknjice, v katerih potekajo opisane reakcije z zelo majhnimi količinami reagentov

(100-200  $\mu$ l/luknjico). Pregled uporabnosti testov po Gugerliju, 1983 (39) obsega 60 del, v fitopatologiji predvsem za ugotavljanje virusov krompirja, hmelja, šarke slive in klorotične pegavosti listov jablane.

Sutula s sod., 1986 (80) ugotavlja, da je problem pri uporabi teh metod nepopolna ali nepravilna interpretacija rezultatov, vendar o tem pri določanju rastlinskih virusov ne piše skoraj nihče (1). Tijsen, 1985 (89) je natančno opredelil te probleme pri uporabi metod v medicini, v fitopatologiji teh študij ni, zato je včasih težko oceniti ali primerjati posamezna testiranja.

Pri vinski trti se je ELISA test uveljavil po letu 1980 in to predvsem za NEPO viruse (9, 23, 49, 83). Nekaj serumov je na razpolago tudi že za trtne clostero-viruse (40, 88).

Veliko specifičnost postopka so se povečali z uporabo monoklonalnih anti-teles (38, 48).

#### 1.4. ZDRAVSTVENA SELEKCIJA VINSKE TRTE

Pod zdravstveno selekcijo v širšem pomenu besede razumemo vse metode s katerimi pridemo do zdravega materiala za razmnoževanje. Zdrav pa pomeni brez znanih virusnih in njim podobnih bolezni, ki se sicer prenašajo pri vegetativnem razmnoževanju in poslabšajo rast ali pridelek vinske trte.

##### 1.4.1 Pridelava zdravega trsnega materiala v svetu

Osnovni ukrep za pridelavo zdravih trt je vizuelni pregled matičnih rastlin zlahtne trte in podlag na znake znanih bolezni. To selekcijo imenujemo tudi negativna, ker iz nadaljnega razmnoževanja izključimo rastline z znaki bolezni. Te znake pa zlahka zamenjamo s podobnimi nevirusnimi motnjami na trti, ali pa so znaki viroz latentni ali maskirani. Še posebej to velja za podlage. Zato je vizuelna zdravstvena selekcija dokaj nezanesljiva. To je le prvi izločilni krog odbire, ki spremlja množično selekcijo. Na vseh višjih stopnjah odbire vključujejo bioteste in imunokemijske metode (52).

Brez široko zasnovane klonske selekcije ni smiselno nobeno testiranje. Campbell 1985 (12) opozarja na nevarnosti pri širjenju genetsko (in seveda proizvodno) odličnega materiala z neznano zdravstveno sliko. Pri tem lahko pride do prevelike akumulacije nekega virusa v danem okolju in do novih izbruhov bolezni predvsem zaradi vpliva spremenjenega okolja, zaradi mutacije virusa ali zaradi sinergizma z novimi neznanimi patogeni. Zelo pogosti so primeri zloma tolerance pri cepljenju različnih podlag in zlahtne trte (22, 74).

V ZDA, predvsem v Kaliforniji, so že leta 1970 (31, 55) sprejeli stroge predpise za registracijo in priznavanje vinske trte, ki temeljijo predvsem na testiranju za viroze. Registrirana je lahko le cepljenka, ki je izšla iz zdravstvene selekcije. Mnogo manj so poudarjali genetsko selekcijo, kar je po eni strani razumljivo, ker zaradi kratke dobe razvoja vinogradništva in širjenja trt (dobrih 100 let), nimajo tako raznolikega in selekcije potrebnega trsnega materiala (32).

Vinogradniške dežele Evrope, predvsem Francija in Nemčija so v okviru EGS v letu 1968 sprejele vrsto predpisov o proizvodnji in prometu s trsnim sadilnim materialom (75). Predpisi temeljijo na principu klonske selekcije, zaščite sort, povečane kakovosti pridelave in velikem pomenu zdravstvenih pregledov. Uvedene so bile tri kategorije sadilnega materiala:

- standardni (brez testiranja na viroze),
- certificirani (testiran in negativen na virus),
- bazni (izhodiščni testirani).

Slednja dva sta na višji kakovostni ravni predvsem zato, ker sta brez znanih viroz in razmnožena pod nadzorom, ki prepreči reinfekcijo.



V Italiji je bil po letu 1977 organiziran obsežen program vrednotenja in pridelave certificiranega materiala (55). Na 22 raziskovalnih postajah v vseh vinogradniških območjih so v prvih letih testirali preko 4000 klonov - kandidatov za več kot 200 različnih trtnih kultivarjev.

V južni Italiji so leta 1970 postavili program za klonsko in zdravstveno selekcijo, predvsem za izločevanje bolezni razbrazdanja lesa in zvijanja listov (73). Podobne programe v Italiji uvajajo tudi v velikih trsnicah kot je trsnica v Rauscedo, iz katere stalno prihaja trsni sadilni material v Slovenijo (21).

Zelo znana je shema klonske selekcije in pridelave zdravega trsnega materiala iz Francije (90). Že od l. 1977 so vanjo vključene vse velike državne in strokovne inštitucije:

INRA - opravlja bazne raziskave in določa metodologijo dela

ANTAV - je tehnično jedro in organizator pridelave z velikimi površinami za kolekcije baznega materiala in

ONIVIT - zagotavlja nadzor nad testiranjem in pridelavo, ter izdaja certifikate za sadilni material.

V Nemčiji, kjer klonska selekcija poteka že več kot 100 let so kmalu po letu 1965 vpeljali za klone vsa možna testiranja na viroze. Delež okuženih trsov v tem materialu je bil zelo nizek. Zaradi številnih novih odkritij in velike možnosti reinfekcije predvsem z NEPO virusi preko tal, so veliki selekcijski centri (npr. Geisenheim) po letu 1985 začeli z retestiranjem vseh baznih in matičnih vinogradov (67).

Uporaba tkivne kulture za pridobivanje zdravih trt je zelo pogosta, vendar še ni preseгла raziskovalnih programov in ni posegla na področje selekcije (3, 36).

#### 1.4.2 Zdravstvena slika matičnih vinogradov v Sloveniji

Z redno opravljeno negativno selekcijo so iz večine vinogradov v Sloveniji izkrčili najbolj očitne osipače in hiravce, nosilce GFV. Pozitivna selekcija, kjer je bila poglobljena naloga odbira bujnih in zelo rodnihi trsov je tako tudi izločila iz razmnoževanja slabo rastoče trte (Reisigkrankheit) (52, 66).

Kljub temu se po tretjem krogu selekcije ob ustreznem pregledu najdejo dosti okuženih trsov. To si razložimo z maskiranjem znakov, z latentnimi okužbami podlag ali z reinfekcijo preko nematod, kjer se obnavlja vinograd na vinograd brez razkuževanja ali počivanja tal. Ker se je v preteklih letih veliko materiala, še zlasti ključev podlag, prineslo iz drugih vinorodnih okolij z nižjo stopnjo selekcije je tudi v tem dober in stalen vir novih okužb.

Še bolj zaskrbljujoče kot pri GFV je stanje glede okužb z boleznijo zvijanja listov (GLR), ki jo zelo redko posebej izločajo in je pojav predčasnega rdečenja listov ponavadi opisan kot nekaj normalnega. Zaradi pomanjkljive zaščite trte

pred boleznimi in škodljivci, zaradi suše in fizioloških motenj so vizuelni pregledi na GLR mnogokrat skoraj nemogoči. Po pregledu matičnih vinogradov ocenjujemo, da je to še resnejši primer kot bolezen kužne izrojenosti.

Drugih bolezni v zdravstveni selekciji ne označujejo, tudi oznake "degeneriran trs" v selekcijskih knjigah ni več najti. Bolezen razbrazdanja lesa še po desetih letih prvih objav o pojavu bolezni pri nas (31) ostaja "nova" in redko kje je zajeta v preglede ob negativni selekciji.

Pregled nad zdravstvenim stanjem naj bi dale selekcijske knjige, ki pa so redkokdaj opremljene s fitosanitarno oceno ali natančnim popisom bolezni, obsegom okužb ipd. Ker se fitosanitarno pregledujejo le pozitivni trsi, kar je približno 30% vseh trt v vinogradu, nimamo pregleda nad obsegom bolezni v celoti.

Tudi material, ki je bil v klonski selekciji, ni bil sistematično pregledan na viroze ali retestiran, le v zadnjih množitvah po letu 1985 je bil cepljen na zdravstveno preverjene podlage (52). Razen nekaj klonskega materiala iz uvoza imamo tako v prometu le standardni material (82).



## 2.1 TESTIRANI MATIČNI TRSI

Za testiranje sem odbrala predvsem trse, ki po pridelovalnih lastnostih ustrezajo za vstop v klonsko selekcijo ali so že selekcionirani in razmnoženi kot potencialni kloni, niso pa še bili testirani na znane viroze. En trs predstavlja en vzorec, ker pri trtnih virusih velja sistemična okužba, vsi vegetativni deli enega trsa imajo isto zdravstveno sliko.

Med sortami sem se odločila predvsem za tiste domače samonikle kultivarje (sorte)<sup>1</sup>, ki imajo dovolj velik delež v pridelavi in so tržno zanimivi. Pri njih smo vezani na lastni razmnoževalni material (cepiči) in na domačo selekcijo.

Drug kriterij izbire so bili večji zdravstveni problemi, npr. obsežna okužba z GFV, nepojasnjena etiologija bolezni (GSP, GLR), povezave med posameznimi boleznimi in podobno.

### 2.1.1 Cv. 'rebula'

Rebula je zanimiva kot bela in kot naša samonikla sorta, ki je še vedno na nizki selekcijski stopnji z obilico tipov. Ti tipi niso ampelografsko definirani, slika še zakrivi visok odstotek trsov z znaki kužne izrojenosti (GFV), ki se ponekod zamenjujejo z lastnostjo tipa. Tako je že Vertovc l. 1844 (91) opisal tipe, ki se osipajo (sipka ali sipa), tip nore rebule, ki nič ne rodi in še druge.

Za osnovni matični vinograd sem izbrala poskusni vinograd v Ampelografskem vrtu (Nova Gorica). Zasajen je bil l. 1971 s selekcioniranim materialom. Gojitvena oblika je dvokraki Guyot. Od skupaj 1032 trsov jih je bilo v letu 1983 po končani petletni pozitivni masovni selekciji v postopku še 830 med njimi jih je 40% imelo pozitivno značko. Veliko trsov je imelo znake kužne izrojenosti, med njimi so bili tudi trsi z zelo dobro oceno za pridelek. Zato sem se najprej odločila za obsežen GFV - ELISA test, ki sem ga dopolnila z indeksiranjem.

Za prvo testiranje z ELISA sem naključno izbrala 70 pozitivno in 70 negativno označenih trsov. Kasneje sem v testiranje vključila še druge po pridelku dobre trse in trse z oznako "nora rebula" - VBG - brez grozdja. Skupaj je bilo testiranih 221 trt. Vsaka ima šifro, ki pomeni vrsto in sadilno mesto. Npr. Rb 1.15: rebula prva vrsta petnajsti trs. Pregled trsov je v prilogi 1. Kolikor so nam dovoljevale tehnične zmožljivosti rastlinjaka in laboratorija, smo nekatere trse vzporedno indeksirali na *Rupestris St. George* in preizkusili v testu na zeljaste rastline (*C. quinoa*, *C. amaranticolor*).

1) V vinogradništvu izraz kultivar (cv.) se ni povsem nadomestil izraza sorta, v tekstu ju uporabljam enakovredno oz. sinonimno

Testirali smo tudi nekaj trsov iz matičnih vinogradov Preserje, Zalošče (evidenca po selekcijski knjigi, trsnica KK Vipava, Vrhopolje, reb V 1-5).

Pri rebuli v selekciji niso bili posebej označeni trsi z znaki GLR ali GSP na closteroviruse smo testirali le en elitni in en trs brez grozdja - VBG.

### 2.1.2 Cv. 'refošk'

Refošk je trta Krasa (teranovka) in Istre, ki je potrebna temeljite selekcije, da si povrne izgubljeno pridelovalno vrednost.

Obširno zdravstveno selekcijo refoška smo začeli po letu 1978, ko smo ugotavljali obseg propadanja mladih trt in povezovali to propadanje z boleznijo razbrazdanja lesa (GSP). Takrat je bilo pregledanih 25 vinogradov v starosti od 3-6 let, na štirih podlagah (K 5 BB, S04, Rupestris 420 A). Propadlo je povprečno 19% trt, v nekaterih vinogradih tudi 30% ali 50% (51). V enem od teh vinogradov (Škrlj-Tomaj, 1500 trsov, 19% propadlih) smo l. 1980 zasadili indikatorje LN 33 in Rupestris St. George, da bi ugotovili, ali gre za prenašalca v vinogradu.

Edini selekcijski vinograd refoška v letu 1983 je bil vinograd Sveto v Komnu na Krasu s skupno 4300 trsi. Za spremljanje sem odbrala spodnji del s skupno 1870 trsi. Ker so začeli selekcijo tudi v manjših vinogradih, sem v preglede vključila tudi te. Zaradi potreb po boljših cepičih so bili po letu 1979 v selekcijo vključeni tudi zelo stari trsi (več kot 30 let) iz različnih lokacij na Krasu. S tem so hoteli ohraniti stare tipe kraškega refoška. Cepiči teh trsov so bili leta 1979 cepljeni na štiri podlage (420 A, K 5BB, S04, Rupestris) in poskusno posajeni v Tomaj (Vodopivec). Ta vinograd sem l. 1983 izbrala kot drugi matični vinograd za cv. 'refošk'. Zanimiv je zaradi zdravstvene slike starih matičnih trsov in cepljenja na z različne podlage.

Poleg ELISA - GFV in GLRaV testa smo opravili še indeksiranje na LN 33, modri pinot in Rupestris, ter natančno ponovno vizuelno selekcijo za bolezni GLR in GSP.

### 2.1.3 Trsi iz programa klonske selekcije in stare sorte.

Klonsko selekcijo cvs. 'laški rizling' in 'sauvignon' je začel inž. S. Matekovič v Mariboru že leta 1958. Poleg tega poteka odbira zametovke v Krškem od l. 1972 (53). Tam so eni in drugi že v tretji množitvi. Do zdaj niso bili testirani na znane viroze, bili pa so redno in natančno zdravstveno pregledani. V GFV - ELISA test sem vključila laški rizling 178 (pet subklonov - 27, 29, 30, 32, 36) in dve zametovki: 12/6 in II-3/4 (vzorec 39, 43). Trse l. rizlinga smo testirali posamič, pri zametovkah, ki so posajene v repetitiji po pet trsov, so trsi v

repeticiji dali vsak eno siljenko, le-te smo združili v en vzorec kakor pri sondiranju materiala v trsnici. Poleg tega sem iz istega vinograda vključila dva trsa z močnim rdečenjem listov (vzorec 42, 46).

V primorskem rajonu je v začetni fazi klonske selekcije le cv. 'zelen' (matični vinograd Slap pri Vipavi). Leta 1983 je bila zaključena pozitivna selekcija. Po opravljeni vizuelni zdravstveni selekciji so bili za testiranje na ELISA zanimivi trsi z oceno  $P \geq 3.0$ , v selekcijski knjigi je bilo opisanih mnogo primerov osipanja - sum na GFV.

Po letu 1982 je zelo naraslo zanimanje za cv. 'beli pinot', posebno še v vipavskem okolišu. Zato je bila zastavljena obširna pozitivna množična selekcija tega kultivarja. Zaradi velikega povpraševanja po sadilnem materialu so bila izdana dovoljenja za rez cepičev že v tretjem letu selekcije. Zato smo se odločili za vzorčno testiranje teh cepičev na GFV (matični vinograd Preserje) z ELISA testom. V januarju sem si pripravila siljenke za listne ekstrakte. V vsakem od 11 snopov cepičev (50 rozg/snop) smo narezali 10 kratkih ključev za siljenke in jih razdelili v dva vzorca po 5 ključev. Tako smo izračunali, da z 22 vzorci mrežno pretestiramo cca 3300 cepičev.

Shema sondiranja:

10-12 matičnih trsov  $\longrightarrow$  50 rozg (6 očes, vsaka = 300 očes)  $\longrightarrow$  1 snop  $\longrightarrow$  10 ključev  $\left\{ \begin{array}{l} \text{5-a vzorec} \\ \text{5-b vzorec} \end{array} \right.$

Za namen ohranjanja starih sort in njihovega proučevanja sta v Lozah pri Vipavi in v Ampelografskem vrtu postavljena dva kolekcijska nasada, skupaj preko 25 sort. Med njimi so zanimive predvsem zelen, glera, pinela, poljšakica, pagadebiti, pergolin, vitovska grganja in kot edina rdeča sorta še sladkočica. Ker so vse na nizki selekcijski stopnji, me je zanimalo njihovo zdravstveno stanje. Pregled po testih in obsegu dela je v prilogi 2.

#### 2.1.4 Cv. 'malvazija'

V sortimentu belih sort primorskega rajona ima malvazija stalno mesto, čeprav se marsikje zlorablja njena sposobnost, da veliko rodi. V starih matičnih vinogradih smo opazili mnogo znakov bolezni kužne izrojenosti, še posebej deformacij listov in osipanja grozdov. Novih matičnih vinogradov ni, oskrba s cepiči se rešuje z materialom iz hrvaške Istre. Tudi matični vinograd v Ampelografskem vrtu smo izločili iz selekcije že v letu 1980 zaradi velikega števila (40%) trsov z znaki kužne izrojenosti. Povzročitelj bolezni GFV je bil dokazan z zeljastim in serološkim testom (imunodifuzija v gelu) (81). Iz vzorca zemlje v tem vinogradu je bil tudi izoliran in identificiran prenašalec virusa, to je nematoda *Xiphinema index* (46).

Zato sem se odločila, da sem med temi trsi s tipičnimi znaki okužbe z GFV izbrala pozitivne kontrolne trse, kot stalni vir GFV - izolata (sl. 1).

### 2.1.5 Podlage in indikatorji

Slovenija se s podlagami vinske trte oskrbuje v glavnem od drugod. V letu 1983 smo imeli le cca 16 ha matičnjakov, zato tudi selekcije podlag praktično ni. Naše testiranje je bilo le vzorčno.

Iz proizvodnega matičnjaka podlag (*V. berlandieri* x *V. riparia*) - 420 A<sup>2)</sup> v Ampelografskem vrtu, ki je bil zasajen l. 1968 s selekcioniranim materialom iz Francije, smo med 950 trsi naključno izbrali 45 trsov za ELISA test na GFV.

V poskusnem vinogradu imamo tudi dve certificirani podlagi 420 A in (*V. berlandieri* x *V. riparia*) SO4<sup>3)</sup> iz Davis-a v Kaliforniji (ZDA), posajene l. 1974. Enakega izvora so indikatorji. Certificiran in indikatorski material smo po nekaj letih dolžni retestirati. Vse matične trse indikatorjev (Rupestris St. George, Mission, LN 33 in Baco 22A) smo retestirali z ELISA testom na GFV, za katerega je največja možnost okužbe preko nematod prenašalk v tleh.

V trsnici Vrhpolje smo med razpoložljivimi podlagami (ključi), pripravljenimi za cepljenje v letu 1985 odbrali 36 vzorcev za ELISA teste na GFV.

Shema vzorčenja:

št. snopa	podlaga	vzorec /	oznaka (primer)
1	3309	a	3309 1a
2	S04	b	3309 1b
3	S04	c	3309 1c
4	S04	d	3309 1d
5	K 5 BB		
6	K 5 BB		
7	K 5 BB		
8	420 A		
9	420 A		

Snop ima 50 rozg dolžine 2 m, v vsakem sem narezala 20 ključev in jih razdelila v štiri vzorce po pet ključev. Po siljenju sem za listni ekstrakt enega vzorca nabrala lističe iz vseh petih ključev v vzorcu.

2) V nadaljnjem besedilu 420 A

3) V nadaljnjem besedilu SO4

## 2.2 METODE ZA VREDNOTENJE MATIČNIH TRSOV

### 2.2.1 Pozitivna množična selekcija (P)

Pozitivna množična selekcija je določena z metodo za odbiranje in potrjevanje matičnih trsov v vinogradih in matičnjakih, ki je sestavni del pravilnika o načinu odbiranja in potrjevanja matičnih rastlin in enotnih metodah za opravljanje strokovne kontrole nad pridelovanjem sadik (66).

Selekcija traja pet let, trsi, ki dobijo dovolj visoko pozitivno oceno, gredo v nadaljnje razmnoževanje. Del te odbire je tudi negativna odbira na virusne in njim podobne bolezni. Trsi s temi znaki se izločijo iz razmnoževanja kljub eventuelno pozitivni oceni pridelka. Pozitivni trsi morajo dati sortno primeren pridelek, izkazovati morajo višjo odpornost na glivične bolezni in to ne glede na leto in obremenitve.

Pozitivne ocene iz posameznih let petletne odbire se lahko seštevajo in pri delitvi s številom let dobimo povprečno oceno pozitivne selekcije ( $P_s+$  npr.: ocene (3, 3, 4, 5, 3) dajo povprečno oceno 3,6.

Tako smo izračunavali ocene in razvrščali trse pri sorti rebula v matičnem vinogradu v Ampelografskem vrtu, evidenca selekcije je v selekcijski knjigi, posebej sem vodila kartoteko odbranih trt.

### 2.2.2 Odbira tipov in elit

Najboljše trse z visoko oceno ( $P + \geq 3,0$ ) in z značilnostmi zelenega tipa smo imenovali elitni trsi. To so izhodiščni trsi za klonsko selekcijo, ki so na prvi stopnji podvrženi testiranju na znane viroze. Tipska in klonska selekcija morata biti opravljena v mnogo večjem obsegu in v več letih kot je bilo mogoče opraviti v okviru te teme.

Elitne trse preverjamo po pridelku individualno. Vsi trsi so obremenjeni s približno enakim številom oces (pri cv. 'rebula' od 24 do 30 oces/trs). Za vsak trs sem preštela grozde, stehala pridelek in iz teh dveh podatkov izračunala povprečno težo grozda za trs.

Pri določanju kvalitete grozdja sem tehtala težo 100 jagod, določala sladkorno stopnjo (merjeno z refraktometrom v % ali  $^{\circ}\text{Oe}$ ) in s titracijo z NaOH določila skupne kisline (v g/l) jagodnega soka - mošta.

Iz vrednosti teže grozda, teže 100 jagod in razmerja pridelek : sladkor sem okvirno določila tipe. Dodatne oznake so možne še po posebnih značilnostih sorte. Pri nekaterih trsih sem ugotavljala kaljivost peloda v 15% raztopini saharoze.



## 2.3 DOKAZOVANJE VIRUSOV Z BIOTESTI

### 2.3.1 Prenos na zeljaste rastline

Pri trtnih virusih je test z zeljastimi rastlinami v postopku selekcije uporaben predvsem kot prvi izločilni test (mrežni test). Kot testne rastline sem uporabila *Chenopodium quinoa* in *C. amaranticolor*. Sejala sem jih v rastlinjaku v Novi Gorici od februarja do marca. Pri trsih - kandidatih za testiranje sem pozimi narezala ključe, ki sem jih dala v vodo v topel prostor. Po nekaj tednih trta zbrsti in mlade lističe sem uporabila za inokulum.

Kot ekstrakcijski pufer sem uporabila 2 % raztopino nikotinske baze (55). Testne rastline sem opazovala 30 dni po inokulaciji, temperatura v prostoru je bila kontrolirana in ni presegla 22°C.

### 2.3.2 Indeksiranje

Prenos okužbe na trsni indikator - indeksiranje je pri večini virusnih okužb vinske trte glavni dokazni postopek. Indeksiranje sem opravila po metodi cepljenja suho na suho. Trs kandidat je podlaga, indikator je cepič. Drugi način je chip budding - okuliranje na suho, pri čemer je podlaga indikator. Ta način sem uporabila tam, kjer nismo imeli na razpolago dovolj lesa (ključe) trsa ki smo ga testirali ali pa je bil v slabšem stanju in ni bilo pričakovati zelenega koreninjenja. Cepljenje in siljenje sem opravila v trsnici KK Vipava, v Vrhpolju, v času vsakoletnega cepljenja od marca do aprila. Siljenje nacepljenih indikatorjev je potekalo po standardni metodi v trsničarski pridelavi. Za vsako kombinacijo trs/indikator sem imela najmanj pet cepljenk.

Indikatorje sem sadila v kartonažni tehniki in jih prvo leto gojila v rastlinjaku. Naslednja leta sem jih sadila v kontrolirano indeksno trsnico v Ampelografskem vrtu.

Indikatorje iz programa OIV imamo v svojem matičnjaku brezvirusnih podlag in sort. Sadili smo ga iz osnovnega materiala, ki nam ga je prijazno odstopil prof. A.C. Goheen iz univerze Davis (Kalifornija, ZDA). Iz inštituta Conegliano (Italija) smo kasneje dobili še indikator "cabernet franc".

## 2.4 ELISA TEST

Prve teste sem opravila v letu 1983 za GFV, kasneje je bilo delo opravljeno po serijah glede na čas, material, namen in razpoložljive serume. Obseg in namen dela po posameznih serijah je prikazan v tab. 3.

Prvih osem serij je bilo za odkrivanje GFV. Izbor materiala je bil prilagojen selekcijskemu delu in rezultatom prejšnjih testov, predvsem za cv. 'rebula'. Prve serije so bile namenjene tehnični izvedbi testa, obenem sem že pričakovala prve rezultate za vključevanje v klonsko selekcijo cv. 'rebula'. Zaradi ugotavljanja zanesljivosti testa sem v sedmi seriji prešla na spektrofotometrično odčitavanje rezultatov. S tem se je tudi pojavil problem postavitve ločnice  $E^+/E^-$ . Zato sem pod serijo 8 predstavila rezultate dveh let (1986 in 1988). V seriji 9 sem v manjšem obsegu testirala trs s sumljivimi znaki osipanja še na drugi soroden nepo virus - ArMV, ki ga povezujejo z boleznijo kužne izrojenosti (55, 78). Nadaljnje serije so za GFV predstavljale rutinski test, začela pa sem s testiranjem na closteroviruse, povezane s kompleksom bolezni GLR - GSP, obenem so bili že na razpolago prvi serumi zanje. Po naših in mednarodnih predpisih pa smo dolžni selekcijski material za oznako "testiran" preizkusiti vsaj glede GLR. S tem se je tudi spremenil izbor materiala, od rebule sem se obrnila k refošku in zametovki, ki sta problematični sorti za GLR - GSP kompleks.

### 2.4.1 Tehnična izvedba, kemikalije, serumi in oprema

Med enzimsko-imunosorbcijskimi testi sem se odločila za test dvojnega sendviča (double antibody sandwich method, das ELISA)<sup>4)</sup> po Clark-u in Adams-u, 1977 (15). Shema postopka je v prilogi 3.

Kot testni material sem povsod, kjer ni drugače označeno, uporabila mlade trtne liste. Nabrala sem jih v vinogradu v času rasti ali pa sem si v času mirovanja v laboratoriju iz ključev rozg (2-3 očesa) pripravila siljenke, ki brez težav vzbrstijo v vodi ob sobni temperaturi.

Reagenti so bili pripravljani po standardni recepturi (37), le za ekstrakcijski pufer sem uporabila PBS z dodatkom 2% nikotinske baze, kot je priporočeno za trto (97). Pri zadnjih testih za GLRaV sem uporabila tris HCl pufer (40). Preizkusila sem naslednje kombinacije:

- ekstrakcijski pufer BIOREBA (K1+)
- ekstrakcijski pufer BIOREBA + 2% nikotina (K2+)
- PBS brez nikotina (K3+)
- PBS + 2% nikotina (K4+)

4) - v nadaljnjem besedilu ELISA ali ELISA test

Tabela 3: Razpored, obseg in namen ELISA testov - zbirni podatki po serijah (1 - 12), glej tudi prilogo 1

Zap. serije	št. mesec/ leto	št. plošč v seriji	vrsta materijala	št. vzorcev	namen testa	testni laboratorij	način odčitavanja	op.
1	marec 1983	3	podlage - Jaska	12	-odkrivanje GFV,	Zavod za zaštitu bilja (FPZ Zagreb)	vizuelno	-več ponovitev na plošči in med ploščami
			rebula P+ in P-A.vrt	88	-standardizacija postopka			
			kontrolni test (mlvz)	8	-zanesljivost testa			
			indikatori	8	-preverjanje K+			
			refošk - Kras/LN33	11	-povezanost GFV in GSP			
L. rizling - osipanje	2							
2	junij 1983	4	rebula P+, P- A.vrt	89	-odkrivanje GFV po	Zavod za zaštitu bilja (FPZ Zagreb)	vizuelno	-dve plošči iz zmrzo- valnika nista dali reakcije
			matični trsi	6	znakov vizuelne selekcije			
			stare sorte	6	-GFV in rumeni mozaik			
indikatori kontrole	8	-uporaba predhodno obloženih plošč						
3	julij 1983	4	rebula A. vrt P+, P-	67	-standardizacija postopka	Katedra za vinogradništvo (BF Ljubljana)	vizuelno	
			indik +K	14	-odkrivanje GFV			
					-uporaba domačih plošč			
4	april 1984	1	rebula A. vrt -	12	-ponovitev +/- reakcij	Zavod za zaštitu bilja (FPZ Zagreb)	vizuelno	
			stare sorte, pinot	16	-ugotavljanje GFV in			
			indikatori	4	osipanja, vzorčenje			
5	september 1983	2	rebula A. v. P+P-	42	-preizkus časa vzorčenja	katedra za vinogradništvo (BF Ljubljana)	vizuelno	
			kontrole	6	za GFV (pomlad vs. jesen)			
6	maj 1985	2	rebula A. v.	30	-selekcija (GFV)	Zavod za zaštitu bilja (FPZ Zagreb)	vizuelno	in spektro- fotometrično
			matični trsi (Preserje)		-selekcija, povezava GFV			
			zelen (Slap)	63	in osipanja			

Tabela 3: nadaljevanje

Zap. št. serije	meseč/ leto	št. plošč v seriji	vrsta materiala	št. vzorcev*	namen testa	testni laboratorij	način odčitavanja	op.
7	junij 1985	3	rebula	34	-selekcija na GFV (A.vrt, Preserje)	Zavod za zaščito bilja (FPZ Zagreb)	spektro-fotometrično in vizuelno	
			podlage	46	-vzorčenje v trsnici			
			indikatorji	7	-retestiranje			
			mlvz	10	-zanesljivost testa			
			pinela, zelen	2				
8	maj 1986	2	žametovka	7	-selekcija klonov GFV	zavod za zaščito bilja (FPZ Zagreb)	vizuelno in spektrofotometrično	
			l. rizling	4	-selekcija subklonov GFV			
			b. pinot	22	-vzorčenje v trsnici GFV			
	junij 1988	1	rebula	50	-selekcija na GFV			
9	sept. 1985	2	rebula	71	-odkrivanje ArMV	zavod za zaščito bilja (FPZ Zagreb)	vizuelno in spektrofotometrično	
	julij 1986	1	indikatorji	6	-ponovitev testa za ArMV			
			stare sorte	3				
10	junij 1988	3	refošk	54	-odkrivanje GFV in GLRaV	Center za krompir Komenda (KIS)	spektrofotometrično	
			rebula	32	-elite in tipi za GFV			
11	julij 1989	2	stare sorte	16	-odkrivanje GFV - rutinski test	Center za krompir Komenda (KIS)	spektrofotometrično	
			refošk	12	-GFV vs GLRaV			
12	oktober 1989	1	refošk	12	-odkrivanje GLRaV tip 1	Biologija (BF Ljubljana)	spektrofotometrično	
			žametovka	15	(ponovitev serije)			
			l. rizling	8				

\* vštete so ponovitve \*\* rezultati prikazani združeno v prilogi

Kot trdno osnovo, na katero vezemo antitelesa, sem uporabljala standardne polystyrenske mikrotitrirne plošče s 96 vzorčnimi luknjicami tuje (INOTECH-BIOREBA) ali domače izdelave (GOLIAS). Uporabljala sem sveže obložene plošče ali take, ki smo jih z antitelesi obložili nekaj mesecev prej in jih do uporabe hranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Inkubacijski čas in temperaturo ( $30^{\circ}\text{C}$  - 7 h,  $37^{\circ}\text{C}$  - 4 h) sem prilagajala poteku in obsegu dela. V nekaj primerih sem kot modifikacijo uporabljala polovično količino reagentov (100  $\mu\text{l}$ ) na vzorec.

Zaradi zanesljivosti postopka sem vsak listni ekstrakt (=vzorec) testirala v dveh sosednjih luknjicah (leva in desna ponovitev testa). Pri spektrofotometričnem odčitku sem vzela srednjo vrednost obeh odčitkov. Večje odstopanje med levim in desnim odčitkom je znak napake (robni efekt, napačno oblaganje, prelivanje vzorcev pd.). Na vsaki plošči so bili poleg 43 vzorcev vedno še kontrolni vzorci in sicer:  $\text{K}^+$  (pozitivni vzorec),  $\text{K}^-$  (negativni vzorec - listni ekstrakt trte preverjeno brez okužbe, npr. indikator St. George za GFV) in včasih še vzorec čistega ekstrakcijskega pufra.

Poleg odčitavanja rezultatov na oko po spremembi barve, sem v nekaterih primerih lahko uporabljala tudi čitalec - spektrofotometer (Dynatech Microplate Reader MR 700). V prilogi 4 je kopija odčitka.

Za dokazovanje trtnih virusov nimamo domačih serumov. Na voljo sem imela reagente, ter serume (IgG in conjug. IgG, AP-IgG poliklonalni serum) švicarske izdelave (BIOREBA AG).

#### 2.4.2 Metode za interpretacijo rezultatov

V testih, kjer smo obarvanje plošč odčitavali na oko, sem po dogovoru vse sumljive (slabo vidne) reakcije ponovila in po ponovitvi v primeru +/- reakcije upoštevala, da je test pozitiven.

Pri spektrofotometričnem odčitavanju sem za vsak primer posebej na tri načine izračunala mejo med pozitivnimi in negativnimi vzorci  $2 \times \text{K}^-$  ali  $3 \times \text{K}^-$ , ter iz povprečne vrednosti odčitka v skupini negativnih vzorcev ( $\bar{x}_{\text{neg}}$ ). To skupino sem izbrala na podlagi odčitkov kontrolnih vzorcev. meja ali ločnica med pozitivnimi (virusnimi) in negativnimi (zdravimi) vzorci ( $\text{E}^+/\text{E}^-$ ) je  $3 \times \bar{x}_{\text{neg}}$  ali  $4 \times \bar{x}_{\text{neg}}$ . Podoben izračun je s postavitvijo standardne deviacije za skupino negativnih vzorcev, meja je pri  $\bar{x}_{\text{neg}} + 3\text{sd}$  (ali  $\bar{x} + 4\text{sd}$ , kjer je  $\text{sd} = \dots$ , n je število testov (37).

Pri interpretaciji rezultatov koristi tudi prikaz le-teh s frekvenčno distribucijo (histogram) za posamezno ploščo ali skupino testov (80). Za absorpcijske vrednosti (OD - optical density) sem izbrala ustrezen interval (0,1 ali 0,2 enote) in vanje razporedila rezultate glede na pogostost pojavljanja. S tem načinom sem prikazala smiselnost izračunavanja ločnic po različnih metodah ( $\text{E}^+/\text{E}^-$ ) za nekaj značilnih serij.



### 3.1. UPORABNOST ELISA TESTA ZA ODKRIVANJE GFV

Na podlagi obsežne literature in prvih razpoložljivih serumov sem preizkusila ELISA test za GFV.

#### 3.1.1 Tehnične zahteve testa in njegova zanesljivost

V prvi seriji testov sem dobila rezultate povsem odgovarjajoče že znanemu GFV statusu testiranih trsov. Vse ponovitve na mikrotitrirnih ploščah so se ujemale. Pozitivne kontrole so reagirale z močnim, jasno rumenim obarvanjem že nekaj minut po dodajanju enzimskega substrata. Nobena od negativnih kontrol ni dala obarvanja.

Plošče, predhodno obložene z antitelesi, hranjene nekaj dni do dveh mesecev pri  $-20^{\circ}\text{C}$ , so dale enako dobre reakcije kot sveže obložene, razen v primeru, da smo jih uporabili direktno iz zmrzovalnika, takrat niso reagirali niti pozitivni kontrolni vzorci (serija 2).

Dve kombinaciji dolžine trajanja inkubacije in temperature (2 uri na  $37^{\circ}\text{C}$  ali 4 ure na  $32^{\circ}\text{C}$ ) sta dali enako dobre rezultate, prilagodila sem jih poteku dela.

Pri dodajanju  $100\ \mu\text{l}$  reagenta na bazen namesto  $200\ \mu\text{l}$  sem dobila pri istih vzorcih enako jasne reakcije.

Mikrotitrirne plošče domače izdelave so pokazale nekaj več odstopanj med levo in desno ponovitvijo testa. Pri domačih ploščah smo odkrili več mehaničnih poškodb in odstopanja pri dimenziji bazenčkov.

Med ekstrakcijskimi pufri za GFV so enako dobro reakcijo dali pripravljene BIOREBA preparati kot tudi pufri z dodatkom nikotina.

Za potrditev uvajanja ELISA testov v selekcijo sem potrebovala podatek o zanesljivosti odkrivanja GFV. V številnih ponovitvah znotraj serije, med serijami v zaporedju, med različnimi sortami in med različno okuženim materialom, sem dobila podatke o zanesljivosti testov, kot jih kaže tab. 4.

Od 55 trsov, ki sem jih večkrat testirala v isti ali v različnih serijah, sem dobila štiri take, ki so dali sumljivo +- reakcijo. Pri tem smo steli drugo in vsako nadaljno ponovitev kot eno. Pri dveh trsah predvidevamo, da gre lahko tudi za novo okužbo, saj sta med drugo in sedmo serijo potekli dve leti. Iz teh podatkov smo dobili tudi lastne pozitivne in negativne kontrolne trse (npr. trsi Mlvz 2.5, Mlvz 2.6, Mlvz 2.9).

Tabela 4: Zbirni prikaz rezultatov ponovljenih ELISA testov za GFV, po posameznih trsah in serijah testov (1983-1985)

zap. št.	trs	serija (ponovitev) testa					zaključna ocena E testa	
		1	2	3	4*	6		7
1	Rb 2.10			+			-	sumljiv
2	2.16			+	-			sumljiv
3	2.25			--				-
4	2.26			-			+	nova okužba**
5	2.29			--	-		-	-
6	2.34			+	+			+
7	2.39			--				-
8	2.47			--				-
9	2.53			+				+
10	2.55		-				-	-
11	2.60		+				+	+
12	2.80		+				-	sumljiv
13	2.81		-				-	-
14	2.87		+				-	sumljiv
15	3.5	+	+					+
16	3.8		++					+
17	3.9		+				+	+
18	3.15	-	-				-	-
19	3.19		+	++				+
20	3.21	-	-	-				-
21	3.31		-				-	-
22	3.35		-				-	-
23	3.41	++						+
24	3.42		+				+	+
25	3.72		-				+	nova okužba**
26	4.9				-			-
27	4.38	+	+		+			+
28	4.39	-	-					-
29	4.88		-				-	-
30	5.13			+	+			+
31	5.14			-		-	-	-
32	5.16			-		-		-
33	5.18			+		+		+
34	5.20			-		-		-
35	5.28			--		-		-
36	5.32	-		--		-		-
37	5.35			-		-		-
38	5.54					-	-	-
39	6.5			--				-
40	6.9			++				+
41	6.32			+	++			+
42	7.43			-			-	-
43	Plvz 2.3						++	+
44	" 2.4	+			+			+
45	" 2.5	++						+
46	" 2.6	+	+	+		+	+	+
47	" 2.9	+	++	+	+			+
48	" 2.20	+	+		++		+	+
49	zelen x 3		+	++				+
50	refošk 1.17	--						-
51	St.G/1	-	-	-		-	-	-
52	K5BB-Tg	-	-	-				-
53	SO4 Tg	-	-	-				-
54	420 A/1	-	-	-				-
55	Pinela 2/17					++		+

\* serija 5 je izpuščena iz primerjave ker je šlo tam za vzorčenje v septembru, ki ga ne obravnavamo za enakovredno zaradi nižje koncentracije GFV v listih;

\*\* možnost nove okužbe v vinogradu, časovni razmik serije "2" in "7" je dve leti.



### 3.1.2 Interpretacija rezultatov

Prva odčitavanja smo opravili vizuelno - s prostim očesom po obarvanju. Sumljive ali slabo vidne reakcije smo ponovili, vendar jih nikoli ni bilo več kot 2-3 na ploščo.

V seriji 7 sem prvič primerjala vizuelne in spektrofotometrične odčitke. Spektrofotometrične odčitke, razvrščene po velikosti od najvišjega do najnižjega, sem uporabila za izračun praga med pozitivnimi (GFV/E<sup>+</sup>) in negativnimi (GFV/E<sup>-</sup>) vzorci, tab. 5.

#### Primer 1:

Če za velikost razreda negativnih vzorcev vzamemo  $n=26$  (vsi vzorci, ki dajo odčitke nižje od tistega za ekstrakcijski pufer), in je  $\bar{x}_{neg}$  povprečna vrednost odčitka za razred negativnih vzorcev, dobimo:

$$\begin{aligned} \bar{x}_{neg} &= 0.131 & \text{prag a} &= \bar{x}_{neg} + 3sd \\ sd &= 0.0237 & &= 0.201 \\ & & \text{prag b} &= \bar{x}_{neg} + 4sd \\ & & &= 0.224 \\ & & \text{prag d} &= 3 \times \bar{x}_{neg} = 0.393 \end{aligned}$$

Glede na različno izbrane kriterije se giblje meja E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup> od zap. št. 20 do vključno zap. št. 25. Torej imamo šest vzorcev, ki so lahko napačno pozitivni ali napačno negativni. V tej skupini je tudi vizuelno določena meja. Med šestimi neopredeljenimi vzorci so se trije (Rb 5.54, 5.86 in Mission) v drugih testih pokazali kot negativni, en vzorec (Mlvz 2.13) pa kot pozitiven za GFV. Dveh vzorcev iz sondiranja (Rb, V) nismo mogli ponoviti. Meja navzgor proti pozitivnim vzorcem je dokaj ostra (0,518/0,399), meja navzdol pa ne (0,203/0,194).

Vrednost za ekstrakcijski pufer je dokaj visoka in blizu E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup>. Če vzamemo to vrednost in jo množimo s 3 (0.516), pridemo že v območje pozitivnih vzorcev kot je mlvz 2.3.

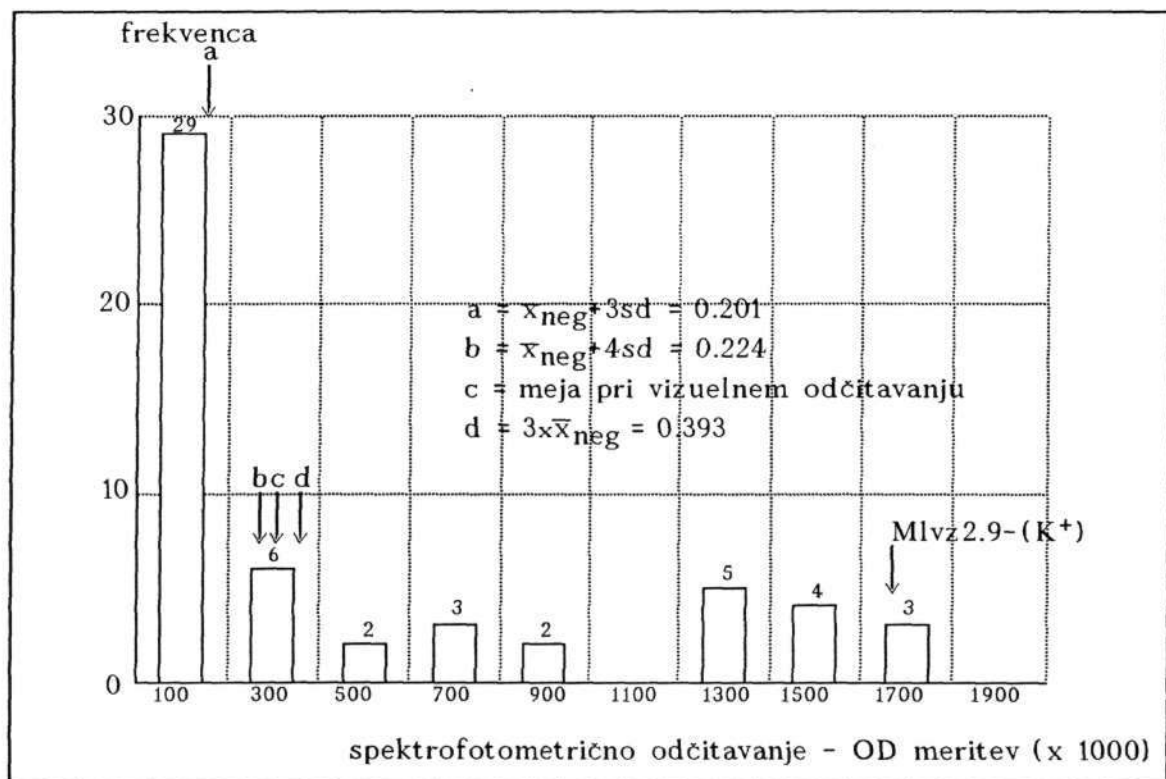
Visoke vrednosti kažejo na nespecifične reakcije (background), ki pa so dokaj enake za vsako posamezno ploščo ali celo serijo.

Tabela 5: Primerjava spektrofotometričnega odčitavanja ELISA testov za GFV ( $\lambda = 405$  nm) in vizuelnega odčitka po rumeni barvi (viz +; viz -; viz + -), ter izračun praga, serija 7, 1985

zap. št.	trs	oznaka	o d č i t e k		meja po izračunu
			spektrofotometrično	vizuelno	
1	Plvz	2.10	1.778	+	
2		2.7	1.762	+	
3		2.9	1.672	+	
4	Pinela	2.17	1.599		
5	Plvz	2.6	1.504	+	
6		2.16	1.493	+	
7		2.19	1.484	+	
8	Rb	3.9	1.390	+	
9		2.30	1.314	+	
10	Plvz	2.3	1.280	+	
11	Rb	3.42 (nora)	1.279	+	
12		3.72	1.279	+	
13		2.60 (nora)	0.955	+	
14		6.42 (nora)	0.840	+	
15		6.31 (nora)	0.751	+	
16		2.26	0.719	+	
17	Rb	4 V	0.685	+	
18	"	V(enacije)	0.548	+	
19	Plvz	2.3	0.518	+	
20		2.13	0.399	+	d = 3 $\bar{x}_{neg}$
21	Rb	1 V	0.276	+	
22	"	5 V	0.234	+ -	c = vizuelna meja
23	"	5.54	0.232	+ -	
24	Mission		0.226	-	b = $\bar{x}_{neg} + 4$ sd
25	Rb	5.86	0.203	-	
26		5.14	0.194	-	a = $\bar{x}_{neg} + 3$ sd
27	Zelen	5	0.183	-	
28	Rb	3 V	0.175	-	
29	Eks.pufer		0.172	-	
30	Rb	3.66	0.168	-	
31	"	2.81	0.168	-	
32	Plvz	2.20	0.161	-	
33	Rb	5.35	0.159	-	
34	"	2.55	0.147	-	
35	"	2.22	0.146	-	
36	"	7.43	0.145	-	
37	"	3.35	0.144	-	
38	Salt Creek	1	0.137	-	
39	Rb	3.31	0.134	-	
40	"	2.10	0.133	-	
41	"	4.88	0.132	-	
42	SO4-2		0.132	-	
43	Rb	1.13	0.130	-	
44	"	1.15	0.129	-	
45	"	1.39	0.112	-	
46	LN 33	1	0.111	-	
47	Rb	3.15	0.108	-	
48		2.80	0.108	-	
49	Dog Ridge	1	0.105	-	
50	420 A I		0.105	-	
51	Rb	2.87	0.103	-	
52	"	2 V	0.103	-	
53	"	6.37	0.100	-	
54	Baco22A	1	0.095	-	

Vzorci rebule z oznako V (1 V - 5 V) so iz sondiranja cepičev v trsnici, 10 rozg istega snopa je en vzorec.

Na podlagi podatkov iz tabele 5 smo v grafu 1 predstavili frekventno porazdelitev odčitkov za ELISA-GFV reakcije. Krivulja negativnih vzorcev ne predstavlja normalne razporeditve. Velik "rep" v desno oz. velika disperzija vzorcev predstavlja problem pri postavitvi praga. Odčitavanje za kontrolni pozitivni vzorec daleč odstopa od vrednosti za neopredeljene vzorce.



Graf 1: Histogram rezultatov ELISA za GFV, 54 vzorcev (rebula-selekcija A.v., podlage, indikatorji, E<sup>+</sup> kontrole - tabela 5) puščice označujejo izračunane E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup>.

### Primer 2:

Pri podlagah, kjer je en vzorec predstavljal več trsov, je po različnih kriterijih izbrana meja E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup> zelo široka in obsega 16 neopredeljenih vzorcev, ki so napačno pozitivni ali napačno negativni, tab. 6.

Pri negativnem vzorcu n=21 (zap.st. 29) so meje naslednje:

$$\bar{X}_{neg} = 0.180$$

$$sd = 0.0115$$

$$\text{prag a} = \bar{X}_{neg_{21}} + 3sd = 0.215$$

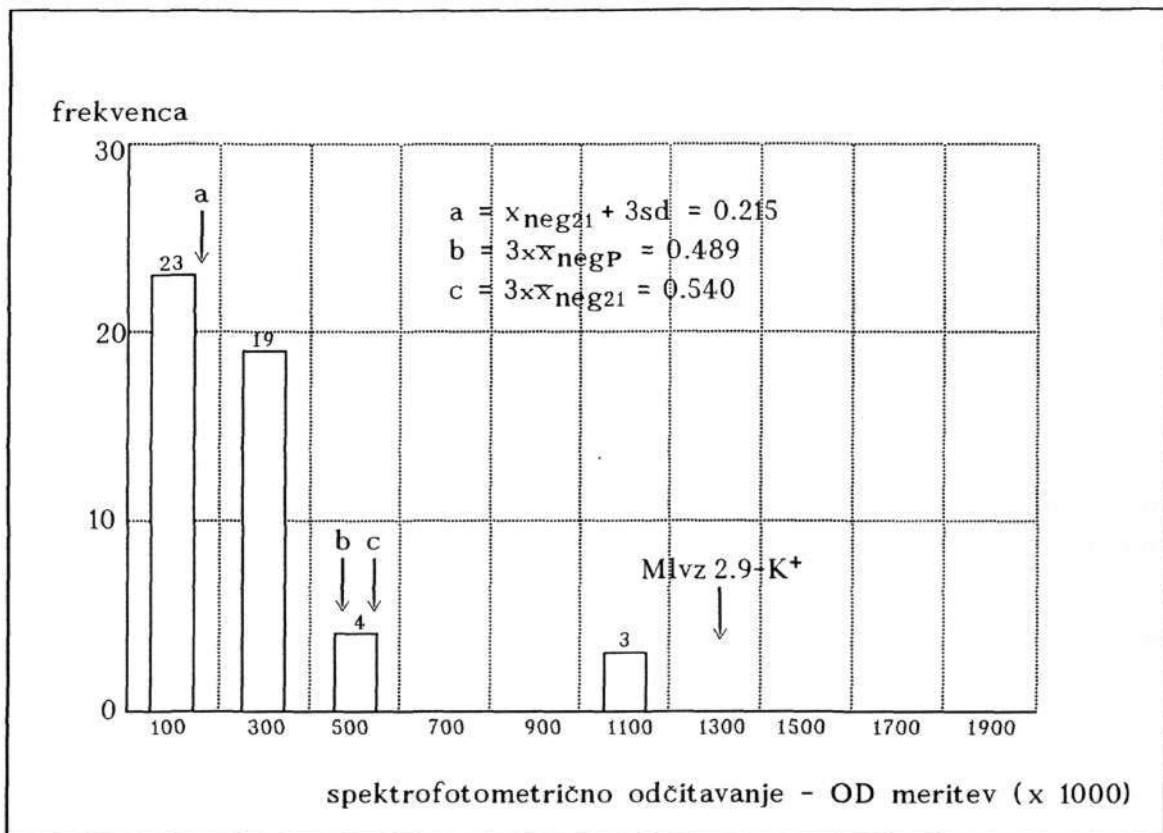
$$\text{prag b} = 3\bar{X}_p = 0,489$$

$$\text{prag c} = 3\bar{X}_{neg} = 0.540$$

Tabela 6: Spektrofotometrično odčitavanje rezultatov ELISA za GFV ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) pri podlagah vzorčenih iz trsnice in izračun praga, serija 7, 1985

Zap. št.	trs/oznaka	odčitek	meja po izračunu
*1	Mlvz 2.9v	1.351	
2	Pinela 2.17	1.169	
3	Mlvz 2.7	1.116	
4	podlage: 3309C-1c	0.519	b, c
5	SO4 -5c	0.424	
6	3309C-1d	0.418	
7	SO4-2b	0.406	
8	SO4-3b	0.348	
9	SO4-2a	0.346	
10	K5BB-8a	0.331	
11	SO4-5a	0.326	
12	K5BB-9a	0.321	
13	KBBB-8b	0.320	
14	420A-11c	0.267	
15	SO4-4c	0.258	
16	K5BB-6c	0.256	
17	3309C-1b	0.242	
18	SO4-5d	0.228	
19	K5BB-9d	0.223	
20	SO4-4a	0.219	a
21	K5BB-6d	0.214	
22	K5BB-7a	0.213	
23	K5BB-8c	0.212	
24	3309C-1a	0.210	
25	420A-11d	0.205	
26	K5BB-9b	0.203	
27	420A-11b	0.199	
28	420A-10c	0.197	
29	K5BB-7b	0.196	
30	SO4-4b	0.193	
31	SO4-3a	0.190	
32	SO4-3c	0.190	
33	K5BB-9c	0.189	
34	K5BB-6b	0.189	
35	K5BB-7a	0.187	
36	SO4-2c	0.186	
37	SO4-2d	0.186	
38	SO4-4d	0.182	
39	420A-10b	0.180	
40	K5BB-6a	0.180	
41	K5BB-9d	0.179	
42	SO4-3d	0.176	
43	420A-10a	0.175	
44	K5BB-7c	0.175	
45	Ekstr.pufer	0.172	
46	420A-11a	0.170	
47	420A-10d	0.167	
48	Ekstr.pufer	0.163	
49	SO4-5b	0.148	

\* Zap.st. 1,2,3 so pozitivne kontrole



**Graf 2:** Histogram rezultatov ELISA za GFV za 46 vzorcev podlag in 3 E<sup>+</sup> kontrole vzorcev, (tabela 6), puščice označujejo E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup> vrednosti

Meja (E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup> = 0.219/0.214) je zelo nejasna in spet gre za primer, da sondirani vzorci nastopajo z visokim nepojasnenim ozadjem.

Iz histograma (graf 2) bi sklepali na isto visoko nespecifično ozadje pri odčitkih za podlage - torej za napačno pozitivne vzorce ali za napačno negativne vzorce.

**Primer 3:**

Ker so za različno ozadje v spektrofotometričnih odčitkih lahko vzroki v različnosti testiranega trsnega materiala (sorta, starost lista), smo se odločili na eni plošči testirati izenačen elitni material z večjim številom pozitivnih vzorcev) tab. 7.

Pri negativnem vzorcu  $n = 12$  (vse vrednosti, ki so manjše ali enake vrednosti za negativno kontrolo -  $K^-$  Rupestris), je meja  $E^+/E^-$  naslednja:

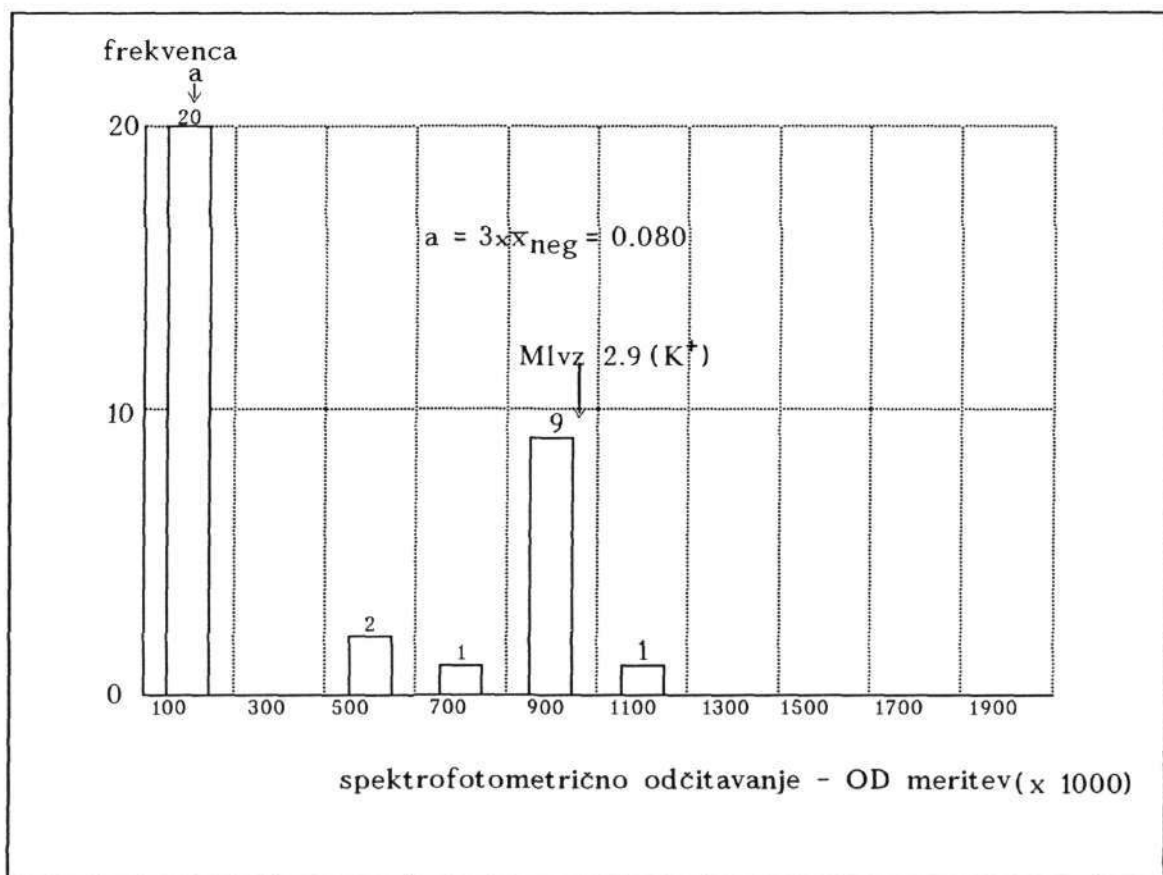
$$\bar{x}_{\text{neg}} = 0.024$$

$$\text{prag } a = 3 \times \bar{x}_{\text{neg}} = 0.072$$

Meja  $E^+/E^-$  je zelo ostra (0.523/0.038), neopredeljenih vzorcev ni, se pa iz histograma (graf 3) vidi divergenca med pozitivnimi kontrolnimi vzorci. Delno lahko tako ugoden rezultat pripišemo standardizaciji postopka.

Tabela 7: Spektrofotometrično odčitavanje rezultatov ELISA za GFV ( $\lambda = 405\text{nm}$ ) pri rebuli (elite) in pri pozitivnih<sup>+</sup>(E) trslih, serija 8, 1988

zap. št.	trs/oznaka	odčitek	izračunani prag
1	rebula	8.2	1.073
2		3.5	1.069
3		6.3VBG	0.977
4		6.51	0.977
5		379	0.927
6		4.38	0.944
7		8.6	0.903
8	$K^+$ Mlvz 2.9		0.876
9		8.9	0.844
10		5.7VBG	0.829
11		1.48VBG	0.822
12		3.66	0.798
13		2.59	0.531
14		2.34	0.523
15	(rebula-elite)	1.18	0.038
16		2.11	0.037
17		1.32	0.035
18		2.43	0.034
19		2.15	0.034
20		2.16	0.034
21		2.32	0.033
22		1.33	0.031
23	$K^-$ Rup		0.030
24		1.15	0.030
25		5.53	0.029
26		2.19	0.028
27		5.32	0.027
28		3.15	0.027
29		2.25	0.025
30		1.38	0.024
31		4.39	0.023
32		8.15	0.020
33		9.18	0.016
34		7.16	0.011



Graf 3: Histogram rezultatov ELISA za GFV, 34 vzorcev (rebula elite in E<sup>+</sup> kontrole, tabela 7)

Rutinski postopek za evidenco in interpretacijo rezultatov testiranja v postopku selekcije je prikazan v prilogi 4

### 3.1.3 Čas vzorčenja in vrsta materiala za ELISA teste

Zaradi različne koncentracije virusnih delcev v listih v različnem času je priporočljivo jemati vzorce mladih vrhnjih lističev v času od maja do konca junija, ali mladih lističev iz siljenih rozg (50, 97).

V seriji 5 sem preizkusila zanesljivost ELISA testa kadar vzorčimo starejše (jesenske) liste. V dveh primerih od devetih pri pozitivnih trsih v jeseni istega leta nismo dobili reakcije na GFV. Nekatere trse sem retestirala še v kasnejših serijah in med skupaj 25 vzorci odkrila 3 napačno negativne (\*), tab. 8.

Septemberski test sem vzela kot manj zanesljiv in pri končni odločitvi o GFV okužbi pri posameznih trsih nisem upoštevala rezultata serije 5.

Tabela 8: Primerjava rezultatov testiranja (ELISA) za GFV ob vzorčenju maj - junij vs. september, v istem letu in/ali kasnejših letih

zap. št.	trs/oznaka	vzorčenje 1983		referenca 1984-1988
		maj/junij	september	maj/junij
1	Rb 1.15	-	-	-
2	1.32	-	-	-
3	1.38	-	-	--
4	1.48 VBG	-	+	+
5	2.34	+	+	+
6 *	2.53	+	-	-
7	3.5 VBG	+	+	-
8	3.15	-	-	-
9	3.42 VBG	+	+	+
10	3.66	+	+	+
11*	4.38	+	-	+
12	4.39	-	-	-
13	4.40	-	-	-
14	5.13	+	+	-
15	5.20	-	-	-
16	5.38	-	-	-
17	5.46	-	-	-
18	5.50	-	-	-
19	5.54	-	-	---
20*	6.42 VBG	-	-	+
21	6.51 VBG	-	+	+
22	6.52 VBG	-	+	+
23	6.61	-	-	-
24	zelen 5	+	+	-
25	mlvz 2.9	+	+	+++

Opazila sem, da pri pripravljanju listnega ekstrakta vzorci starejših listov mnogo hitreje oksidirajo in je treba čas od ekstrakcije do oblaganja plošč z rastlinskim ekstraktom čim bolj skrajšati.

V primeru, da nimamo na razpolago svežih listov trte, le-te lahko zamrznemo. Pri nekaterih kontrolnih pozitivnih trsah (Mlvz 2.6, Mlvz 2.9) sem iz takih vzorcev redno dobila GFV pozitivno reakcijo. Pozitivno je reagiral tudi sok grozdne jagode teh trsov testiran nekaj dni pred trgatvijo.

Tudi neodgnana ali komaj vzbrstela očesa GFV okuženih trt so dala pozitivno reakcijo.

V poskusu, da bi odkrila GFV v vzorcu floema in lesa, nisem uspela. Uporabljala sem le PBS-nikotinski ekstrakcijski pufer, ki je po nekaterih avtorjih uporaben le za ekstrakcijo virusa iz listov (97).

GFV sem odkrila v listih metlike *Chenopodium quinoa*, ki smo jih okuzili mehanično s sokom trte Mlvz 2.6. Enak rezultat sem dobila, če sem testirala sveže liste metlike ali liste, ki smo jih po okužbi hranili štiri mesece pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .



### 3.2 SELEKCIJA MATIČNIH TRSOV cv. 'REBULA'

#### 3.2.1 Vrednotenje rezultatov pozitivne selekcije z ELISA testi na GFV

Po petletni pozitivni selekciji sem v dveh naključno izbranih skupinah dobrih (P+) in slabih trt (P-) dobila sliko okuženosti z GFV po testiranju z ELISA, zbirni podatki so v tab. 9 (priloga 1b, c).

Tabela 9: Prekrivanje rezultatov pozitivne selekcije in testov ELISA za GFV, grupiranje po pozitivni selekciji.

ocena v pozitivni selekciji	število testov z reakcijo na GFV				skupaj trsov
	E-	%	E+	(%)	
P+ (dobri trsi)	58		12	(17%)*	70
P- (slabi trsi)	29**	(41%)	41		70
skupaj trsov	87	(61%)	53	(38%)	140

\* kritična skupina trt (P+ E+) pri katerih zaradi dobrega pridelka jemljemo cepiče, ob tem pa prenašamo latentne okužbe z GFV

\*\* Skupina (P- E-) je sicer brez GFV okužb, vendar je ne razmnožujemo naprej, ker je proizvodno slaba (majhni pridelki, slabši tip grozda, preobčutljivost za sušo, za gnilobo). Visok odstotek te skupine znotraj slabih trsov kaže na nizko selekcijsko stopnjo obravnavanega materiala.

#### 3.2.2 Zastopanost posameznih znakov kužne izrojenosti v E+ in E- skupini

Pri bolezni kužne izrojenosti se pokažejo na trti zelo različni znaki, ki so specifični odgovor rastline na določen virus v danem okolju. Podrobnosti interakcije teh treh elementov bi pojasnile marsikaj o odpornosti, maskiranosti ali latentnosti bolezni po sortah, tipih, ipd. Pri rebuli smo razčlenili kompleks znakov, potem ko smo z ELISA testom grupirali trte v dve skupini brez okužbe (E<sup>-</sup>), z okužbo (E<sup>+</sup>), tab. 10.

Tabela 10: Zastopanost posameznih znakov bolezni kužna izrojenost v E+ in E- skupini, rebula, Ampelografski vrt, 1983-1986

GFV okužba	št trsov z znaki					Σ
	brez znakov	dislocirana vitica*	deformacije lesa	osipanje	trs brez grozdja	
E+	3	2	15	18	15	53
E-	6	22	23	7	0	58

\* samo ta znak

Posebnosti, ki smo jih opazili so naslednje:

- pri trsah rebule z GFV okužbo nikoli ne najdemo petersiljavosti listov, tako tipične pri nekaterih drugih sortah npr. malvaziji.
- okužbe ne zavirajo rasti ("Reisigkrankheit") celo nasprotno, pri trsah s popolnoma osipanimi grozdi ("nora" rebula) je zaradi izostanka depresijskega vpliva pridelka, rast še bujnejša.
- zelo veliko je primerov premaknjene (dislocirane) vitice in manjših deformacij lesa (krajši medčlenki), ki niso povezane z GFV okužbo ugotovljeno z ELISA testom.

### 3.2.3 Razlike v pridelku med selekcijskimi skupinami

Pridelek selekcijskega vinograda v Ampelografskem vrtu v letu 1982 je bil 6.800 kg ali 6.5 kg/trs in v letu 1983 5200 kg ali 5 kg/trs. V letih 1984 in 1985 je bil vinograd močno poškodovan od toče. V skupinah 70 P+ in 70 P- smo testirali razliko v pridelku po trsu (priloga 1b, 1c):

Xp+ 531,95	Xp+ 7.60 kg/trs
Xp- 268,70	Xp- 3.84 kg/trs
d = 3.08	s2 = 0.50
t = 26.5	sd = 0.092

Razlika v pridelku je statistično značilna. Znotraj skupin je opaziti veliko variabilnost, ki ni posledica zdravstvenega stanja in je težko izbrati vzorčne skupine. To variabilnost pripisujemo nizki selekcijski stopnji in neuspešnemu ugotavljanju zdravstvenega stanja trt.

Poleg tega smo izračunali povprečne vrednosti ostalih elementov rodnosti po skupinah pozitivne selekcije in ELISA testov, tab 11.

Tabela 11: Povprečne vrednosti treh elementov rodnosti (za n st.trsov v skupini), rebula Ampelografski vrt, 1983

element rodnosti	selekcijske skupine			
	P+ n=70	P- n=70 (59)*	P+E+ n=12	P+E- n=58
1. pridelek (kg/trs)	7.51	4.50*	6.80	7.90
2. teža 1 grozda (g)	182	145	189	179
3. štev.grozdov/trs	46.5	31.5	37.4	49.8

\* niso vštete VBG trte

### 3.2.4 Primerjava rezultatov biotestov in testov ELISA za GFV

Pri 25 trsih preverjenih po vseh treh metodah smo dobili 15 negativnih, osem pozitivnih in dve sumljivi reakciji, tab. 12.

Zaradi enostavnosti prenosa GFV s sokom trte na zeljaste rastline smo vsako leto vzporedno z indeksiranjem in ELISA testi uporabili te prenose kot prvi izločilni test.

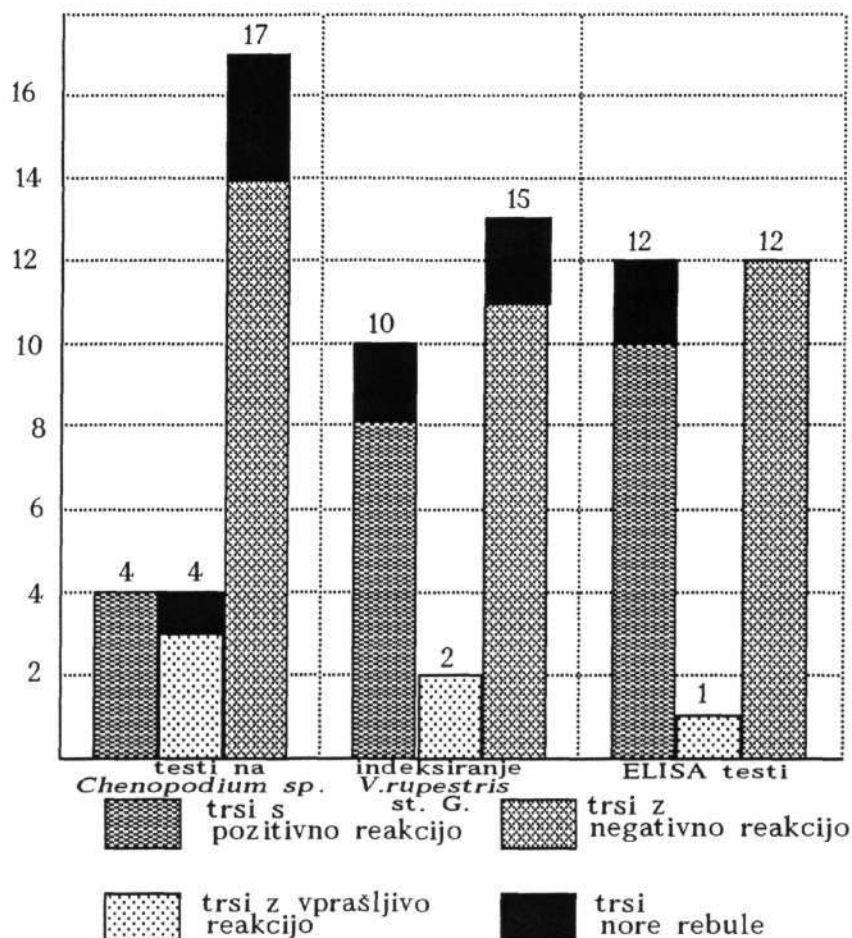
Testi na *Chenopodium spp.*, so dali še slabše rezultate kot indeksiranje. Od 12 E<sup>+</sup> trsov so pozitivno reagirali le štirje, pri dveh smo dobili negativne in pozitivne, torej vprašljive rezultate, ostalih šestih GFV okužb pa s tem testom nismo izsledili.

Nobena od trt brez grozdja ni dala reakcije na zeljastih rastlinah, zato smo krog testov v l. 1986 razširili še na *Nicotiana tabacum* var. Samsun, *Phaseolus vulgaris* (Top Crop) in *Vigna sinensis* (Midget). Za 10 trsov z GFV (E<sup>+</sup>) reakcijo nismo nikjer dobili znakov.

Tabela 12: Primerjava rezultatov biotestov in ELISA testov za GFV pri cv. 'rebula', Ampelografski vrt (1983 - 1985) za 25 trsov in njihove povprečne ocene v pozitivni selekciji (P)

Zap. st.	trs	P vrednosti	testi na zeljastih rastlinah	indeksiranje na <i>Vitis rupestris</i> St. George	ELISA za GFV
1.	1.15	4.4	-	-	--
2.	1.18	2.8	-	-	-
3.	1.40	2.4	--	+	+
4.	2.11	3.2	++	++	+
5.	2.13	3.2	-	--	-
6.	2.15	1.8	-	-	-
7.	2.19	1.8	--	-	-
8.	2.22	2.8	+-	-	-
9.	2.28	1.4	--	+	+
10.	3.5 *	1.2	--	-	+
11.	3.8 *	1.2	++	-	+
12.	3.16	2.2	--	-	-
13.	3.18	4.2	-	--	-
14.	3.31	3.4	-	-	-
15.	3.42*	1.0	--	-	+
16.	3.65	2.4	--	-	-
17.	3.66	2.4	+-	+	+
18.	3.80	2.2	++	++	+
19.	3.81	2.4	-	++	+
20.	4.38	1.6	+	+-	+
21.	5.20	1.2	-	-	-
22.	5.21	1.6	+	++	+
23.	5.35	3.4	-	-	-
24.	6.9	2.2	+	+-	+
25.	7.39*	1.1	-	+	+

\* "nora rebula" - VBG



Graf 4: Primerjava biotestov in ELISA testov za odkrivanje GFV, rebula, Ampelografski vrt (1983 - 1986), reakcije po P skupinah

### 3.2.5 Ugotavljanje in vrednotenje tipov cv. 'rebula'

Že Vertovc (91) je opisal več tipov rebule, po naših pregledih in meritvah ločimo naslednje tipe:

- A rumena rebula (zeleni, kvalitetni tip)
- B zelena rebula (masovni tip s slabšo kvaliteto)
- C zelena osipka (slaba po količini in kakovosti)
- Č rumena osipka (z zelo malo pridelka, visoki sladkorji)
- D nora rebula (nerodna, bujne rasti, moški cvet) - VBG

Podatki o količini in kvaliteti pridelkov, tab. 13, kažejo, da ima tip A količinsko pridelok nad povprečjem in vendar visoke sladkorne stopnje. Variabilnost med leti in med trsi je najmanjša. V sušnih letih 1983 in 1988 grozdje tega tipa ni venelo. Tip spoznamo po valjasto-kopastem grozdu z enako velikimi rumenimi jagodami, brez drobnih slabo oplojenih, zelenih jagod (sl. 2).

Zeleni tip (B) ima velik piramidalen grozd, često z močnim prigrzdom. Jagode so zeleno-rumene barve, v konici grozda često drobnejše, manjše nedozorele jagode je najti tudi v ostalih delih grozda. Ob suši grozdje vene in ne dozori. V pozitivni množični selekciji ta tip dobiva visoke ocene, ker največ rodi.

Tabela 13: Podatki o pridelkih pri različnih tipih rebule, Ampelografski vrt, 1988

zap. št.	trta	pridelki po trsu			kakovost pridelka			tip
		štev. grozdov	teža povp. grozda (g)	pridelek (kg)	teža (g) 100 jagod	sladkor Oe	skupne kisl.(g/l)	
-1	1.15	38	195	7.40	197	65	10.9	B
-2	1.18	31	123	3.80	180	84	13.2	?
3	1.20	22	207	4.55	164	72	10.9	C
4	1.32	30	238	7.15	277	66	11.4	?
5	1.61	33	200	6.60	240	75	9.3	A
6	2.5	10	160	1.60	229	73	11.4	C-Č
7	2.26	29	219	6.35	259	75	7.6	A
8	2.34	32	150	4.80	215	65	11.1	B-C
9	2.43	38	292	11.1	240	74	11.3	A
10	2.74	41	207	8.50	258	70	10.8	A-B
11	3.4	44	197	8.70	194	69	10.3	B
12	3.18	47	200	9.40	239	73	10.2	A
13	3.22	35	200	7.00	240	74	9.7	A
14	3.31	10	130	1.30	308	83	9.3	Č
15	3.56	39	141	5.50	216	71	10.4	B-C
16	3.72	15	147	2.20	247	73	10.0	Č
17	3.80	22	157	3.45	199	61	10.7	C
18	3.81	41	176	7.20	219	73	9.6	A-B
19	4.27	41	222	9.10	216	66	11.8	B
20	4.35	10	120	1.20	307	80	8.8	Č
21	4.52	28	159	4.45	260	74	10.7	C-Č

Trgatev je bila 21. septembra

Tip zelene osipke (C) je po obliki grozda podoben prejšnjemu, vendar je manjši in ima več drobnih nedozorelih jagod. Stopnja osipanja je iz leta v leto različna pri istem trsu.

Rumena osipka (Č) ima v grozdu le nekaj debelih rumenih jagod z visoko stopnjo sladkorja, ostale jagode so drobne ali kmalu po oplodnji odpadejo, pridelki po trsu redko presežejo 2 kg.

Tip nore rebule (D) smo opazovali zaradi hipoteze, da je popolna nerodnost povezana z okužbo z GFV. Druga predpostavka je, da gre za kombinacijo klonske linije, ki ima obenem z gensko "napako" (moški tip cveta) še okužbo GFV. Ker trsi niso rodni, smo jih ovrednotili le po cvetu in prirastu lesa.

Ob cvetenju ima nora rebula normalno razvita socvetja, kabrnike. V letu 1985 sem našla pri 10 trsih tega tipa povprečno 22 socvetij na trs, pri tipu A pa 18.

Povprečna dolžina socvetja je bila pri nori rebuli 7,9 cm pri rumeni rebuli pa 11 cm. Kapice odpadajo od 3 do 9 dni kasneje kot pri ostalih tipih ali pa sploh ne odpadejo in porjavijo. Pri natančnem pregledu socvetij sem opazila, da je ženski del cveta deformiran ali zakrnel v različnih stopnjah in obsegu, čemur tudi sledi različna stopnja osipanja in izpada pridelka. Na isti trti se pojavijo lahko tudi grozdi z nekaj jagodami. Prehodne oblike deformacij so:

- zakrnela, razklana ali bradavičasta brazda,
- plodnica brez brazde in delno zakrnel vrat plodnice,
- samo ostanki zakrnele, bradavičaste plodnice (sl. 3).

Prašniki so normalno razviti, pelod preverjen v letu 1985 za 15 trsov je bil normalno kaljiv v primerjavi s pelodom ostalih tipov. Trsi so zelo bujni z močnimi rozgami. Povprečna teža porezanega lesa na trs pri obremenitvi 30 očes je 6,8 kg, pri elitnih trsih pa le 4,20 kg. Večina cepičev nore rebule preseže zgornjo določeno mejo debeline, to je 12 mm.

V selekcijskem vinogradu Ampelografskega vrta je med 800 pregledanimi trsi 26 trsov tega tipa (3.2%). Med 15 trsi testiranimi na GFV jih je 14 dalo jasno E+ reakcijo v dveh ali treh ponovitvah, en trs je dal sumljivo (+ in -) reakcijo. V ostalih selekcijskih vinogradih je tega tipa nekoliko manj.

### 3.3. ODKRIVANJE GFV V MATERIALU KLONSKE SELEKCIJE, STARIH SORT IN PRI VZORČENJU V TRSNICI - ELISA TEST

V selekcijskem vinogradu Krško smo testirali klone - kandidate. Od šestih trsov zametovke (dva klona 12/6 na SO4 in štirje kloni 3/4 na 5C) ni nobeden dal pozitivne reakcije, trta (KV 47) z osipanimi grozdi iz standardne populacije pa je pokazala GFV okuzbo. V šestih letih ni bilo reinfekcije. Tudi štirje trsi laškega rizlinga kl. 178 so se pokazali zdravi glede na GFV - ELISA test.

Med cepiči rebule (Rb 1V-5V) iz matičnih vinogradov (Preserje, Zalošče) je dal pozitivno reakcijo na GFV 1 snop, dva vzorca sta bila sumljiva in dva negativna. Pri taki okuženosti je premalo sondiranje 10 rozg/snop. Vzorec trte z značilnimi enacijami na sprednji strani lista je reagiral pozitivno na GFV.

Pri cv. 'beli pinot' (matični vinograd Preserje) smo pri 22 vzorcih (11 snopov cepičev) odkrili 2 E<sup>+</sup> vzorca za GFV. V primeru pridelave bi retestirali dva snopa (a 50 rozg), to je 100 vzorcev, skupaj 122 vzorcev namesto 550 potrebnih pri nesondiranem vzorcu.

V edinem matičnem vinogradu cv. 'zelen' (Slap pri Vipavi) sem med 63 testiranimi vzorci našla mnogo manj GFVokužb kot je bilo pričakovati glede na pogosto osipanje grozdja. Med 54 P<sup>+</sup> vzorci sta dva dala pozitivno reakcijo na GFV, med 9 P<sup>-</sup> trsi z močno osipanimi grozdi pa je bil en trs z GFV ELISA pozitivno reakcijo. Pozitivna selekcija tu ni način za odkrivanje GFV, ampak za genetsko slabe trse.

Pri podlagah iz certificiranega materiala (420 A, SO4, K 5BB, Ampelografski vrt, Bazni matičnjak - Titograd) nisem našla okužb GFV, torej po 10 letih ni bilo reinfekcije preko tal, čeprav so bile v bližnjem vinogradu najdene nematode prenašalke GFV (46).

Pri podlagah vzorčenih v trsnici (tab. 6, graf 2) ob najbolj kritični postavitvi ločnice E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup> dobimo od skupno 46 vzorcev en GFV - ELISA pozitiven vzorec (3309C-1c). V primeru, da predvidevamo ob sondiranju razredčitev virusa, ki ni več detektibilna z ELISA testom, ponovimo test za več vzorcev npr. za OD vrednosti od 0,348 do 0,242..

Med starimi neselekcioniranimi sortami (genska banka) sem pri 22 vzorcih našla 15 GFV - ELISA pozitivnih, kar je najvšji odstotek od vseh testiranih skupin. Vedno so te okužbe povezane s slabim pridelkom, predvsem z osipanimi ali drobno zrnatimi grozdi ali križasto jagodo. Pri vitovski grganji sem pri okuženih trsih poleg križaste jagode našla v cvetu podobno zakrnelo plodnico kot pri trsih nore rebule.

### 3.4 ODKRIVANJE ArMV Z ELISA TESTOM

Zaradi možnosti latentnih okužb z virusom mozaika Arabis-a (ArMV) in zaradi njegove potencialne vloge v sinergističnem delovanju z GFV ali z drugimi virusi sem opravila dve seriji testov na oba virusa (serija 9). Za rebulo so prikazani rezultati zbirno pod serijo 9 (priloga 1).

V prvem testiranju rebule na ArMV sem le v enem primeru odkrila oba virusa. Prekrivanje okužb je v tab. 14.

Tabela 14: Mešane okužbe z GFV in ArMV pri cv. rebula, Ampelografski vrt, 1985, ELISA test

ArMV	GFV	število trsov z reakcijo			skupaj
		+	-	+ -	
+		1	0	1	2
-		24	30	3	57
+ -		2	7	3	12
skupaj		27	37	7	71

Drugič v letu 1986 sem ponovila test na ArMV pri 29 trsih, vendar sta od 2 trsov, ki sta prej reagirala pozitivno na ArMV, oba dala negativno reakcijo. Tudi na novo odkritih okužb ni bilo.

Pri 59 testiranih trsih cv. 'zelen' sem našla 2 pozitivni reakciji na ArMV, trsa nista nosila GFV okužb. Za pozitivno kontrolo sem imela le okuženi material hmelja, odčitavanja so bila le vizuelna.



### 3.5 UGOTAVLJANJE BOLEZNI RAZBRAZDANJA LESA (GSP) IN ZVIJANJA LISTOV (GLR)

Omenjeni bolezn nastopata v kompleksu, ki se ni povsem razjasnjen in so prikazani rezultati le prva stopnja v iskanju povezav in vzrokov zanju.

#### 3.5.1 Znaki in obseg bolezn pri cv. 'refošk' - morfološka selekcija

V selekcijskem vinogradu Sveto (Komen) sem med 960 pregledanimi trsi cv. 'refošk' našla 18 takih z znaki razbrazdanja. Tipičnega zvijanja listov ni bilo, veliko je trsov s predčasnim rdečenjem. V pregledu zdravstvene selekcije sem ločila tri različice obarvanja:

- listna površina predčasno rdeči, pas ob žilah ostane zelen, list naguban in krhek,
- listi so predčasno svetlo do bakreno rdeči po vsej površini,
- listi postanejo predčasno temno rdeči po vsej površini.

Pri razbrazdanih trsih gre predvsem za globoko zlebičavost ali jamničavost na podlagi (verjetno K5BB), redkeje na zlahtnem delu trte.

V selekcijskem vinogradu Tomaj, kjer je cv. 'refošk' sajen na različnih podlagah, sem ugotovila veliko število prizadetih trsov, vendar v odstotkih najmanj pri podlagi K5BB, tab. 15.

Tabela 15: Trsi z znaki razbrazdanja, cv. 'refošk' Tomaj (Vodopivec M.), 1985-1988 po podlagah.

podlaga	št. pregledanih trsov skupaj	št trsov z znaki razbrazdanja			Σ	%
		na podlagi	zgoraj	oboje		
K 5BB	310	15	1	0	16	5
Rupestris du Lot	82	22	7	1	30	37
SO 4	27	7	4	0	11	40
420 A	83	19	10	2	31	37
<b>Skupaj</b>	<b>502</b>	<b>63</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>88</b>	<b>17.5</b>

V mladem vinogradu v Tomaju (Škrlj), ki je v l. 1979 imel 19% propadlih trsov, se je do leta 1984 propadanje ustavilo. Na 18 trsih indikatorjev, ki smo jih leta 1981 v tem vinogradu podsadili nisem opazila zadebelitve mladik, le na enem trsu LN 33 sem opazila rahlo rdečenje listov. V letu 1983 je lastnik prazna mesta in indikatorje podsadil z drugo sorto, tako da nadaljne spremljanje ni bilo možno. Pri pregledu istega vinograda v letu 1988 sem med 1200 trsi našla 204 take z znaki razbrazdanja, kar je 17%, skoraj enako kot pred 10 leti.

Od znanih znakov bolezni GLR lahko pri cv. 'refošk' opazimo le predčasno rdečenje. Listi se ne uvijajo. Našli nismo nobenih zvez med pogostostjo znakov razbrazdanja in predčasnega rdečenja listov.

### 3.5.2 Povezave GSP z boleznijo kužne izrojenosti - GFV

V seriji 1 sem opravila ELISA test na GFV za devet trsov cv. 'refošk', ki so imeli v vinogradu znake razbrazdanja, noben trs ni dal pozitivne reakcije. Dva trsa z močno osipanimi grozdi in peteršiljastimi listi sta reagirala na GFV pozitivno. Vse trse, ki so bili v ELISA testu na GLRaV tipe, smo testirali tudi na GFV. Spet med razbrazdanimi trsi ni bilo okužb z GFV. V petih ponovitvah teh testov sem dobila enake rezultate.

Za razliko od rebule so GFV pozitivni trsi cv. 'refošk' prizadeti v rasti, zato so lahko obremenjeni le z dvema šparonoma in jih ponavadi iz razmnoževanja izloči že pravilno opravljena množična pozitivna selekcija. Pogosto se kot znak GFV pojavijo tudi peteršiljasti listi.

### 3.5.3 Znaki in obseg bolezni pri cv. zametovka - morfološka selekcija

Znaki GLR, predvsem predčasno rdečenje listov, so bili znani pri tej sorti v tolikšni meri, da smo predvideli, da gre za popolno okuženost kultivarja in za indikatorske sposobnosti zametovke (52). Sorta se odlikuje po neenakomernem dozorevanju in zelenih jagodah v dozorelem grozdu.

Sl. 10

V selekcijskem vinogradu Stara vas (Šentjernej) je med 440 trsi težko najti v času trgatve takega brez obarvanih listov. Obžilni pas je vedno zelen, listi se delno uvihavajo navzdol.

Sl. 11

Razbrazdanje se pojavi na podlagi, večkrat v obliki drobnih povezanih vdolbinic na lesu. Marsikdaj je skorja gobasta in težko ločljiva. Med 440 trsi je bilo 87 trsov (20%) s temi znaki.

### 3.5.4 Indeksiranje na GSP in GLR bolezni

Obseg in rezultati indeksiranja v letih 1984 - 1988 so v tab. 16. Število indikatorjev z znaki smo dobili po treh letih opazovanja.

Iz rezultatov je razvidno, da imamo pri obravnavanih trsih zelo kompleksno sliko bolezni razbrazdanja lesa in zvijanja listov. Rezultati morfološke selekcije se ne ujemajo s sliko GSP - GLR kompleksa kot jo dobimo po diferencialnem indeksiranju.

Uspeh cepljenja (cca 20%) je prenizek, da bi pri majhnem številu nacepljenih indikatorjev lahko postavili zanesljivo diagnozo bolezni. Vendar je bilo pri večini trsov s hujsimi znaki bolezni (zametovka) težko narezati več kot 15 cepičev/trs, ter so prikazani rezultati iz dveh ali treh let zapored.

Pri indikatorju *Rupestris St. George* je bilo cepljenje bolj uspešno tudi zato, ker ima sposobnost močnega odganjanja speci h stranskih očes in se mnogo boljše obnese pri cepljenju kandidat/indikator. Pri ostalih dveh indikatorjih spodnja očesa ob siljenju pogosteje propadejo.

Tabela 16: Zbirni rezultati indeksiranja na GLR - GSP kompleks za refošk in zametovko, 1984-1988

Zap. št.	Trs oznaka	Morf selekc	indikator						
			Rupestris		LN33		V. vinifera		bolezni (Martelli)
			A	B	A	B	A	B	
1	ref 3.2(Škrlj)	GSP	5/3	3	5/2	0	-	-	Rup-SP
2	3.47	" GSP	10/2	1	5/0	0	5/1	1	Rup-SP+GLR
3	4.17	0	15/0	0	5/0	0	5/0	0	neuspelo
4	4.35	0	10/4	0	10/1	0	5/1	0	0
5	ref 7.35(sel.)	GSP+GLR	8/3	3	5/2	2	8/2	0	Rup-SP+CB
6	7.41	GLR	10/2	0	5/1	1	-	-	CB
7	8.78		8/4	0	10/2	0	-	-	0
8	8.80	GSP+GLR?)	10/2	0	5/1	1	-	-	CB
9	8.81	0	6/3	0	3/1	0	6/0	0	0
10	ref 11/11	Tomaj 0	10/2	2	5/2	1	-	-	Rup-SP+CB
11	11/24	0	10/4	0	4/1	0	4/1	0	0
12	14/41	0	10/5	0	15/1	0	4/2	0	0
13	ref 2.10A.vrt	GSP	16/3	2	-	-	-	-	Rup - SP
14	ref 51	Tomaj GLR	18/2	0	-	-	-	-	0
15	52	GSP	10/2	2	5/0	0	5/1	1	Rup-SP+GLR
16	zam 7.26	GSP+GLR	15/2	0	5/1	0	6/2	2	GLR
17	7.17	GSP+(GLR?)	/1	1	5/2	0	5/0	0	Rup-SP
18	6,21	GSP+GLR	5/2	2	5/0	0	3/0	0	Rup-SP
19	6.17	GSP+GLR	4/1	0	5/2	0	5/0	0	0
20	6.23	GLR	4/0	0	15/1	0	3/0	0	0
Skupaj uspeh cepljenja			189/47		117/20		64/10		
			(25%)		(17%)		(16%)		

legenda: A: št. cepljenih indikatorjev/st. uspešnih cepljenj

B: št. indikatorjev z znaki okužbe

O: ni znakov (ni definirane bolezni) - zdrav

-: ni bilo cepljeno

Pri indikatorju LN 33 sem vedno opazila le rdečenje listov, nikoli pa zadebelitve mladic, ki so omenjene kot značilnost bolezni plutavosti lubja (CB).

Rezultati so orientacijski predvsem za GLR in CB, manjka indeksiranje za razbrazdanje tipa Kober, pri oznaki GLR v morfološki selekciji gre za rdečenje listov z zelenim obzilnim pasom.

## 3.6 ODKRIVANJE CLOSTEROVIRUSOV Z ELISA TESTOM

Od razpoložljivih serumov je bil sele v letu 1988 nam prvič na razpolago serum za GLRaV tip I. V letu 1987 smo nekaj vzorcev za testiranje poslali dr. Gugerliju (Ny on, Švica), tab. 17 (osebna informacija). Njegove rezultate sem uporabila kot referenco za lastna testiranja v letu 1988-89.

Tabela 17: Rezultati ELISA testov za liste trt z znaki zvijanja in rdečenja - GLR in z znaki razbrazdanja lesa GSP (Gugerli, 1987 os. inform.)

Zap. st.	Sorta, trs, lokacija	vizuelna ocena		OD vrednosti		
		GLR	GSP	GLRaV	GLRaV	GVA
				tip I	tip III	
1.	Pagadebiti A. vrt	+	-	149	148	150
				140	138	139
2.	Refošk 7.35 Komen	?	+	130	151	165
				-	-	167
3.	Refošk 7.41 "	+	-	130	150	148
				-	135	150
4.	Refošk 8.78 "	?	-	140	143	150
				138	146	147
5.	Refošk 8.80 "	?	+	138	153	144
				138	147	143
6.	Refošk 8.81 "	-	-	139	142	140
				137	143	145
7.	Sladkočrn 10 Lože	-	-		1470	147
					1457)+	146
8.	Glera 3.9 "	+	-	141	148	148
				140	151	149
9.	Žametovka 6.17 Stara vas	+	+	639	147	147
				749)+	141	141
10.	Žametovka 6.21 "	?	+	719	145	144
				741)+	149	149
11.	Žametovka 6.23 "	+	-	143	1523)+	159
				135	1543)+	159
12.	Žametovka 7.17 "	?	+	327	146	147
				225)+	150	138
13.	Žametovka 7.18 "	+	?	530	547	147
				649)+	620	138
14.	Žametovka 7.26 "	+	+	293	146	107
				301)+	145	171
15.	Negativna kontrola			135	166	174
				141	162	184
16.	Pozitivna kontrola			800	2000	743
				794)+	2000)+	774)+

Na GLRaV-I so reagirali vsi trsi zametovke z značilnim rdečenjem listov, ne pa beli sorti glera in pagadebiti z močno zvitimi listi. Trs 6.23 kljub močnemu rdečenju ni reagiral na serum tipa I, ampak na tip III. Trsa 7.17 in 7.26, ki sta

dala po Gugerliju negativno reakcijo na tip I, vendar sta imela visoko OD ( $> 2 \times$  OD negativne kontrole), sta dala na isti serum pozitivno reakcijo pri ponovitvi testa v letu 1988.

Nobeden od refoškov z močnim rdečenjem ni dal reakcije na GLRaV-I ali III v letu 1987.

V letih 1987-88 sem poslala na testiranje nekaj listnih vzorcev refoškov z močnim razbrazdanjem lesa in vsi so dali pozitivno reakcijo na GLRaV-tip I (Gugerli - osebna inf.).

Enega od teh trsov (Ref 52 Tomaj) sem zato kasneje v testih uporabila kot K<sup>+</sup>, tab. 18.

V letu 1988 sem testirala vzorce refoška in zametovke na GLRaV-I (4 plošče), vendar nisem dobila nikakršnih reakcij. Zadnji odčitki so bili 90 minut po dodajanju enzimskega substrata.

V letu 1990 sem teste ponovila, reakcije so se pokazale šele naslednji dan (cca 12 ur po dodajanju enzimskega substrata). Rezultati teh testov z referenčnimi podatki testiranja za nekatere trse so v tab. 18. Poleg standardnih listnih ekstraktov smo testirali še zmrznjene liste, les in jagode.

Tabela 18: Rezultati ELISA za GLRaV tip I. (zametovka, laški rizling, refošk), 1989, po velikosti odčitka

Zap. št.	trs/oznaka	OD odčitek	referenca (Gugerli, 1987, 1988)		
			GLRaV-I	GLRaV-II	GLRaV-III
1	Ref 15/11 Tomaj selekc.	834			
2	M. pinot A.v. 2.5	685			
3	Ref 52 Tomaj	544	+	?	-
4	Ref 52 Tomaj (K <sup>+</sup> )	430	+		
5	Ž. čr. 42 Krško	379			a
6	Ref 12/42 Tomaj selekc.	354			
7	Ž. čr. 7.26 Stara vas	346	-+	+	-
8	Ref 16/2 Tomaj selekc.	342			
9	Ref 53 Tomaj	327			
10	Ž. čr. 7.16 Stara vas	290			
11	Ž. čr. 6.21 Stara vas	288	++	-	-
12	Ž. čr. 46 Krško	279			
13	Ž. čr. 39 Krško, klon	264			
14	Ž. čr. 7.17 Stara vas	255	-+		b
15	Ž. čr. 43 Krško, klon	251			
16	Ž. čr. 7.26 les	244			
17	Ž. čr. 6.17 Stara vas	236	++		
18	Ž. čr. MB - Zafošnik	183			
19	Ž. čr. 7.26 zmrz. list	183	+		
20	Ž. čr. 6.23 Stara vas (K <sup>-</sup> )	175	-		
21	Ž. čr. 6.23 Stara vas	181	-		+
22	L. rizling 27 Krško	174			
23	" 29 "	171			
24	" 36 grozdje	169			
25	" 36 " les	168			
26	Mlvz 2.20	167			
27	Neoplanta 1 A.v.	165			
28	Ref A.v. 1.7	164			
29	L. rizling 30 Krško	163			
30	L. rizling 36 Krško	156			
31	Ref 11/24 Tomaj selekc.	154			
32	Rebula 5.14 A.v - elita	153			
33	L. rizling 29 Krško - les	152			
34	Zweigelt 112 Krško	152	-	+	-
35	Ref 3.11 A.v.	151			
36	Ž. čr. 42 Krško - les	150			
37	Mlvz 2.9	149			
38	Ref A.v. 2.10	148			
39	Ref 20 Tomaj	147			
40	L. rizling 32 Krško	147			
41	Rebula 5.14 A.v. - les	146			
42	Rebula 5.7 A.v. - VBG	144			
43	Ž. čr. 6.17 zmrznjen list	143			
44	Mlvz 2.9 zmrznjen list	141			
45	Ref 14/41 Tomaj selekc.	140			
46	Ref 3.11 A.v. - les	139			
47	Ref 51 Tomaj	138			
48	Ekstrakcijski pufer	138			

Iz razporeditve OD odčitkov po velikosti (tab. 18) se vidi, da je  $K^+$  vzorec (Ref 52 Tomaj) v obeh ponovitvah dal visoke vrednosti. Vzorec  $K^-$  ima ponovitev v vzorcu Ž.čr. 6.23 in oba vzorca sta dala skoraj enaka odčitka.

V grobem sem mejo med  $E^+$  in  $E^-$  vzorci določila z  $2 \times OD$  za  $K^-$  ( $\approx 350$ ) ali z  $2 \times OD$  za pufer ( $\approx 276$ ). Vrednosti med tema dvema so sumljive do pozitivne.

Med refoški z znaki močnega razbrazdanja je poleg  $K^+$  v skupini sumljivih reagiral le še en trs (Ref 53 Tomaj), ostalih pet (Ref 51, 20, A. v. 1.7, 2.10, 3.11) pa ne.

Med petimi selekcijskimi trsi starega tipa refoška (Tomaj) so trije z visoko vrednostjo OD, eden celo z višjo kot je za  $K^+$ . Vsi trsi žametovke, ki so po Gugerliju dali pozitivno reakcijo na GLRaV tip I, so v zgornjem delu tabele, čeprav tudi med sumljivimi in negativnimi. Standardni listni ekstrakti iz svežih listov so dali mnogo višje vrednosti kot ekstrakti iz zmrznjenih listov, lesa ali grozdja.

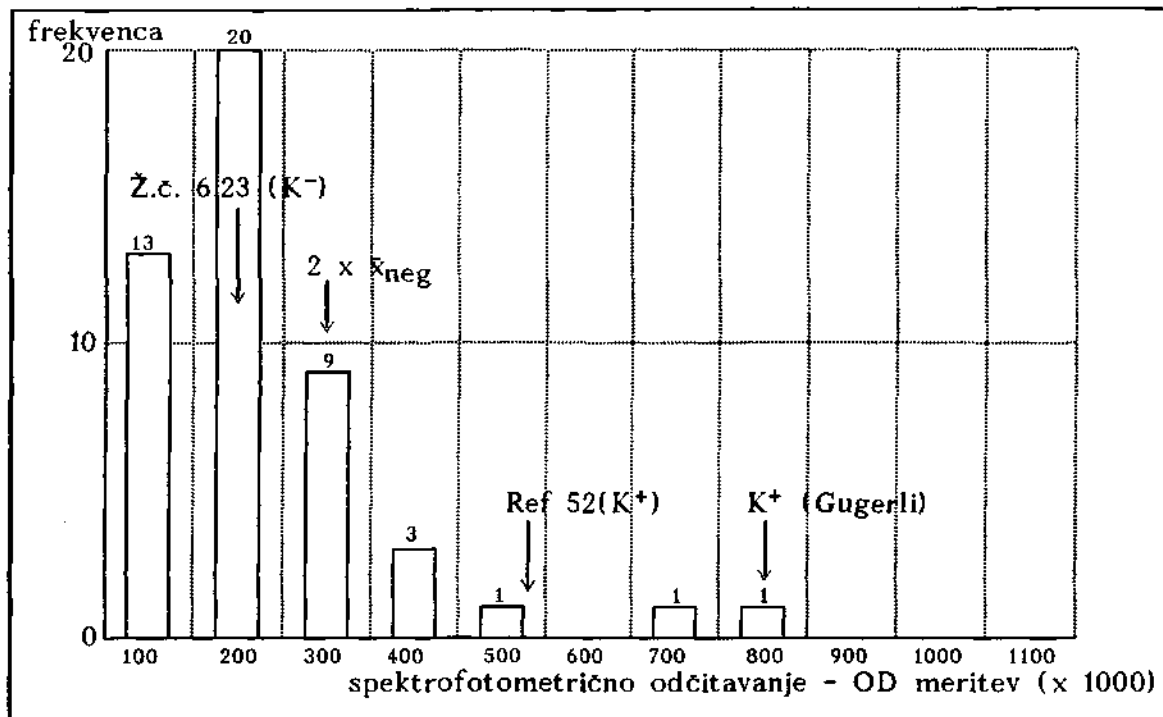
Vseh pet subklonov laškega rizlinga 178 je v negativni skupini. Dva klona žametovke, za katera je bil vzorec sestavljen iz listov petih trt v repetaciji (Ž.č. 39 in 43) sta dala višje vrednosti na meji s sumljivimi. Dva vzorca z močnim rdečenjem iz istega vinograda (Ž.č. 42, 46) sta v pozitivni oziroma sumljivi skupini.

Vzorec listov 400 let stare žametovke (zap. st. 18) iz Maribora je na negativni strani tabele, listi so v letu 1989 kazali predčasno rdečenje. Vzorec modrega pinota z močnim rdečenjem listov je dal OD vrednosti višje od  $K^+$ .

Vzorci rebule (nora) in malvazije z znano GFV okužbo niso reagirali na GLRaV tip I, kakor tudi ne elitni trs, ki je v l. 1989 kazal znake predčasnega rumenenja listov.

V grafu 5 je prikazana frekventna porazdelitev odčitkov ELISA za GLRaV tip I. Tudi tu imamo velik odklon negativnih vzorcev v desno, med njimi so napačno pozitivni ali napačno negativni vzorci.

Visoke in različne nespecifične reakcije (background) med vzorci različnega izvora ali sort ter dolga inkubacijska doba (12 ur) otežujejo postavitve jasne meje  $E^+/E^-$ . Devet vzorcev iz razreda OD 0.250 - 0.350 in mejne vzorce je treba ponovno testirati.



Graf 5: Histogram rezultatov ELISA za GLRaV tip I., 48 vzorcev (zametovka, l. rizling, refošk), 1989, tab 18





#### 4.1 UPORABNOST IN REZULTATI ENZIMSKO-IMUNSKEGA TESTA (ELISA)

ELISA test sem uspešno uporabila za odkrivanje okužb z virusom pahljačavosti listov vinske trte (GFV), ki je v pregledanih vinogradih glavni povzročitelj boleznih kužne izrojenosti.

Tehnično test ni zahteven, nekatere časovno zamudne operacije (priprava vzorca, pranje plošč) se z avtomatizacijo postopka lahko skrajšajo, s čimer je možno povečati obseg dela in število vzorcev v seriji. V literaturi je dosti razprav na temo kdaj in katere vrste materiala vzorčimo. Z različnim vzorčenjem smo potrdili mnenje večine avtorjev (9, 49, 50, 97), da so najprimernejši mladi zgornji lističi ob cvetenju. Bovery s sod. (9) je pri vzorčenju junij - sept. ugotovil padec OD vrednosti od 1.930 ( $\lambda=405$  nm) na 0,560 oz. v odstotku odkritih okužb od 100% na 86%, kar je večji padec, kot smo ga opazili pri našem jesenskem vzorčenju. Zanimivo je, da so vrednosti za negativne kontrole pri vseh avtorjih zelo nizke, vendar tudi zelo različne od 0.00 do 0.150. Slabše rezultate smo dosegli s testiranjem rozg (lesa in floema), kar naj ne bi predstavljalo problema, ker je 3 mesečni optimalni termin za vzorčenje listov lahko podaljšati s siljenjem rozg od januarja naprej. Tehnične meje testa so drugje, predvsem pri odčitavanju in interpretaciji rezultatov.

Čeprav je vizuelno odčitavanje obarvanja plošč možno, je za rutinsko preverjanje zdravstvenega stanja potrebno spektrofotometrično odčitavanje, kjer se izognemo subjektivni napaki in kar je najbolj pomembno, rezultati so dokumentirani in primerljivi. Kot je predstavil Valat (90) organizacijo selekcije v Franciji, gre tudi pri podobnih rutinskih programih drugje za strokovno podprto in strogo nadzorovano delo, ki zahteva metodo kot je ELISA. Standardizacija postopka je pokazala, da moramo imeti tudi pogoste in stalne kontrolne vzorce, da je dobro grupirati vzorce na podlagi podobnosti materiala (ista sorta, starost listov, vrsta materiala). Z vsem tem moramo čimbolj zmanjšati skupino vzorcev s sumljivo zdravstveno sliko. Zanesljivost testa je bila v našem primeru od 92 - 85% in se je večala z vsakim nadaljnjim testom.

Kot je ugotovil Sutula s sod. (80), je med članki, ki obravnavajo uporabo ELISA, zelo malo takih, ki povedo, po kakšni metodi so bili interpretirani rezultati. Med pomembnejšimi navedenimi članki v tem delu le štirje od osmih povedo, da gre za izračun mejne vrednosti glede na 2x ali 3x vrednost negativne kontrole ali izračunane sd, kakor je predlagal Gugerli (37). Po Tijssen-u (89) je uporaba sd vrednosti nelogična, ker ne gre za normalno razporeditev vrednosti, kar je razvidno tudi iz grafov 1 in 2. Močni odklon negativnih vrednosti v desno (rep z napačno pozitivnimi ali napačno negativnimi vzorci) smo obravnavali kot skupino vzorcev, ki mora biti ponovno testirana. Kot je prikazal Sutula (80) na primeru selekcije - elit borovnic za TobRV, je razporeditev OD vrednosti zdravega materiala idealna, skoncentrirana ob najnižjih vrednostih. Podobno idealno bimodalno razporeditev smo mi dobili pri testiranju elitnih trsov

rebule (graf 3), kjer interpretacija rezultatov in postavitev E+/E- meje ni bila vprašljiva. Čeprav v primeru fitopatologije odločitve niso tako usodne kot v medicini, se strinjamo s trditvami Tijssen-a (89), da je treba postopek standardizirati, vzorce šifrirati in z enotnim postopkom interpretacije preprečiti napake ali zlorabo. V primerih testiranja močno okuženega ali skoraj čistega materiala je treba upoštevati, da se zaradi razlik v odstotkih okuženosti zelo spremeni DI (indeks detektibilnosti). Teoretsko izračunana zanesljivost pozitivnih vzorcev pri 2% okužbah (selekcija rebule) je 85%, pri 30% okužbah (genska banka starih sort) je 79%, mnogo manj je napačno pozitivnih. Zato je tudi priporočljivo vključevanje večje skupine kontrolnih vzorcev na vsaki plošči.

V primerjavi z ugotavljanjem bolezni zvijanja listov in razbrazdanja lesa smo z ELISA testi manj dosegli, vendar predvsem zaradi kompleksa bolezni, test je tu bolj občutljiv na nestandardizirano pripravo vzorcev, kar se vidi v visokem backgroundu (OD odčitki 0.200 za K-) in zabrisani meji E+/E-. Ker gre verjetno za sorodne, a ne homologne antigene, kot je za ameriške izolate closterovirusov ugotovil Zee s sod. (94), bo treba opraviti še več testov, ker glede na preliminarne rezultate gre pri naših trtah za mešane okužbe.

Z rezultati ELISA testov smo predvsem izpopolnili sliko okužb, pojavnih oblik in vpliva na pridelek pri cv. 'rebula'.

Odkrili smo kritično skupino trsov, ki glede na dobre proizvodne lastnosti ostane v prometu, vendar povzroči pravo akumulacijo virusa v dani populaciji. Kot komentira Campbell (12) je tako širjenje "neškodljivega" virusa potencialna nevarnost za nenadne izbruhe bolezni predvsem zaradi možnosti sprememb na relaciji gostitelj (trta) - virus - okolje in zaradi možnosti sinergističnega delovanja več virusov. Do tega pri trti hitro pride, ker imamo vedno duet podlaga/cepič in zaradi pri nas zelo obsežne in stalne introdukcije trsnega materiala. Pridružila bi se mnenju Goheen-a (32), da je treba sistematično in v največjem možnem obsegu testirati sadilni material ob najstrožji karanteni kot so to napravili v ZDA.

V primeru "nore" rebule, ki je popolnoma okužena z GFV, lahko postavimo dve predpostavki:

- okužba z GFV povzroči opisano deformacijo plodnice,
- tip z deformirano plodnico je genetski tip, ki pa obenem tudi ves nosi GFV okužbo.

Zanimivo je, da tudi pojav premaknjene vitice, ki po ELISA testu ne sovпада z okužbami GFV, kaže na to, kako v ampelografskih opisih ne znamo ločiti med genetsko in virološko pogojenimi lastnostmi. Še bolj izstopajoč je primer narezanosti lista in oblike listnih zobcev, ki sta med glavnimi ampelografskimi značilnostmi sorte, pa sta lahko tako pod udarom neke virusne okužbe (npr: malvazija - GFV).

Važna ugotovitev ELISA testov pri vzorčenju materiala v trsnici je, da je med podlagami manj GFV okužb kot med cepiči, kjer pa je daleč najvišji odstotek pri selekcijsko najnižji skupini materiala (genska banka).

Test na ArMV je odkril majhno oz. nepotrjeno vlogo tega virusa v boleznih kuzne izrojenosti, čeprav bi morali testirati več trsov in tudi več iz drugih krajev v Sloveniji, če je, kot trdi Martelli (56) virus prevladujoč v severni in centralni Evropi. Glede na širjenje cv. 'Kerner' v Sloveniji in njegovo občutljivost za ArMV v podlagi (28, 79), problem ni zanemarljiv.

Glede zdravstvene oz. etiološke slike kompleksa GLR - GSP se nismo dobili jasnih odgovorov. Razni avtorji (24, 25, 40, 54, 58, 69, 85, 94) so ugotovili povezavo več različnih clostero delcev, vendar v dokaj nasprotujočih si rezultatih. To me je navedlo na misel, da gre za posebnosti reakcije gostitelj - virus, možne sinergizme in veliko paleto v malenkostih različnih delcev. V naših avtohtonih cvs. z izrazitimi znaki GLR - GSP smo pri žametovki našli največ okužb z GLRaV-I., ki simptomatološko odgovarjajo tipičnemu zvijanju listov pri cv. 'modri pinot' (70). Pri cv. 'refošk' smo našli več tipov rdečenja, kot jih je opisal Legin s sod. (54), vendar ELISA testi niso bili pozitivni za GLRaV-I. Ta je bil pogosteje povezan z znaki razbrazdanja, vendar ne v taki meri kot GVA po Rosciglione-ju (70). Z dosedanjimi rezultati ne moremo potrditi njegove povezave med serološko reakcijo na GVA in pozitivnim indeksiranjem na Rupestris. Za preliminarne ELISA rezultate lahko povemo, da kažejo na mešane okužbe, da imamo malo primerov GVA, sortno značilne reakcije, vendar med njimi in rezultati morfološke selekcije ni logične povezave. Zanemarili smo opazovanje za boleznih plutavosti lubja in uporabili preozek krog indikatorjev, kar pa je vse tehnična omejitev. Zelo malo ali nič je znanega o populaciji možnih prenašalcev clostero-virusov v vinogradu pri nas (76). Vendar podobne raziskave presegajo okvir zastavljene teme.

## 4.2 USPEŠNOST METOD ZDRAVSTVENE SELEKCIJE

Zdravstvena slika vinogradov v Sloveniji je slaba, kljub temu, da že nekaj let opravljamo osnovno selekcijo. Po Huglin-u s sod. (47), Valat-u (90) in drugih je vključevanje zdravstvene selekcije v klonsko nuja, vendar le takrat, ko imamo opraviti z višjo stopnjo selekcije, drugače je obseg dela prevelik in rezultati preskromni. Pojavi pa se tudi druga dilema, da zaradi suma na virus izločimo pridelovalno vreden material (12, 44).

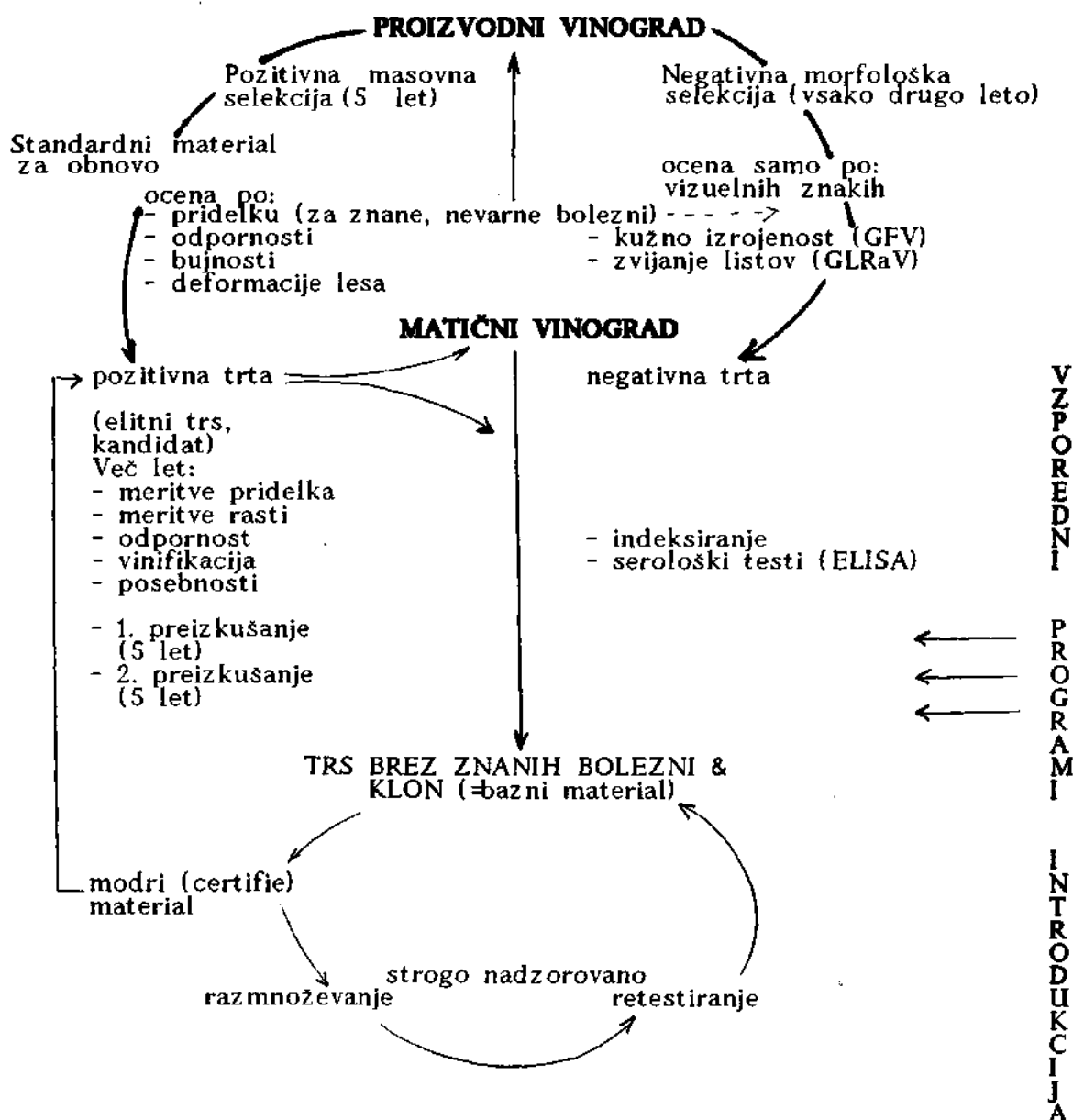
Iz primera rebule smo videli, da je pri morfološki selekciji prevelika možnost napačne odbire glede na zdravstveno stanje. Pri primerjavi GLR - GSP kompleksa se je morfološka selekcija pokazala kot popolnoma neuspešna, razen v primeru zametovke (Krško), kjer je klonski material nekoliko čistejši.

V primerjavi ELISA in zeljastih testov se pridružujemo mnenju več avtorjev, da prvi daleč prednjačijo sposobnost odkrivanja virusov (49, 64, 93). Indeksiranje, ki je nuja za ločevanje kompleksa GLR - GSP bolezni, Martelli (56), ima mnogo več tehničnih omejitev kot ELISA testi. Po Goheen-u (31) je prenos GSP uspešen le, če je v kombinaciji kandidat cepič okuliran na podlago Rupestris, zaradi česar so verjetno propadle naše kombinacije kandidat - podlaga cepljen s cepičem indikatorja v postopku suho/suho. Teh posebnosti pri indeksiranju GFV ne poznamo. Širok krog zahtevanih indikatorjev (60) in sicer osem za vsak vzorec zelo razširi obseg indeksiranja in zahteva mnogo večje materialno možnosti izvedbe programa (rastlinjak, deviška zemlja za indeksno trsnico, razpoložljivi indikatorji).

Vse našete in obravnavane metode odkrivanja virusov imajo svoje omejitve, vendar glede na zastavljen problem lahko med njimi izberemo ustrezno kombinacijo, če dobro poznamo osnovno virološko sliko populacije, ki jo testiramo.

#### 4.3 PROGRAM VKLJUČEVANJA ZDRAVSTVENE SELEKCIJE V SELEKCIJO VINSKE TRTE V SLOVENIJI

Selekcija vinske trte je v Sloveniji že vpeljana, čeprav nekatera razvojna obdobja niso bila naklonjena tovrstnim strokovnim nalogam. Vsi, ki danes v svetu govorijo o selekciji, govorijo tudi in v veliki meri o zdravstveni selekciji, ki je dobila posebno mesto tudi na obravnavi v naši najvišji mednarodni instituciji OIV (60). Čeprav je zastavljeni okvir teme na raziskovalni ravni, je rezultate možno vključiti v teoretične osnove za postavitve aplikativnega programa pridelave brezvirusnega trsnega sadilnega materiala. Shema je povzeta po lastnih izkušnjah dela v organizaciji selekcije v Sloveniji in po shemi, kot so jo predlagali Converse '17) in Goheen (32) za ZDA, Egger (21) in Martelli (56) za Italijo, ter Huglin (47) in Valat (90) za Francijo.



Izbira metod pri odkrivanju viroz vinske trte je bila odvisna od več predpostavk, ki so oblikovale zastavljeno temo.

Prva odločitev je bila glede na to, s kakšnimi problemi se srečujemo v naših vinogradih, s katerimi vrstami boleznimi in v kakšnem obsegu. Važni so predpogoji za izvedbo posameznih metod, dosedanje delo in v našem primeru predvsem stopnja že dosežene selekcije. Naslednja odločitev je bila glede na to, kar se iz širšega raziskovalnega dela in obsežne, predvsem tuje literature ponuja kot rešitev za ugotovljene probleme. Zadnja, čeprav ne najmanj pomembna izbira je bila žal opravljena glede na to, kar sem v danih, predvsem materialnih in organizacijskih razmerah lahko opravila.

Čeprav daleč od tega, da bi z dobljenimi rezultati rešila problem odkrivanja viroz vinske trte v selekciji, vidim v rezultatih prispevek k reševanju teh problemov. Rezultati morda ne bodo zanimivi le za ozko vinogradniško področje, ampak tudi za sorodne panoge npr. sadjarstvo, ter za bazne raziskave.

Delo ni le ocena in primerjava posameznih metod, ampak so le-te že dale povratno informacijo o tem, kakšna je zdravstvena slika obdelanega trsnega materiala in kje so nadaljnje usmeritve v raziskavah in njihovi aplikaciji.

Enzimsko-imunosorbcijski test (ELISA), ki sem ga uporabila in primerjala predvsem z morfološko selekcijo in biotesti, je dobil svoje mesto, čeprav ne brez zadržkov, vendar z znanimi omejitvami. V vseh obravnavanih primerih se je pokazala velika prepletenost med genetsko in zdravstveno selekcijo, ter nuja, da se opravljata povezano in usklajeno.





- Enzimsko-imunski test je ob ustreznih standardih (kontrolni vzorci, pravo vzorčenje, grupiranje vzorcev) najbolj ustrežna pot za odkrivanje okužb z GFV.
- S testom ELISA smo pri elitnih trsah cv. 'rebula' delno lahko ločili genetske in zdravstvene tipe. Rumeni tip (A) priporočamo za razmnoževanje. Kritična skupina trt s prikrito GFV okužbo (17%) je prevelika, da bi selekcijsko delo na viroze zaključili z morfološko selekcijo.
- Indeksiranje na vse možne indikatorje ostane glavni način odkrivanja in ločevanja boleznih znotraj kompleksa GLR-GSP. Preliminarni ELISA testi za closteroviruse so pokazali v glavnem GLRaV okužbe. Delno se vidi razlike v virološki sliki med sortami, kar je posledica njihove dosedanje selekcijske poti, treba je raziskati ali gre za razlike v odpornosti med sortami. Morfološka selekcija v primeru boleznih zvijanja listov popolnoma odpove.
- Pokazalo se je, da je okuženost z virusi v veliki meri odvisna od stopnje selekcije v posamezni populaciji. Med starimi sortami je odstotek GFV okužb najvišji, vprašanje je ali te okužbe prekrivajo dobre lastnosti ter jih je zato treba vključiti in ohraniti v genski banki.
- Glede na rezultate primerjalnih metod lahko postavimo shemo za pridelavo zdravega trsnega materiala v Sloveniji. S širšim ugotavljanjem zdravstvene slike naših vinogradov, bi dobili povratno informacijo o nadaljnjih smereh in ustreznih metodah za odkrivanje virusov vinske trte.



- 1 Anonym. 1979. Il legno riccio della vite in Italia. *Inf.tore fitopatol.* 29(2):3-18
- 2 Barba M., Faggioli F., Cupidi A., Quacquarelli A. 1987. Closteroviruses associated with leaf roll of grapevine. *Proc. 9<sup>th</sup> Meeting ICVG, Jerusalem*, 26 (Abstr.)
- 3 Barlass M., Skene K.G.M., Woodham R.C., Krake L.R. 1982. Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *Ann. Appl. Biol.* 101:291-295
- 4 Bar-Joseph M., Murant A.F. 1982. Closterovirus group. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No.260
- 5 Belli G., Faoro F., Fortusini A., Tornaghi R. 1985. Further data on grapevine leafroll etiology. *Phytopathol. Mediter.* 24:148-151
- 6 Blaich R., Wind R. 1982. Anreicherungsverfahren für den serologischen Nachweis von Virus in Rebblättern. *Vitis* 21:40-42
- 7 Benin M., Grenan S. 1984. Le microgreffage: nouvelle technique d'élimination des virus de la vigne. *Progr. Agric. Vitic.* 101:33-36
- 8 Bovey R. 1970. Importance économique des viroses de la vigne. *Bull. OIV*, 43:124-138
- 9 Bovey R., Brugger J.J., Gugerli P. 1980. Detection of fanleaf virus in grapevine tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) and immune electron microscopy (IEM) *Proc. 7<sup>th</sup> Meeting ICVG, Niagara Falls 1980, Canada Agriculture*: 259-275
- 10 Bovey R., Gartel W., Hewitt W.B., Martelli G.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like diseases of grapevines - Colour atlas of symptoms. Ed. Payot Lausanne, (angl. franc. nem.) 181 pp. 186 phot.
- 11 Cadman C.H., Dias H.F., Harrison B.D. 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevines in Europe and North America, *Nature* 187:577-579
- 12 Campbell W.P. 1985. Selection versus heat treatment as a means of obtaining plants free from specified viruses. *Phytopathol. Mediter.* 24:211 (Abstr.)
- 13 Castellano M.A., Martelli G.P., Savino V., Boscia D. 1985. Progress in the study of the phloem-limited isometric virus-like particles associated with leafroll-diseased grapevines. *Phytopathol. Mediter.* 24:165-169

- 14 Caudwell A., Giannotti J., Kuszala C., Larrue J. 1971. Etude du role de particules de type "mycoplasme" dans l'étiologie de la Flavescence dorée de la vigne. Examen citologique des plantes malades et des cicadelles infectieuses. Ann. Phytopathol., 3: 107-123
- 15 Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. gen. Virol. 34:475-483
- 16 Coiro M.I., Lamberti F., Borgo M., Egger E. 1985. Reproduction of *Xiphinema index* on different grapevine rootstocks. Phytopathol. Medit. 24:177-179
- 17 Converse R.H. 1979. Recommended virus-indexing procedures for new USDA small fruit and grape cultivars. Plant Dis. Repr. 63:848-851
- 18 Conti M., Milne R.G., Luisoni E., Boccoardo G. 1980. A closterovirus from a stemplitting-diseased grapevine. Phytopathology 70:394-399
- 19 Corbett M.K., Wiid J. 1985. Closterovirus-like particles in extracts from diseased grapewines. Phytopath. Mediter. 24:91-100
- 20 Dias H.F. 1963. Host range and properties of grapevine fanleaf and grapevine yellow mosaic viruses. Ann. Appl. Biol. 51d 85-87
- 21 Egger E., Gollino G., Antoniazzi P. 1980. Research on grapevine indicator varieties suitable for detecting leafroll in northern Italy. Proc. 7<sup>th</sup> Meeting ICVG, Niagara Falls 1980 (Canada Agriculture): 329-331
- 22 Engelbrecht D.J. 1979. Nature and effect of the breakdown in tolerance of Jacques rootstock to grapevine stem-grooving in grafted *Vitis vinifera* L. cv. Queen of the vineyard vines. Proc. 6<sup>th</sup> Meeting ICVG, Cordoba 1976, Monografias INIA No.18. Ministr. de Agricult. Madrid:171-178
- 23 Engelbrecht D.J. 1980 Indexing grapevines for grapevine fanleaf virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Proc 7<sup>th</sup> meeting ICVG, Niagara Falls 1980 Canada Agriculture :277-282
- 24 Engelbrecht, D.J., Kasdorf G.G.F. 1985. Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for Grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine. Phytopathol. Mediter. 24d 101-105
- 25 Faoro R., Tornaghi R., Fortusini A., Belli G. 1981. Association of a possible closterovirus with grapevine leafroll in northern Italy. Riv. Pat. veg. S IV, 17d 183-189

- 26 Galzy R. 1964. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. *Annls Epiphyt.*, 15:245-256
- 27 Garau R., Prota U. 1987. Researches on wood disorders (stem pitting and/or stem grooving) of grapevine, in Sardinia. Proc. 9th Meeting ICVG, Jerusalem, 28-29 (Abstr.)
- 28 Gärtel, W. (1985). Stem grooving (stem pitting, legno riccio) like symptoms in vines of cv. Kerner in Germany. *Phytopathol. Mediter.* 24:56-59
- 29 Gifford E.M. Jr., Hewitt W.B. 1961. The use of heat therapy and in vitro shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine. *Amer. J. Enol. Vitic.* 12:129-130
- 30 Goheen A.C. 1970. Grape leafroll. V Frazier N.W. et all. *Virus Diseases of small Fruits and Grapevines.* Univ. Calif. Div. Agr. Sci. Berkeley, Calif.:209-212
- 31 Goheen A.C. 1988. Diseases caused by viruses and viruslike agents. V: *Compendium of grape diseases.* Ed. Pearson R.C., Goheen A.C. (APS Press) p. 47-54
- 32 Goheen A.C., 1989. Virus diseases and grapevine selection. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40: 67-72
- 33 Goheen A.C., Luhn C.F. 1973. Heat inactivation of viruses in grapevines. 5<sup>th</sup> ICVG meeting, Salice Terme, Riv. Patol. Veg. Ser. IV. 9 (suppl): 287-289
- 34 Goheen A.C., Nyland G., Lowe S.K. 1973. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat treatment of the disease in grapevine. *Phytopathology* 63:341-345
- 35 Gooding G.V.Jr 1965. Application of serology to the study of viruses of *Vitis*. Proc. Intern. Conf. Virus Vectors Perenn. Hosts. Davis Califd 211-222
- 36 Gouzoune N.I., Litvak A.I. Kouzmenko A.P., Djenéev S.Y., Zlenko V.A., Gleba I.I., Pivegne N.M. 1988. Emploi de la culture in vitro dans la selection de la vigne. Proc. 68<sup>e</sup> Assemblée générale OIV Paris, Viticulture 1, 21 pp.
- 37 Gugerli P. 1979. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour la diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre. *Rev. suisse Agric.* 11:253-260
- 38 Gugerli P., Fries P. 1981. Utilisation d'anticorps monoclonaux pour le diagnostic de virus chez les plants. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 13:323

- 39 Gugerli P., 1983. Use of enzyme immuno-assay in phytopathology. V: S. Avrameas et al., ( ed. ) *Immuno-enzymatic Techniques*, . Elsevier Biometrical Press Amsterdam:369-384
- 40 Gugerli P., Brugger J.J., Bovey R. 1984. L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 16:299-304
- 41 Harrison B.D., Murant A.F. 1977. NEPO virus group. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.185*
- 42 Hewitt W.B., Raski D.J., Goheen A.C. 1958. Nematode-vector of soil-borne fanleaf virus of grapevine. *Phytopathology* 48:586-595
- 43 Hewitt W.B., Martelli G., Dias H.F., Taylor R.H. 1970. Fanleaf virus of grapevine. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 28.*
- 44 Hewitt W.B. 1979. On the origin and distribution of *Vitis* and the virus diseases of the grapevine. *Proc. 6<sup>th</sup> meeting ICVG, Cordoba 1976, Monografias INIA 18, Ministr. de Agricult. Madrid: 3-5*
- 45 Hrček L., Korošec Z. 1976. Vpliv virusnih bolezní na količino in kakovost pridelka grozdja pri vinski trti. *Zb. Biotechn. Fak. Univ. Ljubljana, Kmetijstvo* 28:111-117
- 46 Hrzič A. 1982. Nematološke raziskave v Sloveniji. *Sod. kmet.* 7-8: 295-298
- 47 Huglin P., Guillot R., Valat C., Vuittenez A. 1980. L'evaluation génétique et sanitaire du matériel clonal de la vigne. *Bull. OIV* 53:857-882
- 48 Huss B., Walter B., Etienne L., van Regenmortel M.H.V. 1986. Grapevine fanleaf virus detection in various grapevine organs using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vitis* 25:178-188
- 49 Jimenez F., Goheen A.C. 1980. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of grape fanleaf virus. *Proc. 7<sup>th</sup> Meeting ICVG, Niagara Falls 1980, Canada Agriculture, : 283-291*
- 50 Kölber M., Lehoczyk J., Kobza S. 1980. Time of sampling and storage of leaf extracts studied on grapevine fanleaf virus (GFLV) with ELISA. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk. Rolniczych* (291):173-180
- 51 Korošec Z. 1982. Propadanje mladih trt na Krasu. *Sod. kmet.* 7 - 8:312-316

- 52 Korošec-Koruza Z. 1988. Selekcija vinske trte na virusne in njim podobne bolezni. URP - Biološke osnove kmetijskih rastlin, Poročilo RSS: 149-158
- 53 Koruza B., Zafošnik A., Petan P. 1987. Razvoj in rezultati klonske selekcije vinske trte (*Vitis vinifera L.*) cv. 'laški rizling' v Sloveniji. Zb. Biotehn. fak. Univ. Ljubljana, Kmetijstvo 49d 137-161
- 54 Legin R., le Gall O., Walter B. 1987. Comparaison de plusieurs types d'enroulement de la vigne. Schweizerische landwirtschaftliche Forschung, 3, 26:313-316
- 55 Martelli G.P. 1979. Identification of virus diseases of grapevine and production of disease-free plants. *Vitis* 18:127-136
- 56 Martelli G.P. 1988. Recent progrès de la virologie de la vigne. (Recent advances in grapevine virology). Proc. 68<sup>e</sup> Assemblée générale OIV, Paris, Viticulture 1, 25 pp.
- 57 Meredith C.P., Lider L.A., Raski D.J., Ferrari N.L. 1982. Inheritance of tolerance to *Xiphinema index* in *Vitis* species. *Am.J.Enol.Vitic.* 33:154-157
- 58 Milne R.G., Conti M., Lesemann D.E., Stellmach G., Tanne E., Cohen J. 1984. Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. *Phytopathol. Z.* 110:360-368
- 59 Murant A.F. 1970. Arabis mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 16
- 60 OIV, 67<sup>e</sup> Assemble générale (Rome, 1987) 1988 resolutions Bull. OIV, 61:683-684
- 61 Pejčinovski F. 1977. O nekim virozama vinove loze u Makedoniji. Proc. (Savetovanje o ekškorozi i virusnim bolestima vinove loze, Mostar, Hepok (publ.):165-175
- 62 Quacquarelli A., Gallitelli D., Savino V., Piazzolla P., Martelli G.P. 1979. Some properties of grapevine fanleaf and other NEPO- viruses infecting the grapevine. Proc. 6<sup>th</sup> meeting ICVG, Cordoba 1976, Monografias INIA Madrid 18:41-49
- 63 Pena-Iglesias A., Vecino B. 1987. Cytological studies of grapevine leaf roll infected tissue: Further evidence of viroid etiology and improvement of diagnosis. *Vitis* 26:37-41

- 64 Ramsdell D.C., Andrews R.W., Gillet J.M., Morris C.E. 1979. A comparison between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *Chenopodium quinoa* for detection of peach rosette mosaic virus in "Concord" grapevines. Plant Dis. Repr. 63(1):74-78
- 65 Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., et Meredith C.P. 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. Plant Disease, 67:335-339
- 66 Rep. sekr. kmet. prehr. gozd. 1983. Metoda za odbiranje in potrjevanje matičnih trsov v vinogradih in matičnjakih - pravilnik UL SRS 36-424/74
- 67 Ries R. 1987. Résultats de la sélection clonale à Geisenheim. Tests virologiques chez le sélectionneur, possibilités et limites du contrôle des virus. Schweizerische landwirtschaftliche Forschung, 3, 26: 332-335
- 68 Rosciglione B., Castellano M.A., Martelli G.P., Savino V., Cannizzaro G. 1983. Mealybug transmission of grapevine virus A. Vitis 22:331-347
- 69 Rosciglione B., Castellano M.A. 1985. Further evidence that mealybugs can transmit Grapevine virus A (GVA) to herbaceous host. Phytopathol. Mediter. 24: 186-188
- 70 Rosciglione B., Gugerli P. 1986. Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. 18(4):207-211
- 71 Rosciglione B., Gugerli P. 1987. Transmission of grapevine leafroll and associated clostervirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus citrii* (Syn). Proc. 9<sup>th</sup> Meeting ICVG Jerusalem: 13-14(Abstr.)
- 72 Rüdell M. 1985. Grapevine damage induced by particular virus-vector combinations. Phytopathol. Mediter. 24:183-185
- 73 Savino V., Boscia D., Martelli G.P. 1985. Incidence of some graft - transmissible virus-like diseases of grapevine in visually selected and heat-treated stocks from Southern Italy. Phytopath. Mediter. 24: 204-207
- 74 Savino V., Boscia D., Musci D., Martelli G.P. 1985. Effect of legno riccio (stem pitting) on "Italia" vines grafted onto rootstocks of different origin. Phytopathol. Mediter. 24:68-72
- 75 von Schenk W. 1969 Die Bedeutung der neuen Saatgutgesetzgebung für die Rebenveredlung. Vort. XI. Geisenheimer Rebenveredlertagung: 11-36
- 76 Schmidt L. 1956. Štitaste uši Hrvatske. Zaštita bilja 36, dodatak:3-11



- 77 Semancik Y.S., Rivera-Bustamante R., Goheen A.C. 1987. Widespread occurrence of viroid-like RNA's in grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38d 35-40
- 78 Stellmach G., Berres R. 1985. Investigations on mixed infections of nepo-viruses in *Vitis spp.* and *Chenopodium quinoa* Willd. by means of ELISA. *Phytopathol. Mediter.* 24:125-128
- 79 Stellmach G. 1987. Die Kerner - Krankheit: Theoretische und praktische Aspekte einer tödlichen Rebevirose. *Wein-Wiss.* 6:421-426
- 80 Sutula C.L., Gillett J.M., Morrissey S.M., Ramsdell D.C. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Dis.* 70, 8:722-726
- 81 Šarić A., 1980. Biochemical identification of viruses in grapevine (Final technical report) USDA Project No. E30-CR-IR6, Grant No. FG-YU-208, p. 29, 7 tab.
- 82 Šarić A., Ivanek M. 1985. Zdravstvena selekcija u proizvodnji loznog sadnog materiala. *Jugoslov. vinograd. vinar.* 9: 14-16
- 83 Tanne E. 1980. The use of ELISA for the detection of some NEPO viruses in grapevines. *Proc. 7<sup>th</sup> Meeting ICVG, Niagara Falls 1980, Canada Agriculture* : 293-296
- 84 Tanne E., Sela I., Klein M., Harpaz I. 1977. Purification and characterization of a virus associated with the grapevine leafroll disease. *Phytopathology* 67:442-447
- 85 Tanne E., Givony L. 1985. Serological detection of two viruses associated with leafroll-diseased grapevines. *Phytopathol. Mediter.* 24:106-109
- 86 Tanne E., Ben-Dov Y., Raccach B. 1987. Transmission of clostero-like particles by mealy bugs (pseudococcidea) in Israel. *Proc. 9<sup>th</sup> Meeting ICVG, Jerusalem*, 15-16 (Abstr.)
- 87 Téliz D., Goheen A.C., Valle P. 1980. Occurrence and spread of grape corky bark and stem pitting in Mexico. *Plant Disease* 64:584-586
- 88 Téliz D., Tanne E., Gonsalves D., Zee F. 1987. Field serological detection of viral antigens associated with grapevine leafroll disease. *Plant Disease* 71: 704-709
- 89 Tijson P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassay s. V: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 15, Ed. Elsevier, Amsterdam, 2-19, 385-418

- 90 Valat C. 1979. Organisation de la sélection clonale en France en vue de la production de plants de vigne sains. *Vignevini*, VI, 5: 11-20
- 91 Vertovc M. 1844. Vinoreja za Slovence. Perložni list h "Kmetijskim in rokodelskim Novicam" Ljubljana, 253 pp
- 92 Vrdoljak M., Šarić A. 1981. Electrophoretic investigation of some grapevine fanleaf virus isolates. *Acta Bot.Croat.* 40:51-60
- 93 Vuittenez A. 1980. The new improvements of serological methods and their possible application to detect and identify viruses and virus-like diseases of the grapevine. Proc. 7<sup>th</sup> Meeting ICVG, Niagara Falls 1980 (Canada Agriculture Research Branch):225-243
- 94 Zee F., Gonsalves D., Goheen A., Kim K.S., Pool R., Lee R.F. 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closteroviruslike particles. *Phytopathology* 77:1427-1434
- 95 Walker M.A., Meredith, C.P., Goheen A.C. 1985. Sources of resistance to grapevine fanleaf virus (GFV) in *Vitis species*. *Vitis* 24d 218-228
- 96 Walkey D.G.A. 1984. Applied plant virology. Ed. Heinemann Ltd. London, pp 329
- 97 Walter B., Vuittenez A., Kuszala J. Stocky G., Burckard J. van Regenmortel M.H.V. 1984. Détection sérologique des virus du court-noué de la vigne par le test ELISA. *Agronomie* 4d 527-534
- 98 Woodham R.C., Antcliff A.Y., Krake L.R. Taylor R.N. 1984. Yield differences between Sultana clones related to virus status and genetic factors. *Vitis* 23:73-83

## 7 POVZETEK

Na podlagi že opravljenega selekcijskega dela v Sloveniji so bile preizkušene različne metode za odkrivanje viroz vinske trte.

Kot osnovna primerjalna metoda je bil izbran enzimsko-imunosorbcijski test (ELISA), opravljen po principu dvojnega sendviča, ki se je pokazal kot najprimernejši za odkrivanje okužb z virusom pahljačavosti listov vinske trte (GFV).

Za primer GFV je bila napravljena tehnična standardizacija testa, ki zahteva predvsem stalne kontrolne vzorce, grupiranje vzorcev na podlagi iste sorte, iste vrste in starosti materiala in isto predhodno obdelavo. Najbolj primeren material so sveži mladi lističi, nabrani ob času cvetenja ali lističi iz siljenk, pripravljene v času mirovanja. Za interpretacijo rezultatov in primerjavo testov se zahteva spektrofotometrično odčitavanje s smiselno postavljenjo mejo E+/E-. Interpretacija rezultatov pri zelo visokih nespecifičnih reakcijah (OD 0.200) je vprašljiva, potrebno je ponoviti več testov. Ponavljanje testov je pokazalo visoko zanesljivost (od 88% do 98%).

V selekcijskem vinogradu cv. 'rebula' je bilo med 232 trsi odkritih 34% okužb z GFV (43% če vštujemo tudi VBG trte), od tega med naključno pozitivno odbranimi od 12% do 17%. Morfološka selekcija te kritične skupine torej ne odkrije. ELISA test je delno ločil genetske in zdravstvene tipe rebule, za razmnoževanje je priporočen rumeni (A) tip. Vsi trsi z oznako 'nora rebula' (VBG) so tudi nosilci GFV. Ugotovljena je delna ali popolna deformacija ženskega dela cveta (plodnice). Hipotetično gre za dve možnosti: stalno kombinacijo virus - genetska napaka ali za močan vpliv virusa GFV.

Pri ugotavljanju virološke slike se je pokazalo, da so najbolj okužene populacije z najnižjo selekcijsko stopnjo (genska banka 67%) najmanj pa klonski kandidati ali vsaj množično selekcioniran vinograd (2% elite - 12% P+ trsi).

Indeksiranje kot druga uporabna metoda v diagnostiki viroz vinske trte se je pokazalo kot tehnično zahtevno in problematično, predvsem zaradi nizkega prijema cepljenja (22%), Vendar v kompleksu boleznij zvižanja listov (grapevine leaf roll, GLR) in razbrazdanje lesa (grapevine stem pitting, GSP) ostaja indeksiranje glavni dokazni postopek.

Uspel je prenos znakov razbrazdanja na indikator V. rupestris St. George, ki je potrdil razširjenost boleznij "Rupestris stem-pitting", predvsem na cv. 'refošk'. Indikator LN 33 nikoli ne pokaže tipičnega znaka zvižanja listov (GLR) ali zadebelitve in pokanja mladice (plutavost lubja, corky bark, CB).

V preliminarnih ELISA testih na closteroviruse povezane z boleznijo GLR-GSP je bila pogosta pozitivna reakcija na closterovirus GLRaV I pri cv. 'refošk' in cv. 'zametovka', manj je tipa I in III in nikoli v mešani okužbi. Vendar se slika znakov boleznij iz morfološke selekcije ne prekriva z rezultati indeksiranja in ELISA, iz česar lahko sklepamo na kompleksno etiologijo teh boleznij, kot jo ugotavljajo tudi številni tuji avtorji. Morfološka selekcija je tu kot metoda za diagnostiko viroz zelo nezanesljiva. Ta del raziskav zahteva razširitev indeksiranja na vse možne indikatorje in določitev populacije closterovirusov za avtohtone sorte.

Glede na velik pomen selekcijskega dela v vinogradu lahko s kombinacijo preizkušenih metod za diagnostiko viroz postavimo model za vključevanje teh metod v selekcijo. Vsaki višji stopnji genetske selekcije je potrebno vzporedno postaviti čim bolj uspešne metode za odkrivanje viroz, vse pa je potrebno povezati v sistem selekcije, testiranje in priznavanja trsnega razmnoževalnega materiala kot velja v skupnosti EGS.

## 8 SAŽETAK

Na osnovu već obavljenog selekcijskog rada u Sloveniji, istraženi su najpogodniji metodi za otkrivanje virusnih zaraza vinove loze.

Kao osnovni komparativni metod odabran je enzimsko- imunisorpcijski test na principu dvostrukog sendvič metoda (ELISA) koji se pokazao kao najpogodniji za otkrivanje zaraza virusom lepezavosti lista vinove loze (GFV).

Na primeru GFV izradjena je tehnička standardizacija postupka u kojoj se traži izbor stalnih kontrolnih uzoraka, njihovo grupisanje uz izbor sorte, materijala i prethodne obrade. Najpogodniji materijal su sveži mladi listići za vreme cvatnje loze ili isti od poteranih reznica u zimsko doba. Za interpretaciju rezultata i komparaciju testova preporučuje se čitanje spektrofotometrom sa logično postavljenom granicom  $E^+/E^-$ . Interpretacija rezultata sa vrlo visokom nespecifičnom reakcijom ( $OD = 0.200$ ) je pod upitnikom, treba ponoviti više testova. Pouzdanost testa je visoka - od 88% do 98%.

U selekcionom vinogradu cv. 'rebula' je od 232 čokota otkriveno 34% GFV zaraza (43% ako ubrajamo i čokote VBG-bez roda), od tog broja među slučajno odabranim pozitivnim čokotima od 12% do 17% (čokoti kritična grupa). Morfološka selekcija prema tome ne otkriva zaraza ove kritičke grupe.

ELISA test je delimično odvojio genetske i zdravstvene tipove rebule, za razmnožavanje je preporučen žuti (A) tip. Svi čokoti sa oznakom VBG su i nosioci GFV zaraze. Utvrđena je delimična ili potpuna deformacija ženskog dela cveta (plodnika). Hipotetički se radi o dve mogućnosti: Stalnoj kombinaciji virus- genetska deformacija ili o velikom uticaju zaraze na plodnik.

Kod postavljanja virološke slike vinograda se pokazalo da je najveća zaraza u populaciji na najnižem stepenu selekcije (banka gena - 68%) i najniža uz klonske kandidate ili vinograd pozitivne masovne selekcije (2% - 12%).

Indeksiranje kao drugi metod koji se upotrebljava u dijagnostici virusnih zaraza pokazalo se kao tehnički složeno i problematično, naročito zbog niskog prijema kalemljenja (22%). Međutim, u kompleksu bolesti uvijanja lišća (GLR) i deformacija drveta (GSP) indeksiranje ostaje glavni dokazni postupak.

Izvršen je prenos simptoma uzlebljenosti drveta na indikator *Vitis rupestris* St. George čime je potvrđena proširenost bolesti "Rupestris stemmiting", i to naročito na cv. 'refošk'. Indikator LN 33 ni u jednom slučaju nije pokazivao tipične simptome uvijanja lišća (GLR) ili zadebljanja i pucanja mladica (corky bark, CB).

U preliminarnim ELISA testovima na closteroviruse povezane sa GLR-GSP kompleks bolesti bila je česta pozitivna reakcija na closterovirus GLRaV i kod cv. 'refošk' i cv. 'žametovka', manje ima tipa I i III, ali nikada u mešovitoj zarazi. Simptomi bolesti iz morfološke selekcije nisu u logičnoj vezi sa rezultatima indeksiranja i ELISA testa, što indicira na kompleks svojstva etiologije bolesti, kao što su to utvrdili i mnogi strani autori. Morfološka selekcija u tim bolestima nije od nikakve koristi. Ovaj deo istraživanja traži proširenje indeksiranja na sve raspoložive indikatore i determinaciju populacije closterovirusa za autohtone sorte.

S obzirom na veliki značaj selekcijskog rada u vinogradarstvu, kombinacijom proverenih metoda za dijagnostiku virusnih zaraza mogli bismo postaviti model za uključivanje ovih metoda u selekcijski rad. Svakom višem stepenu genetske selekcije treba paralelno postaviti što uspešnije metode za otkrivanje virusnih zaraza i njihovo povezivanje u sistem selekcije, testiranja i priznavanja loznog sadnog materijala kakvi važe u Evropskoj ekonomskoj zajednici.

## 9 SUMMARY

Different methods for detecting virus diseases of the grapevine were tested on the basis of the previous selection work in viticulture in Slovenia.

Double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (das ELISA) was chosen as the main comparative method and as the best known way in the detection of the grapevine fanleaf virus disease (GFV).

In the case of GFV the required standards for ELISA were as follows: the standard negative and positive control samples, the grouping of samples according to the grapevine cultivar, the age and the source of the plant material, and the preliminary treatment. Young leaves sampled at bloom time in the vineyard or on the dormant cuttings forced to grow in greenhouse were the best source of the material. To interpret the ELISA data the spectrophotometric reading is necessary where the positive/negative threshold (E+/E-) is well defined. The high non-specific reactions of the negative controls (OD 0.200) were questionable and the results called for repeating the tests. The procedure gave the high accuracy of 88% to 98%.

In the mother block vineyard of cv. 'rebula' the group of 232 vines were sampled randomly and 34% of vines showed to be positive to GFV (43% when VBG -vines with no crop were included). The group of positive vines showed lower incidence of virus disease (12% to 17%). This is critical group because it is never detected as the diseased material by morphological visual selection work. ELISA partially differentiated between genetic and sanitary types of cv. 'rebula', the type A being recommended for the viticultural practice. All the vines noted as VBG, gave the positive GFV reaction. The partial of the complete deformation of the pistile in the VBG group was established. Two hypotetic conclusions are proposed: the constant coincidence of the genetic abnormality and the GFV infection of the strong negative influence of the GFV on the development of the grape flower.

Establishing the sanitary status of the vineyards the less selected populations (the old collections) showed the highest incidence of GFV (64%) and the clonal or positive mass selected plots showed the lowest GFV infections (2% - 12%).

We transmitted the "Rupestris stem pitting" symptoms for cv. 'refošk' to the Rupestris St. George. In contrary to the field symptoms the indicator LN 33 showed no typical leaf rolling or shoot swelling or cracking known from the corky bark disease (CB).

Preliminary ELISA for the GLR associated closteroviruses revealed the presence of the GLRaV type I (cv. 'refošk' and cv. 'zametovka') more frequently as the types II od III, but no mixed infections have been detected. The sanitary status of the vineyard does not correspond to the results of the indexing and the ELISA, the etiology of the diseases has not been cleared out completely. The visual selection is not the adequate method in this case. The expanded indexing procedure to all possible indicator varieties is recommended especially for the autochtone grapevine cultivars.

According to the great impact of the selection work in viticulture the scheme of the diagnostic methods for virus diseases and the clonal selection work is proposed. All the elaborate selection work should be combined with the diagnostic methods for known virus diseases as it is proposed in all viticulture countries in CEE.



## **SEZNAM PRILOG**

- 1a Zbirni podatki selekcije cv. 'rebula', Ampelografski vrt, 1983-1989
- 1b Zbirni podatki selekcije cv. 'rebula', dobri trsi (P+70)
- 1c Zbirni podatki selekcije cv. 'rebula', slabi trsi (P-70)
- 2 Zbirni pregled testiranja starih sort primorskega rajona
- 3 Shema uporabljenega ELISA testa
- 4 Evidenca ELISA testa (primer)
- 5 Slike







zap. št.	trta	množična selekcija						biotesti		ELISA (GFV) serija									ArMV					p r i d e l k i				
		pozitivna			negativna (znaki)			zelj.	indk.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	leto	kg/trs	število grozdov	x teža grozda	sladkor 0°e	kisi. g/l	teža 100 jagod			
		X	P	A	B	C	D																					
99	3.35	3.8	+	x														83	16.75	77	218							
100	3.40	2.8	+															89	11.80	61	193							
101	3.41	2.0	-	x	x	x				†								83	2.20	16	146							
102	3.42	1.0	-	x	x		x							+		+		83	2.00	18	111							
103	3.44	2.2	-			x												83	3.70	19	194							
																		87	11.45	46	248							
																		88	10.55	42	251							
																		89	7.70	50	154							
104	3.45	2.4	-	x		x																						
105	3.49	1.0	-				x																					
106	3.53	2.0	-																									
107	3.54	2.6	-															83	4.80	29	165							
108	3.55	2.6	+	x																								
109	3.58	2.4	-	x	x																							
110	3.61	2.4	-	x	x	x												83	4.80	41	117							
																		87	5.19	38	241							
																		88	6.60	26	254							
111	3.62	2.0	-	x	x													83	5.15	42	123							
																		88	2.45	27	21							
112	3.65	2.4	-	x	x	x												83	7.25	47	154							
																		88	5.10	25	204							
113	3.66	2.6	+	x	x									+		(-)	+	±	83	8.15	44	185						
																		88	9.00	42	214							
114	3.68	2.8	+	x	x													83	4.90	27	181							
115	3.69	2.0	+	x	x																							
116	3.71	3.8	+															89	2.70	15	180							
117	3.72	3.0	+	x	x													83	9.35	40	233							
																		87	6.30	33	251							
																		88	2.20	15	147	73	10.0	247				
118	3.73	2.8	+	x																								
119	3.74	2.0	-	x														88	3.70	21	176							
120	3.75	2.8	+	x														83	6.35	26	244							
121	3.77	2.2	-		x													83	6.35	28	226							
122	3.78	2.6	-	x																								
123	3.79	3.2	+	x	x													83	4.40	32	138							
																		87	6.85	38	180							
																		88	3.70	25	148							
124	3.80	2.2	-	x	x													83	2.90	17	170							
																		88	3.45	22	157	61	10.7	199				
																		89	5.40	41	132							
125	3.81	2.6	+	x	x													83	5.20	36	144							
																		88	7.20	41	176	73	9.6	219				
																		89	3.65	17	215							
126	3.84	2.6	+	x	x																							
127	3.85	2.4	-			x												83	4.65	30	155							
128	3.86	2.4	-			x																						
129	4.2	3.0	+	x																								
130	4.3	2.2	-			x																						
131	4.4	2.0	-			x																						
132	4.9	2.8	+	x		x												83	3.05	31	98							
																		88	5.20	25	208							
																		89	8.50	42	202							
133	4.11	2.4	-	x		x												83	4.30	25	172							
134	4.12	2.2	-	x														83	3.80	26	146							
135	4.14	1.0	-	x			x											83	0									
136	4.16	1.8	-	x	x	x												83	2.20	18	122							
																		88	6.00	37	216							
																		89	9.35	39	240							
137	4.22	2.0	-	x																								
138	4.26	3.0	+	x		x												83	5.95	24	248							
139	4.27	2.8	+	x														83	2.70	20	135							
																		87	8.15	40	202							
																		88	9.10	41	222	66	11.8	216				
																		89	5.50			58	14.6	211				
140	4.35	3.2	+	x		x												83	10.3	69	149							
																		88	1.20	10	120	80	8.8	307				
141	4.37	2.8	+	x														83	7.15	31	231							
142	4.38	1.6	-		x	x		+	±	+								83	3.25	26	125							
143	4.39	2.4	-	x										+				83	7.60	49	155							
																		88	7.50	25	140							
144	4.40	2.8	+			GLR												83	7.90	40	198							
																		89	6.90	48	144							
145	4.47	2.6	+															88	4.10	29	141							
146	4.50	2.8	+	x																								
																		88	3.35	22	152							

zap. št.	trta	množifna selekcija										blatostl		ELISA (GRV) serija									p r i d e l k i						
		pozitivna					negativna (znaki)					zelj.	lndk.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	letu	kg/trs	število grozdov	X teža grozda	sladkor O°C	kisl. g/l	teža 100 jagod
		X	P	A	B	C	D																						
147	4.52	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	5.65	34	166	74	10.7	260	
148	4.59	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	4.45	28	159	74	10.7	260	
149	4.60	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	5.70	61	61				
150	4.61	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	5.00	32	156				
151	4.70	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	9.00	48	196				
152	4.71	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	5.60	30	166				
153	4.88	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	8.60	49	178				
154	5.7	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	7.55	43	176				
155	5.13	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	4.60	0	0				
156	5.14	3.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	4.60	35	131				
157	5.16	3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	4.20	29	145				
158	5.18	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	14.45	77	187				
159	5.19	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	4.65	38	163				
160	5.20	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	9.55	53	161				
161	5.21	1.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	7.90	42	188				
162	5.28	3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	6.80	31	219				
163	5.32	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	4.80	30	155				
164	5.33	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	4.80	29	172				
165	5.34	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	5.25	47	154				
166	5.35	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	4.65	29	160				
167	5.38	3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	6.10	31	198				
168	5.39	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	6.15	30	230				
169	5.44	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	6.60	30	220				
170	5.46	3.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	5.70	38	137				
171	5.50	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	6.75	37	169				
172	5.53	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	8.60	42	204				
173	5.54	3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	6.20	31	198				
174	5.58	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	6.20	38	169				
175	5.59	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	6.20	37	169				
176	5.68	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	8.60	42	204				
177	5.70	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	6.20	36	172				
178	5.71	3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	5.80	31	198				
179	5.80	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	6.20	36	172				
180	5.82	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	8.10	82	156				
181	5.86	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	3.70	20	185				
182	5.88	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	8.70	56	155				
183	6.2	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	4.20	24	175				
184	6.3	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	4.20	24	175				
185	6.4	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	4.20	24	175				
186	6.5	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	4.00	29	138				
187	6.5	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	4.38	28	155				
188	6.7	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	7.20	41	176				
189	6.9	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	4.20	32	162				
190	6.10	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	5.50	34	162				
191	6.15	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	4.70	35	154				
192	6.16	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	6.80	30	220				
193	6.20	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	4.30	20	216				
194	6.22	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	4.90	21	233				
195	6.25	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	2.10	18	111				
196	6.26	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	6.10	54	113				
197	6.27	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	6.00	33	182				
198	6.31	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	7.35	42	175				
199	6.32	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	6.00	33	182				
200	6.36	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	6.20	37	169				
201	6.37	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83	6.20	36	172				

zap. št.	trta	množična selekcija						biotesti		ELISA (GFV) serija									pridelki								
		pozitivna		negativna (znaki)				zelj.	indk.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	ArMV	leto	kg/trs	število grozdov	x teža grozda	sladkor O <sup>o</sup> e	kisl. g/l	teža 100 jagod	
		X	P	A	B	C	D																				
202	6.42	1.0	-				x												83	0	0	0					
203	6.49	2.4	+	x															83	0	0	0					
204	6.51	1.0	-				x												83	0	0	0					
205	6.52	1.0	-																83	0	0	0					
206	6.61	2.4	-				x												83	3.90	26	150					
207	6.62	3.2	+				x												83	5.50	42	132					
208	6.63	2.4	-				x												83	6.70	48	139					
209	6.65	2.0	-																83	2.40	26	92					
																			88	0	0	0					
210	6.64	1.0	-				x												83	0	0	0					
211	6.66	1.4	-																83	3.18	38	82					
212	7.4	2.0	+	x	x														83	4.20	35	120					
213	7.9	2.2	-																83	4.20	35	120					
214	7.10	2.2	-				x												83	4.20	35	120					
215	7.14	1.8	-				x	x											83	3.40	29	117					
216	7.16	2.6	+				x												83	7.40	36	205					
217	7.25	3.0	+																83	7.40	36	205					
218	7.27	2.8	+	x															83	7.40	36	205					
219	7.35	3.8	+																83	7.40	36	205					
220	7.39	1.0	-				x												88	0	0	0					
221	7.41	2.6	+	x	x														83	5.85	38	154					
222	7.42	2.0	-																83	3.75	35	107					
223	7.43	2.8	+				x												83	6.15	46	177					
																			89	6.25	35	179					
224	7.44	3.0	+	x															89	8.85	35	253					
225	7.63	2.0	-				x												88	4.20	30	140					
226	7.70	3.0	+	x															88	4.20	30	140					
227	7.76	2.8	+																89	7.00	-	-	80	10.2	229		
228	8.2	2.0	-				x												89	7.00	-	-	80	10.2	229		
229	8.6	2.6	+	x	x														89	4.20	26	162					
230	8.9	2.8	+	x															89	4.20	26	162					
231	8.15	2.8	+	x															89	4.20	26	162					
232	9.18	3.0	+	x															89	4.20	26	162					

LEGENDA:

pozitivna x = izračun vrednosti: vsota ocen/št. let

selekcija p = oznaka za pozitivno množično selekcijo

+ pridelovalno dobra trta

- pridelovalno slaba trta

negativna (znaki) A - premaknjena vitica

selekcija B - deformacija na rozgi (dvojni členki, bifurkacije)

x - trs ima ta znak

C - osipanje

D - trta brez grozdja, "nora" ali VBG

biotesti: zelj - zeljasta rastl. (*Chenopodium sp.*)

indk - trtni indikator

- brez reakcije (=brez virusa)

+ z reakcijo (z virusom)

ELISA: 1 do 9: zaporedna številka serije

- brez reakcije (negativna reakcija - brez virusa)

+ z reakcijo (pozitivna reakcija - z virusom)

‡ sumljiva reakcija

pridelki: 0 - ni pridelkov,

- ni podatka

Priloga Ibi: Zbirni podatki selekcije cv. 'rebala', dobri trsi (70 P+)

trta	množična selekcija						biotesti		ELISA (GPV) serija									p r i d e l k i						
	pozitivna			negativna (znaki)			zelj.	indk.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	leto	kg/trs	število grozdov	x teža grozda	siadkor 00e	kisl. g/l	teža 100 jagod
	x	P	A	B	C	D																		
1.15	4.4	+																83	17.10	110	155			
1.18	2.8	+	x	x	x													83	10.15	73	138			
1.31	2.8	+																83	7.20	39	185			
1.32	3.4	+																83	9.00	46	196			
1.33	2.8	+	x															83	9.00	46	196			
1.39	3.4	+		x														83	6.30	33	191			
2.10	2.4	+	x	x						+		+						83	5.80	39	226			
2.11	3.2	+	x	x						+								83	4.40	21	210			
2.12	2.8	+	x	x														83	4.90	27	216			
2.13	3.2	+	x	x														83	9.10	24	207			
2.16	3.0	+	x	x						+								83	6.55	32	267			
2.17	3.4	+	x	x														83	5.50	23	241			
2.22	2.8	+	x	x														83	6.35	34	187			
2.23	2.8	+	x	x	x													83	7.25	38	191			
2.26	4.0	+	x	x														83	7.15	38	188			
2.29	4.2	+	x												+			83	7.20	36	189			
2.30	2.8	+																83	8.65	36	240			
2.43	3.4	+													+			83	13.7	68	201			
2.51	3.0	+	x	x														83	7.40	43	172			
2.53	2.6	+		x																				
2.54	2.4	+																83	9.15	45	203			
2.55	2.8	+	x															83	5.50	41	134			
2.57	2.8	+	x															83	4.20	25	168			
2.74	3.8	+	x													+		83	12.50	87	219			
2.81	3.0	+		x	x													83	8.85	52	170			
2.85	2.8	+		x														83	6.95	43	162			
2.87	3.2	+																83	7.65	33	232			
3.9	3.4	+	x	x														83	6.35	37	172			
3.15	3.2	+	x	x														83	7.80	37	210			
3.18	4.2	+	x							(+)								83	15.00	67	157			
3.22	3.2	+		x														83	9.00	38	239			
3.31	3.4	+	x															83	9.20	48	191			
3.32	3.2	+	x	x														83	9.20	48	191			
3.35	3.8	+	x															83	16.75	77	218			
3.66	2.6	+	x	x	x					+		+			(-)	+		83	8.15	44	185			
3.68	2.8	+	x	x														83	4.90	27	181			
3.72	3.0	+	x	x														83	9.35	40	233			
3.75	2.8	+	x															83	6.35	26	244			
3.79	3.2	+	x	x														83	4.40	32	138			
3.81	2.6	+	x	x						+		+						83	5.20	36	144			
4.2	3.0	+	x															83	9.45	58	163			
4.9	2.6	+	x															83	3.05	31	98			
4.26	3.0	+	x		x													83	5.95	24	248			
4.27	2.8	+	x															83	2.70	20	135			
4.35	3.2	+	x		x													83	10.3	69	149			
4.37	2.8	+	x															83	7.15	31	231			
4.40	2.8	+								+								83	7.90	40	198			
4.47	2.6	+																88	4.10	29	141			
4.71	2.6	+	x	x														83	5.60	30	186			
4.88	3.0	+	x															83	7.55	43	176			
5.14	3.6	+		x														83	14.45	77	187			
5.16	3.2	+																83	6.95	38	183			
5.18	2.2	-		x														83	7.90	42	188			
5.32	3.0	+																83	6.15	31	198			
5.35	3.8	+	x	x														83	6.60	42	204			
5.38	3.2	+	x	x														83	6.20	36	172			
5.53	3.4	+	x	x														83	6.55	37	177			
5.54	3.8	+	x															83	6.30	35	174			
5.86	4.0	+		x														83	8.10	52	156			
6.2	2.6	+																83	8.70	20	185			
6.5	2.8	+	x															83	8.70	56	155			
6.10	2.8	+																83	7.20	41	176			
6.15	2.6	+	x	x	x													83	4.20	32	162			
6.27	2.6	+	x															83	4.30	20	215			
6.36	2.8	+																83	6.10	54	113			
6.37	2.6	+	x															83	7.35	42	175			
6.62	3.2	+			x													83	5.50	42	132			
7.27	2.8	+	x															83	7.40	36	205			
7.41	2.6	+	x	x														83	5.85	38	154			
7.43	2.8	+		x														83	8.15	46	177			

Priloga 1c: Zbirni podatki selekcije cv. 'rebula', slabi trsi (70 P-)

trta	množična selekcija						biotesti		ELISA (GFV) serija											p r i d e l k i				
	pozitivna		negativna (znaki)				zelj.	indk.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	leto	kg/trs	število grozdov	x̄ teža grozda	sladkor 0°e	kisl. g/l	teža 100 jagod
	X	P	A	B	C	D																		
1.38	2.2	-	x	x													83	3.80	24	152				
1.40	2.4	-		x	x		-	+									83	3.55	23	154				
1.85	1.0	-				x											83	0	0	0				
2.9	2.0	-	x	x	x												83	8.30	48	173				
2.15	1.8	-	legno riccio														83	3.30	32	103				
2.19	1.8	-	x	x													83	3.35	21	160				
2.25	2.2	-	x														83	5.50	41	134				
2.27	2.2	-	zvijanje														83	6.15	37	166				
2.28	1.4	-		x			-	+									83	4.55	37	123				
2.32	2.2	-	x	x													83	3.20	18	178				
2.34	2.0	-	x	x	x												83	4.65	24	194				
2.41	1.6	-	x	x		x											83	0.85	8	106				
2.44	1.4	-	x	x	x												83	3.45	32	108				
2.58	2.2	-	x	x													83	5.85	34	172				
2.59	1.4	-	x	x	x												83	2.20	15	147				
2.59	1.4	-	x	x		x											83	0.40	2	20				
2.60	1.0	-	x	x		x											83	0.40	2	20				
2.61	2.0	-															83	5.75	47	122				
2.69	1.6	-	x		x												83	5.05	40	126				
2.70	2.4	-	x		x												83	3.65	19	191				
2.80	2.0	-		x													83	6.00	47	128				
2.86	1.4	-			x												83	2.75	24	115				
3.5	1.2	-				x		-	-	+							88	0.20	2	10				
3.7	2.4	-	x		x												83	4.20	29	148				
3.8	1.2	-	x		x	x		±	-								83	0	0	0				
3.10	2.4	-	x	x													83	4.10	26	158				
3.14	2.0	-															83	4.10	34	120				
3.16	2.2	-	x	x	x			-	+								83	7.90	75	158				
3.19	1.2	-	x		x	GLR											83	4.75	35	136				
3.24	2.2	-	x														83	6.45	51	126				
3.25	2.2	-	x	x													83	4.15	25	166				
3.41	2.0	-	x	x	x												83	2.20	15	146				
3.42	1.0	-	x	x		x		-	-	+							83	2.00	18	111				
3.44	2.2	-			x												83	3.70	19	194				
3.54	2.6	-															83	4.80	29	165				
3.61	2.4	-	x	x	x												83	4.80	41	117				
3.62	2.0	-	x	x	x												83	5.15	42	123				
3.65	2.4	-	x	x	x												83	7.25	47	154				
3.77	2.2	-			x												83	6.35	28	226				
3.80	2.2	-	x	x													83	2.90	17	170				
3.85	2.4	-			x												83	4.65	30	155				
4.11	2.4	-	x		x												83	4.30	25	172				
4.12	2.2	-	x														83	3.80	26	146				
4.14	1.0	-	x			x											83	0	0	0				
4.16	1.8	-	x	x	x												83	2.20	18	122				
4.38	1.6	-		x	x			+	-	+							83	3.25	26	125				
4.39	2.4	-	x														83	7.60	49	155				
4.52	2.4	-		x													83	5.65	34	166				
4.59	1.8	-	x		x												83	5.70	93	61				
4.61	2.0	-		x	x												83	5.00	32	156				
5.7	1.0	-				x											83	0	0	0				
5.13	1.8	-	x	x	x												83	4.60	35	131				
5.20	1.2	-	x	x													83	4.80	31	155				
5.21	1.6	-	x		x			+	+								83	5.25	47	112				
5.33	2.4	-		x	x												83	6.60	30	220				
6.9	2.2	-		x				+									83	4.00	29	138				
6.20	2.2	-			x												83	5.50	34	162				
6.22	1.8	-			x												83	4.70	35	134				
6.31	1.8	-		x													83	2.10	18	111				
6.32	1.0	-				x											83	0	0	0				
6.42	1.0	-				x											83	0	0	0				
6.51	1.0	-				x											83	0	0	0				
6.52	1.0	-				x											83	0	0	0				
6.61	2.4	-			x												83	3.90	26	150				
6.63	2.4	-			x												83	6.70	48	139				
6.65	2.0	-															83	2.40	26	92				
6.66	1.4	-		x													83	3.15	38	82				
7.9	2.2	-															83	4.20	35	120				
7.14	1.8	-		x	x												83	3.40	29	117				
7.42	2.0	-															83	3.75	35	107				
7.63	2.0	-			x												88	4.20	30	140				

**Priloga 2:** Zbirni pregled testiranja starih sort primorskega rajona

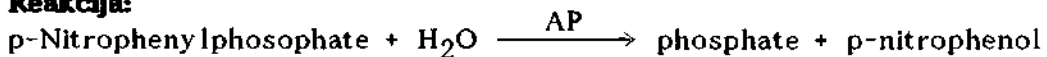
zap. št	sorta	namen, lokacija št. trsov	indeksiranje na GFV	ELISA		
				GFV +	GFV -	GLRaV I
1	zelen	67 Slap - selekcija močno osipanje	∅	6+	61-	∅
		5 Lože muzejski nasad	+	4+	1-	∅
2	pinela	2 genska banka	+	2+		∅
		15 selekcija -		2+	10-	
		1 Lože		1+		
3	glera	3 genska banka Lože	+	1+		∅
		5 A. vrt		4-	1-	
4	vitovska grganja	9 Kras - selekcija		3+	6-	∅
		1 A. vrt - gen. banka			1-	-
5	pagadebiti	2 A. vrt genska banka	-		2-	∅
6	klarnica	2 A. vrt	-	2+		-
7	pika	1 A. vrt	-	1+		-
Skupaj		22 genska banka		15+	7- (68%)	3+
		91 selekcija		11+	80- (14%)	∅

Legenda: + pozitivni test  
 - negativni test  
 ∅ test ni bil opravljen

**Priloga 3:** Shema uporabljenega ELISA testa (double antibody sandwich method)

- 1. Oblaganje plošč z antitelesi**  
dodaj 200  $\mu$ l (100  $\mu$ l) mešanice pufra in IgG v vsako luknjico in tesno prekrij ploščo
- 2. Inkubacija** pri 30°C za 4<sup>h</sup> (37°C za 2<sup>h</sup>)
- 3. Pranje po inkubaciji** - izprazni plošče - in jih 3x do 4x pazljivo izperi s pralnim pufrom (250 - 500  $\mu$ l/luknjico)
- 4. Dodajanje rastlinskega ekstrakta**  
na 1 g listov dodaj 10 ml ekstr. pufra zgneti in precedi, ter dodaj 200  $\mu$ l/luknjico
- 5. Inkubacija pri 6°C** za 16<sup>h</sup> (možno tudi 4<sup>o</sup> - 10<sup>o</sup> in 12<sup>h</sup> - 20<sup>h</sup>)
- 6. Pranje** kot zgoraj
- 7. Dodajanje konjugiranega IgC**  
Razredči conj.- IgG v konjugantnem pufri in dodaj 200  $\mu$ l/luknjico, tesno prekrij
- 8. Inkubacija pri 30°C za 5<sup>h</sup>** (4<sup>h</sup> - 37°C)
- 9. Pranje** isto kot zgoraj
- 10. Dodajanje encimskega substrata**  
dodamo 200 $\mu$ l p-nitrophenylphosphate substrata v diethanolnem pufri
- 11. Inkubacija**  
60 min pri sobni temperaturi v temi!
- 12. Ustavljanje reakcije**, če je potrebno s 50  $\mu$ l/luknjico 3M NaOH
- 13. Vrednotenje**, vizuelno po rumeni barvi ali s spektrofotometrom pri 405  $\mu$ m

**Reakcija:**





**Priloga 4:** Evidenca ELISA testa (primer)

- a) seznam vzorcev - šifriranje
- b) izpisek OD vrednosti iz čitalca in shema
- c) rezultati
- d) fotografija (pogojno) sl. 4

a) Seznam vzorcev - šifriranje - 13.julij.1989 - GFV - št. 3

sifra	vzorec - trs	sifra	vzorec - trs
86	Rb 3.84	110	Rf 6 R-T
87	Rb 2.81	111	Rf T
88	Rb 7.4	112	Rf 1 RT
89	Rb 1.27	113	Pika
90	Rb 1.74	114	Rb 2.29
91	6.25	115	Rb 7.29
92	6.49	116	Mlvz 2.20 K+
93	7.44	117	Rb 5.80
94	Vit. grg. 4	118	Rb 5.68
95	L. rizl. Loze	119	Rb 4.70
96	Vit. grg. 18	120	Rb 5.84
97	Rb 6.16	121	Rb 4.70
98	Rb 7.25	122	Rb 3.4
101*	Rf IV/30-R	123	Rb 1.61
102	Rf II/56-R	124	Rb 3.40
103	Rf I/45-R	125	Rb 1.24
104	Rf 28 R-ŠT	126	Rb 6.26
105	Rf 19 R-ŠT	127	Rb 5.70
106	Rf 17 R-ŠT	128	Rb 2.84
107	Rf 27 R-K	129	Rb 3.11
108	Rf 24 R-K	130	Rb 5.82
109	Rf 1	K1+	- ekst. pufer BIOREBA 2
		K2+	PVP +2% nikotin
		K3+	PVP brez nikotina
		K4+	ekst. pufer BIOREBA1
		K5+	BIOREBA 2 + 2% nikotin

\* vzorca 99, 100 izvzeta zaradi večjega števila pufrov

b) Priloga 4: Izpisek OD vrednosti iz čitalca

DYNATECH LABORATORIES

GFV '45 MR700 PRINTOUT OPTION 1

DUAL MODE REF FILTER 5 TEST FILTER 2 THRESHOLD = 1.99 CALIBRATION = 1.00

PLATE ID: A. 3. DATE: 13.7.89 OPERATOR: KIS. Lab.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	0.003	0.171	0.151	0.150	0.155	0.152	0.149	<u>0.398</u>	<u>0.440</u>	0.186	0.172
B	0.158	0.150	<u>0.975</u>	<u>0.488</u>	0.144	<u>1.630</u>	<u>0.599</u>	<u>0.194</u>	0.170	0.166	0.184	0.176
C	0.136	0.145	0.168	0.162	0.148	0.160	0.152	0.155	0.184	0.169	0.174	0.213
D	0.146	0.151	0.175	0.148	0.151	0.157	0.166	0.162	0.163	0.174	0.185	0.161
E	0.153	0.153	<u>OVER</u>	<u>OVER</u>	0.195	0.176	0.211	0.210	0.174	0.174	0.177	0.281
F	<u>0.735</u>	<u>0.605</u>	0.167	0.169	0.167	0.261	<u>OVER</u>	<u>OVER</u>	<u>0.611</u>	<u>0.762</u>	0.168	0.281
G	0.161	0.153	0.200	0.180	<u>0.461</u>	0.188	0.188	0.177	0.202	0.182	0.174	0.170
H	0.175	0.172	0.194	0.186	0.193	0.223	0.269	0.275	0.293	0.179	0.174	0.174

\* INDICATES UNREAD WELL  
# INDICATES COMBINED DATA

DYNATECH LABORATORIES

c) Rezultat ELISA - 13.7.1989 - GFV - ploščica št. 3  
 - rangiranje OD vrednosti max → min  
 - E+ / E-

sifra	vzorec	OD	Op.	sifra	vzorec	OD	Op.
116	Mlvz 220	over		130	Rb 5.82	174	
108	Rf 24 R	over		106	Rf 17 R-ŠT	173	
K 4	kontrola	1.630	TRIS HCl	124	Rb 3.40	173	
K 1+	kontrola	0,975	TRIS HCl	123	Rb 1.61	172	
117	Rb 5.80 VBG	0.686		114	Rb 2.29	168	
113	Pika	0.670		92	Rb 6.49	168	
K 5+	kontrola	0.599		105	Rf 19 R-Š	168	
K 2+	kontrola	0.488	PVP+nikotin	98	Rb 7.25	166	
127	Rb 5.70 VBG	0.461		95	L. rizl. Loče	165	
89	Rb 1.27	0.419	E+ / E-	K+	St. G.	162	
128	Rb 2.84	0.272	rob	104	Rf 18-R-Š	161	
129	Rb 3.11	0.236	rob	86	Rb 3,84	161	
112	Rf 1R-T	0.229	rob	103	Rf I. 45-R	160	
118	Rb 5.68	0.224	rob	119	Rb 4.70	157	
115	Rb 7.29	0.214		91	Rb 6.25	154	
110	Rf GRT	0.210	rob	96	Vtg 18	154	
126	Rb 6.26	0.210		107	Rf 17-R-K	153	
P	pufer-čisti	0.194		97	Rb 6.16	153	
101	Rf IV/30-R	0.193		87	Rb 2.21	152	
122	Rb 3.4	0.192		88	Rb 7.4	151	
120	Rb 5.84	0.190		102	Rf II.56-R	148	
125	Rb 1.24	0.190		K 3+	Kontrola	144	PVP brez nikot.
P	pufer-čisti	0.188		94	VTG-4	140	
109	Rf R-T	0.184					
121	Rb 4.70	0.182					
93	Rb 7.44	0.180					
90	Rb 1.74	0.179					
111	Rf R-T	0.174					



Slika 1: Znakovi bolesti kužne izrojenosti na K+ trsu - Mlvz 2.7



slika 2: Tipi rebule

levo - tip C - zelena osipka  
v sredini Č - rumena osipka  
desno A - rumena rebula



Slika 3: Zakrnela plodnica tipa nore rebule VBG



Slika 4: Evidenca ELISA testa

## ŽIVLJENJEPIŠ

Rojena sem bila 6. junija 1949 na Viru pri Domžalah kot druga hči v družini Ljudmile in Jurija Korošca. Po končani gimnaziji v Ljubljani sem se l. 1968 vpisala na Biotehniško fakulteto v Ljubljani - na agronomski oddelek, kjer sem v juniju 1974 diplomirala na smeri sadjarstvo - vinogradništvo.

Že med študijem sem se vključila v strokovno delo na katedri za vinogradništvo, kjer sem se takoj po diplomi zaposlila kot pripravnik - raziskovalec. Vključena sem bila v delo zdravstvene selekcije vinske trte, ki jo je takrat kot eden od prvih v Jugoslaviji začel prof. dr. L. Hrček. Začela sem z eksperimentalnim delom biološke sekcije v fakultetnem poskusno-pedagoškem objektu Ampelografski vrt v Novi Gorici. V letu 1976 sem dobila enoletno štipendijo RSS (sklad Borisa Kidriča) za podiplomsko izpopolnjevanje v ZDA. Kot nadaljevanje jugoslovanskega projekta o zdravstveni selekciji vinske trte sem dobila mesto na državni univerzi Davis v Kaliforniji. Pod mentorstvom dr. A.C. Goheen-a sem pripravila nalogo s področja indeksiranja viroz in poslušala predavanja iz fitopatologije in vinogradništva. S priznanimi izpiti iz tega študija in z delno opravljeno magistrsko nalogo sem se po vrnitvi v l. 1978 vpisala na interdisciplinarni program Biologija na Sveučilištu v Zagrebu. Tu sem pod mentorstvom prof. dr. Ane Šarić v juliju 1980 obranila magistrsko nalogo iz indeksiranja vinske trte na viroze.

Še med bivanjem v ZDA sem dobila naziv asistenta za področje vinogradništva na Biotehniški fakulteti in po vrnitvi tudi opravljala vaje iz vseh predmetov tega področja. Poleg tega sem sodelovala pri 28 diplomskih nalogah pri izdelavi podiplomskega programa za področje vinogradništva. Od l. 1980 sem vodila raziskovalni nalogi Selekcija vinske trte glede na viroze oz. Proučevanje introduciranih kultivarjev vinske trte.

Preko Poslovne skupnosti za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije, kjer sem sodelovala v raznih strokovnih organih, sem opravljala naloge s področja ampelografije, priznavanja introduciranih kultivarjev in klonov ter trsničarstva. V letu 1983 sem tudi prevzela vodstvo Ampelografskega vrta, kjer sem do zdaj usposobila rastlinjak, termotkomoro, v obnovi vinograda pa razširila kolekcijo klonskega materiala in obnovila muzejski nasad starih sort.

Od l. 1984 zasedam mesto višjega strokovnega sodelavca za področje vinogradništva in s ciklusi predavanj in vaj sodelujem v pedagoškem procesu.

