

UNIVERZA V NOVI GORICI
VISOKA ŠOLA ZA VINOGRADNIŠTVO IN VINARSTVO

**VPLIV OKUŽBE Z VIRUSOM PAHLJAČAVOSTI LISTOV
VINSKE TRTE (GFLV) NA KAKOVOST GROZDJIA
SORTE REFOŠK IN POKALCA (*VITIS VINIFERA* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Matjaž ŠČUREK

Mentor: doc. dr. Maruša Pompe Novak

Nova Gorica, 2014

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Maruši Pompe Novak za odlično mentorstvo in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala tudi mag. Maji Cigoj za veliko pomoč, nasvete, ter spremstvo na vsakem koraku od začetka do konca izdelave diplome.

Iskrena hvala tudi vsem drugim profesorjem, ki so na kakršen koli način pomagali pri izdelavi diplomskega dela. Tu bi se precej rad zahvalil doc. dr. Branki Mozetič Vodopivec, doc. dr. Paolo Silvilotti in dr. Kajetanu Troštu za dragocene nasvete.

Hvala moji družini za to, da sem se moral hitro naučiti, da je znanje edina stvar kar nas lahko krasi in je edino bogastvo, katerega nam ne more nihče ukrasti.

Na koncu pa seveda iskrena hvala tudi Vinskim bratom, sošolcem in sošolkam, s katerimi smo se borili skozi ta študijska leta, da lahko sedaj mi vodimo druge po prelepi poti vinske kulture.

POVZETEK

Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) povzroča bolezen imenovano kužna izrojenost vinske trte (Grapevine degeneration disease). Bolezen kužna izrojenost vinske trte je razširjena po vseh vinorodnih regijah po svetu in je ena najresnejših virusnih boleznih vinske trte (Andret - Link in sod., 2004), saj povzroča zmanjšano količino pridelka (lahko tudi do 80%) ter skrajšano življenjsko dobo trsov (Pearson and Goheen, 1998). Kljub poročilom o vplivu okužbe z GFLV na kvaliteto pridelka, pa je zelo malo eksperimentalnih podatkov o vplivu okužbe z GFLV na količinske in kakovostne parametre grozdja. V okviru diplomskega dela smo analizirali vpliv okužbe z GFLV na količino in kakovost grozdja z merjenjem osnovnih kakovostnih parametrov grozdja (količina sladkorjev, vrednost pH in količina skupnih kislin), polifenolov in parametrov barve pri sortah Refošk in Pokalca. Poleg tega smo analizirali tudi vpliv okužbe z GFLV na kakovost grozdja pri dveh različnih gojitvenih oblikah (enojni in dvojni Guyot) sorte Pokalca. Ugotovili smo, da je okužba z GFLV vplivala na zmanjšanje količine pridelka, povečanje vrednosti pH in zmanjšanje vsebnosti kislin v soku grozdnih jagod ter pri gojitveni obliki enojni guyot tudi na povečanje vsebnosti antocianov in skupnih fenolov v moštu.

SUMMARY

The grapevine fanleaf virus (GFLV) is the causal agent of grapevine fanleaf degeneration disease. This disease is extended to all wine-growing regions in the world and it is one of the most serious viral diseases of the grapevine (Andret - Link in sod., 2004), causing a serious reduction in yields (up to 80%) and a shortened productive lifespan of vineyards (Pearson and Goheen, 1998). Despite the reports on the impact of the infection with GFLV on the quality of the harvest, there is only a few experimental data to evaluate the impact of the infection with GFLV on the quantitative and qualitative parameters of the grapes. Through this undergraduate thesis we analyzed the impact of the infection with GFLV on the quantity and quality of the grapes by measuring the basic qualitative parameters of the grapes (the quantity of sugars, the pH value and the quantity of common acids), polyphenols and color parameters in the vine species Refosco and Pokalca. Furthermore we analyzed also the impact of the infection with GFLV on the quality of the grapes in two different cultivation forms (single and double Guyot) of the vine species Pokalca. The analysis shows that the infection with GFLV caused a reduction of the harvest, increased the pH value, decreased the content of acids in the grape juice and, in the cultivation form of single guyot, increased the the content of anthocyanin and common phenols in the must.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
SUMMARY	IV
KAZALO VSEBINE	V
SEZNAM TABEL	VII
SEZNAM SLIK	VIII
OKRAJŠAVE	X
SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 Povod za delo	1
1.2 Namen diplomskega dela	2
2 TEORETIČNE OSNOVE	3
2.1 Sorti Refošk in Pokalca	3
2.1.1 SORTA REFOŠK.....	3
2.1.2 SORTA POKALCA	4
2.2 Virus pahljačavosti listov vinske trte	5
2.2.1 OMEJEVANJE IN KONTROLA ŠIRJENJA OKUŽBE Z GFLV.....	6
2.3 Kakovostni parametri grozdja	7
2.3.1.1 Masa jagod	7
2.3.1.2 Koncentracija sladkorja.....	8
2.3.1.3 Skupne kisline	8
2.3.1.4 Vrednost pH	9
2.3.1.5 Fenolne spojine	9
3 EKSPERIMENTALNI DEL	11
3.1 Izbor sort, vinogradov in trsov	11

3.2	Izbor gojitvenih oblik	15
3.2.1	ENOJNI GUYOT	16
3.2.2	DVOJNI GUYOT.....	16
3.3	Štetje števila grozdov in meritve teže pridelka.....	16
3.4	Meritve mase jagod.....	17
3.5	Meritve vsebnosti sladkorjev	17
3.6	Meritve vrednosti pH.....	18
3.7	Meritve količine skupnih kislin	18
3.8	Meritve količine fenolnih spojin	18
3.9	Meritve barve	19
3.10	OBDELAVA PODATKOV	21
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	22
4.1	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA KOLIČINO PRIDELKA	22
4.2	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA TEŽO JAGOD	23
4.3	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA ŠTEVILO GROZDOV NA TRS	24
4.4	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST SLADKORJA V GROZDJU 25	
4.5	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST TITRACIJSKIH KISLIN.	26
4.6	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VREDNOST pH.....	26
4.7	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST FENOLNIH SNOVI V GROZDJU.....	28
4.8	VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA BARVO GROZDJA	29
5	ZAKLJUČKI	32
6	VIRI	33

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Izbrani trsi sorte Refošk v vinogradu v Komnu	13
Tabela 2: Izbrani trsi sorte Pokalca v vinogradu v Prepottu.....	13

SEZNAM SLIK

Slika 1: Lokacija vinograda v Komnu (Google maps..., 2013).....	11
Slika 2: Lokacija vinograda v Preppottu (Google maps..., 2013)	12
Slika 3: Zimska rez vinske trt: levo gojitvena oblika dvojni Guyot, desno gojitvena oblika enojni Guyot (Foto: vinodiary.com, 2013).....	15
Slika 4: Refraktometer za določanje vsebnosti sladkorja (Foto: Matjaž Ščurek, 2013). 17	
Slika 5: Spektrofotometer za določanje skupnih fenolov (Foto: Matjaž Ščurek, 2013). 19	
Slika 6: Določanje parametrov barve z ekstrakcijo antocianov (Foto: Matjaž Ščurek, 2013).....	20
Slika 7: Teža pridelka pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$	22
Slika 8: Teža 100 jagod pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$	23
Slika 9: Število grozdov na trs pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja.....	24
Slika 10: Vsebnost sladkorja pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja.....	25
Slika 11: Vsebnost titracijskih kislin pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$	26
Slika 12: pH vrednost pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$	27

Slika 13: Vsebnost fenolov pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$	29
Slika 14: Absorbanca pri 420 nm metanolnih ekstratov zdravih in okuženih trsov sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$	30
Slika 15: Absorbanca pri 520 nm metanolnih ekstratov zdravih in okuženih trsov sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$	31

OKRAJŠAVE

°Brix= Brixove stopinje

°Kl= Klosterneuburške stopinje

°Oe= Oechslejeve stopinje

CP= Coat protein, plaščni protein

GFLV= Grapevine fanleaf virus, virus pahljačavosti listov vinske trte

MP= Movement protein, gibalni protein

NAR= Neto asimilacija rastline

ORF= Open reading frame, odprt bralni okvir

RNA= Ribonucleic acid, ribonukleinska kislina

RS= Republika Slovenija

VPG= Virusni protein

SIMBOLI

% = procenti

°C = stopinje Celzija

1 UVOD

1.1 Povod za delo

Kot vse druge kulturne rastline je tudi vinska trta (*Vitis vinifera* L.) izpostavljena vplivom okolja ter boleznim in škodljivcem, ki nenehno ogrožajo količino in kakovost pridelka. Glede na to, da je vinska trta trajnica, je izpostavljena boleznim in škodljivcem skozi dolgo časovno obdobje. Poleg tega na vinsko trto vinogradniki z željo po velikih pridelkih in hitrem mladostnem razvoju vinograda vplivajo z uporabo hormonov in drugih pospeševalcev razvoja ter pretiranim gnojenjem in okolje s slabšo svojo kakovostjo (kisli dež, učinek tople grede, ozonske luknje, emisije žvepla in dušikovih spojin). Zato si sodobnega vinogradništva brez ustreznega varstva vinske trte pred boleznimi in škodljivci skoraj ne moremo predstavljati (Vršič in Lešnik, 2005).

Med žive ali biotske faktorje, ki napadajo vinsko trto, štejemo povzročitelje bolezni (bakterije, glive, fitoplazme, viruse in viroide) ter škodljivce (žuželke, pršice, ogorčice itd.). V teh primerih je bolezen rezultat interakcij med občutljivim gostiteljem in patogenim organizmom. Na vinski trti se lahko pojavijo tudi bolezenska znamenja, ki jih povzročajo abiotski dejavniki, kot so neravnotežje hranil, okolijski stres ali kemična toksičnost (Pearson in Goheen, 1998). Bolezni vinske trte obstajajo že od časov, ko so ljudje vinsko trto udomačili. Takrat so bile bolezni, ki so danes prisotne po celem svetu, omejene na manjša vinorodna področja po Evropi. Virusi so se lahko širili le z naravnim načinom prenosa - s prenašalci, saj je bila trgovina s sadilnim rastlinskim materialom zelo omejena in nerazvita, zato do prenašanja povzročiteljev bolezni na daljše razdalje ni prihajalo. Po letu 1860 pa se je iz Amerike v Evropo prenesla trtna uš (*Phylloxera*, *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch.), ki je do leta 1880 uničila večino evropskih vinogradov. Začelo se je aktivno iskanje odpornih hibridov vinske trte in s tem mešanje rastlinskega materiala s cepljenjem različnih primerkov vinske trte. Kot odporni so se izkazali hibridi med ameriškimi divjimi in francoskimi trtami, zato so jih uporabili kot podlage na katere so cepili različne dragocene kulturne sorte vinske trte ter obnovili evropske vinograde. Žal pa so se hkrati z mešanjem rastlinskega materiala prenesli in razširili tudi virusi, saj

kljub vizualni selekciji trsov, latentno okuženi trsi niso bili izločeni (Uyemoto in sod., 2009).

Eden izmed gospodarsko pomembnih virusov razširjenih po vseh vinorodnih regijah po svetu je virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), ki povzroča bolezen imenovano kužna izrojenost vinske trte (Grapevine degeneration disease) (Andret - Link in sod., 2004). Bolezen kužna izrojenost vinske trte povzroča zmanjšano količino pridelka (lahko tudi do 80%) ter skrajšano življenjsko dobo trsov (Pearson and Goheen, 1998). Kljub poročilom o vplivu okužbe z GFLV na kvaliteto pridelka, pa je zelo malo eksperimentalnih podatkov o vplivu okužbe z GFLV na količinske in kakovostne parametre grozdja.

1.2 Namen diplomskega dela

Cilj diplomskega dela je bil analizirati vpliv okužbe z GFLV na kakovost grozdja z merjenjem osnovnih kakovostnih parametrov grozdja (količina sladkorjev, vrednost pH in količina skupnih kislin), polifenolov in parametrov barve pri sortah Refošk in Pokalca.

Poleg tega je bil cilj diplomskega dela analizirati vpliv okužbe z GFLV na kakovost grozdja pri dveh različnih gojitvenih oblikah (enojni in dvojni Guyot) sorte Pokalca.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Sorti Refošk in Pokalca

2.1.1 SORTA REFOŠK

Sorta vinske trte (*Vitis vinifera* L.) Refošk ima sinonim teranovka ter številne tuje nazive, kot so refošk istrski, teran, istrijanec, Terrano d`Istra, Refosko del Carso, Refosko d`Istra. Različni t. i. »italjanski« refoški (npr. refosco di peduncolo rosso, refoscone, refosco grosso, refosco nostrano, refosco di Faedis) pa nimajo ničesar skupnega z »našim« refoškom..

Po geografski razvrstitvi spada sorta Refošk v črnomoško geografsko skupino *Proles pontica* in podskupino *balcanica*. Za podskupino *balcanica* je značilen povprečno velik, zbit grozd, jagode pa so povprečno velike in okrogle. Za sorte, ki spadajo v to skupino, je značilna delna brezpečkatost, pečke so drobne ali povprečno velike in hruškaste oblike. Za grozdni sok je značilen manjši delež sladkorja in več kislin (Cindrić in sod., 2000). Geografski izvor sorte Refošk, ki jo gojimo pri nas, ni znan (Robinson, 1999).

Gojenje sorte Refošk je razširjeno v slovenskem primorju (v kraškem in koprskem vinorodnem okolišu), v hrvaški Istri in v severno-vzhodnem delu Italije. V kraškem in koprskem vinorodnem okolišu se pojavlja v dveh različicah, in sicer kot sorta Refošk z zeleno in sorta Refošk z rdečo pecljevino. Kljub temu, da različni avtorji trdijo, da sta to dve povsem različni sorti, prva naj bi bila deklarirana kot teran, druga kot refošk, še vedno vprašanje ni dokončno razjasnjeno na nivoju analiz DNA (Hrček in Korošec Koruza, 1996).

Sorta Refošk je glede na dozorevanje pozna sorta (Avramov in Briza, 1988). Čas zorenja je od sredine septembra do prve polovice oktobra (Ripper, 1912). Masa grozda je povprečno med 150 in 250 g. Trta daje obilen in reden pridelek. Je odporna proti oidiju in gnilobi, znatno manj pa proti peronospori. Deževno in hladno jesensko vreme ji ni po godu. Proti pozebi ni odporna. Skladnost z ameriškimi podlagami je dobra (Ripper, 1912).

Sorta Refošk je bujne rasti. Za tla ni preveč občutljiva. Na težkih in mokrih tleh ne pridelamo veliko pridelka. Posebno ji ustrezajo zračne zemlje, bogate z rudninskimi snovmi. Posebno kakovostno vino pridelamo na tleh, ki so bogata z železom. Ob cvetenju se rada osipa, med zorenjem pa se grozdje osuši in pecljevina gnije. Pogosto jo napadajo cikade in rdeča sadna pršica. Ker sodi med bujne sorte, jo moramo previdno gnojiti z dušikom, posebno še zaradi nagnjenosti k osipanju. S fosforjevimi in kalijevimi gnojili jo lahko zelo močno gnojimo, tudi z borom nekoliko izboljšujemo oploditev. Sorta Refošk zahteva sorazmerno dolgo rez (7-10 očes) in zelo dobro prenaša visoke gojitvene oblike. Na Krasu sorto Refošk režejo na šparone s 6 do 7 očes. Sorta Refošk daje kakovostno rdeče obarvano vino z veliko vsebnostjo kisline, ki deluje osvežujoče in trpko (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Po zastopanosti sort v Sloveniji je na prvem mestu sorta Laški rizling. Sorta Refošk je v Sloveniji zastopana s 5,9 %, med rdečimi sortami pa je vodilna. V primorski vinorodni deželi je sorta Refošk s 16,9 % deležem vodilna sorta. V vinorodnem okolišu Kras zaokrožuje 72,3 % in v koprskem vinorodnem okolišu 48,2% celotnega sortimenta (Škvarč in sod., 2002).

2.1.2 SORTA POKALCA

Sorta Pokalca se v Italiji imenuje Schioppettino, uporabljata pa s še sinonima Črna rebula in Ribolla nera. Ime verjetno izvira iz hrustljivosti kožice jagod in opisuje pokanje jagod med zvečanjem le-teh.

Sorta Pokalca je glede na dozorevanje pozna sorta. Grozdje zori v prvi dekadi oktobra. Masa grozda je povprečno okoli 150 g. Trta je bujna in daje reden pridelek. Dobro raste na dobro izpostavljenem gričevjem območju. Precej občutljiva je na peronosporo, napadejo jo pa tudi druge bolezni. Značilnost grozdja oziroma mošta so dokaj nizke kisline in povprečno visoki sladkorji.

Vršiček mladike je pri sorti Pokalca odprt, zelene barve z rahlo dlakavimi listi. List je petdelen s ploščatim profilom, peceljni sinus ima v obliki črke V, spodnja stran lista je rahlo dlakava. Grozd je srednje velik, stožčast, z dvema vejama, kompakten, pecelj je kratek. Jagode so majhne, modro temne barve, s trdnimi kožicami in brezbarvnim sokom (Pucciarelli in sod. 2010).

Sorta Pokalca izhaja iz Furlanije, točneje iz območja med Prepottom in Goriškimi Brdi. Čeprav so našli zgodovinske reference te sorte že iz leta 1282, sorta Pokalca nekaj časa ni bila opisana v nobenih katalogih vinske trte. Nato so jo leta 1863 opisali v katalogu vinske trte iz Furlanije kot Ribolla nera. Pod enakim imenom so jo nato spet omenili leta 1921, ko jo je komisija za oceno kvalitete grozdja uvrstila med trte smiselne za pridelovanje grozdja za predelavo v kvalitetno vino.

Kot vse avtohtone sorte so v začetku 20. stoletja tudi sorto Pokalca hitro zamenjale bolj produktivne sorte iz Francije, v taki meri, da se je sorta Pokalca skoraj izgubila in izumrla. Rešili so jo predvsem raziskovalci in tradicionalni vinogradniki, ki so se zavedali pomembnosti avtohtone posebnosti in kakovosti krajevnih vinskih sort. Leta 1981 so jo uvrstili med priporočene sorte vinske trte v provinci Videm.

Danes je sorta Pokalca prisotna predvsem v kraju Prepotto, kjer vinogradniki in vinarji iz nje pridelujejo zelo tipično vino. Ta vinorodni kraj, ki spada v vinorodni okoliš Friuli Colli Orientali, je edini vinorodni kraj, kjer se pridelujejo le eno sorto vinske trte, to je italijansko sorto Pokalca (Pucciarelli in sod. 2010).

2.2 Virus pahljačavosti listov vinske trte

Virus pahljačavosti listov vinske trte (Grapevine fanleaf virus, GFLV) povzroča bolezen, imenovano kužna izrojenost vinske trte (Grapevine degeneration complex), ki je ena najresnejših virusnih boleznih, ter tudi najstarejša znana bolezen vinske trte. Razširjena je po vseh večjih vinorodnih regijah po svetu. Bolezen povzroča zmanjšan pridelek (kdaj tudi do 80%) ter skrajša življenjsko dobo trsov. Kljub poročilom o vplivu okužbe z GFLV na kvaliteto pridelka, pa je zelo malo eksperimentalnih podatkov o vplivu okužbe z GFLV na količinske in kakovostne parametre grozdja. Pri sorti Callet so izmerili 20% manj pridelka na z GFLV okuženih trsah v primerjavi z zdravimi, pri sorti Manto Negro pa

manjšo vsebnost antocianov v z GFLV okuženem grozdju v primerjavi z zdravim (Cretazzo et al., 2009).

GFLV se v vinogradih na kratke razdalje prenaša s talno ogorčico (*Xiphinema index*), ki se hrani na koreninah vinske trte, na daljše razdalje pa ga prenašamo ljudje z okuženim sadilnim materialom, lahko pa tudi z okuženo kmetijsko mehanizacijo (Andret-Link in sod., 2004; Hewitt in sod., 1958).

Vinska trta se na okužbo z virusom GFLV odzove z različno močnimi bolezenskimi znamenji, kar je posledica razlik v fiziološkem stanju trsa, pri katerem pride do okužbe z GFLV, možnih interakcijah z drugimi virusi (Šutic in sod., 1999) ter vplivov okolja (Blažina, 1992; Bovey in sod., 1980), možno pa je, da sta tip in jakost bolezenskih znamenj odvisna tudi od sorte vinske trte in od genotipske različice virusa, ki okužuje trs (neobjavljeno, Maruša Pompe Novak).

2.2.1 OMEJEVANJE IN KONTROLA ŠIRJENJA OKUŽBE Z GFLV

Obstajajo različni načini za kontrolo in omejevanje širjenja okužbe z GFLV. Najpomembnejše je testiranje trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov ter uporaba zdravega (brezvirusnega) sadilnega materiala (Urek in Hržič, 1998). V kolikor zdravega sadilnega materiala ni na voljo, je možno pridobivanje brezvirusnega sadilnega materiala s termoterapijo, to je s toplotno obdelavo štiri tedne na temperaturi 38-40 °C. Obstaja pa tudi možnost pridobivanja brezvirusnega sadilnega materiala z *in vitro* kulturo meristema ali s somatsko embriogenezo (Martelli in Boudon-Padieu, 2006), pri kateri je učinkovitost pri vzgoji brezvirusnega materiala skoraj 100 % (Gambino in sod., 2009).

Eden izmed načinov omejevanja širjenja GFLV je zatiranje njegovega prenašalca, ogorčice *X. index*, vendar je to v obstoječem vinogradu težje izvedljivo (Pearson in Goheen, 1998). Zatiranje ogorčic je možno z uporabo kemičnih sredstev – nematocidov, vendar velikokrat učinkovitost ni najboljša, saj ogorčice bivajo globoko v tleh, kamor nematocidi težko prodrejo (Urek in Hržič, 1998). Poleg tega ta metoda tudi ni najbolj

sprejemljiva z ekološkega stališča. Pomembnejša je izbira površine brez ogorčic pred zasaditvijo vinograda (Pearson in Goheen, 1998; Andret-Link in sod. 2004a). Pri saditvi vinograda na površino izkrčenega okuženega vinograda, kjer je bila prisotnost ogorčice okužene z GFLV dokazana, je potrebna vsaj 10 letna doba mirovanja tal, saj lahko z GFLV okužene ogorčice *X. index* preživijo več let tudi ob odsotnosti gostitelja (Demangeat in sod., 2005).

Pomembna je tudi vzgoja podlag, odpornih proti GFLV in ogorčici *X. index*, za kar so uporabili nekatere divje vrste iz rodov *Vitis* in *Muscadinia*, ki so odporne na GFLV in ogorčico *X. index* (Pearson in Goheen, 1998).

Sodobne možnosti za omejevanje njegovega širjenja so predvsem v vzgoji gensko spremenjene vinske trte, odporne na GFLV, čemur je bilo v zadnjem času posvečenih veliko raziskav. Do sedaj je raziskovalcem uspelo pripraviti nekaj podlag odpornih na GFLV, katerih odpornost temelji na v rastlinski genom vstavljenem genu, ki kodira plaščni protein GFLV. S tem pa so se odprla nova okoljevarstvena vprašanja o potencialnem tveganju povezanem z izpustom gensko spremenjenih trsov v okolje.

2.3 Kakovostni parametri grozdja

2.3.1.1 Masa jagod

Oblika, velikost, masa in barva jagode so pomembne sortne značilnosti. Vse te lastnosti so odvisne tudi od podnebnih in talnih razmer ter agrotehničnih ukrepov. Jagoda ima približno 10 % jagodne kožice, 86 do 90 % mesa in 3 do 4 % pečk (Vršič in Lešnik, 2001). Med zorenjem grozdja je potrebno maso jagod tehtati, saj ta kaže na stopnjo zrelosti. Med zorenjem masa jagod narašča do faze polne zrelosti, v fazi prezrelosti pa se zmanjšuje. V primeru, da je velikost značilna za določeno sorto, sladkorna stopnja pa majhna, je to lahko zaradi prevelike obremenitve ali neprimerne gnojenja zemlje (Boulton in sod.,

1996). Stehta se maso 100 jagod, ki predstavljajo povprečen vzorec iz vinograda. Ko masa jagod ne narašča več, je grozdje v polni zrelosti. Če takrat grozdja ne potrgamo, začne le-to izgubljati na masi, vseeno pa lahko pridobiva na kakovosti (Bavčar, 2006).

2.3.1.2 Koncentracija sladkorja

Sladkor se transportira v grozdno jagodo v obliki disaharida saharoze, ki pa se takoj hidrolizira v enostavnejši heksozi, glukozo in fruktozo. V grozdnem soku sta tako predvsem glukozna (grozdni sladkor) in fruktoza (sadni sladkor), ki sta glavni vir hrane za kvasovke pri alkoholnem vrenju. Koncentracija sladkorjev v grozdni jagodi med dozorevanjem narašča. Meritev koncentracije sladkorjev z refraktometrom je največkrat opravljena analiza grozdnega soka. Izražamo jo v Oechslejevih stopinjah ($^{\circ}\text{Oe}$), v Brixovih stopinjah ($^{\circ}\text{Brix}$) ali v Klosterneuburških stopinjah ($^{\circ}\text{Kl}$). Opravimo jo lahko na terenu direktno iz jagod, boljše informacijo pa dobimo, če reprezentativni vzorec jagod stisnemo, filtriramo, meritev vsaj trikrat ponovimo in izračunamo povprečje (Bavčar, 2006).

2.3.1.3 Skupne kisline

Kisline v moštu so poleg sladkorjev pomemben dejavnik za ugotavljanje tehnološke zrelosti grozdja (Šikovec, 1985).

V grozdnem soku prevladujejo organske kisline, od katerih sta v času trgatve najpomembnejši vinska in jabolčna kislina. Skupaj predstavljata od 70 do 90% vseh kislin v grozdju. Vinska kislina se v začetku zorenja akumulira v kožici jagode in v mesu takoj pod njo, medtem ko se jabolčna kislina nahaja predvsem v mesu blizu pečk. Med dozorevanjem grozdja je bolj stabilna vinska kislina kot jabolčna kislina. Koncentracija skupnih kislin se z dozorevanjem grozdja zmanjšuje. Predvsem v vinorodni deželi Primorska v zelo vročih letih vinogradniki pazijo, da koncentracija skupnih kislin ne upade preveč zaradi pospešene porabe jabolčne in izjemoma celo vinske kisline. Zato je

v takšnih pogojih koncentracija skupnih kislin odločilna za določitev datuma trgatve (Bavčar, 2006).

2.3.1.4 Vrednost pH

Za kakovost in stabilnost vina je pomembna kislost mošta oziroma vina, ki jo označujemo z vrednostjo pH. Od vrednosti pH so odvisni mnogi procesi v vinu in tudi potrebni ukrepi v času negovanja in hranjenja vina (Vodovnik in Vodovnik, 1999).

Vrednost pH je definirana kot negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov in je indikator razsežnosti, do katere je bila mešanica kislin nevtralizirana med dozorevanjem. Z dozorevanjem grozdja se pH veča (Bavčar, 2006).

2.3.1.5 Fenolne spojine

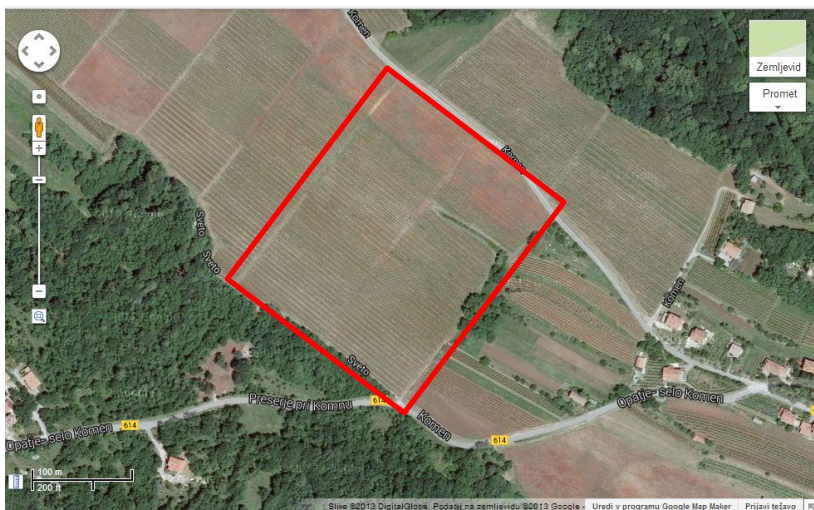
Za pridelovalce rdečih vin je pomembno poznavanje vsebnosti fenolov v grozdju. Posebno v rdečem grozdju so fenoli izredno pomembne spojine. Moštu in pozneje vinu prispevajo barvo, okus in so odločilni pri stabilizaciji in zorenju rdečih vin. Antocianini so barvila rdečega grozdja. V rdečem vinu so odločilni za značilno barvo. Njihova tvorba in akumulacija se za razliko od ostalih fenolnih spojin prične šele z zorenjem grozdja. Največ antocianov se akumulira v grozdni jagodi v času polne zrelosti, pozneje pa se njihova koncentracija zmanjša. Antociani se nahajajo samo v kožici grozdne jagode, kjer so raztopljeni v soku celičnih vakuol. Izjemoma pri prezrelem grozdju lahko preidejo tudi v meso jagode. Zaradi lažje dostopnosti ter dobre topnosti v vodi, se antociani izlužujejo iz kožice že v začetku maceracije rdeče drozge. Njihova koncentracija narašča do maksimuma, ki se doseže tretji do četrti dan maceracije, nato pa med podaljšano maceracijo celo upade. Sinteza ostalih fenolnih spojin (katehini, hidroksicimetne kisline) se začne bolj zgodaj, njihova koncentracija pa med dozorevanjem grozdja celo upada zaradi povečanja jagod. Zaradi polimerizacije proantocianidinov oziroma kondenziranih taninov se tudi zmanjša grenkoba grozdne jagode. Na senzorično kakovost taninov, ki se pozneje izlužijo v vino, ima največji vpliv zrelost grozdja ob trgatvi. Prisotna mora biti prava količina dovolj zrelih taninov, da dosežemo zadovoljivo polnost rdečih vin ter

primernost za daljše zorenje. V kožicah grozdne jagode se tanini nahajajo v posebnih vakuolah in zrcih, ekstrahirajo pa se hkrati z antocianini. Ekstrakcija je odvisna od načina in časa kontakta mošta s trdnimi deli grozdja med maceracijo in od sorte grozdja. Koncentracija taninov narašča do konca alkoholne fermentacije, če predhodno ne prekinemo maceracije. V primeru podaljšane maceracije narašča predvsem na račun pečk, saj le te vsebuje visoke koncentracije taninov. Za izluževanje taninov iz pečk je nujen etanol, ki raztopi zunanji sloj in s tem omogoči ekstrakcijo (Bavčar, 2006).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Izbor sort, vinogradov in trsov

Za analizo vpliva okužbe z GFLV na kakovost grozdja smo izbrali dva vinograda, enega v Komnu na Krasu (Slika 1) in drugega v Prepottu v Friulli Colli Orientali (Slika 2). V vinogradu v Komnu smo izbrali 65 zdravih trsov sorte Refoššk in 7 z GFLV okuženih trsov sorte Refoššk (Tabela 1). V vinogradu v Prepottu pa smo izbrali 20 zdravih trsov sorte Pokalca in 25 z GFLV okuženih trsov sorte Pokalca (Tabela 2). Izbrani trsi so bili v okviru drugih raziskav analizirani tudi na prisotnost najpogostejših virusov, bakterij in fitoplazem. Analize so potrdile odsotnost vseh ostalih analiziranih virusov, bakterij in fitoplazem, razen GFLV.



Slika 1: Lokacija vinograda v Komnu (Google maps..., 2013)



Slika 2: Lokacija vinograda v Preppottu (Google maps..., 2013)

Da smo dobili čim bolj reprezentativne rezultate meritev količine in kakovosti grozdja smo izbrali vzorce iz večjega dela vinograda, pri čemer smo pazili na podobno lego zdravih in okuženih trsov. Trse smo označili (npr. SCH 8/15) s kratico imena sorte (SCH = Pokalca in REF = Refošk) ter zaporedno številko vrste in sadilnega mesta (npr. 8/15 = osma vrsta / petnajsti trs).

Tabela 1: Izbrani trsi sorte Refošk v vinogradu v Komnu

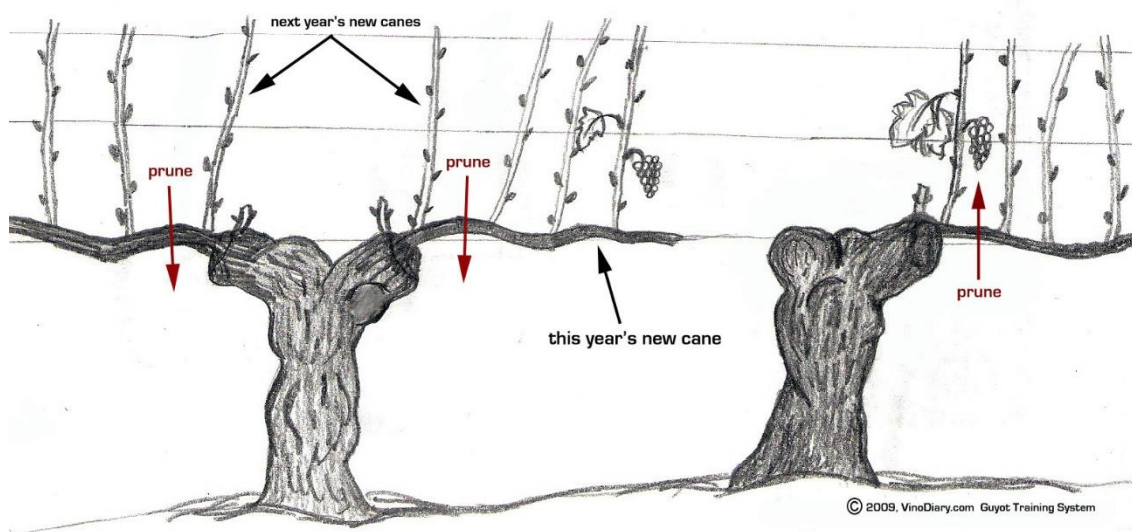
sorta Refošk					
zdravi trsi					z GFLV okuženi trsi
REF 18/12	REF 22/5	REF 38/4	REF 39/34	REF 40/38	REF 19/22
REF 18/14	REF 22/10	REF 38/8	REF 39/38	REF 40/45	REF 21/14
REF 18/15	REF 22/19	REF 38/10	REF 40/4	REF 40/48	REF 21/17
REF 18/26	REF 22/20	REF 38/13	REF 40/6	REF 40/50	REF 22/12
REF 18/27	REF 22/28	REF 38/19	REF 40/7	REF 40/52	REF 22/18
REF 19/5	REF 23/3	REF 38/23	REF 40/13		REF 38/31
REF 19/7	REF 23/4	REF 38/25	REF 40/14		REF 39/9
REF 19/11	REF 23/5	REF 38/33	REF 40/19		
REF 19/12	REF 23/9	REF 38/35	REF 40/20		
REF 20/10	REF 23/17	REF 38/37	REF 40/25		
REF 20/11	REF 23/27	REF 38/44	REF 40/29		
REF 20/12	REF 23/28	REF 39/4	REF 40/34		
REF 20/17	REF 38/1	REF 39/7	REF 40/35		
REF 21/7	REF 38/2	REF 39/13	REF 40/36		
REF 21/23	REF 38/3	REF 39/25	REF 40/37		

Tabela 2: Izbrani trsi sorte Pokalca v vinogradu v Prepottu

sorta Pokalca			
enojni Guyot		dvojni Guyot	
zdravi trsi	z GFLV okuženi trsi	zdravi trsi	z GFLV okuženi trsi
SCH 7/24	SCH 7/5	SCH 22/17	SCH 22/10
SCH 7/31	SCH 7/7	SCH 22/19	SCH 22/16
SCH 7/35	SCH 7/21	SCH 22/20	SCH 24/13
SCH 7/45	SCH 8/8	SCH 22/21	SCH 25/13
SCH 7/47	SCH 8/15	SCH 24/7	SCH 25/18
SCH 8/23	SCH 8/19	SCH 25/21	SCH 25/40
SCH 8/26	SCH 8/22	SCH 25/27	SCH 25/43
SCH 8/27	SCH 9/21	SCH 25/29	SCH 25/44
SCH 8/41	SCH 10/16	SCH 26/24	SCH 26/9
SCH 9/39	SCH 10/24		SCH 26/20
	SCH 10/32		SCH 27/8
	SCH 11/8		
	SCH 11/36		
	SCH 11/44		

3.2 Izbor gojitvenih oblik

Za analizo vpliva okužbe z GFLV na kakovost grozdja pri dveh različnih gojitvenih oblikah smo pri sorti Pokalca izbrali dve različni gojitveni obliki, enojni in dvojni Guyot (Slika 3), pri sorti Refošk pa smo imeli na razpolago le gojitveno obliko enojni Guyot. Z gojitveno obliko mislimo na način oblikovanja večletnega lesa in v ta namen ustrezne opore. Oboje daje trti za gojitveno obliko značilen habitus. V naravi je trta kot ovijalka svoje potrebe po svetlobi zagotovila s tem, da je mladike razvila nad krošnjo dreves. Pri tem je razvila majhne grozde slabe kakovosti. Za doseganje pridelka in kakovosti, ki zagotavlja gospodarno pridelavo grozdja, je človek divjo trto z obrezovanjem in gojitveno obliko spravil v takšno gojeno obliko, ki omogoča večletni pridelek. Zdaj poznamo veliko gojitvenih oblik, večina je odsev regionalnih tradicij (Stanko Vršič, Mario Lešnik-Vinogradništvo, 2001).



Slika 3: Zimska rez vinske trte: levo gojitvena oblika dvojni Guyot, desno gojitvena oblika enojni Guyot (Foto: vinodiary.com, 2013)

3.2.1 ENOJNI GUYOT

Gojitvena oblika enojni Guyot je zelo razširjena v Franciji in Nemčiji, v zadnjem času jo več uporabljamo tudi pri nas, predvsem v vinogradih, kjer so trte v vrsti gosto posajene. Višina debla mora biti za 15 do 20 cm nižja od osnovne žice. Na vrhu debla narežemo rodni les na kratek vzgojni reznik ali čep in šparon. Daljši rodni les privežemo vodoravno ob osnovno žico. Lahko ga tudi ovijemo okrog žice in nato privežemo. Šparon lahko privežemo še v rahlem loku.

3.2.2 DVOJNI GUYOT

Gojitvena oblika dvojni Guyot je v Sloveniji najbolj znana in razširjena. Gojitvena oblika dvojni Guyot sodi med preprostejše gojitvene oblike. Z njo trto manj obremenimo kot pri kordonskih oblikah, če upoštevamo temeljna pravila rezi. Gojitvena oblika dvojni Guyot zahteva vsaj 1,2 m razdalje med trsi, pri sortah z dolgimi internodiji pa tudi 1,4 m in več. Šparone vežemo v rahlem loku, pri manjših razdaljah v vrsti pa v večjem loku, ker bi se v nasprotnem primeru šparoni med seboj križali in bi bili listi slabo osvetljeni. Zato moramo pri manjših razdaljah v vrsti trse vzgojiti tako, da sta kraka čim krajša. Tako dosežemo nekoliko večjo obremenitev z rodnimi očesi, boljšo razporeditev mladik in grozdja, kar omogoča učinkovitejše varstvo pred boleznimi in škodljivci, boljšo osvetlitev, višjo listno steno in s tem večja neto asimilacija (NAR), ter boljše dozorevanje (Stanko Vršič, Mario Lešnik- Vinogradništvo, 2001).

3.3 Štetje števila grozdov in meritve teže pridelka

Ob trgatvi smo na izbranih trsih ločeno potrgali grozdje. Grozde smo prešteli ter določili težo pridelka na posamezni trs.

3.4 Meritve mase jagod

Za meritve mase jagod smo po tehtanju teže pridelka od vsakega trsa naključno izbrali po 100 jagod ter stehtali maso v gramih na decimalko natančno.

3.5 Meritve vsebnosti sladkorjev

Za meritve vsebnosti sladkorjev smo po tehtanju teže pridelka od vsakega trsa naključno izbrali po 200 jagod in jih shranili v zamrzovalniku pri -20°C . Odmrznjene vzorce grozdja smo v vrečkah ročno zmečkali in tako pridobili grozdni sok, v katerem smo kasneje izmerili količino sladkorjev, pH vrednost in določili količino skupnih kislin. Količino sladkorjev smo določili z umerjenim digitalnim refraktometrom (ATAGO WM-7) (Slika 4) v skali $^{\circ}\text{Brix}$. Na predhodno očiščeno stekleno prizmo smo kanili kapljico grozdnega mošta in na zaslonu odčitali vsebnost sladkorjev. Za vsak vzorec mošta smo naredili 3 ponovitve meritev.



Slika 4: Refraktometer za določanje vsebnosti sladkorja (Foto: Matjaž Ščurek, 2013)

3.6 Meritve vrednosti pH

Z merjenjem vrednosti pH smo merili koncentracijo H_3O^+ ionov. Merili smo jo potenciometrično, pri čemer smo merili potencial med standardno elektrodo in stekleno elektrodo, katere potencial se je spreminjal s spremembo koncentracije H_3O^+ ionov v raztopini. Vrednost pH v soku smo določili s pomočjo avtomatskega titratorja s stekleno elektrodo (Titrino 848 plus, Metrohm; Švica).

pH-meter smo najprej umerili s standardnimi raztopinami s pH 4,00, pH 7,00 in pH 9,00 (Francetič, 2006, povzeto po Zoecklein, 1995). Stekleno elektrodo moramo vedno pred meritvami umeriti, saj se ne pozna vseh različni potencialov, ki nastopajo v merilnem členu, saj je metoda relativna.

Predhodno pripravljene vzorce smo nalili v čašo, elektrodo primerno potopili v vzorec in, ko se je vrednost na ekranu instrumenta ustalila, odčitali vrednost pH.

3.7 Meritve količine skupnih kislin

Koncentracijo titracijskih kislin smo določali z volumetrično metodo ob uporabi končne točke titracije pri pH 7, in sicer s pomočjo avtomatskega titratorja s stekleno elektrodo (Titrino 848 plus, Metrohm; Švica).

10 ml grozdnega soka smo prelili v čašo ter ga razredčili z 50 ml vode. Elektrodo smo primerno potopili v čašo. Titrali smo z 0,1 M raztopino NaOH. Ko so se vrednosti na ekranu instrumenta ustalile, smo odčitali količino skupnih titracijskih kislin (g/l).

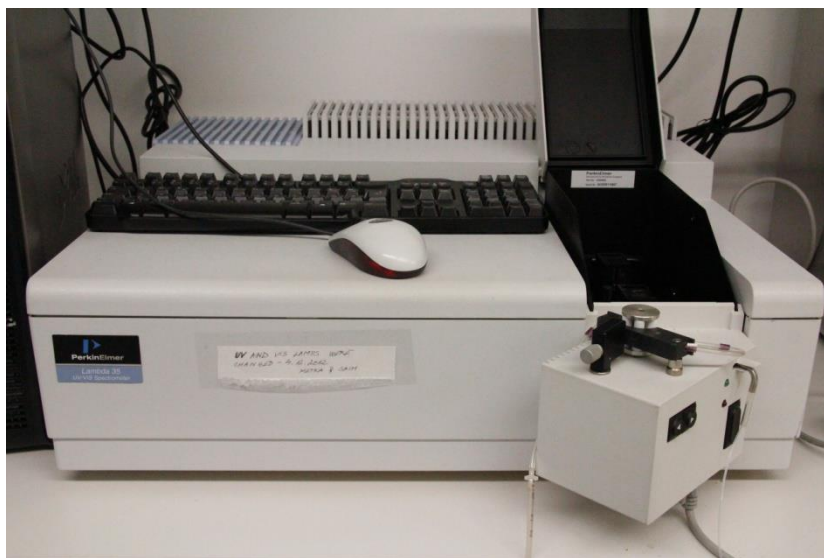
3.8 Meritve količine fenolnih spojin

Za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktih grozdja smo izbrali spektrofotometrično metodo z reagentom Folin-Ciocalteu po metodi Waterhouse in sod., 2002 (prirejeno za manjše volumne).

Za meritve količine fenolnih spojin smo po tehtanju teže pridelka od vsakega trsa naključno izbrali 3 krat po 20 jagod in jih shranili v zamrzovalniku pri -20°C . Zmrznjene

grozdne jagode smo stehali in jim nato ločili kožico jagode od mesa jagode ter ponovno stehali samo kožice jagod. V stekleničke s temnim steklom smo odmerili 100 ml metanola (Sigma, Nemčija), kjer smo kožice ekstrahirali 24 ur. Raztopino prve ekstrakcije smo odtočili v druge stekleničke, ter kožicam ponovno dodali 50 ml metanola in jih ekstrahirali še nadaljnji 2 uri. Raztopini obeh ekstraktij smo nato združili v stekleničke s temnim steklom in jih shranili pri -20°C .

Za meritve smo pripravili kivete s standardi galne kisline (25-2000 mg/l), z vzorci (ekstrakti) in tudi slepi vzorec (voda). V vsako kiveto smo dodali $20\mu\text{l}$ vzorca, 1,58 ml destilirane vode in $100\mu\text{l}$ reagenta Fiolin-Ciocalteu. Po skrbnem mešanju smo mešanice inkubirali od 30 sekund do 8 minut, nato pa v vsako kiveto dodali $300\mu\text{l}$ raztopine natrijevega karbonata (20%, m/v), previdno in dobro premešali ter pustili 2 uri na sobni temperaturi. Nato smo izmerili absorbanco vzorcev pri 765 nm s spektrofotometrom (Slika 5). Vse analize smo izvajali v treh paralelkah.

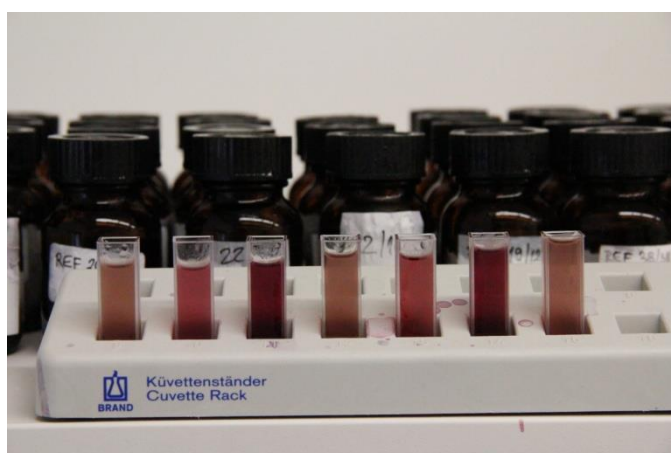


Slika 5: Spektrofotometer za določanje skupnih fenolov (Foto: Matjaž Ščurek, 2013)

3.9 Meritve barve

Za meritve barve smo uporabili metanolne ekstrakte kožic grozdja, ki smo jih pripravili za meritve količine fenolnih snovi in so bili shranjeni v temnih stekleničkah pri -20°C .

Metanolne ekstrakte smo segreli na sobno temperaturo, jih prefiltrirali in po 1 ml prenesli v kivete (Slika 6). Kivete smo vstavili v spektrofotometer ter izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 420nm in 520nm, ki so karakteristične valovne dolžine za skupino fenolnih kislin, flavonoidov in antocianinov (Macheix in sod., 1990). Absorbanci pri 420 nm in 520 nm sta sorazmerni s količino oranžnih in rdečih pigmentov, ki se nahaja v rdečem grozdju. Večja absorbanca pomeni večjo koncentracijo pigmentov in lahko služi kot ocena vsebnosti fenolov v metanolnih ekstraktih, ki pa je neposredno povezana z vsebnostjo fenolov v grozdju, iz katerega smo pripravili metanolne ekstrakte. Rezultatov nismo kvantificirali, ker nismo imeli ustreznih molskih ekstinkcijskih koeficientov za te spojine v topilu metanol, vendar ker so bili vsi vzorci grozdja okuženih in zdravih trsov sort Refošk in Pokalca pripravljene na enak način, smo lahko te vrednosti primerjali med seboj.



Slika 6: Določanje parametrov barve z ekstrakcijo antocianov (Foto: Matjaž Ščurek, 2013)

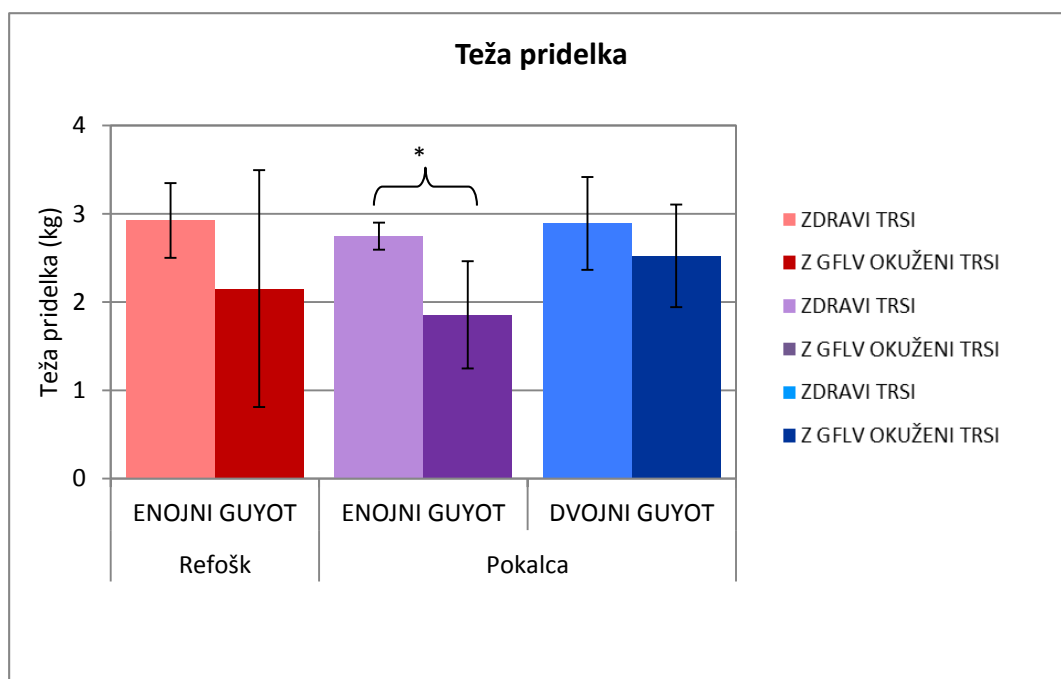
3.10 OBDELAVA PODATKOV

Po končanih meritvah v vinogradu in laboratoriju smo podatke obdelali v programu Microsoft Office Professional Plus 2013. Podatke smo glede na trse, ki so jim pripadali, razdelili v šest skupin, in sicer glede na to, ali so bili trsi zdravi ali okuženi z GFLV, ali so bili sorte Refošk ali Pokalca in ali so bili gojeni v obliki enojni ali dvojni Guyot. Za vsak parameter količine in kakovosti grozdja smo za vsako izmed šestih skupin izračunali povprečno vrednost in 95% interval zaupanja. Interval zaupanja smo izračunali kot $1,96 \times$ standardna napaka. Interval zaupanja nam pove, v katerem območju leži dejanska povprečna vrednost. S t-testom pa smo analizirali stopnjo statistično značilne razlike med zdravimi in z GFLV okuženimi trsi. Stopnjo statistično značilne razlike smo označili s številom zvezdic, pri čemer je ena zvezdica označevala tveganje manjše od 5% ($p < 0,05$), dve zvezdici tveganje manjše od 1% ($p < 0,01$) in tri zvezdice tveganje manjše od 0,1% ($p < 0,001$). Podatke smo še vnesli v grafe, da smo lahko rezultate tudi vizualno primerjamo med sabo.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA KOLIČINO PRIDELKA

V splošnem smo opazili trend, da je okužba z GFLV zmanjšala količino pridelka. Pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Pokalca je bilo zmanjšanje teže pridelka statistično značilno, medtem ko pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Refošk zmanjšanje teže pridelka kljub veliki razliki v povprečni vrednosti zaradi razmeroma velike standardne deviacije ni bilo statistično značilno (Slika 7). Pri gojitveni obliki dvojni Guyot pri sorti Pokalca nismo zaznali statistično značilnega vpliva na težo pridelka (Slika 7).



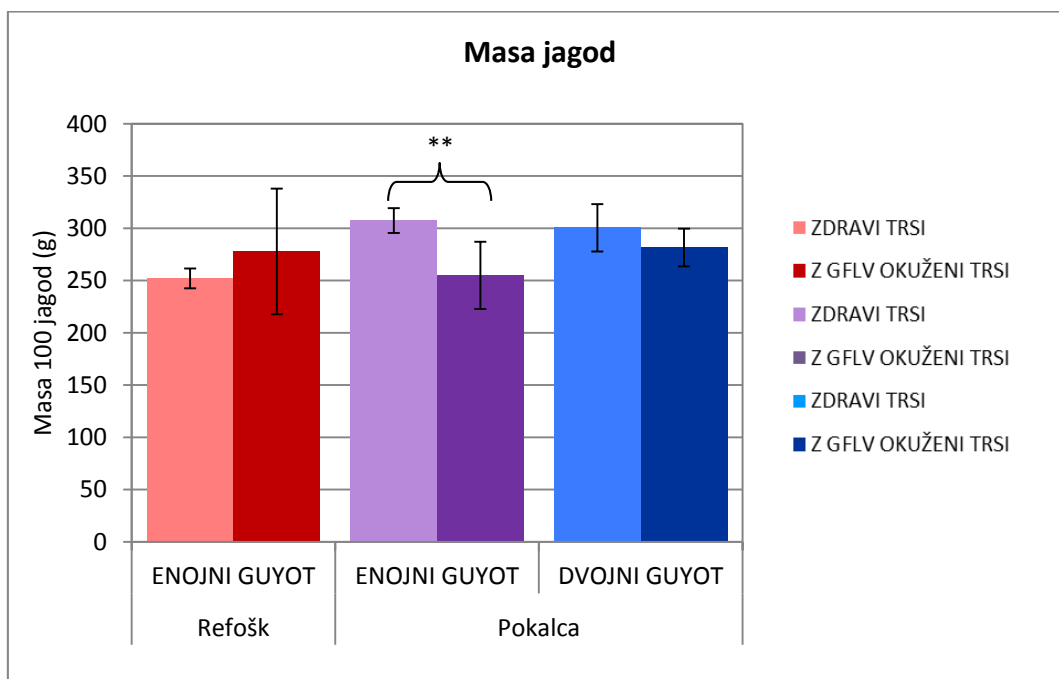
Slika 7: Teža pridelka pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$.

Iz teh rezultatov je razvidno, da ima okužba z GFLV sorte Pokalca pri gojitveni obliki dvojni Guyot bistveno manjši vpliv na zmanjšanje teže pridelka v primerjavi z gojitveno obliko enojni Guyot. To bi morda lahko razložili tako, da so imeli trsi pri gojitveni obliki dvojni Guyot večjo maso listov in tako na razpolago več energije za preprečevanje negativnih učinkov virusne okužbe. Druga možnost pa bi bila, da je imela virusna okužba

različen vpliv na različno stare trse, ki so bili v različnem fiziološkem stanju, saj so bili trsi z gojitveno obliko enojni Guyot mlajši od trsov z gojitveno obliko dvojni Guyot.

4.2 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA TEŽO JAGOD

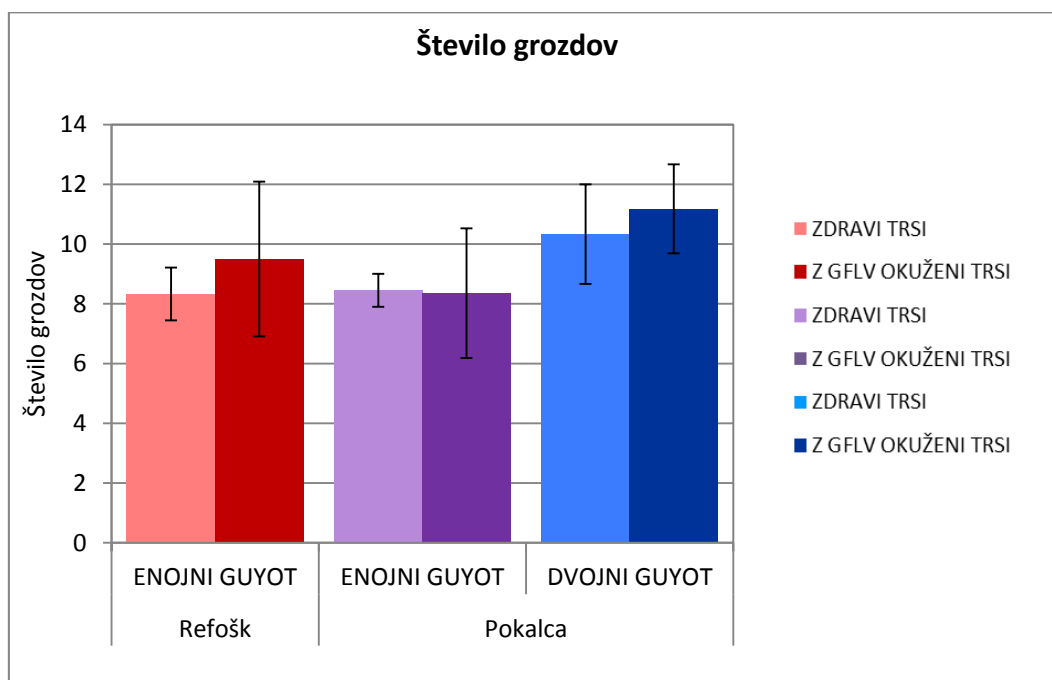
Pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Pokalca smo izmerili zmanjšanje teže 100 jagod pri trsih okuženih z GFLV v primerjavi z zdravimi trsi. Zmanjšanje teže je bilo statistično značilno. Pri gojitveni obliki dvojni Guyot pri isti ter pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Refošk bistvenega vpliva okužbe na težo jagod nismo zasledili (Slika 8).



Slika 8: Teža 100 jagod pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$.

4.3 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA ŠTEVILO GROZDOV NA TRS

Pri nobeni od gojitvenih oblik (enojni in dvojni Guyot) pri nobeni od preiskovanih sort (Pokalca in Refošk) nismo zasledili vpliva okužbe z GFLV na število grozdov na trs (Slika 9). Iz tega lahko predvidevamo, da virus GFLV ne vpliva na rodnost mladik vinske trte.



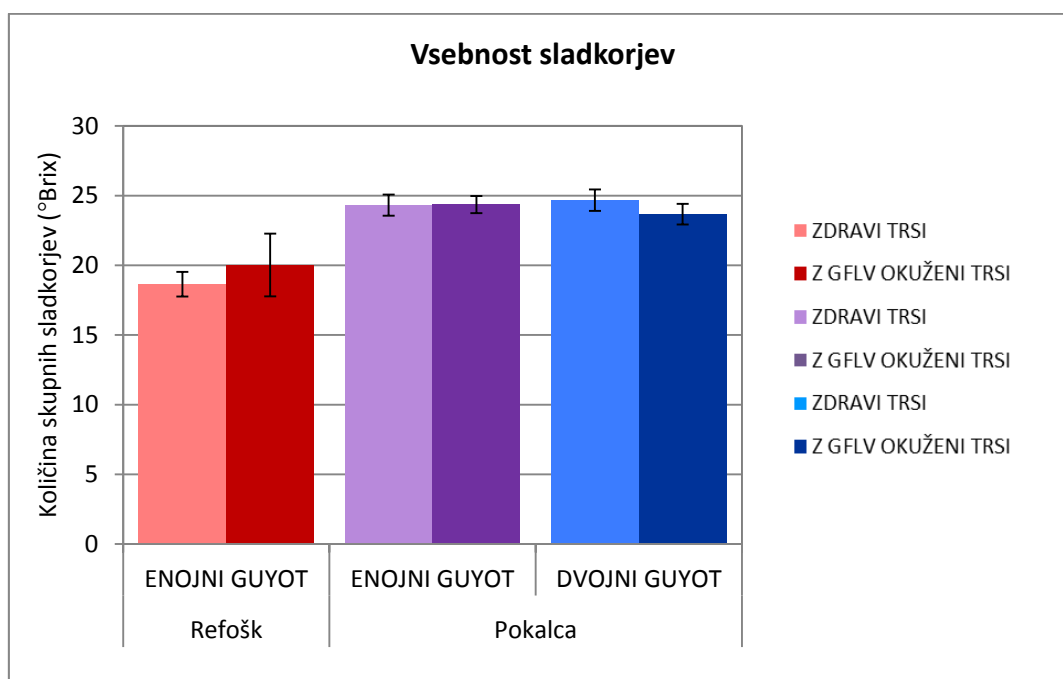
Slika 9: Število grozdov na trs pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja.

Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je okužba z GFLV različno vplivala na trse sort Pokalca in Refošk. Pri obeh sortah se je namreč pri gojitveni obliki enojni Guyot pod vplivom okužbe z GFLV zmanjšala teža pridelka, pri čemer je število grozdov ostalo nespremenjeno. Istočasno se je pri sorti Pokalca zmanjšala tudi masa jagod, iz česar lahko sklepamo, da je bilo zmanjšanje mase pridelka pri sorti Pokalca na račun manjših jagod, kar pa se pri sorti Refošk ni zgodilo. Pri sorti Refošk je masa jagod ostala nespremenjena, torej se je moralo zmanjšati število jagod na grozd, kar imenujemo osipanje. To se sklada

tudi s podatki v literaturi, po katerih je osipanje pogosto bolezensko znamenje pri sorti Refošk (Hrček in Korošec Koruza, 1996).

4.4 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST SLADKORJA V GROZDJU

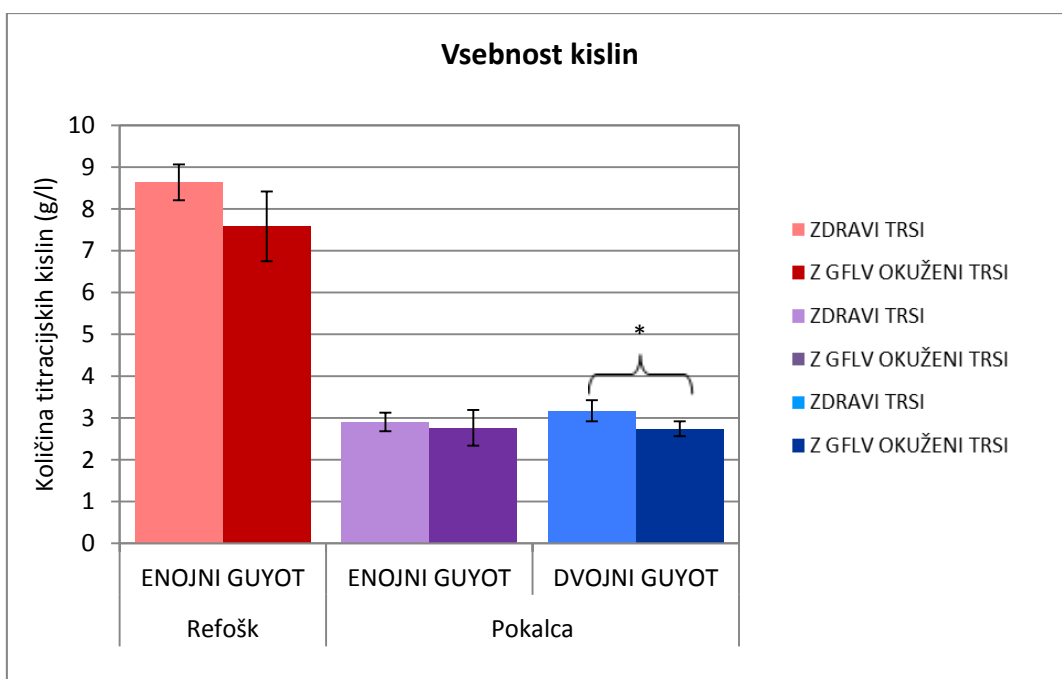
Pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Refošk smo pri trsih okuženih z GFLV izmerili višjo povprečno vrednost vsebnosti sladkorja v grozdju kot pri zdravih trsih. Razlika ni bila statistično značilna, verjetno zaradi razmeroma velike standardne deviacije. Pri sorti Pokalca pri nobeni od gojitvenih oblik (enojni in dvojni Guyot) nismo zaznali bistvene razlike v vsebnosti sladkorja med zdravimi in z GFLV okuženimi trsi (Slika 10).



Slika 10: Vsebnost sladkorja pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja.

4.5 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST TITRACIJSKIH KISLIN

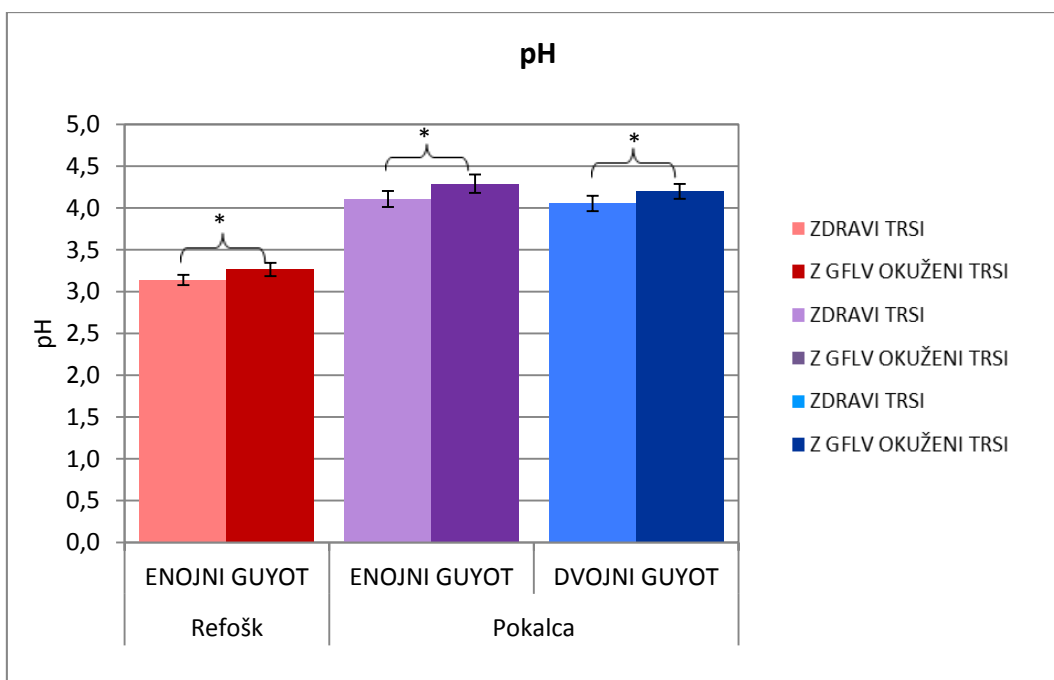
V splošnem smo opazili trend, da je okužba z GFLV zmanjšala vsebnost titracijskih kislin v grozdju. Pri obeh gojitvenih oblikah (enojni in dvojni Guyot) in pri obeh sortah (Refošk in Pokalca) smo pri z GFLV okuženih trsah izmerili manjšo povprečno vrednost vsebnosti titracijskih kislin kot pri zdravih trsah. Pri gojitveni obliki dvojni Guyot pri sorti Pokalca je bilo zmanjšanje vsebnosti titracijskih kislin tudi statistično značilno (Slika 11).



*Slika 11: Vsebnost titracijskih kislin pri zdravih in okuženih trsah sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$.*

4.6 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VREDNOST pH

Pri obeh gojitvenih oblikah (enojni in dvojni Guyot) in pri obeh sortah (Pokalca in Refošk) se je vrednost pH v grozdju statistično značilno povečala pod vplivom okužbe z GFLV (Slika 12).



Slika 12: pH vrednost pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$.

Povečanje vrednosti pH pod vplivom virusne okužbe se sklada z zmanjšano vsebnostjo kislin pod vplivom virusne okužbe, saj višja vrednost pH pomeni bolj bazičen oziroma manj kisel sok iz grozdnih jagod, kar se sklada z manjšo vsebnostjo kislin.

Vrednost pH vpliva na biološki razkis vin, to je na pretvorbo jabolčne kisline v mlečno kislino, diacetil, očetno kislino in različne estre, kar je zelo pomembno pri rdečih vinih z večjo koncentracijo skupnih kislin.

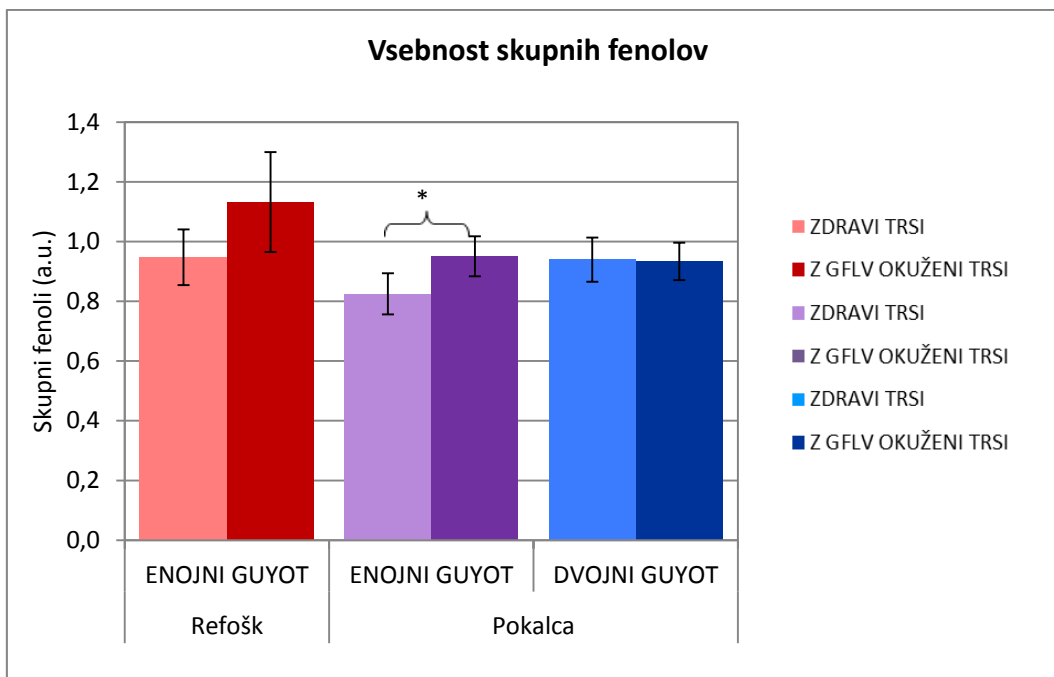
Sorti Refošk in Pokalca sta se zelo razlikovali v absolutni vrednosti pH, ki se je pri sorti Refošk gibala med 3,0 in 3,3, pri sorti Pokalca pa med 4,0 in 4,3. Pri sorti Refošk se je povišanje vrednosti pH iz 3,0 pod vplivom okužbe z GFLV na 3,3 izkazalo kot pozitivno, saj se je raven pH pomaknila na bolj primerno raven za biološki razkis (Slika 10). Vrednosti pH blizu 3,3 omogočajo bolj stabilen potek razkisa pod pogoji primernejšimi za bakterijo *Oenococcus oeni*, ki je najbolj zaželena kot vodilna bakterija biološkega razkisa (Bavčar., Kletarjenje danes. 2006). Pri sorti Pokalca pa je povišanje vrednosti pH

iz 4,0 pod vplivom okužbe z GFLV na 4,3 povzročilo povišanje že tako previsoke vrednosti pH (Slika 12) in tako negativno vplivalo na biološki razkis, saj je tako povzročalo večjo koncentracijo očetne kisline in manj diacetila, ki je v koncentracijah od 1 do 4 mg/l zelo zaželen, saj daje vinu prijeten vonj po maslu, ter kompleksnost, kar dvigne kakovost vina.

Višji pH hkrati pomeni tudi manjšo stabilnost barve rdečih vin ter delno izgubo preprečitev manjših oksidacij. Višji pH omogoča tudi lažjo rast nezaželenih mikroorganizmov v moštu in vinu, kar seveda ni zaželeno pri predelavi grozdja v vino. Višji pH v moštu pa pozitivno vpliva na prilagajanje kvasovk v lag fazi fermentacije, kar je zelo pomembno za bolj stabilno in uravnoteženo fermentacijo. Manjši je tudi razpad etilnih in acetatnih estrov, ki pripomorejo predvsem pri sadnih aromah vina (Bavčar, 2006).

4.7 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA VSEBNOST FENOLNIH SNOVI V GROZDJU

Pri gojitveni obliki enojni Guyot smo tako pri sorti Pokalca kot tudi pri sorti Refošk pri trsih okuženih z GFLV izmerili višjo povprečno vrednost količine fenolov kot pri zdravih trsih. Povečanje vsebnosti fenolov pri sorti Refošk ni bilo statistično značilno, medtem ko je pri sorti Pokalca bilo statistično značilno. Pri gojitveni sorti dvojni Guyot pri sorti Pokalca nismo opazili razlike v vsebnosti fenolov med zdravimi in z GFLV okuženimi trsi (Slika 13).



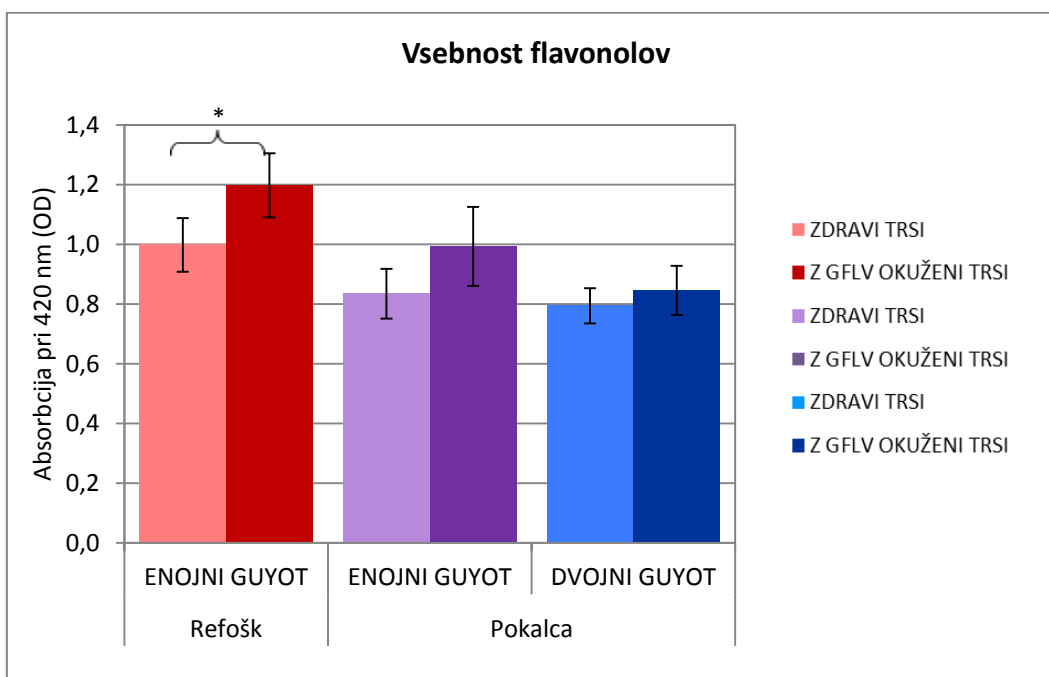
Slika 13: Vsebnost fenolov pri zdravih in okuženih trsih sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$.

Fenoli v grozdju so pomemben vir antioksidantov ter antimikrobnih in antivirusnih učinkovin tako za človeka kot za samo rastlino. Po meritvah vsebnosti fenolnih snovi v kožicah jagod smo tako pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Pokalca kot tudi pri sorti Refošk opazili povečanje količine fenolov pod vplivom okužbe z GFLV. Na ta način rastlina poveča odpornost in se brani pred povzročitelji bolezni. Povečanje vsebnosti fenolnih snovi je dobrodošlo tudi kvaliteto vina, saj povečanje skupnih fenolov pomeni večjo stabilnost in bogatost vina ter večjo možnost staranja in zorenja vina. Pri gojitveni obliki dvojni Guyot pri sorti Pokalca vpliva okužbe z GFLV na vsebnost fenolov nismo videli.

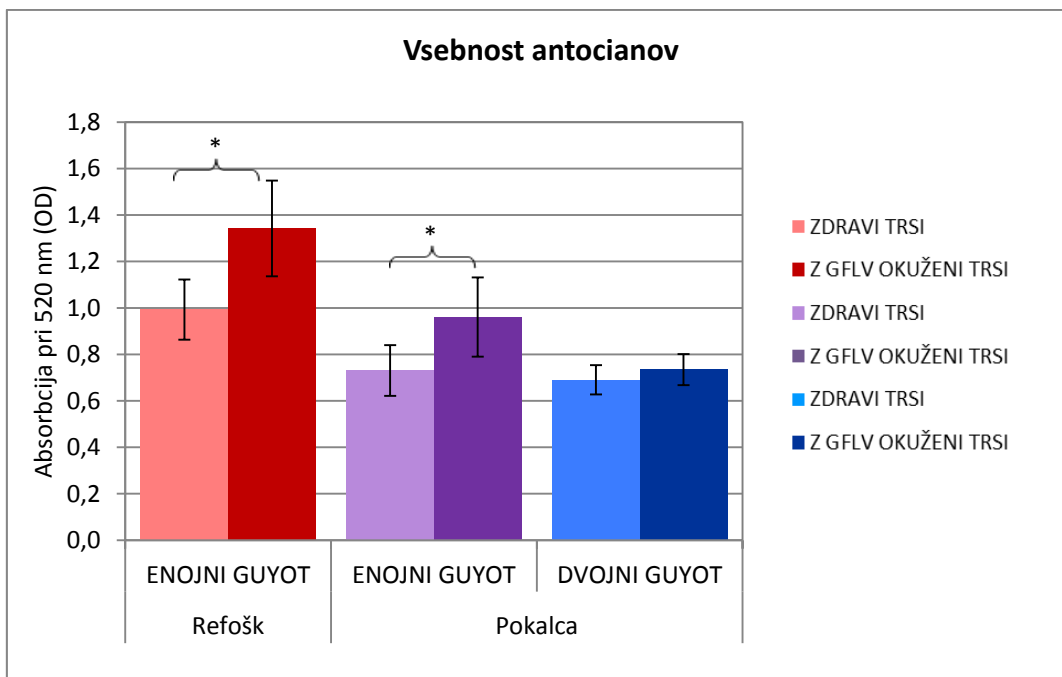
4.8 VPLIV OKUŽBE Z GFLV NA BARVO GROZDJA

Pri trsih okuženih z GFLV smo izmerili višjo povprečno vrednost absorbcije metanolnih ekstraktov pri valovnih dolžinah 420 nm, pri kateri imajo najvišjo absorbcijo flavonoli

(Slika 14), in 520 nm, pri kateri imajo največjo absorbcijo antociani (Slika 15), kot pri zdravih trsah pri obeh gojitvenih oblikah (enojni in dvojni Guyot) in obeh sortah (Pokalca in Refošk). Razlike so bile statistično značilne pri valovni dolžini 520 nm pri gojitveni obliki enojni Guyot pri obeh sortah (Refošk in Pokalca) (Slika 15). Ker je absorbcija pri 520 nm neposredno povezana z vsebnostjo antocianinov, ki spadajo med flavonoide, lahko sklepamo, da je imelo grozdje iz okuženih trsov večjo vsebnost antocianinov oziroma flavonoidov kot grozdje iz neokuženih trsov.



Slika 14: Absorbanca pri 420 nm metanolnih ekstratov zdravih in okuženih trsov sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$.



Slika 15: Absorbanca pri 520 nm metanolnih ekstratov zdravih in okuženih trsov sort Refošk in Pokalca pri gojitvenih oblikah enojni in dvojni Guyot. Prikazana je povprečna vrednost in interval zaupanja. * $p < 0,05$.

Rezultati meritev absorbanc pri 420 nm in 520 nm, ki so neposredno povezani z vsebnostjo flavonolov oziroma antocianinov sledijo podobnemu trendu, kot smo ga opazili pri analizi vsebnosti skupnih fenolov, kar je bilo tudi pričakovano, saj tako antocianini kot flavonoli spadajo med flavonoide, ki pa so glavna skupina fenolov v rdečem grozdju (Košmerl in Kač, 2004). Tako rezultati merjenja absorbanc, ki ustrezajo posameznim skupinam fenolov v grozdju kot tudi rezultati skupnih fenolov kažejo na to, da je okužba z GFLV zelo vplivala na kakovost pridelka v smislu kopičenja fenolov. Zanimivo je to, da sta se gojitveni obliki različno odzvali na okužbo s sintezo fenolov.

Okužba z virusom GFLV tako pri grozdju sorte Refošk kot tudi pri grozdju sorte Pokalca ugodno vpliva na vsebnost antocianinov, kar lahko pomembno poveča tudi kakovost vina.

5 ZAKLJUČKI

Okužba z GFLV je vplivala na količino pridelka kot tudi na kakovost grozdja sort Refošk in Pokalca. Še posebej je vplivala na vrednost pH soka grozdnih jagod ter vsebnost kislin, antocianov in skupnih fenolov.

Okužba z GFLV je zmanjšala količino pridelka. Pri obeh gojitvenih oblikah (enojni in dvojni Guyot) smo pri obeh sortah (Refošk in Pokalca) pri z GFLV okuženih trsih izmerili manjšo težo pridelka kot pri zdravih trsih, ki je bila pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Pokalca tudi statistično značilno manjša.

Pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sorti Pokalca smo izmerili statistično značilno zmanjšanje teže 100 jagod pri trsih okuženih z GFLV v primerjavi z zdravimi trsi.

Na število grozdov okužba z GFLV ni imela vpliva pri nobeni od gojitvenih oblik (enojni in dvojni Guyot) in pri nobeni od preiskovanih sort (Pokalca in Refošk).

Prav tako tudi na vsebnost sladkorja pri nobeni od gojitvenih oblik (enojni in dvojni Guyot) in pri nobeni od preiskovanih sort (Pokalca in Refošk) okužba z GFLV ni imela vpliva.

Pri obeh gojitvenih oblikah (enojni in dvojni Guyot) in pri obeh sortah (Pokalca in Refošk) pa se je pod vplivom okužbe z GFLV vrednost pH v grozdju statistično značilno povečala, ob tem pa smo opazili tudi trend zmanjšanja vsebnosti kislin.

Pod vplivom virusne okužbe se je pri gojitveni obliki enojni Guyot pri sortah Refošk in Pokalca statistično značilno povečala vsebnost antocianov in skupnih fenolov, medtem ko pri gojitveni obliki dvojni Guyot pri sorti Pokalca okužba z GFLV ni vplivala na vsebnost antocianov in skupnih fenolov.

Iz tega lahko zaključimo, da je okužba z GFLV različno vplivala na gojitveni obliki enojni in dvojni Guyot, pri čemer smo močnejši vpliv okužbe z GFLV opazili na gojitveni obliki enojni Guyot kot na gojitveni obliki dvojni Guyot.

V splošnem lahko zaključimo, da ima okužba z GFLV z vinogradniškega in vinarskega vidika negativen vpliv na količinske parametre grozdja, medtem ko ima na nekatere kakovostne parametre grozdja celo pozitiven vpliv.

6 VIRI

1. Andret – Link P., Laparte C., Valat L., Ritzenthaler C., Deamungeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fucks M. 2004a. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industrx. *Journal of Plant Pathology*. 86,3: 183-195
2. Avramov L., Briza K. 1988. Posebno vinogradarstvo (Ampelografija). Novi Sad, Univerzitet: 367 str.
3. Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana: Kmečki Glas, str.19-21
4. Belin C., Schmitt C., Demangeat G., Komar V., Pinck L., Fuchs M. 2001. Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology*, 291:161-171
5. Blažina I. 1992. Vzgoja zdravih trsov vinske trte sorte zelen (*Vitis vinifera* L. cv. Zelen) z metodo termoterapije in tkivne kulture. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 92 str
6. Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, The Chapman & Hall: 604 str.
7. Bovey R., Gartel W., Hewitt W.B., MartelliG.P., Vuittenez A. 1980. Virus and virus-like disease of grapevines. Colour atlas of symptoms. Lausanne, Editions Payot: 181 str.
8. Cindrić P., Korać N., Kovač V. 200. Sorte vinove loze: metode i rezultati ispitivanja. Novi Sad, Poljoprivedni fakultet, Prometej: 440 str.
9. Demangeat G., Voisin R., Minot J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95: 1151-1156

10. Francetič V. 2006. Navodila za vaje pri predmetu Analizne metode pri pridelavi vina. Interno gradivo za laboratorijske vaje pri predmetu Analizne metode pri pridelavi vina. Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo. Univerza v Novi Gorici.
11. Gaire F., Schmitt C., Stussi-Garaud C., Pinck L., Ritzenthaler C. 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, 264: 25-36
12. Gambino G., Di Matteo D., Gribaudo I. 2009. Elimination of grapevine fanleaf virus from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 1: 57-60
13. Hewitt W.B., Raski D.J. in Goheen A.C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*. 48: 586-595
14. Hrček L., Korošec – Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte. Ptuj. SVA Veritas: 112-115
15. Jean-Jacques Macheix, Annie Fleuriet, Jean Billot, 1990. *Fruit Phenolics*
16. Košmerl T., Kač M. 2004. Osnovne kemijske analize mošta in vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106-106
17. Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. 1990. *Fruit phenolics*. Boca Raton. CRC Press: 392 str.
18. Martelli G.P., Boundon-Padiev E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus like diseases of the grapevine. Bibliographic report 1998-2004. Bari, CIHEAM: 279 str.
19. Naraghi-Arani P., Daubert S., Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82: 1792-1795

20. Pearson R.C., Goheen A.C. 1998. Compendium of grape diseases, 4 th ed. st. Paul. The American Phytopathological
21. Pompe-Novak M., Gutiérrez-Aguirre I., Vojvoda J., Blas M., Tomažič I., Vigne E., Fuchs M., Ravnikar M., Petrovič N. 2007. Genetic variability within RNA2 of grapevine fanleaf virus. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 3: 307-312
22. Ripper M. 1912. Kraški teran. Gorica, Narodna tiskarna: 29 str
23. Robinson J. 1999. Oxford companion to wine. Oxford, Oxford University Press: 820 str.
24. Šikovec S. 1985. Sodobno kletarjenje. Ljubljana. Kmečki glas: 280 str.
25. Škvarč A., Ozimič D., Maljevič J., Štabuc R., Novak E., Carlevaris B 2002. Vinogradi za tretje tisočletje. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje. 2. vinogradništvo in vinarski kongres, Otočec, 31. 1. – 2. 2. 2002. Puconja M. (ur.). Nova Gorica, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije in Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 1-18.
26. Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. 1999. Handbook of plant virus diseases. Boca Raton, CRC Press: 553 str.
27. Urek G., Hržič A. 1998. Ogorčice – nevidni zajedalci rastlin: fitonematologija. Ljubljana, samozaložba: 240 str.
28. Uyemoto, J. K., Martelli, G.P., Rowhani A. 2009. Grapevine viruses, virus like diseases and other disorders. In: Virus Diseases of Plants: Grape, Potato and Wheat Image Collection and Teaching Resource CD-Rom. APS Press, st. Paul, MN 55121
29. Vigne E., Bergdoll M., Guyader S., Fuchs M. 2004b. Population structure and genetic variability within isolates of grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, 85: 2435-2445

30. Vodovnik A., Vodovnik T. 1999. Nasveti za vinarje. Ljubljana, Kmečki glas: 265 str.
31. Vršič S., Lešnik M. 2005. Vinogradništvo. 2 natis. Ljubljana, Kmečki glas: 360 str.
32. Vršič Stanko. Vinogradništvo /Stanko Vršič, Mario Lešnik; Ljubljana: Kmečki glas, 2001, 131-134 str..
33. Waterhouse A. L. (2002). Determination of total phenolics. Current protocols in food analytical chemistry. University of California, str. I1.1.1-I1.1.8.
34. Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump, B.H., Nury, F.S. 1995. Wine analysis and production. New York: Chapman & Hall: 621 str.
35. Xue B., Ling K.S., Reid C.L., Krastanova M., Sehiga M., Momol E.A., Sule S., Mozsar J., Gonsalves D., Burn T. 1999. Transformation of five grape rootstocks with plant tumefaciens. In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant, 35: 226-231