

Projekt CRP:

Ukrepi za preprečevanje nadaljnega širjenja zlate trsne rumenice

Program dela:

Projektno delo je organizirano v obliki delovnih sklopov (DS) glede na vsebino in cilje raziskave. Projektni partnerji združujejo tehnično in vsebinsko ekspertizo ter dolgoletne izkušnje s področja varstva rastlin. V projektu sodelujejo partnerji iz Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB), Kmetijsko gozdarskega zavoda Nova Gorica (KGZ-NG), Kmetijsko gozdarskega zavoda Maribor (KGZ-MB), Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) in Kmetijskega inštituta Slovenije (KIS). NIB, ki je koordinator projekta, ima veliko izkušenj z vodenjem nacionalnih in mednarodnih projektov, z raziskavami s področja biologije in epidemiologije fitoplazem ter obsežne izkušnje glede detekcije in identifikacije fitoplazem v rastlinah in žuželčnih prenašalcih. V okviru NIB-a deluje tudi laboratorij, ki je nacionalni referenčni laboratorij za fitoplazme ter partner konzorcijskega referenčnega laboratorija Evropske unije za škodljive organizme rastlin, kot so fitoplazme. KGZ-NG, KGZ-MB in IHPS imajo odlično poznavanje problematike fitoplazem in njenih prenašalcev na terenu (tako v vinogradih, kot tudi v nasadih lesk), izkušnje s področja proučevanje bionomije prenašalcev in zatiranja z insekticidi. Poleg tega ima KGZ-NG dolgoletne izkušnje na področju entomologije kot uradni laboratorij in tudi na področju raziskav. KIS pa ima veliko znanja s področja obdelave hiperspektralnih slik za namen daljinskega zaznavanja okužb rastlin na terenu.

DS1 Koordinacija

V okviru tega DS bo potekala koordinacija aktivnosti partnerjev ter redno poročanje o poteku dela in doseženih rezultatih naročnikom. V ta namen so znotraj posameznih DS definirani merljivi mejniki in rezultati. Tekom projekta bodo poleg uvodnega in zaključnega sestanka organizirani redni delovni sestanki partnerjev projekta ter sestanki z vsebinsko spremljevalko projekta s strani financerja, ki bodo po potrebi potekali v obliki telekonferenc. Ti sestanki bodo organizirani z namenom učinkovitega usklajevanja dela med partnerji ter hitrega prenosa informacij in spoznanj pridobljenih v posameznih fazah projekta. Postavljena bo spletna stran projekta (NIB) za katero bodo tekom projekta prispevali vsebine vsi partnerji (gre za rezultate nalog, katerih priprava je vključena v tematske DS opisane v nadaljevanju).

Predvideni so naslednji mejniki:

- M1.1 Uvodni sestanek partnerjev projekta – mesec 1 – nosilec NIB
- M1.2 Postavljena spletna stran projekta – mesec 2 – nosilec NIB
- M 1.3 Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) ter letno poročilo za 2022 ARRS – mesec 6 – nosilec NIB
- M 1.4 Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) – mesec 12 – nosilec NIB
- M 1.5 Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) ter letno poročilo za 2023 ARRS – mesec 18 – nosilec NIB
- M 1.6 Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) – mesec 24 – nosilec NIB
- M 1.7 Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) ter letno poročilo za 2024 ARRS – mesec 30 – nosilec NIB
- M1.8 Zaključni sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko projekta – mesec 36 – nosilec NIB

Predvideni so naslednji rezultati:

- R1.1 Zaključno poročilo projekta (MKGP in ARRS) – mesec 36 – nosilec NIB

DS2 Možnost ugotavljanja Grapevine flavescence dorée fitoplazme (FD) v preimaginalnih stadijih ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus* Ball)

V tem DS bomo preverili možnost zaznave prisotnosti fitoplazme FD (povzročiteljice zlate trsne rumenice) v preimaginalnih razvojnih stopnjah najpomembnejšega prenašalca - ameriškega škržatka (L3-L5) še pred pojavom značilnih vizualnih bolezenskih znamenj v vinogradu in sicer z namenom vzpostavitve ukrepov še preden se bolezen FD v vinogradu razširi. Za zaznavo fitoplazme FD v preimaginalnih razvojnih stopnjah ameriškega škržatka bomo uporabili molekularne teste.

Ličinke ameriškega škržatka se začnejo izlegati v drugi dekadi maja in se nato v petih razvojnih stopnjah (ličinke: L1 in L2; nimfe: L3, L4 in L5) razvijejo v odrasle škržatke. Fitoplazmo lahko prenašajo že nimfe tretje razvojne stopnje (L3), najbolj učinkoviti prenašalci pa so odrasli ameriški škržatki, ki se običajno pojavijo v začetku julija. Pojav nimfe L3 običajno sovpada s koncem cvetenja trte, L4 z začetkom razvoja plodičev in L5 s pričetkom rasti jagod na grozdju.

Prva bolezenska znamenja okužbe s fitoplazmo FD na trti lahko sicer opazimo že po cvetenju trte, a so pogosto takrat znamenja še slabo vidna in posledično jih zato lahko spregledamo. Poleg tega, na podlagi vizualnih bolezenskih znamenj ne moremo razločevati ali gre za okužbo z zlato trsno rumenico ali za okužbo z drugimi (ne karantenskimi) fitoplazmami ali virusi, zato je nujna laboratorijska analiza. Ugotavljanje prisotnosti fitoplazem v trti je težko, saj so fitoplazme v rastlini neenakomerno razporejene, njihova koncentracija je nizka in različna v različnih letnih časih. Na podlagi vseh navedenih dejstev, je v skladu s standardom EPPO PM7/079(2), za zanesljivo detekcijo fitoplazem priporočeno vzorčenje simptomatičnih poganjkov v obdobju od julija do oktobra, kar pomeni, da njeno prisotnost morda ugotovimo šele, ko se je ta v nasadu s pomočjo učinkovitega prenašalca – ameriškega škržatka že močno razširila.

Prisotnost fitoplazme v vinogradu lahko posredno spremljamo tudi s preverjanjem prisotnosti fitoplazme v ameriškem škržatku. Na podlagi izkušenj vemo, da lahko z molekularnimi testi, ki so priporočeni v EPPO PM7/079(2), prisotnost fitoplazme FD odkrijemo v odraslih osebkih ameriškega škržatka, nimamo pa podatka o možnosti zaznave fitoplazme FD v stopnjah L3-L5. V primeru, da bi fitoplazmo FD lahko zaznali že v preimaginalnih razvojnih stopnjah L3-L5, bi to pomenilo, da obstaja možnost zanesljivejšega zgodnjega odkrivanja okužb vinogradov s fitoplazmo FD in ustreznega ukrepanja.

Naloga 2.1 Vzorčenje nimf ameriškega škržatka L3-L5 (KGZ-NG, KGZ-MB)

V vinogradih iz območja, kjer je potrjena okužba z zlato trsno rumenico, bomo vzorčili nimfe ameriškega škržatka L3, L4 in L5. Nimfe bomo vzorčili v vsaj 3 različnih vinogradih s potrjeno okužbo s fitoplazmo FD (na primer 1x Z in 2x SV Slovenija) v dveh rastnih sezonah. Nimfe L3 bomo vzorčili v času cvetenja, nimfe L4 ob začetku razvoja plodičev in nimfe L5 v času rasti jagod. Vzorce nimf bomo nabrali s pomočjo entomološke mreže in entomološkim sesalcem. Nimfe bomo takoj po ulovu dali v 70 % etanol. Nimfe iste razvojne stopnje ulovljene v istem časovnem obdobju in na isti lokaciji bomo združili v en vzorec. Za vsak vzorec bomo vodili evidenco o stopnji nimfe, času in lokaciji ulova.

Naloga 2.2 Preverjanje prisotnosti fitoplazme FD v nimfah ameriškega škržatka L3-L5 (NIB)

Pred laboratorijsko analizo bomo iz vzorcev nimf sprali etanol in pripravili podvzorce z 1-10 nimfami iste razvojne stopnje. Podvzorce nimf bomo homogenizirali, iz homogenata izolirali celokupno DNA in

jo analizirali s PCR v realnem času na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV. Molekularna metoda določanja fitoplazem iz skupine 16SrV, ki bo uporabljena, je v skladu z EPPO PM7/079(2).

Naloga 2.3 Evalvacija in diseminacija rezultatov o možnosti ugotavljanja fitoplazme FD v preimaginalnih stadijih ameriškega škrdatka (NIB)

Pridobljene rezultate analiz vzorcev nimf iz obeh sezon bomo evalvirali in pripravili poročilo z izsledki kjer bodo, v kolikor bo na podlagi rezultatov to smiselno, vključena tudi nova priporočila glede izvajanja pregledov in analiz s ciljem zgodnejšega odkrivanja prisotnosti fitoplazme povzročiteljice zlate trsne rumenice v vinogradu. Izsledke bomo zainteresirani strokovni javnosti posredovali pred pričetkom rastle sezone v letu 2025 in na ta način omogočili (v kolikor se bo to izkazalo kot smiselno) vpeljavo v prakso že pred zaključkom tega projekta.

Predvideni so naslednji mejniki:

- M2.1.1: nabrani vzorci nimf L3-L5 v 1. sezoni – mesec 10 – nosilec KGZ-NG, KGZ-MB
- M2.2.1: analizirani vzorci nimf L3-L5 iz 1. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV – mesec 13 – nosilec NIB
- M2.1.2: nabrani vzorci nimf L3-L5 v 2. sezoni – mesec 22 – nosilec KGZ-NG, KGZ-MB
- M2.2.2: analizirani vzorci nimf L3-L5 iz 2. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV – mesec 25 – nosilec NIB

Predvideni so naslednji rezultati:

- R2.3: poročilo o možnosti zaznave fitoplazme FD v preimaginalnih stadijih ameriškega škrdatka in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti – mesec 31 - nosilec NIB.

DS3 Drugi možni prenašalci fitoplazme FD in njihova prisotnost v Sloveniji

V tem DS bomo razširili znanje o možnih prenašalcih fitoplazme FD, ki so prisotni v Sloveniji. Popis in informacije o zastopanosti možnih prenašalcev te fitoplazme v vinogradih, nasadih lesk ter v njihovi neposredni okolici bo osnova za izvedbo DS4.

Glavni žuželčni prenašalec fitoplazme FD med trtami je ameriški škrdatek, ki s sesanjem iz listnih žil okuženih trt fitoplazmo sprejme z rastlinskim sokom in jo prenese na neokužene trte. Ko se škrdatek okuži, ostane kužen celotno življenjsko dobo. Ameriški škrdatek živi predvsem na trti. Po podatkih iz literature, lahko iz okuženega navadnega srobotra (*Clematis vitalba*) fitoplazmo na trto prenese navadni dolgoglavec (*Dictyophara europaea*), z okužene jelše na trto pa vzhodnjaški škrdatek (*Orientalus ishidae*) in jelšev škrdatek (*Oncopsis alni*), glede na najnovejše raziskave pa morda tudi škrdatek *Allygus* spp. (Malembic-Maher in sod., 2020). Vzhodnjaški škrdatek je bil izpostavljen tudi kot možen prenašalec fitoplazme FD iz leske na trto (Casati in sod., 2017), v Sloveniji pa tudi kot možen prenašalec te fitoplazme med gojenimi leskami (*Corylus avellana*) (Mehle in Dermastia, 2019). Z izjemo ameriškega škrdatka in vzhodnjaškega škrdatka, v Sloveniji še niso bile izvedene zadostne raziskave v smeri preverjanja o drugih možnih prenašalcih fitoplazme FD, ki bi bili lahko pri nas pomembni pri prenosu fitoplazme FD v vinograde in znotraj nasadov lesk.

Naloga 3.1 Priprava seznama možnih prenašalcev fitoplazme FD (KGZ-NG)

V okviru tega DS bomo, na podlagi podatkov iz literature in predvsem na podlagi poznavanja njihovih vedenjskih in prehranjevalnih navad, pripravili seznam škrdatkov, ki bi poleg že omenjenih škrdatkov, bili možni prenašalci fitoplazme FD med različnimi gostiteljskimi rastlinami. V seznam bom vključili tudi ključne informacije, kot so na primer znani podatki o gostiteljskih rastlinah in njihova razširjenost v Sloveniji (vključno z informacijami o morebitnih znanih podatkih glede prisotnosti v Sloveniji).

Naloga 3.2 Preverjanje prisotnosti možnih prenašalcev fitoplazme FD v vinogradih, nasadih lesk in v njihovi okolici (KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS)

V vinogradih in v nasadih lesk ter v bližini le-teh bomo izobesili rumene lepljive plošče. Rumene lepljive plošče bomo izobesili v štirih vinogradih in njihovi okolici (na primer 1x Z Slovenija, 2x SV Slovenija in 1x osrednja Slovenija) ter v treh nasadih lesk in njihovi okolici (na primer 1x Z Slovenija, 1x SV Slovenija in 1x osrednja Slovenija). V vsak vinograd/nasad lesk bomo izobesili tri rumene lepljive plošče (na treh različnih mestih v nasadu). Po tri rumene lepljive plošče bomo izobesili tudi v okolici vsakega proučevanega vinograda/nasada lesk. Rumene lepljive plošče bomo menjali vsake 14 dni v obdobju od maja do septembra. Pri pregledu plošč se bomo poleg ameriškega in vzhodnjaškega škrdatka osredotočili na vse možne prenašalce FD določene v nalogi 3.1 in določili število ulovljenih osebkov na ploščo za vsako vrsto škrdatka, v vsaki časovni točki in za vsako lokacijo posebej.

Naloga 3.3 Priprava seznama o najverjetnejših oziroma o predvidoma najpomembnejših možnih prenašalcih fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji (KGZ-NG)

Na podlagi rezultatov naloge 3.2 bomo pripravili za vsakega možnega prenašalca iz seznama pridobljenega v nalogi 3.1 oceno glede njegove vloge pri prenosu fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji. Na ta način bomo pridobili seznam o predvidoma najpomembnejših možnih prenašalcih fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji, ki bo osnova za načrtovanje dela v okviru DS4.

Predvideni so naslednji mejniki:

- M3.1.1: priprava seznama možnih prenašalcev fitoplazme FD s ključnimi informacijami – mesec 7 – nosilec KGZ-NG
- M3.2.1: nabrani vzorci lepljivih plošč z ujetimi osebki – mesec 12 – nosilec KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
- M3.2.2: rezultati pregleda lepljivih plošč s podatki o zastopanosti (in dinamiki pojavnosti v določenem časovnem obdobju) možnih prenašalcev v proučevanih vinogradih, v nasadih lesk in v njihovi okolici – mesec 15 – nosilec KGZ-NG.

Predvideni so naslednji rezultati:

- R3.3: seznam najverjetnejših oziroma predvidoma najpomembnejših možnih prenašalcih fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji – mesec 19 - nosilec KGZ-NG.

DS4 Okuženost drugih možnih prenašalcev fitoplazme FD v vinogradih, nasadih lesk in v njihovi okolici

V tem DS bomo preverili okuženost možnih alternativnih prenašalcev FD v vinogradih in nasadih lesk nabranih na območjih okuženih s fitoplazmami iz skupine 16SrV in v bližini le-teh. Osredotočili se bomo zgolj na tiste, ki bodo v DS3 (R3.3) spoznani kot verjetno najpomembnejši možni prenašalci fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji.

Prisotnost fitoplazme FD smo v Sloveniji že potrdili v osebkih vzhodnjaškega škrdatka ulovljenih v okuženih nasadih lesk ter njihovi okolici in z znano oceno stopnje okuženosti le-teh. Podatkov o stopnji okuženosti vzhodnjaškega škrdatka s fitoplazmo FD iz okolice okuženih vinogradov nimamo, manjkajo nam tudi podatki o okuženosti drugih možnih prenašalcev fitoplazme FD v vinogradih, nasadih lesk in v njihovi okolici. Sama okuženost škrdatkov s fitoplazmo FD še ne pomeni, da jo je

škržatek tudi sposoben prenašati na druge rastline, kljub temu, pa je to pomemben podatek, ki nam pove, da obstaja možnost, da je tak škržatek prenašalec fitoplazme FD.

Naloga 4.1 Vzorčenje možnih prenašalcev fitoplazme FD (KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS)

V vinogradih iz območja okuženega z zlato trsno rumenico, v nasadih lesk s potrjeno okužbo s fitoplazmami iz skupine 16SrV ter v neposredni okolici teh vinogradov in nasadov lesk bomo lovili osebkke odraslih škržatkov. Škržatke bomo lovili v vsaj petih časovnih točkah v obdobju od junija do septembra. Lovili jih bomo v treh različnih vinogradih (na primer 1x Z Slovenija in 2x SV Slovenija), v treh nasadih lesk (na primer 1x Z Slovenija, 1x SV Slovenija in 1x osrednja Slovenija) ter v njihovi okolici. Škržatke bomo lovili s pomočjo entomološke mreže in z entomološkim sesalcem. Ulovljene škržatke bomo po ulovu takoj shranili v 70 % etanol. Ulovljene škržatke bomo nato identificirali in izbrane škržatke (na podlagi R3.3) iste vrste, ulovljene v isti časovni točki in na isti lokaciji, združili v en vzorec. Za vsak vzorec bomo vodili evidenco o vrsti škržatka, času in natančni lokaciji ulova (t.i. popis lokacije vključno z opisom okoliške vegetacije).

Naloga 4.2 Preverjanje prisotnosti fitoplazme FD v škržatkih (NIB)

Pred molekularno analizo bomo etanol iz škržatkov sprali, pripravili podvzorce z 1-5 škržatkov, podvzorce škržatkov homogenizirali, iz homogenata izolirali celokupno DNA in jo analizirali s PCR v realnem času na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV. Molekularna metoda določanja fitoplazem iz skupine 16SrV, ki bo uporabljena, je v skladu z EPPO PM7/079(2) in omogoča hkrati tudi oceno količine fitoplazme v analiziranem vzorcu. V primeru potrditve prisotnosti fitoplazme iz skupine 16SrV, bomo na vzorcih/podvzorcih, v katerih bomo na podlagi rezultatov PCR v realnem času ocenili, da je količina fitoplazme zadostna za ugotavljanje ali gre za okužbo z izolati, ki na trti lahko povzročijo epifitocije ali ne, izvedli v ta namen dodatne analize. Te dodatne analize bodo analize nukleotidnega zaporedja gena map (Malembic-Maher in sod., 2020) ali druge molekularne analize, če se bodo v Euphresco projektu Flado-Vigilant (2020-A-344) izkazale kot primernejše od analiz gena map.

Naloga 4.3 Evalvacija in diseminacija rezultatov o možnih novih prenašalcih fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji (KGZ-NG, NIB)

Pridobljene rezultate analiz bomo evalvirali in pripravili poročilo z izsledki o možnih novih prenašalcih fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji. Izsledke bomo predstavili zainteresirani strokovni javnosti ter rezultate javno objavili.

Predvideni so naslednji mejniki:

- M4.1.1: nabrani škržatki – mesec 24 – nosilec KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
- M4.1.2: pripravljene vzorci z identificiranimi škržatki - mesec 26 – nosilec KGZ-NG
- M4.2.1: analizirani vzorci škržatkov na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV – mesec 28 – nosilec NIB
- M4.2.2: določeni genotipi izolatov fitoplazme 16SrV odkritih v vzorcih škržatkov – mesec 32 - nosilec NIB.

Predvideni so naslednji rezultati:

- R4.3: poročilo o okuženosti drugih možnih prenašalcev FD v vinogradih in v bližini vinogradov in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti – mesec 36 - nosilec KGZ-NG, NIB.

DS5 Proučevanje vzhodnjaškega škratka (*Orientus ishidae*)

V tem DS bomo pridobili znanje o vzhodnjaškem škržatku in sicer je namen tega DS, da pridobimo podatke o njegovi bionomiji, da preverimo možnost prenosa fitoplazme FD z njim med leskami in iz lesk na trto ter možnost, da ga zatiramo z insekticidi v nasadih lesk.

Ker je vzhodnjaški škržatek polifagna tujerodna žuželčja vrsta v Sloveniji, imamo do sedaj premalo podatkov o njegovi bionomiji, ki je nujna za pravočasno in uspešno zatiranje tega škodljivca, za katerega je že znano, da prenaša fitoplazme iz skupine 16SrV med jelšami ter da iz jelš na trto lahko naključno zanese tudi izolate, ki jih potem ameriški škržatek lahko raznese med trtami, kar lahko vodi do pojava epifitocij v vinogradu. Na podlagi rezultatov strokovnjakov iz Švice ter podatkov, ki smo jih pridobili v okviru Euphresco projekta Flado-Vigilant (2020-A-344) ter v okviru ARRS projekta NanoPhyto (L7-2632) sumimo, da je vzhodnjaški škržatek tudi pomemben prenašalec fitoplazem iz skupine 16SrV med leskami in zelo verjetno fitoplazmo FD lahko tudi naključno zanese iz lesk na trto, kar pa je seveda potrebno še preveriti. Ker je glede na do sedaj znane podatke vzhodnjaški škržatek najverjetnejši in verjetno najpomembnejši prenašalec fitoplazem iz skupine 16SrV med leskami, je smiselno, da proučimo tudi možnost njegovega zatiranja v nasadih lesk, kar bo pripomoglo k omejevanju širjenja okužb v nasadih in posledično škode, ki je zaradi teh fitoplazem povzročena.

Naloga 5.1 Proučevanje bionomije vzhodnjaškega škržatka (IHPS, KGZ-NG, KGZ-MB)

V okviru te naloge bomo na podlagi pregleda literature pripravili pregled podatkov o bionomiji vzhodnjaškega škržatka, ki je klimatsko primerljivem našemu okolju. Na območjih, kjer so znani habitati pojavljanja vzhodnjaškega škržatka, bomo v rastni sezoni 2024 na klimatsko različnih lokacijah po Sloveniji (Z, SV in osrednja Slovenija) od maja do avgusta (na 7-10 dni) z entomološko mrežo in entomološkim sesalcem iskali preimaginalne stadije vzhodnjaškega škržatka ter glede na lokacijo in čas spremljanja beležili njihov pojav. Odrasle vzhodnjaške škržatke bomo spremljali s pomočjo rumenih lepljivih plošč od junija do oktobra, katere bomo menjali na 2 tedna. Na podlagi pridobljenih podatkov bomo poskušali pridobiti več podatkov o bionomiji pojavljanja posameznih razvojnih stopenj vzhodnjaškega škržatka. Opazovanja in spremljanja na terenu bomo dopolnili z meteorološkimi podatki in fenološkimi fazami razvoja vinske trte in lesk.

Naloga 5.2 Preverjanje možnosti prenosa fitoplazme FD med leskami in na trto z vzhodnjaškim škržatkom (IHPS, NIB)

Pripravili bomo tri mrežnike, ki bodo preprečevali vstop in izstop škržatkov. V en mrežnik bomo posadili trte sorta Chardonnay, v drug mrežnik leske (Istrska dolgoplodna), v tretji mrežnik, ki bo služil kot negativna kontrola, pa leske in trte skupaj. Vse posajene trte in leske bodo z laboratorijskimi testi izvedenimi v skladu z EPPO PM7/079(2) in EPPO PM7/133(1) preverjeno proste fitoplazem. Odrasle osebkje vzhodnjaškega škržatka bomo lovili v neposredni okolici s 16SrV fitoplazmami okuženih nasadov (v nasadih, kjer smo v okviru Euphresco projekta Flado-Vigilant (2020-A-344) že dokazali, da je del populacije vzhodnjaškega škržatka okužen s fitoplazmami skupine 16SrV) in jih žive prenesli v mrežnik s trto in v mrežnik z leskami. V mrežnika bomo vnesli vse osebkje vzhodnjaške škržatka, ki jih bomo ulovili v dveh rastnih sezonah od junija do septembra. V ta namen bomo v vsaki rastni sezoni odrasle osebkje vzhodnjaškega škržatka lovili vsaj 5x (v vsaj 5 različnih dnevih v času intenzivnega naleta v juliju in avgustu). Ob koncu prve in ob koncu druge rastne sezone bomo trte in leske iz mrežnikov (tudi iz mrežnika, ki bo služil kot negativna kontrola) analizirali na prisotnost fitoplazem, na vzorcih s potrjeno okužbo na fitoplazme pa izvedli še dodatne molekularne analize, s katerimi bomo preverili ali gre za okužbo z izolati, ki na trti lahko povzročijo epifitocije ali ne. Laboratorijske metode, ki jih bomo uporabili, so natančno opredeljene v opisu naloge 4.2.

Naloga 5.3 Proučevanje možnosti zatiranja vzhodnjaškega škržatka z insekticidi na leskah (IHPS)

Na podlagi podatkov iz literature ter izkušenj iz tujine, bomo pripravili seznam insekticidov, ki bi bili primerni za zatiranje vzhodnjaškega škržatka in za uporabo v nasadih leske. Pri tem se bomo osredotočili na insekticidne aktivne snovi, ki so že dovoljene na leskah za zatiranje lešnikarja in glede na način delovanja, če lahko glede na bionomijo pojava vzhodnjaškega škržatka s pridobljenimi podatki v nalogi 5.1 pričakujemo glede na izkušnje pri zatiranju ameriškega škržatka učinek na vzhodnjaškega škržatka. Poleg tega pa bomo na EU nivoju pogledali v dostopne sezname razpoložljivih aktivnih snovi v Evropi, ki bi imele glede na način delovanja vpliv na zmanjševanje oziroma zatiranje vzhodnjaškega škržatka in njihovo uporabo v Sloveniji. Pri čemer bomo upoštevali poleg načina delovanja morebitne omejitve pri implementaciji oziroma uporabe na leskah v Sloveniji.

Naloga 5.4 Evalvacija rezultatov proučevanja vzhodnjaškega škržatka (IHPS)

Pridobljena nova spoznanja o vzhodnjaškem škržatku bomo evalvirali in pripravili poročilo s povzetkom o njegovi bionomiji, možnosti prenosa fitoplazme FD z njim med leskami in iz lesk na trto ter morebitne možnosti njegovega zatiranja z insekticidi v nasadih lesk. Izsledke bomo predstavili zainteresirani strokovni javnosti.

Predvideni so naslednji mejniki:

- M5.2.1 pripravljene mrežniki – mesec 6 – nosilec IHPS
- M5.2.2 izbrane in preverjene s fitoplazmami neokužene trte in leske posajene v mrežnike - mesec 7 – nosilec IHPS, NIB
- M5.2.3 vneseni osebki vzhodnjaškega škržatka v mrežnika v 1. rastni sezoni - mesec 12 – nosilec IHPS
- M5.2.4 znani rezultati testiranja lesk in trt iz vseh treh mrežnikov ob koncu 1. rastne sezone - mesec 14 – nosilec IHPS, NIB
- M5.1.1 pripravljena metodologija za spremljanje bionomije vzhodnjaškega škržatka - mesec 19 – IHPS, KGZ-MB
- M5.2.5 vneseni osebki vzhodnjaškega škržatka v mrežnika v 2. rastni sezoni - mesec 24 – nosilec IHPS
- M5.1.2 zbrani podatki o pojavu preimaginalnih stadijev vzhodnjaškega škržatka in pojavu odraslih osebkov ter meteorološki podatki in podatki o fenoloških fazah razvoja vinske trte in leske - mesec 25 – nosilec IHPS, KGZ-MB, KGZ-NG
- M5.2.6 znani rezultati testiranja lesk in trt iz vseh treh mrežnikov ob koncu 2. rastne sezone - mesec 26 – nosilec IHPS, NIB.

Predvideni so naslednji rezultati:

- R5.1 poročilo o bionomiji vzhodnjaškega škržatka - mesec 29 – nosilec IHPS
- R5.2 poročilo o rezultatih poskusa o možnosti prenosa fitoplazme FD med leskami in na trto z vzhodnjaškim škržatkom - mesec 29 – nosilec IHPS, NIB
- R5.3 Podatki o možnem obvladovanju vzhodnjaškega škržatka na leski – mesec 29 – nosilec IHPS
- R5.4 Poročilo o z glavnimi poudarki o novih spoznanjih glede vzhodnjaškega škržatka, in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti – mesec 36 - nosilec IHPS

DS6 Pomen lesk kot rezervoar za prenos FD na trto

V tem DS bomo razširili znanje o leski kot alternativnem gostitelju fitoplazme povzročiteljice zlate trsne rumenice z namenom ugotavljanja pomena teh gostiteljskih rastlin kot rezervoarja fitoplazem za okužbe vinogradov. V ta namen bomo preverili morebitno okuženost samoniklih in gojenih lesk s fitoplazmami, ki lahko povzročijo zlato trsno rumenico na območjih v bližini vinogradov v Sloveniji.

Prisotnost fitoplazme iz skupine 16SrV smo v Sloveniji potrdili v propadajočih gojenih leskah. Večina nasadov lesk, ki smo jih na prisotnost fitoplazem analizirali do sedaj, ni v bližini vinogradov. Samonikle leske v Sloveniji še nismo analizirali na prisotnost fitoplazem, je pa to smiselno preveriti, saj so na primer v Švici prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV odkrili v samoniklih leskah brez bolezenskih znamenj, ki so rastle v bližini vinograda okuženega z zlato trsno rumenico.

Naloga 6.1 Vzorčenje samoniklih in gojenih lesk v bližini vinogradov (KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS)

V bližini vinogradov s potrjeno okužbo z zlato trsno rumenico in tudi v bližini vinogradov, kjer okužba s fitoplazmo FD še ni bila potrjena, bomo preverili prisotnost samoniklih in gojenih lesk. Samonikle in gojene leske, z in brez bolezenskih znamenj, ki bodo rastle v bližini vinogradov bomo vzorčili v dveh sezonah, obakrat v bližini vsaj 6 različnih vinogradov s potrjeno okužbo z FD (na primer 2x Z Slovenija in 4x SV Slovenija), in v bližini vsaj 3 vinogradov, kjer okužba z FD še ni bila potrjena (na primer 1x Z Slovenija, 1x SV Slovenija in 1x osrednja Slovenija). V obeh sezonah bomo na vsaki od izbranih lokacij vzorčili vsaj 5 lesk. Vzorec bo vključeval poganjke in po možnosti tudi korenine nabrane na vsaj treh delih krošnje/koreninskega sistema ene leske. Ob vzorčenju bomo poleg natančne lokacije vzorčene leske, zabeležili še druge podatke, ki jih bomo potrebovali za nadaljnjo evalvacijo, kot so na primer morebitna opažena znamenja na leski (vključno s slikovnim gradivom), oddaljenost leske od vinograda, število lesk v bližini vinograda, opis stanja teh lesk, v primeru gojenih lesk pa še sorto in starost leske.

Naloga 6.2 Preverjanje prisotnosti fitoplazme FD v leskah (NIB)

V laboratoriju bomo izvedli analizo na prisotnost fitoplazem ločeno za vsak vzorec poganjkov in korenin. Iz listov bomo izrezali listne žile, iz korenin pa nastrgali floem. Listne žile in floem korenin bomo homogenizirali, iz homogenata izolirali celokupno DNA in jo analizirali s PCR v realnem času na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV, na izbranih vzorcih pa izvedli še dodatne molekularne analize s katerimi bomo preverili ali gre za okužbo z izolati, ki na trti lahko povzročijo epifitocije ali ne. Metode, ki jih bomo uporabili so natančno opredeljene v opisu naloge 4.2.

Naloga 6.3 Evalvacija in diseminacija rezultatov (NIB)

Pridobljene rezultate analiz iz obeh sezon bomo evalvirali in pripravili poročilo z izsledki, kjer bo na podlagi rezultatov opredeljen pomen lesk (samoniklih in gojenih) kot rezervoar za prenos FD na trto. Izsledke bomo predstavili zainteresirani strokovni javnosti.

Predvideni so naslednji mejniki:

- M6.1.1: nabrani vzorci lesk v 1. sezoni – mesec 13 – nosilec KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
- M6.2.1: analizirani vzorci lesk iz 1. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV – mesec 14 – nosilec NIB
- M6.2.2: določeni genotipi izolatov fitoplazme 16SrV odkritih v leskah iz 1. sezone – mesec 17 - nosilec NIB
- M6.1.2: nabrani vzorci lesk v 2. sezoni – mesec 25 – nosilec KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
- M6.2.3: analizirani vzorci lesk iz 2. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV – mesec 26 – nosilec NIB
- M6.2.4: določeni genotipi izolatov fitoplazme 16SrV odkritih v leskah iz 2. sezone – mesec 29 - nosilec NIB

Predvideni so naslednji rezultati:

- R6.3: poročilo o pomenu lesk (samoniklih in gojenih) kot rezervoar za prenos FD na trto in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti – mesec 36 - nosilec NIB

DS7 Daljinsko zaznavanje z metodo hiperspektralnega slikanja z letalom za zgodnje odkrivanje okužb z FD

Namen tega DS je razvoj klasičarskih modelov za prepoznavanje rastlin okuženih s FD, z uporabo letalskega hiperspektralnega slikanja v časovni vrsti. Zajem podatkov v časovni vrsti bo omogočil razvoj metod za zgodnje odkrivanje okužb, torej pred pojavom vidnih znakov.

Doslej razvite metode za določanje okužb s FD na vinski trti so bile osredotočene na samo enkratni zajem podatkov, ko so bili znaki okužb najbolj razviti. Omejitve uporabe multispektralnega slikanja za določanje zdravstvenega stanja rastlin smo prikazali tudi v okviru projekta CRP V4-1103. Rezultati raziskave kažejo na pomembnost visoke spektralne in prostorske ločljivosti ter vpliv rastrskih celic z mešanimi spektralnimi podpisi. Čeprav je bilo hiperspektralno slikanje uspešno uporabljeno za določanje okužb s FD, so bile te raziskave omejene na rastlinjake ali manjše poskuse v vinogradih. Tovrstni modeli imajo zato omejeno uporabnost na večjih površinah, na primer posameznih vinogradih. Z uporabo letalskega hiperspektralnega slikanja v časovni vrsti na več vinogradih bomo pridobili prostorsko in spektralno natančne podatke velikega števila rastlin. Z združevanjem spektralnih podatkov in rezultatov popisa zdravstvenega stanja rastlin iz programa strokovnih nalog, bomo lahko razvili zanesljive klasičarske modele, s čimer bo omogočeno pravočasno in usmerjeno ukrepanje na večjih vinogradiških površinah.

Naloga 7.1 Hiperspektralno slikanje z letalom in brezpilotnim letalnikom

Letalske hiperspektralne slike bomo pridobili v sodelovanju s podjetjem Aerovizija d.o.o. Podatke bomo zajemali večkrat v rastni sezoni. Slike bomo zajemali z dvema hiperspektralnima kamerama, Hypspx VNIR (400 - 1000 nm) in SWIR (1000 - 2500 nm). Pri vseh slikanjih bomo uporabili talne referenčne točke (angl. ground control points), s čimer bomo izboljšali pozicijsko natančnost posnetkov. Točno pozicijo tarč bomo določili s sprejemnikom GNSS Stonex S9i, s centimetrsko natančnostjo. Vse slike bomo radiometrično korigirali, georeferencirali in ortorektificirali. Tako pripravljene slike bomo nato segmentirali, da iz njih ekstrahiramo rastrske celice posamezne vinske trte. Te podatke bomo nato pretvorili v svetlobni odboj na dnu atmosfere, ter jih združili s podatki o zdravstvenem stanju rastlin iz programov preiskav strokovnih nalog. Hiperspektralno slikanje bomo izvedli hkrati z vizualnimi pregledi oziroma v čim bližjem časovnem terminu, odvisno od vremena. Tako bomo zmanjšali variabilnost podatkov in s tem povečali razmerje med signalom in šumom.

Naloga 7.2 Strojno učenje in validacija modelov

Predobdelava spektralnih podatkov bo, med drugim, vključevala normalizacijo s površino pod krivuljo, derivate z glajenjem Savitzky-Golay, manjšanje dimenzionalnosti podatkov in ekstrakcijo karakteristik, ter raziskavo podatkov (npr. z uporabo analize glavnih komponent, diskriminantne analize najmanjših delnih kvadratov, ter t-distribuirana stohastična vdelava soseda – angl. t-distributed stochastic neighbour embedding). Tako obdelane podatke bomo uporabili v poskusih strojnega učenja z različnimi klasičarskimi algoritmi (npr. extreme gradient boosting, metoda podpornih vektorjev, konvolucijske nevronske mreže). Uspešnost modelov bomo ocenjevali z več merili, na primer s krivuljo ROC (angl. Receiver Operating Characteristic) in meritvami natančnosti (na primer specifičnost in občutljivost). Pomemben dejavnik bo tudi čas, potreben za izračun rezultatov, saj bolj zapletene metode (npr. metoda podpornih vektorjev in globoko učenje) zahtevajo več časa za izračune, v primerjavi z bolj enostavnimi metodami. Končne rezultate bomo predstavili s kartami verjetnosti okužb (angl. heat maps) za vsako rastrsko celico. Ker bodo tovrstne karte ohranjale prostorske informacije, bo tako olajšano upravljanje z boleznimi in škodljivci. Vse razvite modele bomo dodatno validirali in kalibrirali z novimi podatki iz drugega leta projekta.

Spektralno obdelavo podatkov bomo izvedli z odprtokodno programsko opremo in programskimi jeziki (npr. Python, R in Q-GIS). Odprtokodna narava te programske opreme bo olajšala nadaljnji razvoj natančnega kmetijstva drugim raziskovalnim skupinam in ne bo omejena na uporabo v Sloveniji.

Predvideni so naslednji mejniki:

- M 7.1.1 Zaključeno letalsko hiperspektralno slikanje v prvem letu – mesec 13, nosilec KIS
- M 7.1.2 Zaključeno letalsko hiperspektralno slikanje v drugem letu – mesec 25, nosilec KIS
- M 7.2.1 Zaključeno predprocesiranje hiperspektralnih posnetkov – mesec 29, nosilec KIS
- M 7.2.2 Zaključeno strojno učenje – mesec 34, nosilec KIS

Predvideni so naslednji rezultati:

- R7.2.1 Spektralne knjižnice, klasifikacijski modeli in karte verjetnosti okužb – mesec 35, nosilec KIS
- R7.2.2 Poročilo o daljinskem zaznavanju bolezni vinske trte – mesec 36, nosilec KIS

Časovnica:

Časovnica projekta (tabela spodaj) prikazuje mejnike in rezultate projekta. Za poročanje ARRS so predvideni meseci okvirni, poročanje bo prilagojeno datumskim okvirom financerja.

Tabelarični prikaz mejnikov in rezultatov po vrstnem redu izvajanja
(barve ustrezajo delovnim sklopom prikazanim na GANTT prikazu)

Delovni sklop	tip	oznaka	opis	mesec projekta	nosilec
DS1	mejnik	M1.1	Uvodni sestanek partnerjev projekta	01	NIB
DS1	mejnik	M1.2	Postavljena spletna stran projekta	02	NIB
DS1	mejnik	M1.3	Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) ter letno poročilo za 2022 ARRS	06	NIB
DS5	mejnik	M5.2.1	Pripravljeni mrežniki	06	IHPS
DS3	mejnik	M3.1.1	Priprava seznama možnih prenašalcev fitoplazme FD s ključnimi informacijami	07	KGZ-NG
DS5	mejnik	M5.2.2	Izbrane in preverjeno s fitoplazmami neokužene trte in leske posajene v mrežnike	07	IHPS, NIB
DS2	mejnik	M2.1.1	Nabrani vzorci nimf L3-L5 v 1. sezoni	10	KGZ-NG, KGZ-MB
DS1	mejnik	M1.4	Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo	12	NIB
DS3	mejnik	M3.2.1	Nabrani vzorci lepljivih plošč z ujetimi osebki	12	KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
DS5	mejnik	M5.2.3	Vneseni osebki vzhodnjaškega škržatka v mrežnika v 1. rastni sezoni	12	IHPS
DS2	mejnik	M2.2.1	Analizirani vzorci nimf L3-L5 iz 1. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV	13	NIB

DS6	mejni	M6.1.1	Nabrani vzorci lesk v 1. sezoni	13	KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
DS7	mejni	M7.1.1	Zaključeno letalsko hiperspektralno slikanje v prvem letu	13	KIS
DS5	mejni	M5.2.4	Znani rezultati testiranja lesk in trt iz vseh treh mrežnikov ob koncu 1. rastne sezone	14	IHPS, NIB
DS6	mejni	M6.2.1	Analizirani vzorci lesk iz 1. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV	14	NIB
DS3	mejni	M3.2.2	Rezultati pregleda lepljivih plošč s podatki o zastopanosti (in dinamiki pojavnosti v določenem časovnem obdobju) možnih prenašalcev v proučevanih vinogradih, v nasadih lesk in v njihovi okolici	15	KGZ-NG
DS6	mejni	M6.2.2	Določeni genotipi izolatov fitoplazme 16SrV odkritih v leskah iz 1. sezone	17	NIB
DS1	mejni	M1.5	Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) ter letno poročilo za 2023 ARRS	18	NIB
DS3	rezultat	R3.3	Seznam najverjetnejših oziroma predvidoma najpomembnejših možnih prenašalcev fitoplazme FD iz alternativnih gostiteljev na trto in med leskami v Sloveniji	19	KGZ-NG
DS5	mejni	M5.1.1	Pripravljena metodologija za spremljanje bionomije vzhodnjaškega škrčatka	19	IHPS, KGZ-MB
DS2	mejni	M2.1.2	Nabrani vzorci nimf L3-L5 v 2. sezoni	22	KGZ-NG, KGZ-MB
DS1	mejni	M1.6	Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP)	24	NIB
DS4	mejni	M4.1.1	Nabrani škrčatki	24	KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
DS5	mejni	M5.2.5	Vneseni osebki vzhodnjaškega škrčatka v mrežnika v 2. rastni sezoni	24	IHPS
DS2	mejni	M2.2.2	Analizirani vzorci nimf L3-L5 iz 2. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV	25	NIB
DS5	mejni	M5.1.2	Zbrani podatki o pojavu preimaginalnih stadijev vzhodnjaškega škrčatka in pojavu odraslih osebkov ter meteorološki podatki in podatki o fenoloških fazah razvoja vinske trte in leske	25	IHPS, KGZ-MB, KGZ-NG
DS6	mejni	M6.1.2	Nabrani vzorci lesk v 2. sezoni	25	KGZ-NG, KGZ-MB, IHPS
DS7	mejni	M7.1.2	Zaključeno letalsko hiperspektralno slikanje v drugem letu	25	KIS
DS4	mejni	M4.1.2	Pripravljene vzorce z identificiranimi škrčatki	26	KGZ-NG

DS5	mejnik	M5.2.6	Znani rezultati testiranja lesk in trt iz vseh treh mrežnikov ob koncu 2. rastne sezone	26	IHPS, NIB
DS6	mejnik	M6.2.3	Analizirani vzorci lesk iz 2. sezone na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV	26	NIB
DS4	mejnik	M4.2.1	Analizirani vzorci škržatkov na prisotnost fitoplazem iz skupine 16SrV	28	NIB
DS5	rezultat	R5.1	Poročilo o bionomiji vzhodnjaškega škržatka	29	IHPS
DS5	rezultat	R5.2	Poročilo o rezultatih poskusa o možnosti prenosa fitoplazme FD med leskami in na trto z vzhodnjaškim škržatkom	29	IHPS, NIB
DS5	rezultat	R5.3	Podatki o možnem obvladovanju vzhodnjaškega škržatka na leski	29	IHPS
DS6	mejnik	M6.2.4	Določeni genotipi izolatov fitoplazme 16SrV odkritih v leskah iz 2. sezone	29	NIB
DS7	mejnik	M7.2.1	Zaključeno predprocesiranje hiperspektralnih posnetkov	29	KIS
DS1	mejnik	M1.7	Sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko in vmesno poročilo (MKGP) ter letno poročilo za 2024 ARRS	30	NIB
DS2	rezultat	R2.3	Poročilo o možnosti zaznave fitoplazme FD v preimaginalnih stadijih ameriškega škržatka in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti	31	NIB
DS4	mejnik	M4.2.2	Določeni genotipi izolatov fitoplazme 16SrV odkritih v vzorcih škržatkov	32	NIB
DS7	mejnik	M7.2.2	Zaključeno strojno učenje	34	KIS
DS7	rezultat	R7.2.1	Spektralne knjižnice, klasifikacijski modeli in karte verjetnosti okužb	35	KIS
DS1	mejnik	M1.8	Zaključni sestanek partnerjev projekta z vsebinsko spremljevalko projekta	36	NIB
DS1	rezultat	R1.1	Zaključno poročilo projekta (MKGP in ARRS)	36	NIB
DS4	rezultat	R4.3	Poročilo o okuženosti drugih možnih prenašalcev FD v vinogradih in v bližini vinogradov in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti	36	KGZ-NG, NIB
DS5	rezultat	R5.4	Poročilo o z glavnimi poudarki o novih spoznanjih glede vzhodnjaškega škržatka, in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti	36	IHPS
DS6	rezultat	R6.3	Poročilo o pomenu lesk (samoniklih in gojenih) kot rezervoar za prenos FD na trto in predstavitev zainteresirani strokovni javnosti	36	NIB
DS7	rezultat	R7.2.2	Poročilo o daljinskem zaznavanju boleznih vinske trte	36	KIS

Podpis:

Vodja projekta:

Vsebinska spremljevalka:

Doc. dr. Nataša Mehle

Nacionalni inštitut za biologijo

Mag. Erika Orešek

MKGP, UVHVVR