

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/18



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1102
Naslov projekta	Reševanje problematike ustaljenih karantenskih bolezni sadnih vrst Prunus spp. za ohranitev pridelave
Vodja projekta	15489 Irena Mavrič Pleško
Naziv težišča v okviru CRP	1.01.02 Reševanje problematike ustaljenih karantenskih bolezni z iskanjem in uvajanjem tolerantnih sort in tipov sadnih vrst Prunus spp. za ohranitev pridelave
Obseg raziskovalnih ur	1336
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	10.2011 - 09.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	401 Kmetijski inštitut Slovenije
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	105 Nacionalni inštitut za biologijo 1360 KMETIJSKO GOZDARSKA ZBORNICA SLOVENIJE KMETIJSKO GOZDARSKI ZAVOD NOVA GORICA
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.03 Rastlinska produkcija in predelava 4.03.05 Fitomedicina
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.01 Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo

2.Sofinancerji

Sofinancerji					
1.	<table border="1"> <tr> <td>Naziv</td> <td>Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano</td> </tr> <tr> <td>Naslov</td> <td>Dunajska 22, Ljubljana</td> </tr> </table>	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano	Naslov	Dunajska 22, Ljubljana
Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano				
Naslov	Dunajska 22, Ljubljana				

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

V okviru projekta smo raziskovali tri glavne karantenske bolezni koščičarjev, šarko, leptonekrozo koščičarjev ter bolezni, ki jih povzročajo glive iz rodu *Monilinia*. Pripravili smo tri protokole za testiranje odpornosti koščičarjev na PPV, Monilije in ESFY. Okarakterizirali smo izolate PPV iz različnih delov Slovenije in ugotovili, da pripadajo trem skupinam izolatov, PPV-M, PPV-D in PPV-Rec, izolati PPV-M pa dvema podskupinama znotraj te skupine, PPV-Ma in PPV-Mb. Potrdili smo opažanja, da se lahko znaki in škode zaradi okuženosti s PPV v posameznih letih pojavljajo šele tik pred obiranjem. Ugotovili smo tudi, da je malo verjetno, da bi tudi v prihodnje uspeli v Brkinih poiskati na PPV odporna ali tolerantna drevesa. Zato smo preučili nabor sort, ki bi lahko nadomestile 'domačo slivo' v Brkinih in predlagali izbor sort, ki bi jih bilo potrebno preizkusiti. Ugotovili smo, da se je *Monilinia fructicola* v nasadih na Goriškem v času trajanja projekta zelo razširila in izpodrinila domorodni vrsti *M. laxa* in *M. fructigena*. Ker je ta vrsta agresivnejša, hitreje prirašča in intenzivneje sporulira predvidevamo, da se bo bolezen v prihodnosti izrazila v večjem obsegu, hkrati pa lahko pride pri tej vrsti tudi do hitrejšega nastanka odpornosti na fungicide. Pri preizkušanju odpornost plodov in poganjkov marelice sorte 'domači flokarji' na okužbo z glivama *M. laxa* in *M. fructicola* smo ugotovili, da so bile nekroze na poganjkih sorte 'domači flokarji' zelo omejene in značilno manjše kot pri drugih sortah. Uvedli smo metodo za hitro določanje prisotnosti vrste *M. fructicola* ter skupine gliv *M. fructigena*, *M. laxa* in *Monilia polystroma* na osnovi PCR z detekcijo v realnem času in TaqMan kemiji. Na Primorskem smo našli precej vitalnih dreves marelice brez vidnih bolezenskih znamenj okužbe z ESFY, ki pa so bila vsa okužena s to fitoplazmo. Da bi ugotovili, ali se opažena tolerantnost na okužbo prenaša tudi na potomstvo, torej na mlade sadike, smo opravili cepljenje podlag s cepiči dveh starih sort marelic. Vse cepljene sadike so v letu 2014 ustrezno rastle. Ugotovili smo, da je ključnega pomena za prenos fitoplazme ESFY stopnja okuženosti prezimitvene populacije češpljeve boljše, ki se spomladi seli z iglavcev na primarne gostitelje iz rodu *Prunus*. Laboratorijska potrditev navzočnosti fitoplazme v jajčecih češpljeve boljše nakazuje možnost transovarialnega prenosa fitoplazme s prezimitvenih samic na potomstvo. S pomočjo postavljenega modela za oceno stroškov pridelave koščičarjev, smo modelirali pridelovalne razmere brez omejitev in pridelovalne razmere s prisotnimi karantenskimi boleznimi. Modelirali smo velikost pridelka, življenjsko dobo nasadov ter ukrepe za preprečitev oz. blažitev posledic proučevanih karantenskih bolezni za tri različne tehnologije pridelave marelic in za tri različne tehnologije pridelave sliv za predelavo. Ugotovili smo, da je, ob upoštevanju navedenih tehnologij pridelave marelic in sliv, razlika v ekonomičnosti pridelave velika.

ANG

Studies of three quarantine diseases of stone fruits, sharka, brown rot and European stone fruit yellows were studied in frame of the project. Three protocols for testing the susceptibility of stone fruit cultivars PPV, *Monilinia* sp. and ESFY have been developed. PPV isolates from different parts of Slovenia were characterized and found to group into PPV-Rec, PPV-D and PPV-M groups with PPV-Ma and PPV-Mb subgroups. We confirmed that fruit drop due to PPV infection of susceptible cultivars can sometimes take place just before harvesting. We also concluded that it is hardly possible that PPV tolerant or resistant plums will be found in Brkini and a list of cultivars, which could be used in this region instead of cv. Domača češplja was prepared. The monitoring in Goriška region showed that the introduced species *M. fructicola* has spread extensively in last years and displaced the indigenous species *M. laxa* and *M. fructigena*. We suspect that the disease will spread extensively due to faster growth, aggressiveness and intensive sporulation of the introduced species. It can also develop fungicide resistance faster than other species. Testing of resistance against *M. laxa* in *M. fructicola* on apricot fruits and shoots revealed that old Slovene cultivar Domači flokarji produces typically smaller necroses on shoots compared to other cultivars. A method based on real-time PCR with Taq-Man chemistry was introduced for detection of *M. fructicola* and the detection of three other brown rot fungi *M. fructigena*, *M. laxa* and *Monilia polystroma*. Many trees without ESFY symptoms were found in Primorska region but they were all proved to be infected with phytoplasma. To determine if tolerance to ESFY is maintained also on grafted young plants, buds were taken from four infected trees of 'Debeli flokarji' and 'Catarji' and grafted onto Myrobalan 29 C rootstock. All 12 grafted plants developed well in the first year. The most important factor in ESFY spread is the degree of infection of re-immigrants (overwintering forms returned from shelter plants) of *C. pruni* that flies to primary hosts (*Prunus*) in spring. The confirmation of 'Ca. P. Prunorum' in the eggs of *C. pruni* indicates a possibility of trans-ovarian transmission to progeny. Using the model for estimation of cost of stone fruit production we modeled the production conditions without restrictions and with the presence of three quarantine diseases. Yield, orchard productivity and measures to avoid or mitigate the effects of studied diseases were modeled for three different technologies of production. We calculated big differences in economy of plum and apricot production.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Projekt je obravnaval tri karantenske bolezni koščičarjev, katerih povzročitelji so virus, glive in fitoplazma. Zaradi medsebojnega prepletanja nalog so člani projektne skupine pri izvajanju projekta intenzivno sodelovali med seboj ter s specialisti za sadjarstvo in s strokovnjaki svetovalne službe, ki najbolj poznajo praktične probleme v pridelavi koščičarjev in stanje na terenu. Pri vseh treh boleznih smo lahko spremljali razlike v pojavu bolezni in možnostih spremljanja bolezni zaradi vremenskih razmer, ki so v posameznih letih vplivale na pojavljanje bolezni ali na pridelek in s tem

na možnost ugotavljanja vpliva bolezni na pridelek.

Izdelava protokola za preizkušanje imunosti, odpornosti oz. tolerantnosti koščičarjev na PPV

Šarka, ki jo povzroča *Plum pox virus* (PPV), je najnevarnejše virusno obolenje koščičastih sadnih vrst. Pri občutljivejših sortah lahko okužba s PPV povzroči popolno izgubo pridelka. Eden najučinkovitejših ukrepov za obvladovanje PPV je gojenje odpornih sort. Na osnovi podatkov iz literature in slovenskih izkušenj smo izdelali protokol za preizkušanje vseh tipov odpornosti koščičarjev na PPV.

Proučevanje in karakterizacija izolatov virusa šarke

Namen tega sklopa je bil karakterizacija izolatov PPV iz različnih delov Slovenije, kar nam bi dalo širšo sliko o njihovi prisotnosti in razširjenosti v Sloveniji. Za karakterizacijo izolatov virusa šarke smo izbrali 32 izolatov PPV iz različnih delov Slovenije in iz različnih gostiteljskih rastlin. Izdelali smo filogenetske analize slovenskih nukleotidnih zaporedij in nukleotidnih zaporedij iz baze NCBI GenBank dolžine 908 nt na NIB/CP regiji PPV genoma. V nadaljevanju smo pri 18 slovenskih izolatih proučili tudi variabilnost 1323 baznih parov dolgih nukleotidnih zaporedij P3/6K1/CI regije, ki je zelo variabilna. Filogenetska analiza je pokazala, da se izolati razporejajo enako kot je bilo ugotovljeno pri proučevanju NIB/CP regije istih izolatov. Vse dosedanje analize so pokazale, da so v Sloveniji prisotni izolati iz skupin PPV-Rec, PPV-D in PPV-M. Znotraj PPV-M najdemo izolate iz podskupine PPV-Ma in podskupine PPV-Mb.

Iskanje virov odpornosti oz. tolerantnosti na PPV v nasadih češpelj in sliv

Vse od začetka sistematičnega nadzora virusa šarke v Brkinih nismo ugotovili okužb s tem virusom. Po vdoru PPV v Brkine pa se je izkazalo, da je 'Domača sliva' oz. Brkinska češpa nanj izjemno občutljiva. Občutljivost se kaže kot masovno odpadanje plodov tik pred zrelostjo, kar povzroča ogromno gospodarsko škodo. Kljub ekstremni občutljivosti Brkinske češpe na PPV smo poskušali v Brkinih poiskati posamezne rastline, ki bi bile odporne ali tolerantne na okužbo, vendar takih dreves nismo našli. Ker so možnosti, da bi našli na PPV odporna ali tolerantna drevesa v Brkinih zelo majhne, rešitev za pridelovalce sliv pa bi potrebovali čim hitreje, smo na osnovi pogovorov z domačimi in tujimi strokovnjaki predlagali, da bi bili kot nadomestilo za 'Domačo slivo' za uporabo kot namizni sorti primerni 'Čačanska lepotica' in 'Jojo', za predelavo v slivovko pa 'Top 2000' oz. 'Plumtastic'.

Inventarizacija stanja nasadov na pridelovalnem območju (Monilinia sp.)

Bolezni, ki jih povzročajo glive iz rodu *Monilinia* so razširjene v vseh pridelovalnih območjih koščičarjev v Sloveniji. Namen tega sklopa raziskav je bil pridobiti realnejšo oceno navzočnosti vrste *M. fructicola* in njenega relativnega pomena glede na domače povzročiteljice sadne gnilobe in cvetne monilije. Inventarizacija stanja v nasadih na Goriškem je pokazala, da se je tujerodna vrsta *M. fructicola* v času

projekta zelo razširila in izpodrinila domorodni vrsti *M. laxa* in *M. fructigena*. Posledic tako spremenjene vrstne sestave povzročiteljev sadne gnilobe še ni mogoče oceniti, predvidevamo pa, da se bodo izrazile v večjem obsegu bolezni, saj je vrsta *M. fructicola* agresivnejša, hitreje prirašča in intenzivneje sporulira. V ustreznih razmerah lahko poleg nespolnega oblikuje tudi spolni reproduktivni cikel, kar vodi tudi do hitrejšega nastanka odpornosti na fungicide.

Protokol za vrednotenje odpornosti koščičarjev na okužbo z glivami iz rodu *Monilinia*

Za ugotavljanje občutljivosti oz. morebitne odpornosti sort marelice in breskve na okužbo z glivami iz rodu *Monilinia* smo na osnovi podatkov iz literature izdelali načrt preizkušanja oz. protokol, ki zajema tako opazovanja v nasadih kot preizkušanje v laboratorijskih razmerah. V letih trajanja projekta smo protokol preizkušali in dopolnjevali. Ugotovili smo, da je za ugotavljanje odpornosti oz. občutljivosti najprimernejše laboratorijsko testiranje rodnih poganjkov z umetnimi okužbami, pri katerem lahko glede na velikost in obliko nastale nekroze ovrednotimo razlike v med sortami. Med preizkušenimi sortami marelice in breskve nismo ugotovili razlik v občutljivosti z izjemo nekaterih osebkov sorte 'debeli flokar', ki so se po teh parametrih značilno razlikovali od drugih sort.

Ocenjevanje in preizkušanje odpornosti na glive rodu *Monilinia*

V letu 2012 smo odpornost na glive iz rodu *Monilinia* ocenjevali pri marelicah, breskvah in nektarinah. Cvetove smo umetno okužili z vrstama *M. laxa* in *M. fructicola*. Pri marelicah, breskvah in nektarinah je bila jakost sporulacije pri okužbi z *M. fructicola* izrazito večja kot pri okužbi z *M. laxa*. Pri ocenjevanju in preizkušanju odpornosti plodov marelic in breskev smo ugotovili, da nobena od preizkušenih sort ni bila povsem odporna na okužbo.

Pri laboratorijski okužbi cvetov z obema glivama nismo ugotovili razlik v občutljivosti marelic, zato smo okužbe opravili še na rodnih poganjkih. Sorte so se razlikovale po videzu nekroze in so večinoma pripadale odpornejšemu tipu. Pri preizkušanju odpornost plodov in poganjkov marelice sorte 'domači flokarji' na okužbo z obema glivama na plodovih nismo opazili razlik v primerjavi z ostalimi sortami. Nekroze na poganjkih sorte 'domači flokarji', so bile zelo omejene in značilno manjše kot pri drugih sortah.

Izdelava podlag za hitro določanje vrste monilij iz okuženega rastlinskega materiala

Uvedli smo metodo za detekcijo in identifikacijo vrste *M. fructicola* na osnovi PCR z detekcijo v realnem času (qPCR) in TaqMan kemiji po van Brouwershaven in sod., 2009. S to metodo lahko v vzorcih določimo prisotnost glive *M. fructicola* ter prisotnost skupine gliv *Monilinia fructigena*, *M. laxa* in *Monilia polystroma*. Test je specifičen za rod *Monilia* in pomnoži ITS regijo v tandemskih ponovitvah rDNA. Opisana metoda zagotavlja večjo specifičnost za identifikacijo karantenske vrste *M. fructicola* kot morfološka identifikacija in večjo občutljivost kot klasični PCR. Z novo metodo smo v letu 2012 spremljali dinamiko

nihanja trosov glive *M. fructicola* tekom rastne sezone.

Inventarizacija stanja okuženosti z ESFY v nasadih na pridelovalnih območjih v Sloveniji

Vzorčili in analizirali smo drevesa starih sort marelic na prisotnost fitoplazme povzročiteljice ESFY. Kljub temu, da smo našli precej vitalnih dreves marelice brez vidnih bolezenskih znamenj okužbe z ESFY, se je izkazalo, da so vsa analizirana drevesa okužena s to fitoplazmo. Naša želja pa je, da bi našli vsaj kakšno neokuženo drevo, zato bomo z iskanjem neokuženega drevesa nadaljevali v okviru projekta V4-1413.

Aprila 2013 smo v skladu z dogovorom opravili cepljenje dveh domačih sort marelic, Debeli flokarji in Catarji, v Kojskem v Goriških Brdih. Cepiči so izvirali z dreves, ki so bila v prejšnjem letu testirana in okužena z ESFY, vendar so drevesa vitalna in dobro rodijo. Namen poskusa je ugotoviti, ali se tolerantnost na okužbo, ki jo opažamo pri drevesih, prenaša tudi na potomstvo, torej na mlade sadike. Vse cepljene sadike so v letu 2014 ustrezno rastle.

Proučevanje bionomije češpljeve bolšice in iskanje drugih potencialnih prenašalcev fitoplazme 'Ca. P. Prunorum'

Češpljeva bolšica (*Cacopsylla pruni* (Scopoli)) je glavni naravni prenašalec fitoplazme ESFY. Fitoplazmo prenaša na perzistentni način, pri čemer je ključnega pomena stopnja okuženosti populacije češpljeve bolšice, ki se spomladi seli s prezimitvenih sekundarnih gostiteljev (iglavcev) na primarne gostitelje iz rodu *Prunus*. Koncentracija fitoplazme ESFY se v prenašalcu v latentnem obdobju bivanja na prezimitvenih rastlinah zelo poveča, zato je prezimitvena populacija lahko zelo močno okužena in odločilna pri prenosu povzročitelja na zdrave rastline.

Vse razvojne stopnje češpljeve bolšice so lahko nosilci fitoplazme 'Ca. P. prunorum' in zato potencialni prenašalci ESFY. Laboratorijska potrditev navzočnosti fitoplazme 'Ca. P. Prunorum' v jajčecih češpljeve bolšice nakazuje možnost transovarialnega prenosa fitoplazme s prezimitvenih samic na potomstvo.

Iz teh spoznanj izhaja, da okužene rastline v neposredni bližini zdravih niso izključni niti najpomembnejši vir širjenja ESFY na zdrave rastline, pač pa predvsem stopnja okuženosti gostiteljskih rastlin na zelo širokem območju in pogojev za razvoj in razmnoževanje češpljeve bolšice.

Protokol za vrednotenje tolerantnosti sort in tipov marelice na ESFY

Ob dejstvu, da so fitoplazemska obolenja neozdravljiva, je za omejevanje in preprečevanje širjenja bolezni bistvenega pomena izvajanje preventivnih ukrepov. V okoljih z velikim infekcijskim pritiskom fitoplazme, s kakršnim se soočamo tudi pri nas, je uporaba tolerantnih sort smiselna in lahko omogoči pridelavo občutljivih sadnih vrst, kot je marelica. S tem namenom smo pripravili navodila za proučevanje občutljivosti oz. tolerantnosti različnih sort/tipov pri marelici na okužbo s fitoplazmo ESFY. Izdelan protokol omogoča

vrednotenje občutljivosti oz. tolerantnosti sort v primeru okuženosti z ESFY, s čimer želimo prispevati k odbiru tolerantnejših sort ali tipov za gojenje pri marelici.

Priprava tehnoloških ukrepov in izračun gospodarnosti pridelave koščičarjev

Glede na rezultate projekta, pretekle izkušnje z boleznimi in podatke iz literature smo postavili model za oceno stroškov pridelave koščičarjev, ki bo podlaga za končno oceno ekonomičnosti pridelave koščičarjev v proučevanih razmerah s prisotnimi karantenskimi boleznimi sadnih vrst *Prunus* spp.. S pomočjo modela smo modelirali pridelovalne razmere brez omejitev (predpostavka neokuženih dreves) in pridelovalne razmere s prisotnimi karantenskimi boleznimi. Modelirali smo velikost pridelka, življenjsko dobo nasadov ter ukrepe za preprečitev oz. blažitev posledic proučevanih karantenskih bolezni.

Na podlagi predhodno postavljenih modelnih kalkulacij za pridelavo marelic in sliv smo postavili modele za tri različne tehnologije pridelave marelic in za tri različne tehnologije pridelave sliv za predelavo. Ugotovili smo, da je, ob upoštevanju navedenih tehnologij pridelave marelic in sliv, razlika v ekonomičnosti pridelave velika.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Vsi zastavljeni cilji projekta so bili doseženi. Pripravili smo vse tri predvidene protokole za testiranje odpornosti koščičarjev na tri obravnavane karantenske bolezni. Opredelili smo izolate PPV iz različnih pridelovalnih območij Slovenije, pripravili pregled razširjenosti posameznih skupin PPV po gostiteljskih rastlinah. Ker nismo našli dreves, ki bi kazala odpornost ali tolerantnost na šarko, smo pripravili seznam sort, ki bi lahko služile kot alternativa za sorto 'domača sliva', ki bi jih bilo potrebno vključiti v preizkušanje sort. Ugotovili smo, da se je plodova monilija v času trajanja projekta na Goriškem zelo razširila in zelo pričakujemo v prihodnjih letih izbruh bolezni v večjem obsegu. Preizkusili smo občutljivost marelic in breskev na *M. fructicola* in *M. laxa*. V preizkus smo vključili tudi staro sorto 'debeli flokarji' in ugotovili, da so bile nekroze na poganjkih te sorte zelo omejene in značilno manjše kot pri drugih sortah. Uvedli smo metodo na osnovi PCR v realnem času za detekcijo *M. fructicola* in jo uporabili za spremljanje zastopanosti konidijev gliv iz rodu *Monilinia* na površju cvetov, listov in plodov izbranih vrst koščičarjev. Izdelali smo desetletni pregled stanja okuženosti z ESFY v Sloveniji. Proučili smo bionomijo češpljeve bolšice in ugotavljali tudi okuženost drugih potencialnih prenašalcev fitoplazme *Ca. P. Prunorum*. Preverili smo okuženost vseh razvojnih stadijev češpljeve bolšice s fitoplazmo. V izračunu gospodarnosti pridelave sliv in marelic smo pri posameznih kulturah upoštevali različne tehnologije pridelave in pri izračunih upoštevali vse tehnološke ukrepe, ki so tudi rezultat tega projekta.

6.Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Program raziskovalnega projekta je bil v celoti izveden. V zadnjem letu se je eden od sodelavcev projektne skupine upokojil, vendar sta njegovo delo in ure v celoti prevzela in opravila sodelavca iz iste raziskovalne organizacije.

7.Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	2613839	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	PCR v realnem času za specifično detekcijo treh fitoplazem iz skupine apple proliferation
		ANG	Real-time PCR for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group
	Opis	SLO	V poglavju opisana metoda za hitro, zanesljivo, specifično in občutljivo detekcijsko metodo na osnovi PRC v realnem času za detekcijo treh fitoplazem, ki okužujejo sadno drevje. To so 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. prunorum', and 'Ca. P. pyri', ki povzročajo metličavost jablan, leptonekrozo koščičarjev in odmiranje hrušk.
		ANG	A fast, reliable, specific and sensitive real-time PCR detection method for three fruit trees infecting phytoplasma was described in this book chapter. The method can be used for the detection of 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. prunorum', and 'Ca. P. pyri', causal agents of apple proliferation, European stone fruit yellows, and pear decline.
	Objavljeno v	Humana Press; Phytoplasma; 2013; Str. 269-281; A': 1; Avtorji / Authors: Mehle Nataša, Nikolić Petra, Gruden Kristina, Ravnikar Maja, Dermastia Marina	
Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji		
2.	COBISS ID	2515279	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Najbolj razširjene fitoplazme v Sloveniji, njihovi prenašalci in ukrepi za njihovo obvladovanje
		ANG	The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia
	Opis	SLO	V članku so predstavljeni rezultati analiz številnih rastlinskih in žuželčnih vzorcev na prisotnost fitoplazem v desetletnem obdobju, med njimi tudi rezultati analiz koščičarjev na prisotnost Ca. P. Prunorum.
		ANG	The paper presents the ten years results of testing many plant and insect samples for the presence of phytoplasma. The stone fruit samples collected during this study and tested for the presence of Ca. P. Prunorum are also presented.
	Objavljeno v	Divan Enterprises; Phytopathogenic mollicutes; 2011; Vol. 1, issue 2; str. 65-76; Avtorji / Authors: Mehle Nataša, Ravnikar Maja, Seljak Gabrijel, Knapič Vlasta, Dermastia Marina	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
3.	COBISS ID	4448616	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Občutljivost hitrih testov, seroloških in molekularnih tehnik za detekcijo virusa šarke v različnih tkivih
		ANG	Sensitivity of field tests, serological and molecular techniques for Plum Pox Virus detection in various tissues
		Primerjali smo občutljivost hitrih testov, DAS-ELISA, RT-PCR in RT-qPCR za	

Opis	SLO	detekcijo virusa šarke (Plum pox virus, PPV) v različnih tkivih marelice, breskve, slive in cibore, okuženih z izolati PPV-D, PPV-M ali PPV-Rec. Ugotovili smo, da so hitri testi primerni le za potrditev okužbe v listih z bolezenskimi znamenji. Za ugotavljanje okužbe v vzorcih brez bolezenskih znamenj je potrebno DAS-ELISA kombinirati ali nadomestiti z molekularnimi metodami.
	ANG	Sensitivity of field tests, DAS-ELISA, RT-PCR and RT-qPCR were compared for the detection of Plum pox virus (PPV) in various tissues of apricot, peach, plum and damson plum infected with PPV-D, PPV-M or PPV-Rec isolates. We have found that field tests are useful for confirmation of the PPV infection in symptomatic leaves, while in non-symptomatic tissues DAS-ELISA should be combined or replaced by molecular methods.
Objavljeno v	Biotehniška fakulteta; Acta agriculturae Slovenica; 2014; Letn. 103, št. 1; str. 129-136; Avtorji / Authors: Viršček Marn Mojca, Mavrič Pleško Irena, Altenbach Denise, Bitterlin Walter	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	2888783 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Vrednotenje tolerantnosti sort in tipov marelice na leptonekrozo koščičarjev (ESFY)
	ANG	Evaluation of tolerance of apricots to European stone fruit yellows
Opis	SLO	Na 11. slovenskem posvetovanju o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo smo predstavili tri predavanja in dva posterja z rezultati raziskav, ki so predmet tega projekta. V obliki predavanja smo predstavili protokol za vrednotenje odpornosti marelice na leptonekrozo koščičarjev, možnosti za preprečevanje škod zaradi virusnih okužb in bionomijo češpljeve boljice, kot posterja pa raznolikost slovenskih izolatov PPV in rezultate spremljanja monilij na koščičarjih s PCR v realnem času.
	ANG	Three talks and two posters with results from this project were presented at 11th Slovenian plant protection society meeting with international participation. The talks were about method for testing of apricot resistance to ESFY, measures for prevention of damages caused by viruses and bionomy of <i>Cacopsylla pruni</i> . The two posters presented the diversity of Slovenian PPV isolates and the results of monitoring of <i>Monilinia</i> sp. on stone fruits using real-time PCR.
Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
Objavljeno v	Društvo za varstvo rastlin Slovenije = Plant Protection Society of Slovenia; Zbornik predavanj in referatov 11. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo (in Okrogle mize o zmanjšanju tveganja zaradi rabe FFS v okviru projekta CropSustaIn), Bled, 5.-6. marec 2013; 2013; Str. 78-83; Avtorji / Authors: Ambrožič Turk Barbara, Fajt Nikita, Mehle Nataša, Dermastia Marina, Mavrič Pleško Irena	
Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
2.	COBISS ID	3967592 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Preizkušanje občutljivosti sort koščičarjev za obvladovanje šarke v Sloveniji
	ANG	Testing the susceptibility of stone fruit cultivars for sharka control in Slovenia
	Na tretjem slovenskem sadjarskem kongresu z mednarodno udeležbo, ki ga	

Opis	SLO	organizira Strokovno sadjarsko društvo Slovenije, smo predstavili možnosti za preizkušanje občutljivosti vrst in sort koščičarjev na šarko, ki smo jih zbrali v pripravljenem protokolu. Protokol za preizkušanje odpornosti koščičarjev na glive iz rodu Monilinia pa smo v okviru projekta tudi preizkusili v praksi.
	ANG	The possibilities for testing sensitivity of stone fruits varieties to PPV were presented at the Third Slovenan fruit growing congress organized by Fruit growing expert society of Slovenia. The data presented are part of the prepared method for testing resistance to PPV. The method for testing resistance of stone fruits to Monilinia sp. were tested during the project.
Šifra	F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
Objavljeno v	Strokovno sadjarsko društvo Slovenije; Zbornik referatov 3. Slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 21.-23. november 2012; 2012; Str. 333-340; Avtorji / Authors: Viršček Marn Mojca, Mavrič Pleško Irena	
Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
3. COBISS ID	3859244	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Proizvodnja marelice v Sloveniji - problemi in perspektive
	ANG	Apricot production in Slovenia - problems and perspectives
Opis	SLO	Na tretjem slovenskem sadjarskem kongresu z mednarodno udeležbo, ki ga organizira Strokovno sadjarsko društvo Slovenije, smo predstavili možnosti za preizkušanje občutljivosti vrst in sort koščičarjev na šarko, ki smo jih zbrali v pripravljenem protokolu. Protokol za preizkušanje odpornosti koščičarjev na glive iz rodu Monilinia pa smo v okviru projekta tudi preizkusili v praksi.
	ANG	Difficulties in apricot production in Slovenia, most important diseases and possibilities for saving the problems in production were presented at the conference. The experiences from other European countries were presented as well.
Šifra	F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
Objavljeno v	Poljoprivredni fakultet, Katedra za vočarstvo; Inovacije u vočarstvu; 2013; str. 171-182; Avtorji / Authors: Fajt Nikita, Komel Erika, Usenik Valentina, Donik Purgaj Biserka, Beber Matjaž, Ambrožič Turk Barbara, Viršček Marn Mojca, Mavrič Pleško Irena	
Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

V času izvajanja projekta smo predstavljali rezultate projekta tudi sadjarjem v Sloveniji. Tako smo se s predavanji pojavili na dveh dogodkih – na delavnici "Od njive do mize" v okviru projekta LAS Krasa in Brkinov je bilo predstavljeno delo Sadjarskega centra bilje in podano povabilo k iskanju dreves 'brkinske češpe', ki kažejo večjo odpornost na šarko, na Razstavi marelic z degustacijo na Planini pri Ajdovščini pa je bilo predstavljeno delo Sadjarskega centra Bilje s poudarkom na pomenu zdravstvenega stanja izhodiščnega materiala, proučevanja in odpravljanja vzrokov za karantenske in druge bolezni koščičarjev. Na srečanju pridelovalcev marelic iz Vipavske doline na Planini pri Ajdovščini pa smo udeležencem predstavili povzročitelja ESFY in šarke ter rezultate projekta.

V prilogi je tudi obsežnejše vsebinsko poročilo projekta, ki je bil skupaj z zaključnim poročilom posredovan sofinancerju.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

V okviru nalog, ki smo jih izvajali v raziskovalnem projektu smo pridobili številna nova znanja in informacije o obravnavanih treh karantenskih boleznih koščičarjev, ki so pomembna tako za prakso (pridelovalci, svetovalna služba, službe, ki se ukvarjajo z varstvom rastlin), kot tudi za širšo znanstveno skupnost. Izboljšali smo obstoječe metode (npr. izolacija DNA za določanje gliv in izolacija DNA iz različnih stadijev prenašalcev) in uvedli novo metodo za določanje gliv iz rodu *Monilinia*. Ugotovili smo možnost transovarialnega prenosa fitoplazme s samic na potomce, kar pa je potrebno še potrditi. Izkušnje z detekcijo fitoplazme v prenašalcih bomo lahko uporabili pri nadaljnjih študijah na drugih prenašalcih in patogenih. Z analizami dela genoma PPV smo razširili znanje o raznolikosti tega virusa.

ANG

During this research project we gained important new knowledge and information about the three most important quarantine diseases of stone fruits. This knowledge and information is important for fruit growing (experts from extension service, growers, plant health specialists...) and for scientific community. We improved already existing methods used in our laboratories (e.g. DNA extraction for detection of fungi and DNA extraction from different life stages of insect vectors) and introduced a new method for detection of different *Monilinia* species. The detection of phytoplasma *Ca. P. Prunorum* in eggs of the vector indicates a possibility of transovarial transmission of phytoplasma from infected females to progeny. This finding still needs further confirmation. Experience of phytoplasma detection in insect vectors will be used in the future on different insects and pathogens. The knowledge about molecular diversity of PPV was expanded with the new information on diversity of PPV in Slovenia.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Ta CRP projekt je bil izrazito usmerjen v iskanje rešitev problemov, ki bodo pomembni za prakso in predvsem za Slovenijo. Obravnavali smo tri najpomembnejše karantenske bolezni koščičarjev v Sloveniji in pri tem prišli do številnih rezultatov pomembnih za prakso. Ugotovitve izračuna ekonomičnosti pridelave marelic in sliv so pokazale velike razlike v ekonomičnosti pridelave ob upoštevanju predlaganih tehnologij, kar bo lahko vodilo pri postavljanju novih nasadov teh sadnih vrst.

V okviru projekta je bil narejen izbor sort sliv tolerantnih na PPV, ki bi v Brkinih lahko nadomestile sorto 'domača sliva', ki je izjemno občutljiva na okužbo s PPV.

Rezultati spremljanja bionomije češpljeve boljice in priporočila za njeno zatiranje bodo pripomogla k obvladovanju prenašalca in s tem k zmanjšanju škode zaradi ESFY. Poznavanje bionomije pa bo omogočilo tudi učinkovito in ciljano uporabo FFS in s tem pripomoglo k njihovi racionalni rabi.

Domača sorta marelice 'Debeli flokarji' se je izkazala kot zanimiva sorta, ki bi lahko pripomogla k oživitvi pridelave marelice v Sloveniji. Rezultati projekta kažejo, da je sorta potencialno tolerantna na okužbo z ESFY, posamezna drevesa pa kažejo tudi manjšo občutljivost na glive iz rodu *Monilinia*. Marelica, ki je bila nekoč pomembna sadna vrsta v pridelavi koščičarjev pri nas bi tako lahko ponovno pridobila na pomenu.

Te in številne druge rezultate tega projekta bomo lahko s pridom uporabili v svetovalni dejavnosti za področje pridelovanja koščičarjev in obvladovanje raziskovanih bolezni.

ANG

This research project was aimed to find solutions for problems in fruit production in Slovenia. It was dealing with three most important quarantine diseases of fruit trees in Slovenia and produced many important practical results. The calculations of economy of production for plum and apricot showed considerable differences economy of production for different fruit trees production technologies. These calculations can be used in the future as the basis for stone fruit orchards planning.

We prepared a list of PPV tolerant plum varieties which could substitute the production of extremely sensitive plum variety *Domača sliva* in Brkini.

The results of bionomy studies and recommendations for control of *Cacopsylla pruni* will help to control the vector and better disease management. Obtained knowledge about the vector of ESFY will enable effective and targeted use of plant protection products.

Old Slovenian apricot variety Domači flokarji is an interesting variety which could be used for recovery of apricot production in Slovenia. The results show that this variety is potentially tolerant to ESFY infection, single trees also show to be less sensitive to *Monilinia* sp.. This way the apricot, which was an important fruit in production in Slovenia would again gain an importance.

These and several other project results could be used in the future in extension service and expert work in stone fruit production and disease management.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

Povzročitelja ESFY in šarke ter rezultate projekta smo predstavili pridelovalcem ter na strokovnih in znanstvenih srečanjih doma in v tujini. Največji interes po rezultatih projekta kažejo pridelovalci koščičarjev, ki se vsakodnevno spopadajo z boleznimi in si želijo čim prej do njihovih rešitev, poleg njih pa tudi uradni organi (Upravo za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin). Na sestanku strokovne skupine za sadjarstvo in vinogradništvo smo že predstavili del rezultatov projekta.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹²

S tujimi raziskovalnimi inštitucijami smo sodelovali neformalno.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

FAJT, Nikita, KOMEL, Erika, USENIK, Valentina, DONIK PURGAJ, Biserka, BEBER, Matjaž, AMBROŽIČ TURK, Barbara, VIRŠČEK MARN, Mojca, MAVRIČ PLEŠKO, Irena. Proizvodnja kajsije u Sloveniji - problemi i perspektive. V: MILATOVIĆ, Dragan (ur.). Inovacije u voćarstvu : IV savetovanje : zbornik radova : tema savetovanja: Unapređenje proizvodnje breskve i kajsije : Beograd, 11. feb. 2013. Beograd: Poljoprivredni fakultet, Katedra za voćarstvo, 2013, str. 171-182. [COBISS.SI-ID 3859244]

12. Izjemni dosežek v letu 2014¹⁴

12.1. Izjemni znanstveni dosežek

Projekt je bil izrazito usmerjen v iskanje rešitev za prakso, zato smo za dosežek projekta izbrali družbeno-ekonomski dosežek.

12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Pojav propadanja dreves pri marelici je v našem okolju precej prisoten in vpliva na znatno opuščanje pridelave te sadne vrste v Sloveniji. Na propadanje dreves pri marelicah pomembno vpliva tudi občutljivost sort za bolezni kot je ESFY. V Sloveniji je na nekaterih območjih še prisotnih nekaj domačih, lokalnih tipov oziroma avtohtonih sort marelice s kakovostnimi plodovi, ki so se uspeli ohraniti do danes. V okviru projekta smo vzorčili in na ESFY analizirali več vzorcev odvzetih z dreves dveh starih sort marelic, Debeli flokarji in Catarji. Nobeno izmed vzorčenih dreves ni izražalo bolezenskih znamenj značilnih za okužbo s fitoplazmami, prisotnost fitoplazme ESFY pa smo dokazali v vseh drevesih. Rezultati projekta kažejo, da je sorta potencialno tolerantna na okužbo z ESFY, posamezna drevesa pa kažejo tudi manjšo občutljivost na glive iz rodu *Monilinia*. Marelica, ki je bila nekoč pomembna sadna vrsta v pridelavi koščičarjev pri nas bi tako lahko ponovno pridobila na pomenu.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenci (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Kmetijski inštitut Slovenije

Irena Mavrič Pleško

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

14.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/18

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priložitev/-i k temu poročilu.

Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2015 v1.00

76-62-A0-D8-23-95-CF-A6-B7-1D-13-5C-63-89-AD-E2-ED-00-32-37

Priloga 1

Podrobnejše vsebinsko poročilo za projekt št. V4-1102 v okviru ciljnega raziskovalnega programa "ZAGOTOVIMO.SI HRANO ZA JUTRI"

Naslov projekta: "Reševanje problematike ustaljenih karantenskih boleznih sadnih vrst *Prunus* spp. za ohranitev pridelave"

Delo na projektu je potekalo v okviru več programskih sklopov:

- 1.1. Izdelava protokola za preizkušanje imunosti, odpornosti oziroma tolerantnosti koščičarjev na PPV
- 1.2. Proučevanje in karakterizacija izolatov virusa šarke in pregled stanja okuženosti s šarko v Sloveniji
- 1.3. Iskanje virov odpornosti oziroma tolerantnosti na PPV v nasadih češpelj in sliv
- 1.4. Inventarizacija stanja nasadov na pridelovalnem območju (*Monilinia* sp.)
- 1.5. Odpornost vrst in sort koščičarjev na plodovo monilijo (*Monilinia fructicola*)
- 1.6. Izdelava podlag za hitro določanje vrste monilij iz okuženega rastlinskega materiala
- 1.7. Inventarizacija stanja okuženosti z ESFY v nasadih na pridelovalnih območjih v Sloveniji
- 1.8. Iskanje virov odpornosti na ESFY
- 1.9. Bionomija češpljeve boljice *Cacopsylla pruni* in iskanje drugih potencialnih prenašalcev fitoplazme 'Ca. P. prunorum'
- 1.10. Izdelava protokola za vrednotenje tolerantnosti sort in tipov marelice proti ESFY
- 1.11. Priprava tehnoloških ukrepov in izračun gospodarnosti pridelave koščičarjev
- 1.12. Izvedene predstavitve aktivnosti in rezultatov projekta

Podrobnejši opis aktivnosti in rezultatov dela v okviru posameznih tematskih sklopov

1.1. Izdelava protokola za preizkušanje imunosti, odpornosti oziroma tolerantnosti koščičarjev na PPV

Šarka, ki jo povzroča *Plum pox virus* (PPV), je najnevarnejše virusno obolenje koščičastih sadnih vrst. Pri občutljivejših kultivarjih lahko okužba z virusom PPV povzroči popolno izgubo pridelka. Eden od najučinkovitejših ukrepov v borbi proti škodam zaradi šarke, še posebno na močno okuženih območjih kot je Slovenija, je gojenje odpornih sort. Izolati PPV so zelo variabilni in se združujejo v 7 različkov. Ti se razlikujejo po patogenosti, gostiteljskih rastlinah, zmožnosti in učinkovitosti prenosa z ušmi in navzočnosti v različnih geografskih območjih, zato se podatki o odpornosti in občutljivosti sort zelo razlikujejo med različnimi avtorji in različnimi državami. Občutljivost oz. odpornost posameznih sort je torej potrebno preizkusiti v lastnih pridelovalnih območjih.

Pri koščičastih sadnih vrstah najdemo več vrst oz. tipov odpornosti proti PPV. V okviru projekta smo na osnovi podatkov iz literature in slovenskih izkušenj izdelali protokol za preizkušanje vseh tipov, torej imunosti, odpornosti oz. tolerantnosti koščičarjev proti PPV. Pripravili smo tudi metodo za selekcijo manj občutljivih tipov 'Domače slive' oz. njenega tipa iz Brkinov (Brkinska češpa).

V slovenskih gojitvenih razmerah je smiselno proučevati odpornost oz. občutljivost za PPV pri pomološko zanimivih in preizkušenih kultivarjih, predvsem tistih, ki so po podatkih iz literature manj občutljivi za ta virus. V ta namen naj bi pri vsaki sadni vrsti izbrali manjše število kultivarjev, ki bi zapolnili najnujnejše potrebe gojenja koščičastih sadnih vrst v Sloveniji, saj je preizkušanje njihove odpornosti drago, dolgotrajno in zahtevno.

Za proučevanje občutljivosti, odpornosti, imunosti in tolerantnosti kultivarjev sliv, marelic ter breskev in nektarin smo predlagali kombinacijo preizkušanja v zavarovanem prostoru in preizkušanja v naravnih pogojih ob visokem infekcijskem pritisku. Kot osnovo preizkušanja v zavarovanem prostoru smo izbrali metodo italijanskih raziskovalcev (Pasquini in sod., 2010). V Sloveniji je potrebno testiranje z lokalnimi izolati PPV-M, PPV-Rec in PPV-D. Vsi kultivarji iste sadne vrste naj bi bili cepljeni na isto občutljivo zdravo podlago (npr. GF305, Mirabolana, St. Julien). Na podlago hkrati cepimo preizkušano sorto in okužen cepič. Cepimo zgodaj spomladi s ploščičasto okulacijo («chip budding») ali avgusta z navadno ali ploščičasto okulacijo. Naslednjo pomlad preverimo zdravstveno stanje dreves in sicer testiramo na navzočnost ApMV (*Apple mosaic virus*), PDV (*Prune dwarf virus*), PNRSV (*Prunus necrotic ringspot virus*) in ACLSV (*Apple chlorotic leafspot virus*) ter PLMVd (*Peach latent mosaic viroid*). Rastline v preizkušanju testiramo seveda tudi na navzočnost PPV in sicer z DAS-ELISA, RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Na osnovi opazovanj in ocenjevanja znakov okužbe in rezultatov laboratorijskih analiz klasificiramo preizkušane kultivarje v skupine po Pasquini in sod. (2010) kot je razvidno iz Tabele 1. Sadike izbranih sort oz. kultivarjev na komercialnih podlagah nato posadimo na lokacijo z visokim infekcijskim pritiskom. Za vrednotenje občutljivosti/tolerantnosti sort ali tipov na okužbo s PPV tudi pri testiranju na prostem uporabimo klasifikacijo po Pasquini in sodelavci (Pasquini in sod., 2010).

Za pridobitev hitrih prvih informacij za odpornost na lokalno razširjen izolat oz. izolate PPV lahko cepimo v krono okužene rastline in opazujemo reakcijo.

Tabela 1. Klasifikacija odgovora gostiteljske rastline na osnovi pojava bolezenskih znamenj na podlagi in žlahtnem delu in rezultatov različno občutljivih diagnostičnih testov.

Fenotipska analiza podlaga	Diagnostični test sorta	Tip			
		ELISA	RT-PCR	rt RT-PCR ¹	
+	+	+	+	+	Občutljiva sorta
+	-	+	+	+	Tolerantna sorta
+	-	-	+	+	Zelo tolerantna sorta
+	-	-	-	+	Odporna sorta
-	-	-	-	+	Zelo odporna sorta
-	-	-	-	-	Imuna sorta

¹ rt RT-PCR = RT-PCR v realnem času

Rezultate tega dela smo predstavili s predavanjem »Preizkušanje občutljivosti sort koščičarjev za obvladovanje šarke v Sloveniji« na 3. Slovenskem sadjarskem kongresu z mednarodno udeležbo, ki je potekal od 21. do 23. novembra 2012. V Zborniku kongresa je bil objavljen naslednji članek:

VIRŠČEK MARN, Mojca, MAVRIČ PLEŠKO, Irena. Preizkušanje občutljivosti sort koščičarjev za obvladovanje šarke v Sloveniji = Testing of stone fruit cultivars susceptibility for containment of sharka in Slovenia. V: HUDINA, Metka (ur.). Zbornik referatov 3. Slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 21.-23. november 2012. Ljubljana: Strokovno sadjarsko društvo Slovenije, 2012, str. 333-340. [COBISS.SI-ID 3967592].

Vir:

Pasquini G., Ferretti L., Gentili A., Campus L., Verde I., Micali S., Conte L., Barba M. 2010 Evaluation of different peach genotypes for resistance to *Plum pox virus* strain M: preliminary results. Julis-Kuhn-Archiv 427: 334-338.

1.2. Proučevanje in karakterizacija izolatov virusa šarke in pregled stanja okuženosti s šarko v Sloveniji

Določitev vrste izolata je pomemben korak za uspešno obvladovanje in omejevanje širjenja PPV. Za proučevanje populacije PPV v Sloveniji smo v letih 2011 in 2012 na 18 lokacijah zbrali 31 vzorcev koščičarjev (Tabela 2).

Vzorci sliv smo vzorčili 7.5.2012 in 11.5.2012 v Brkinih. Vzorčili smo na skupno 5 lokacijah: Podbeže, Zavrhek, Orehek pri Materiji (2 lokaciji) in Slivje. Skupno smo analizirali 17 vzorcev, od tega je bilo devet vzorcev okuženih s PPV. V starem nasadu sliv v Orehku pri Materiji okužbe nismo potrdili, okužen pa je bil mladi nasad istega lastnika na drugi lokaciji in vse ostale vzorčene lokacije. Dodatno smo v sredini maja 2012 v Vipavski dolini vzorčili marelice na dveh lokacijah in breskve prav tako na dveh lokacijah. Vsi štirje vzorci breskev so bili okuženi. Od skupno osmih vzorcev marelic smo okužbo s PPV potrdili pri štirih vzorcih.

Za karakterizacijo smo izbrali en vzorec marelice iz Stare gore pri Novi Gorici in osem vzorcev sliv in sicer vse tri pozitivne vzorce sliv iz Podbež, po en vzorec iz Zavrhka, Orehka pri Materiji in tri vzorce iz Slivlj. Ravno tako smo za karakterizacijo izbrali nekaj vzorcev nabranih v letu 2011.



Slika 1. Znamenja okužbe s šarko na koščičah marelice



Slika 2. Odpadanje plodov pri sorti 'Domača sliva' oz. njenem tipu iz Brkinov (Brkinska češpa) v Brkinih leta 2011

RT-PCR produkte, namnožene iz izolirane celokupne RNA posameznih vzorcev s pari začetnih nukleotidov P1/P3M ali P1/P3D smo sekvenirali. S pomočjo filogenetske analize slovenskih nukleotidnih zaporedij in nukleotidnih zaporedij iz baze NCBI GenBank dolžine 908 nt na Nib/CP regiji PPV genoma smo 16 slovenskih nukleotidnih zaporedij razvrstili v skupino PPV-Rec, 10 v PPV-M in 5 v PPV-D. PPV-Rec izolate smo potrdili na 16 vzorcih iz raznih kultivarjev sliv, enem vzorcu iz koreninskih izrastkov slive in enem vzorcu cibore. Okužbo s PPV-M izolati smo potrdili pri 3 breskvah, 2 marelicah in 5 slivah, okužbo s PPV-D izolati pa pri 3 marelicah in 2 slivah (Tabela 2). Rezultati kažejo, da so v Sloveniji prisotni izolati iz skupin PPV-Rec, PPV-M in PPV-D in da so izolati PPV-Rec na slivah prevladujoči. Identičnost nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov je znašala od 83,7 do 100%. Znotraj posameznih skupin izolatov so slovenski izolati pokazali manjšo variabilnost. Identičnost nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov je bila najvišja znotraj skupine PPV-Rec (98,0 - 100%). Slovenski izolati znotraj PPV- M izolatov so pokazali 97,6 do 99,7% identičnost, medtem ko je identičnost slovenskih izolatov iz skupin PPV-D znašala od 96,1 do 99,4%.

Tabela 2: Karakterizacija slovenskih izolatov PPV

Leto vzorčenja	Lokacija	sadna vrsta	sorta	različek
2011	Maribor-vrt	marelica	Boccuccia	PPV-D
2011	Maribor-vrt	marelica	Tyrinthos	PPV-M
2011	Maribor-vrt	sliva	neznana	PPV-M

2011	Maribor-vrt	sliva	Domača sliva	PPV-D
2011	Domžale- vrt 1	marelica	neznana	PPV-D
2011	Domžale -vrt 2	sliva	neznana	PPV-Rec
2011	Domžale -vrt 2	<i>P. insititia</i>	neznana	PPV-Rec
2011	Domžale -vrt 2	breskev	neznana	PPV-M
2011	Mengeš-vrt	marelica	neznana	PPV-M
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 1	sliva	neznana	PPV-Rec
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 2	sliva	koreninski izrastki	PPV-Rec
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 2	sliva	neznana	PPV-Rec
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 2	sliva	neznana	PPV-Rec
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 3	sliva	neznana	PPV-M
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 3	sliva	neznana	PPV-M
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 3	sliva	neznana	PPV-Rec
2011	Šempeter pri Novi Gorici-vrt 4	sliva	neznana	PPV-Rec
2011	Kromberk - vrt	sliva	neznana	PPV-Rec
2011	Kamnik-nasad	sliva	Stanley	PPV-D
2011	Vogrsko-nasad	breskev	neznana	PPV-M
2011	Zemono-nasad	breskev	neznana	PPV-M
2011	Brkini- Huje	sliva	President	PPV-Rec
2011	Brkini- Huje	sliva	Brkinska češpa	PPV-Rec
2012	Brkini-Podbeže-vrt	sliva	neznana	PPV-Rec
2012	Brkini-Podbeže-vrt	sliva	neznana	PPV-Rec
2012	Brkini-Podbeže-vrt	sliva	neznana	PPV-Rec
2012	Brkini-Zavrhek-nasad	sliva	Brkinska češpa	PPV-M
2012	Brkini-Orehek pri Materiji-nasad	sliva	neznana	PPV-Rec
2012	Brkini-Slivje-nasad	sliva	Brkinska češpa	PPV-Rec
2012	Brkini-Slivje-nasad	sliva	Stanley	PPV-M in PPV-Rec
2012	Brkini-Slivje-ob poti	sliva	sejanec	PPV-Rec
2012	Stara gora-nasad	marelica	neznana	PPV-D

Filogenetske analize slovenskih nukleotidnih zaporedij in nukleotidnih zaporedij iz baze NCBI GenBank dolžine 908 nt na N1b/CP regiji PPV genoma smo predstavili s posterjem z naslovom 'Raznolikost slovenskih izolatov PPV (*Plum pox virus*)' na 11. slovenskem posvetovanju o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, ki je potekal od 5. in 6. marca 2013 na Bledu. Mednarodni javnosti smo te rezultate predstavili s posterjem z naslovom 'Genetic diversity of *Plum pox virus* isolates in Slovenia' na 2nd International Symposium on *Plum Pox Virus* v začetku septembra 2013 v Olomoucu na Češkem.

V nadaljevanju smo pri 18 slovenskih izolatih proučili tudi variabilnost 1323 baznih parov dolgih nukleotidnih zaporedij na delu P3, celotni 6K1 in delu CI regije (nukleotidi 2384-3706

izolata M92280), ki je zelo variabilen. Filogenetska analiza je pokazala, da se izolati razporejajo enako kot je bilo ugotovljeno pri proučevanju dela N1b in CP regije istih izolatov. Vse dosedanje analize so pokazale, da so v Sloveniji prisotni izolati iz skupin PPV-Rec, PPV-D in PPV-M. Znotraj PPV-M najdemo izolate iz podskupine PPV-Ma in podskupine PPV-Mb.

V sezoni 2013 smo prisotnost znakov okužbe s PPV preverili v nasadu marelic v Kojsem v Goriških Brdih, od koder so bili odvzeti tudi cepiči, uporabljeni za poskus, opisan v nadaljevanju poročila. Znakov okužbe ni bilo. Odvzeli in analizirali smo tri vzorce in v nobenem nismo potrdili prisotnosti PPV.

1.3. Iskanje virov odpornosti oziroma tolerantnosti na PPV v nasadih češpelj in sliv

Nastavek plodov sliv v Brkinih je bil v letu 2012 izjemno slab zaradi pozebe in suše. V večini nasadov, ki smo jih obiskali v avgustu, pridelka praktično ni bilo, zato je bilo iskanje morebitno odpornih ali tolerantnih dreves onemogočeno. Nekaj več pridelka so imela le drevesa v vasi Slivje, vendar pa smo pri vseh drevesih zabeležili intenzivno odpadanje plodov pred obiranjem.

V začetku leta 2013 smo pripravili letak za pridelovalce, s katerim jih pozivamo k sodelovanju pri iskanju manj občutljivih dreves 'Domače slive'. Letak smo v začetku marca 2013 posredovali pospeševalcem na področju Brkinov, ki so ga razdelili pridelovalcem sliv. V letaku smo pojasnili pomen šarke, cilje dela znotraj programskega sklopa »Viri odpornosti PPV«, vrste odpornosti proti šarki in izražanje znakov okužbe s PPV na slivah. Letak smo opremili tudi s slikami znakov okužbe na listih sliv in v mesu ter na površini plodov 'Domače slive'. Odziv pridelovalcev na poziv, naj se obrnejo na nas z informacijo o potencialno zdravih drevesih, ni bil v skladu z našimi pričakovanji. Na žalost na ta način nismo dobili nobene informacije o potencialno zdravih ali tolerantnih drevesih.

V sezoni 2013 smo opravili več obiskov v nasadih sliv v Brkinih (vasi Zavrhek, Slope, Slivje, Huje...), z namenom, da bi poiskali drevesa, ki kažejo odpornost ali tolerantnost na okužbo s PPV. Leto 2013 je bilo, za razliko od leta 2012, zelo ugodno leto za pridelek sliv. Nastavek plodov je bil spomladi na večini lokacij dober, pridelek pa, kljub suši, ki je bila izrazita v juliju in avgustu, pri večini pridelovalcev dober do zelo dober. Čas zorenja je bil nekoliko zakasnen. Nasade v Brkinih smo pričeli pregledovati konec avgusta in v začetku septembra, ko običajno zori glavnina Brkinske češplje, tipa sorte 'Domača sliva'. Opazili smo, da so s PPV okužena drevesa tudi dobro rodna. Odpadanje plodov se je pokazalo samo v nasadih v vaseh Huje in Podbeže, v vseh ostalih nasadih ni bilo odpadanja plodov, kljub temu, da so bili znaki na listih in plodovih izraziti in da so plodovi pred dvema letoma odpadli skoraj v celoti. V vasi Podbeže smo opravili tri obiske. Obseg odpadanja pri okuženih drevesih sorte 'Domača sliva', tip Brkinska češpa je bil odvisen od starosti in obsega okužbe. Večina okuženih dreves je imela številne znake okužbe na listih in nobenih znakov na plodovih ali šibke znake na majhnem deležu plodov. To nakazuje, da so drevesa okužena šele krajši čas. Pri teh drevesih se je odpad v obdobju od 20. avgusta do 10. septembra povečal od 5 na 30%. Drevo, ki je kazalo močne znake okužbe na listih in na večini plodov, je 20. avgusta odvrгло okrog 20% plodov, 10. septembra pa je bilo na tleh že okrog 60% plodov. Plodovi

tega drevesa so bili tudi bistveno bolj zreli in manjši. Naša opazovanja potrjujejo navedbe, da se lahko v nekaterih letih znaki in škode zaradi okužbe s PPV pojavijo šele teden dni pred zorenjem.



Slika 3: Izjemno bogata letina sliv v Brkinih – september, 2013.

Meritve vsebnosti topne snovi (sladkorjev) z ročnim refraktometrom, ki smo jih v prvih dneh septembra opravili na plodovih z dreves v primerjavi z že odpadlimi plodovi, niso pokazale velikih razlik, kar pomeni, da bi bili plodovi s tal potencialno lahko uporabni tudi za predelavo. Seveda pa je potrebno preveriti, ali uporaba takih plodov vpliva na kvaliteto teh proizvodov, npr. brkinskega slivovca. Podobno kot pri plodovih z drevesa in odpadlih plodovih pa terenske meritve z ročnim refraktometrom niso pokazale bistvenih razlik med plodovi z znaki šarke in brez znakov. Zato smo lastniku nasada v vasi Huje svetovali ločeno predelavo predčasno odpadlih plodov in plodov obranih z drevesa, da bi na degustaciji žganja ugotavljali morebitne razlike v kakovosti. Lastniku, kjer je bilo opaziti največje odpadanje plodov, smo svetovali precepljanje nekaj dreves s sortami, ki so tolerantne na okužbe s PPV, da se čim prej pridobi rodnost in s tem nekaj lastnih izkušenj z novejšimi sortami na teh lokacijah.



Slika 4: Kontrola vsebnosti topnih snovi v plodovih sliv pred obiranjem.

Na osnovi pogovorov z domačimi in tujimi strokovnjaki smo pridobili podatke o najbolj zanimivih sortah, ki bi lahko nadomestile 'Domačo slivo' oz njen tip iz Brkinov (Brkinska češpa) in bi jih bilo potrebno čim prej preizkusiti na okuženem območju v Sloveniji. Za uporabo kot namizna sorta sta primerni tolerantna sorta iz Čačka 'Čačanska lepotica' in hipersenzitivna sorta 'Jojo', za predelavo v slivovko pa hipersenzitivna sorta 'Top 2000' oz. 'Plumtastic'. Po cepljenju na okuženo podlago ali v krošnjo okuženega drevesa cepič hipersenzitivne sorte odmre, zato je ne moremo preskušati s cepljenjem na okuženo slivo. Za preizkušanje take sorte na prostem moramo posaditi sadike v okužen nasad. Našli smo tudi potencialnega uvoznika iz Srbije in Nemčije za uvoz razmnoževalnega materiala v kolikor se bodo našla finančna sredstva za preskušanje.

Po obilnem pridelku v letu 2013 je bila letu 2014 rodnost sliv na Brkinih zelo slaba, zato v sezoni 2014 nismo mogli izvesti iskanja dreves, ki bi kazala večjo odpornost ali tolerantnost na okužbo z PPV.

5. julija 2014 so se člani projektne skupine dr. Fajt Nikita, Ivan Kodrič in dr. Mojca Viršček Marn udeležili srečanja pridelovalcev marelic iz Vipavske doline na Planini pri Ajdovščini in udeležencem predstavili povzročitelja dveh boleznih na koščičarjih, ESFY in šarke ter rezultate projekta.

1.4. Inventarizacija stanja nasadov na pridelovalnem območju (*Monilinia* sp.)

Bolezni, ki jih povzročajo glive iz rodu *Monilinia* so razširjene v vseh pridelovalnih območjih koščičarjev v Sloveniji. Vrsti *M. fructigena* in *M. laxa* sta splošno razširjeni, *M. fructicola* pa je bila najdena le na Goriškem in na območju Brežic.

Zaradi vremenskih razmer, ki so bile v letu 2012 za razvoj monilij zelo neugodne (vročina, suša), je bil obseg sadne gnilobe v pregledanih nasadih koščičarjev razmeroma majhen. Kljub natančnemu vzorčenju plodov v različnih razvojnih fazah, ki je vključevalo združevanje delnih vzorcev iz različnih delov ploda, krošnje in drevesa, vrste *M. fructicola* tekom rastne dobe v pregledanih nasadih nismo odkrili. Zasledili smo jo le pri laboratorijski inkubaciji breskev iz nasada na Vogrskem (latentna okužba plodov).

Vseh vzorcev, ki smo jih nabrali in analizirali tekom rastne dobe 2012 je bilo 148. Med izoliranimi glivami je prevladovala *M. laxa* (126 izolatov), drugi izolati pripadajo vrstama *M. fructigena* (18 izolatov) in *M. fructicola* (4 izolati).

Na podlagi rezultatov prvega leta projekta in izkušenj iz prejšnjih let smo lahko ugotovili, da je *M. fructicola*, ki trenutno še ima karantenski status, pri nas prisotna v zelo majhnem odstotku glede na domači vrsti *M. laxa* in *M. fructigena*. Tudi ni podatkov o tem, da bi povzročala večjo škodo kot domače vrste; opažamo pa, da se pogosto pojavlja v latentni obliki, kar pomeni, da povzroča gnilobo po obiranju, v skladišču oz. na poti do potrošnika. Potrebno je nadaljnje spremljanje dinamike pojavljanja te glive, saj je znano, da sčasoma lahko povsem izpodrine domače vrste in zaradi svoje večje agresivnosti povzroči več škode, težave pa lahko nastanejo tudi zaradi razvoja odpornosti na fungicide.

Tudi v letu 2013 je bil zaradi vremenskih razmer (vročina in suša) obseg sadne gnilobe v pregledanih nasadih koščičarjev razmeroma majhen. Nabrali in analizirali smo 155 vzorcev, od tega 25 vzorcev breskev in nektarin ter 130 vzorcev marelic.

Pri breskvah in nektarinah je med povzročiteljicami sadne gnilobe prevladovala vrsta *M. fructicola* (13 izolatov), v manjši meri sta bili zastopani tudi domorodni vrsti *M. fructigena* (7 izolatov) in *M. laxa* (5 izolatov). Primerjava z rezultati iz prejšnjega leta kaže, da je bilo v nasadih breskev in nektarin na Goriškem okužb z glivo *M. fructicola* znatno več kot v prejšnjih letih. V okolici Vogrskega, kjer se je bolezen leta 2009 pojavila prvič, je *M. fructicola* celo prevladovala nad domorodnima vrstama *M. laxa* in *M. fructigena*. V sedmih nasadih na tem območju je bilo odvzetih 16 vzorcev, med katerimi jih je 13 pripadalo vrsti *M. fructicola* in trije vrsti *M. fructigena*, medtem ko vrste *M. laxa*, doslej glavne povzročiteljice sadne gnilobe, sploh nismo ugotovili. O podobni dinamiki populacij gliv povzročiteljic sadne gnilobe poročajo tudi iz drugih držav. Tako se je npr. v Španiji pet let po introdukciji gliva *M. fructicola* v nasadih koščičarjev povsem udomačila in izpodrinila domače vrste. Ta zamenjava povzročiteljev za zdaj še ni povzročila povečanja obsega bolezni in gospodarske škode, kar je bilo pričakovati, saj je znano, da je *M. fructicola* bolj virulentna kot domorodne vrste in hitreje razvije odpornost na fungicide.

V introdukcijskem nasadu marelic v Stari gori smo od marca do julija 2013 opravili štiri vzorčenja in odvzeli 130 vzorcev cvetov, poganjkov, plodičev in zrelih plodov. Med izoliranimi glivami je prevladovala vrsta *M. laxa* (108 izolatov), vrsti *M. fructigena* je pripadalo 21 izolatov, vrsti *M. fructicola* pa en izolat. V nasadih marelic je bil spomladi obseg bolezni razmeroma velik, saj so bile ugodne vremenske razmere za njen razvoj. Iz propadlih cvetov in mladih poganjkov, ki so veneli, črneli in se kljukasto upognili, smo izolirali le vrsto *M. laxa*. Ugotovili smo tudi razmeroma visoko stopnjo latentne okuženosti cvetov (Sylvercot 10 %) s to glivo. V času zorenja plodov je bilo zaradi vročega in suhega vremena okužb zelo malo,

povzročila pa jih je večinoma vrsta *M. laxa*, deloma tudi *M. fructigena*. Samo v enem primeru smo na okuženem plodu ugotovili vrsto *M. fructicola*.

V času zorenja Domačih flokarjev in Catarjev smo obiskali star nasad teh sort v Kojskem v Goriških Brdih. Odvzeli smo par vzorcev za analize in se dogovorili, da bi v prihodnjem letu, če bo dovolj pridelka, opravili laboratorijsko preizkušanje odpornosti teh sort marelic na sadno gnilobo.

V letu 2014 smo v nasadih koščičarjev analizirali 59 vzorcev cvetov, poganjkov in plodov marelic in breskev. Pri marelicah se je bolezen pojavila v nekoliko večjem obsegu le na mladih poganjkih, gnitja plodov pa je bilo malo. Vsi izolati iz marelic so pripadali vrsti *M. laxa*. Nasprotno pa smo pri breskvah ugotovili obsežen pojav plodove monilije, ki je bil po vsej verjetnosti povezan z napadom plodove vinske mušice. V nasadih na Vogrskem smo odvzeli 29 vzorcev plodov in pri veliki večini (25 vzorcev) potrdili okužbo z glivo *M. fructicola*, preostale pa je okužila *M. fructigena*. Kot smo ugotovili že v prejšnjem letu, se tudi letos kaže izrazit trend širjenja in prevlade glive *M. fructicola*.

1.5. Odpornost vrst in sort koščičarjev na plodovo monilijo (*Monilinia fructicola*)

Cvetna monilija in sadna gniloba, ki ju povzročajo vrste iz rodu *Monilinia*, sta pomembni glivični bolezni koščičarjev. V naših rastnih razmerah povzročata znatne izgube pridelka tako v času obiranja kot med skladiščenjem in transportom. Nevarnejši sta v letih s pogostimi padavinami in zmernimi temperaturami. Povzročajo ju glive iz rodu *Monilinia*: domorodni vrsti *M. laxa* in *M. fructigena* ter vnesena vrsta *M. fructicola*. Pogoste so tudi mešane okužbe z vsemi tremi glivami.



Slika5. Okužba marelice s cvetno monilijo, kljub opravljenim tretiranjem proti njej

Varstvo pred boleznima temelji na tretiranju s fungicidi in na doslednem izvajanju higienskih ukrepov. Z gojenjem odpornih oz. tolerantnih sort bi lahko znatno zmanjšali škodo zaradi bolezni in prispevali k manjši rabi fitofamaceutskih sredstev.

Izdelali smo protokol za vrednotenje občutljivosti vrst in sort koščičarjev na okužbo z glivami iz rodu *Monilinia*, ki obsega opazovanja v nasadih in umetne okužbe v laboratorijskih razmerah. Opazovanja v nasadu so podvržena različnim dejavnikom, ki zmanjšujejo njihovo zanesljivost, zlasti nihanju inokuluma gliv tekom rastne dobe, vremenskim razmeram ter agrotehničnim ukrepom, vključno s škropljenjem. Laboratorijsko testiranje temelji na umetnih okužbah cvetov, poganjkov ter zrelih plodov, ki jih površinsko razkužimo in nanje naneseemo suspenzijo trosov, po inkubaciji pa ovrednotimo jakost okužbe. V laboratorijskih razmerah ocenjujemo okužbo s posamezno vrsto rodu *Monilinia*, v nasadu pa skupen obseg okužb z vsemi vrstami, saj posameznih vrst po simptomih ne moremo razlikovati. Kriteriji za oceno občutljivost posameznih sort so delež okuženih cvetov in zrelih plodov v nasadu, delež okuženih cvetov in plodov po laboratorijski inkubaciji ter velikost nekroze in jakost sporulacije pri umetno okuženih plodovih in cvetovih. Za končno oceno odpornosti oz. občutljivosti posamezne sorte so potrebni tako rezultati terenskih opazovanj kot laboratorijskih testov. Ker so bolezni, ki jih povzročajo glive iz rodu *Monilinia* izrazito odvisne od vremenskih razmer v posameznem letu, smo protokol preizkušali vsa tri leta trajanja projekta in ga po potrebi dopolnili s pridobljenimi izkušnjami.

Proučevanje odpornosti sort je prvo leto potekalo v introdukcijskih nasadih marelic, breskev in nektarin v Stari Gori in Biljah ter v dveh proizvodnih nasadih breskev v Mirnu in na Vogrskem. Vključenih je šest sort marelic (Tardicot, Bergeron, Goldrich, Bora, Pinkcot in Sylvercot) ter deset sort breskev in nektarin (Norman, Veteran, Maria Marta, Redhaven, Rich May, Rubirich, Crizia, Laura, Guerriera in Amiga).

Med pojavom bolezni na cvetovih (cvetna monilija) in plodovih (sadna gniloba) ni korelacije, zato smo obe obliki bolezni obravnavali ločeno. V nadaljevanju povzemamo rezultate poskusov v prvem letu.

(i) Okužba cvetov:

- v nasadu je okužba cvetov marelic nihala od 0 % (Goldrich, Pinkcot in Sylvercot) do 2 % (Tardicot, Bergeron) oz. 4 % (Bora), v nasadih breskev pa 2 % pri sorti Rubirich in 0 % pri drugih sortah.
- z laboratorijsko inokulacijo cvetov marelic in breskev nismo ugotovili razlik v občutljivosti na okužbo. Opazili smo le, da je bil pri vseh preizkušanih sadnih vrstah in sortah razvoj simptomov hitrejši in jakost sporulacije izrazito večja pri okužbi z vrsto *M. fructicola* kot pri okužbi z vrsto *M. laxa*, kar kaže na večjo agresivnost prve vrste. Protokol za vrednotenje odpornosti nameravamo v tej točki spremeniti in za umetne okužbe uporabiti rodne poganjke namesto cvetov.



Slika 6. Cvetovi marelic, okuženi z glivama *Monilinia fructicola* (levo) in *M. laxa* (desno)

(ii) Okužba plodov:

- nobena od preizkušenih sort marelic ni bila odporna na okužbo. Med posameznimi sortami so bile opazne razlike v občutljivosti, ki pa jih ni mogoče realno ovrednotiti, saj je nasad marelic med zorenjem zgodnjih sort prizadela toča. Visoka stopnja okužbe pri sortah Sylvercot in Bora, ki sta dozorevali ravno v času toče, je tako v veliki meri posledica ran in poškodb na kožici, ki so se naknadno okužile s trosi *Monilinia* spp.

- med preskušeni sortami breskev in nektarin ni bilo nobene povsem odporne. Zaradi precejšnjih razlik v tehnologiji pridelave, zlasti števila škropljenj, je bila primerjava odpornosti sort breskev in nektarin mogoča le znotraj posameznega sadovnjaka. Stopnja okužbe plodov v sadovnjaku je bila v splošnem zelo nizka, saj je vroče in sušno vreme, ki je trajalo vse poletje, vplivalo na nizko raven inokuluma povzročiteljic sadne gnilobe. Ocena občutljivosti plodov je v takih razmerah manj realna. Sorte z najmanjšim deležem okužb v sadovnjaku in najmanjšo nekrozo pri umetni inokulaciji v laboratoriju (Amiga, Crizia, Guerriera) smo uporabili za ponovno preizkušanje odpornosti v naslednji rastni sezoni.



Slika 7. Breskve po umetni inokulaciji z glivo *Monilinia fructicola*

V letu 2013 je delo potekalo le v introdukcijskem nasadu marelic v Stari gori. Ker je bil pridelek pri večini izbranih sort marelice zaradi različnih vzrokov, začeni s spomladansko pozebo, izredno majhen oz. ga sploh ni bilo, ni bilo mogoče opraviti terenskih opazovanj in laboratorijskih preizkusov odpornosti na zrelih plodovih (umetne okužbe plodov).

Ker rezultati dosedanjega dela niso pokazali razlik v odpornosti izbranih sort marelice na sadno gnilobo smo z umetnimi inokulacijami preizkusili še sorti domači flokar in catar.

V letu 2014 smo v laboratorijskih razmerah z umetnimi inokulacijami preizkusili odpornost plodov marelice sorte 'domači flokar' na okužbo z vrstama *Monilinia laxa* in *M. fructicola*. Tretji in četrti dan po inokulaciji smo izmerili velikost nastalih nekroz ter jakost sporulacije. Po teh parametrih se sorta 'domači flokar' ne razlikuje značilno od sort, ki smo jih preizkušali v prejšnjih letih. Pač pa so se razlike pokazale, ko smo za okužbo uporabili poganjke. Nekroze, ki smo jih izmerili 21 dni po inokulaciji poganjkov sorte 'domači flokar', so bile zelo omejene in značilno manjše kot pri drugih sortah. Razlike v občutljivosti na okužbo smo ugotovili pri posamičnih drevesih iz dveh lokacij na Kojskem, medtem ko so bile pri drevesih iz tretje lokacije (Hum) nekroze na poganjkih enako velike kot pri drugih sortah marelic, ki so bile vključene v preizkušanje.

1.6. Izdelava podlag za hitro določanje vrste monilij iz okuženega rastlinskega materiala

Po pregledu literature za detekcijo in identifikacijo vrste *M. fructicola* smo za vpeljavo v našem laboratoriju izbrali metodo, ki so jo opisali van Brouwershaven in sodelavci, 2009 (van Brouwershaven *et al.*, 2009).

Z opisano metodo lahko v vzorcih določimo (i) prisotnost glive vrste *Monilinia fructicola* in (ii) prisotnost skupine vrst gliv *Monilinia fructigena*, *M. laxa* in *Monilia polystroma*. Opisana metoda temelji na PCR z detekcijo v realnem času in TaqMan kemiji. Par začetnih oligonukleotidov je specifičen za rod *Monilia* in pomnoži ITS regijo v tandemskih ponovitvah rDNA. Dve različni označeni sondi sta specifični: (i) prva za glivo vrste *Monilinia fructicola* in (ii) druga za skupino vrst gliv *Monilinia fructigena*, *M. laxa* in *Monilia polystroma*. Opisana metoda zagotavlja večjo specifičnost za identifikacijo karantenske vrste *M. fructicola* kot morfološka identifikacija in večjo občutljivost kot metoda s konvencionalno PCR, ki ju trenutno uporabljamo v našem laboratoriju.

Ribosomalna DNA (rDNA) nosi zapis za ribosomalno RNA (rRNA). Vsaka evkariontska celica (vključno z glivami) ima 50 – 5.000 identičnih kopij rDNA, ki kodira tri proteine ribosoma. Po transkripciji se sintetizirajo tri rRNA molekule: 18S (majhna podenota /small sub unit / SSU), 5.8S in 28S (velika podenota/ large sub unit /LSU). Med tandemsko urejenimi geni so vmesne regije imenovane: NTS (non transcribed spacers), ETS (external transcribed spacer) in ITS (internal transcribed spacers, ITS1, ITS2). rDNA regija se pogosto uporablja v taksonomiji in identifikaciji kot tarčna molekula, saj so določeni predeli specifični za taksone.

Metoda PCR v realnem času temelji na eksponencialnem pomnoževanju tarčne DNA molekule, podobno kot klasična PCR metoda. Ključna razlika je v odčitavanju nastanka te tarčne molekule s pomočjo fluorescentnega barvila v vsakem ciklu reakcije. Poleg pomnoževanja lahko produkt tudi kvantificiramo oz. določimo količino naše tarče.

Uspešnost pomnoževanja DNA po izbrani metodi PCR v realnem času smo pokazali pri kontrolnih DNA vrst gliv *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa* in *Monilia polystroma*. Tudi iz vzorcev okuženega rastlinskega materiala smo lahko uspešno določili prisotnosti vrste monilij. Uspešnost pomnoževanja DNA po izbrani metodi PCR v realnem času smo testirali

pri serijskih razredčitvah DNA izolirane iz vrst gliv *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa* in *Monilia polystroma* ter pri serijskih razredčitvah spor pri vrstah *M. fructicola* in *M. fructigena*. Na ta način smo določili parametre za kontrolo kakovosti ob uvedbi metode (test občutljivosti (»sensitivity«), test ponovljivosti (»repeatability«, r) in test PCR učinkovitosti (»efficiency«, E)). Pripravili smo interni dokument za metodo v skladu s standardom ISO 9001.

Testirali smo tudi avtomatizirano izolacijo DNA s pomočjo robota MagMax in komercialnega kompleta *MagMax 96 Total RNA Isolation Kit* (proizvajalca Ambion), ki bi lahko še dodatno skrajšala čas analize v primerjavi z ročno metodo izolacije DNA iz gliv, ki jo trenutno uporabljamo v našem laboratoriju. Testirali smo izolacijo DNA iz čistih kultur karantenske vrste *M. fructicola* ter iz vzorcev plodov (jabolka, breskve in marelice) okuženih z glivama *M. fructicola* in *M. fructigena*. Uspešno smo uvedli avtomatizirano izolacijo DNA s pomočjo robota MagMax. Pripravili smo interni dokument za metodo v skladu s standardom ISO 9001.

Za odstranitev inhibitorjev PCR reakcije, ki so ostali prisotni v nekaterih vzorcih tako izolirane DNA, smo uspešno uporabili postopek odstranjevanja inhibitorjev PCR reakcije, ki temelji na polimeru polivinil polipirrolidon (PVPP). Pripravili smo interni dokument za metodo v skladu s standardom ISO 9001.

Uvedli smo postopek za kvantifikacijo glive *M. fructicola*, ki temelji na zgoraj opisanih metodah avtomatizirane izolacije DNA in PCR v realnem času ter po potrebi odstranitvi inhibitorjev PCR reakcije.

Da bi spremljali dinamiko nihanja števila trosov glive *M. fructicola* tekom rastne sezone, smo v letu 2012 nabrali 102 vzorca, ki so predstavljali mikofloro na površini cvetov, listov in sadežev breskev in marelic vzorčenih preko rastne sezone, v enakomernih časovnih intervalih od cvetenja pa do zorenja plodov. Med analiziranimi 102 vzorci nismo zasledili prisotnosti karantenske glive *M. fructicola*, smo pa pri 55 od teh vzorcev pokazali prisotnost drugih gliv rodu *Monilinia* (*M. fructigena*, *M. laxa* in/ali *Monilia polystroma*). Do sedaj prisotnost vrste *M. polystroma* v Sloveniji še ni bila potrjena in je z uporabljeno metodo tudi ne moremo nedvoumno določiti. Inhibitorji PCR reakcije so bili prisotni v 20 vzorcih izolirane DNA. Po uspešni odstranitvi inhibitorjev smo prisotnost gliv druge skupine določili v sedmih vzorcih, kjer jih pred postopkom s PVPP nismo zaznali.

Prednosti in slabosti metode PCR v realnem času za identifikacijo *M. fructicola*:

Prednosti:

- večja specifičnost kot identifikacija z morfološko metodo in
- večja občutljivost kot metoda s konvencionalno PCR, ki jo trenutno uporabljamo v našem laboratoriju,
- večja hitrost metode (rezultati v enem delovnem dnevu),
- enostavno sočasno testiranje številnih vzorcev,
- 96-sočasnih reakcij na ploščici za PCR v realnem času pomeni sočasno testiranje 45 vzorcev,
- možnost nadgradnje sistema za obdelavo večjega števila vzorcev z robotizacijo izolacije DNA, robotizacijo pipetiranja – nanašanja reagentov, nadgradnjo aparature PCR v realnem času za 384-sočasnih reakcij....

- ni potrebna specializacija raziskovalca za posamezen takson,
- varnost (ni uporabe nevarne kemikalije etidijev bromid, ki se jo uporablja za barvanje agaroznih gelov po klasični PCR).

Slabosti:

- raznolikost v določenih predelih DNA molekule lahko onemogoči pravilno identifikacijo (podobno kot pri klasični PCR metodi).

Literatura:

I. R. van Brouwershaven, M. L. Bruil, G. C. M. van Leeuwen and L. F. F. Kox. 2009. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. *Plant Pathology* 59, 3: 548-555.

1.7. Inventarizacija stanja okuženosti z ESFY v nasadih na pridelovalnih območjih v Sloveniji

Pojav propadanja dreves pri marelici je v našem okolju precej prisoten in vpliva na znatno opuščanje pridelave te sadne vrste v Sloveniji. Na propadanje dreves pri marelicah pomembno vpliva tudi občutljivost sort za bolezen kot je ESFY. V Sloveniji je na nekaterih območjih (Goriška Brda, Vipavska dolina, Posavje) še prisotnih nekaj domačih, lokalnih tipov oziroma avtohtonih sort marelice s kakovostnimi plodovi, ki so se uspeli ohraniti do danes.



Slika 8. Primeri propadanja marelic na Primorskem

V avgustu 2012 smo v Goriških Brdih vzorčili in analizirali štiri drevesa dveh starih sort marelic, Debeli flokarji (3 drevesa) in Catarji (1 drevo) z namenom testiranja na ESFY. Nobeno izmed vzorčenih dreves ni izražalo bolezenskih znamenj značilnih za okužbo s fitoplazmami, prisotnost fitoplazme ESFY pa smo dokazali v vseh štirih drevesih. Ta drevesa smo evidentirali kot možne tolerantne tipe na ESFY. Z namenom ugotovitve/potrditve tolerantnosti smo se z lastnico navedenih dreves dogovorili za odvzem cepičev iz testiranih okuženih dreves in možnost cepljenja določenega števila sadik na njenem zemljišču.



Slika 9. Pridelek marelic sorte Debeli flokarji v nasadu, kjer so bila vzorčena drevesa okužena z ESFY

V marcu 2013 je bilo v introdukcijskem nasadu marelic v Stari gori, kjer propadanje marelic opazamo že vrsto let, pred cvetenjem opaženo večje število dreves, ki so se predčasno olistala, cvetela pa skorajda niso. V zvezek fenoloških opazovanj so bile zabeležene tudi prisotnost razpok na deblu in druge anomalije pri razvoju posameznih dreves. Zelo dolga zima in mokra spomlad je, kljub opravljenim tretiranjem, vplivala na večjo okužbo s cvetno monilijo. V aprilu in maju smo opravili sistematično vzorčenje simptomatičnih dreves. Povzorčenih je bilo 13 dreves na ESFY in 2 vzorca na *Pseudomonas syringae*, na monilijo, tla na prisotnost drugih gliv (v dveh vzorcih je bila ugotovljena prisotnost glive *Phytophthora plurivora*), ter listi na prisotnost PPV in drugih virusov. Za vzorčenje tal smo se odločili zato, ker so v določeni vrsti drevesa propadala kar zaporedoma. Da bi dobili čim bolj natančno sliko, smo s pomočjo traktorja tudi izruli in povzorčili napol propadajoče drevo. Rezultati so bili v veliki meri pričakovani in so navedeni pri posameznih sklopih projekta. Pridelek marelic v nasadu je bil zelo skromen, deloma zaradi slabih spomladanskih vremenskih razmer (delna pozeba, slabo oprasovanje), deloma zaradi slabega zdravstvenega stanja dreves (monilije, ESFY).

S PCR v realnem času smo v letu 2013 analizirali 6 vzorcev (od tega so bili trije vzorci kumulativni: sestavljeni iz poganjkov in korenin 2-5 dreves). V vseh analiziranih vzorcih smo potrdili prisotnost fitoplazme ESFY (Tabela 3).

Tabela 3: Vzorci marelic iz Stare gore, ki so bili analizirani na prisotnost ESFY

ID	id_let	Vzorčevalec	Ime_naročnika	Kraj_vzorčenja	lokacija vzorčenega drevesa	vzorčeno	Namen testiranja	Ime_rastline	Tip tkiva	končano	Rezultati
60	2013	Mehle Nataša	CRP sadno drevje	Stara gora	8/5,7/18,5/18,1/5,4/13	15-apr-13	Sum na: ESFY	marelica	korenina	06-maj-13	Poz: ESFY
61	2013	Mehle Nataša	CRP sadno drevje	Stara gora	8/11	15-apr-13	Sum na: ESFY	marelica	korenina	06-maj-13	Poz: ESFY
62	2013	Mehle Nataša	CRP sadno drevje	Stara gora	3/10	15-apr-13	Sum na: ESFY	marelica	korenina	06-maj-13	Poz: ESFY
63	2013	Mehle Nataša	CRP sadno drevje	Stara gora	7/22,6/21,4/9	15-apr-13	Sum na: ESFY	marelica	korenina	06-maj-13	Poz: ESFY
64	2013	Mehle Nataša	CRP sadno drevje	Stara gora	8/21	15-apr-13	Sum na: ESFY	marelica	korenina	06-maj-13	Poz: ESFY
65	2013	Mehle Nataša	CRP sadno drevje	Stara gora	8/30,9/23	15-apr-13	Sum na: ESFY	marelica	korenina	06-maj-13	Poz: ESFY



Slika 10, 11 in 12: Bolezenska znamenja na marelicah iz Stare gore v katerih smo dokazali okužbo z ESBY.



Slika 13. Nasad marelic (Catarji, Bela pašta) v Gonjačah - Goriška Brda, oktober 2013.

Analizirali smo tudi 5 vzorcev starih avtohtonih sort marelic brez znamenj okužbe z namenom iskanja neokuženega drevesa. Tudi v vseh teh analiziranih vzorcih smo potrdili prisotnost fitoplazme ESFY (Tabela 4).

Tabela 4: Rezultati testiranja vzorcev nesimptomatičnih starih sort marelic, ki so bili analizirani na prisotnost ESFY in PPV

Kraj vzorčenja	Rastlina	Sorta	ESFY	PPV
Kojsko	marelica	Drobni flokarji	poz	neg
Gonjače	marelica	Bela pašta	poz	poz
Kojsko	marelica	Debeli flokarji	poz	neg
Gonjače	marelica	Catarji	poz	neg
Kojsko	marelica	Debeli flokarji	poz	neg

Julija 2014 smo analizirali 7 vzorcev starih avtohtonih sort marelic brez znamenj okužbe z namenom iskanja z ESFY neokuženega drevesa. V vseh analiziranih vzorcih smo potrdili prisotnost fitoplazme ESFY. Z iskanjem neokuženega drevesa bomo nadaljevali v okviru projekta V4-1413 z naslovom »Vzpostavitev sistema vzdrževalne selekcije in pridelave semenskega materiala sort kmetijskih rastlin za sonaravne oblike kmetovanja«.

1.8. Iskanje virov odpornosti na ESFY

Po ugotovljenih pozitivnih rezultatih na ESFY pri testiranih drevesih starih sort marelic 'Debeli flokarji' in 'Catarji' ('Debeli flokarji', Kojsko; 'Catarji', Snežatno), smo se na sestanku projektne skupine dogovorili, da spomladi 2013 opravimo v mlademu nasadu marelic prve lastnice v Kojskem cepljenje določenega števila podlag s cepiči z okuženih dreves. Namen te aktivnosti je bil, da ugotovimo ali se bo 'tolerantnost' na ESFY s starih (izhodiščnih) dreves prenesla tudi na mlajše sadike. Cepljenje smo opravili 19. aprila 2013 (načrt v prilogi). Pocepili smo podlage mirabolana 29 C v 1. vrsti (na 1. terasi) mladega nasada, kjer prvo cepljenje ni bilo uspešno, zato je bilo potrebno na podlago, ki je bila različne bujnosti, opraviti različne načine cepljenja – na budno oko, kjer je bila podlaga šibkejša in v žlebiček ali razkol, kjer je bila bujnejša. Cepiči so bili pobrani v januarju 2013, ločeno po testiranih drevesih od I-III. S cepiči okuženega drevesa 'Debelih flokarjev' št. I so bile pocepljene 4 podlage, s cepiči z drevesa II in III pa po tri podlage. S sorto 'Catarji' smo pocepili le dve podlagi, a smo že vnaprej predvidevali, da uspeha najbrž ne bo, ker so bili cepiči predrobni. Uspeh cepljenja pri sorti 'Debeli flokarji' je bil 100 %, medtem ko prijema pri 'Catarjih' ni bilo. V juliju smo opravili mandanje in poletno rez za nadaljnjo vzgojo dreves. Cepljenje 'Catarjev' smo v septembru 2013 ponovili. Prijem le-teh je bil uspešen. Vse cepljene sadike so v letu 2014 ustrezno rastle. Pri pregledu marca 2014 smo opazili, da so štiri od desetih sadik Debelih flokarjev predčasno odganjale z močnejše razvitimi lističi, medtem ko so bili pri preostalih sadikah brsti šele napeti.

V septembru smo v Kojskem obiskali še kolekcijski nasad starih sort, da bi povzorčili še nekaj zanimivih sort na prisotnost ESFY in PPV. Tako smo povzorčili korenine in enoletne poganjke sorte 'Drobni flokarji' v Kojskem in v Gonjačah sorto 'Bela pašta'. Ponovno smo povzorčili sorti 'Debeli flokarji' in 'Catarji', da bi ugotovili ali so tudi druga drevesa teh sort okužena z ESFY. Analize so v vseh vzorcih potrdile prisotnost ESFY, rezultati na PPV pa so bili negativni, razen pri sorti 'Bela pašta', ki je pokazala okužbo s PPV (Tabela 4).

1.9. Bionomija češpljeve bolšice *Cacopsylla pruni* in iskanje drugih potencialnih prenašalcev fitoplazme 'Ca. P. prunorum'

Češpljeva bolšica (*Cacopsylla pruni* (Scopoli): Hemiptera: Sternorrhyncha: Psyllidae) je glavni naravni prenašalec fitoplazme ESFY (Carraro in sod., 1998). Fitoplazmo prenaša na perzistentni način, pri čemer je ključnega pomena stopnja okuženosti populacije češpljeve bolšice, ki se spomladi seli s prezimitvenih rastlin (različni zimzeleni iglavci: smreka, jelka, bori) na primarne gostitelje iz rodu *Prunus* (Carraro in sod., 2002; Carraro in sod., 2004; Thébaud in sod., 2008). Koncentracija fitoplazme ESFY se v prenašalcu v latentnem obdobju bivanja na sekundarnih gostiteljih zelo poveča, zato je prezimitvena populacija lahko zelo močno okužena in odločilna pri prenosu povzročitelja na zdrave rastline (Thébaud in sod., 2009). Tedeschi in sod. (2006) so ugotovili, da se okuženost prezimitvenih samic češpljeve bolšice lahko prenese tudi transovarialno na novo potomstvo, ki je tako že od vsega začetka infektivno. Iz teh spoznanj izhaja, da okužene rastline v neposredni bližini zdravih ne vplivajo bistveno na pojav in širjenje ESFY, pač pa predvsem stopnja okuženosti gostiteljskih rastlin na zelo širokem območju in pogoji za razvoj in razmnoževanje češpljeve bolšice.

Namen raziskave o bionomiji češpljeve bolšice je bil ugotoviti njeno časovno in populacijsko dinamiko preseljevanja s prezimitvenih rastlin na primarne gostitelje ter poleti v obratni smeri, pojavljanje različnih razvojnih stopenj prenašalca v klimatskih razmerah Primorske, kjer je pridelovanje koščičastega sadja najpomembnejše. Boljše poznavanje bionomije češpljeve bolšice v naših klimatskih razmerah bo omogočilo določanje kritičnih obdobji za prenos ESFY ter na podlagi tega ustrežnejše načine njenega zatiranja.










Na področju raziskave bionomije češpljeve bolšice so bile v letu 2012 izvedene naslednje aktivnosti:

- Na štirih izbranih lokacijah (Kromberk in Loke pri Novi Gorici ter Zavrhek in Prelože v Brkinih) smo od zadnje dekade februarja do sredine julija tedensko spremljali nalet in velikost prezimitvene populacije češpljeve bolšice. Pri tem smo uporabljali metodo lova na rumene lepljive plošče in lov z entomološko mrežo ali otresanje imaga na entomološko ponjavo.
- Pri ulovljenih osebkih smo v začetku spremljali zrelost ovarijev samic v laboratoriju z disekcijo zadka pod stereomikroskopom.
- Na dveh lokacijah (Kromberk in Loke pri Novi Gorici) smo tedensko spremljali pojavljanje in dinamiko razvojnih stadijev češpljeve bolšice z vzorčenjem napadenih gostiteljskih rastlin (domača češplja, črn trn). V laboratoriju smo pod stereomikroskopom ugotavljali pojavljanje in razmerja posameznih razvojnih stadijev češpljeve bolšice.
- Izdelava trajnih preparatov razvojnih stadijev češpljeve bolšice po ustaljenih postopkih opredeljenih v poslovniku kakovosti.
- Izdelava fotografske dokumentacije razvojnih stadijev;
- V začetku naleta češpljeve bolšice na primarne gostitelje konec februarja in v marcu je bilo na opazovanih mestih odvzetih 5 vzorcev prezimitvenih osebkov češpljeve bolšice za laboratorijsko testiranje okuženosti vstopne populacije s fitoplazmo "Ca. P. prunorum".

- Konec oktobra 2012 je bil v močno okuženem breskovem nasadu z ESFY v Orehovljah odvzet tudi vzorec z večjim številom breskovega škržatka (*Asymmetrasca decedens*) za laboratorijsko testiranje na navzočnost "*Ca. P. prunorum*".

Rezultati enoletnega spremljanja bionomije češpljeve bolšice so zbrani v Tabeli 5.

Tabela 5: Začetek pojavljanja posameznih razvojnih stadijev češpljeve bolšice v I. 2012.

Lokacija	Začetek naleta	Zreli ovariji	Prva odložena jajčeca	Prve L1	Prve L2	Prve L3	Prve L4	Prve L5	Pojav poletnih imaga	Zadnji* poletni osebki
Kromberk	2.3.2012	16.3.2012	26.3.2012	30.3.2012	18.4.2012	25.4.2012	30.4.2012	-	18.5.2012	21.6.2012
Loke	24.2.2012	10.3.2012	26.3.2012	12.4.2012	25.4.2012	30.4.2012	30.4.2012	30.4.2012	25.5.2012	21.6.2012
Zavrhek	19.3.2012	29.3.2012	-	-	-	-	-	-		
Prelože	20.3.2012	29.3.2012	-	-	-	-	-	-		
										

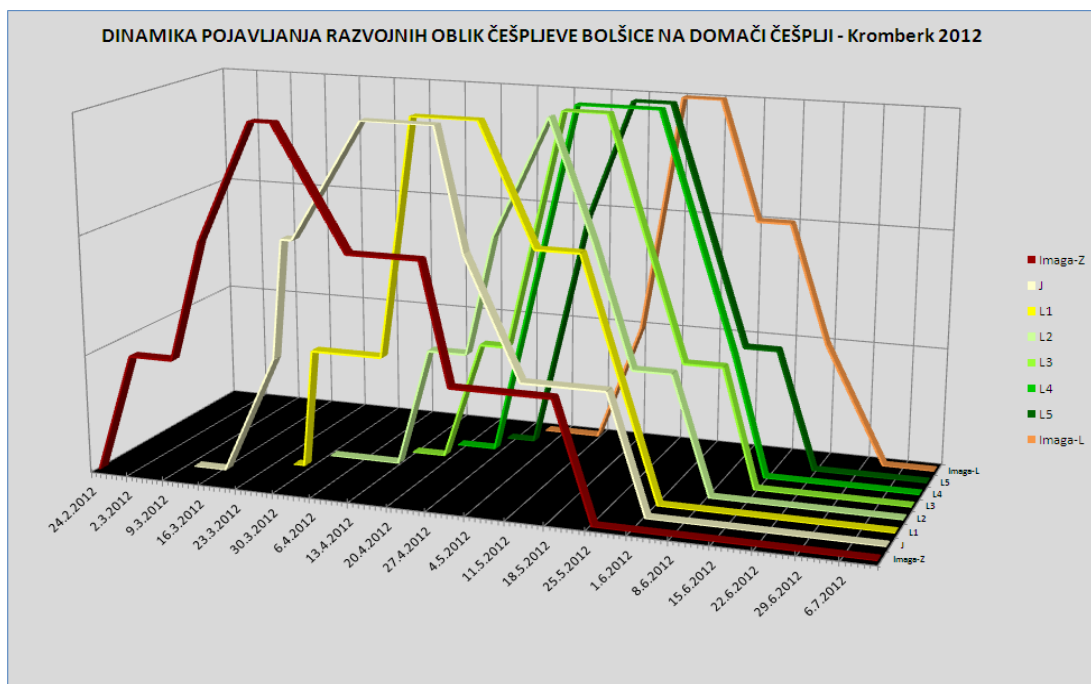
*Zadnji poletni osebki najdeni na primarnih gostiteljih pred preselitvijo na prezimitvene gostitelje.

Prvi nalet odraslih osebkov češpljeve bolšice na primarne gostitelje smo zabeležili pri pregledu 24. februarja na lokaciji Loke pri Novi Gorici (črni trn). V Brkinih smo ta nalet zabeležili šele pri pregledu lovnihi pasti 20. marca. V obeh primerih so bili primarni gostitelji v tem času še v fazi mirovanja ali zgodnjega prebujanja (fenološka faza 01-03 po BBCH lestvici). Številčnost ulova češpljevih bolšic na rumene lepljive plošče je naraščala in dosegla vrh v drugi polovici marca na Goriškem in v prvi polovici aprila na območju Brkinov v fenološki fazi cvetnih popkov in cvetenja gostiteljskih rastlin (BBCH 55-72). V vsem tem obdobju sta bila bolj ali manj enakovredno zastopana oba spola (samci in samice). Konec aprila so bili na vseh opazovanih mestih še vedno navzoči odrasli osebki prezimitvene populacije, a je njihova številčnost že zelo upadla. Zadnje odrasle osebkke smo na rumene plošče na Goriškem ujeli v drugi dekadi maja, v Brkinih pa še konec maja. Proti koncu aprila se je delež samcev zmanjšal bolj kot delež samic, kar kaže na zaton te generacije. V maju so se lovili samo še posamezni osebki prezimitvenih samic.

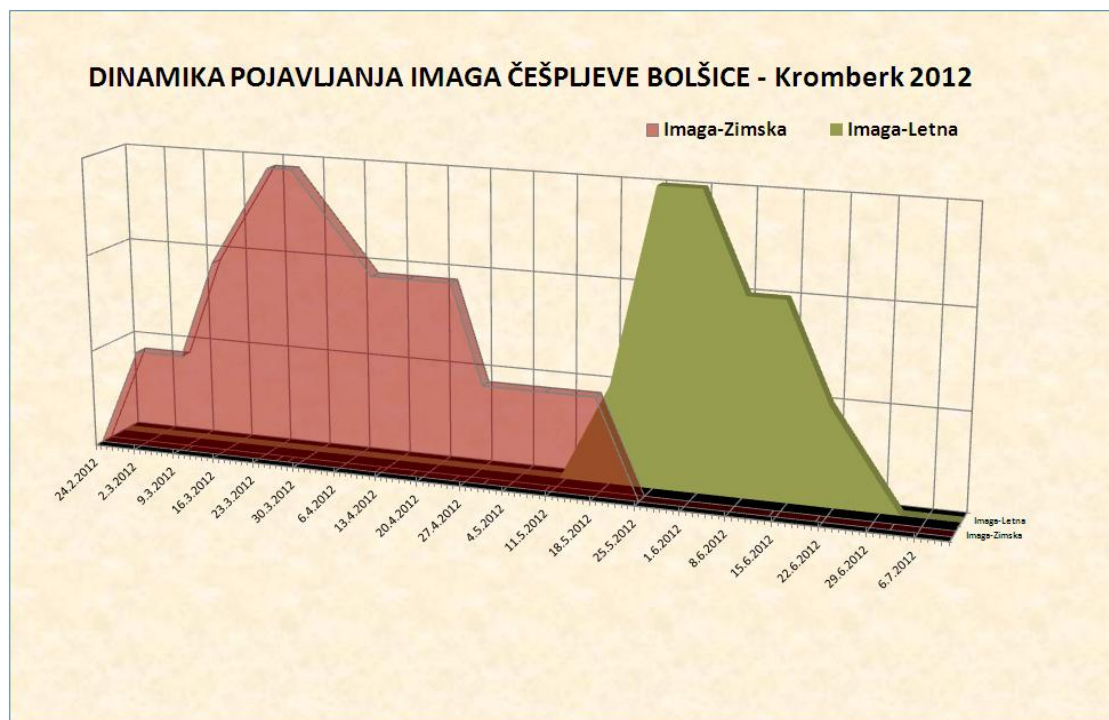
Po naselitvi na primarnih gostiteljih se odrasli osebki intenzivno prehranjujejo na nabrekajočih brstih in nato na poganjkih, v začetku, ko še ni zelenih delov, se prehranjujejo tudi na olesenelih enoletnih šibah. Z disekcijo zadkov samic in navzočnostjo jajčec v ovarijih smo ugotavljali njihovo spolno zrelost. V začetku naleta v ovarijih samic nismo našli jajčec. Ta so se pojavila šele po približno dveh tednih po prvem naletu na primarne gostitelje. Dopolnilno prehranjevanje na primarnih gostiteljih je očitno pogoj, da osebki spolno dozori. Prva odložena jajčeca smo našli šele približno 3-4 tedne po prvem pojavu odraslih osebkov na primarnih gostiteljih. Samica najpogosteje odlaga jajčeca na spodnjo stran listov vzdolž glavne listne žile, najraje v žilne pazduhe. Jajčeca so odložena posamič ali v manjših skupinah do 10 jajčec. Mlada jajčeca so bleščeče rumenkasto bela z značilnim nitastim priveskom na koncu. V teku embrionalnega razvoja postajajo vedno bolj rumena do oranžno rumena.

Trajanje embrionalnega razvoja je zelo odvisno od vremenskih razmer, zlasti temperature. V opazovanih objektih na Goriškem so se v naravnih razmerah prve ličinke pojavile dobra dva tedna po prvih odloženih jajčecih. Toplo vreme v zadnji dekadi aprila je zelo pospešilo razvoj

larvalnih stadijev. Potreben čas za razvoj posameznega larvalnega stadija ni enak, pač pa je daljši za nižje razvojne stadije in krajši za višje larvalne stadije. Ličinke prvega razvojnega stadija (L1) se večinoma prehranjujejo na mestu, kjer se izležejo, ob glavnih žilah na spodnji strani listov. Osebkii drugega larvalnega stadija (L2) se začnejo razseljevati in jih pogosto najdemo v večjem številu med razvijajočimi se listi na vrhu bujnejših poganjkov. Nimfe L3, L4 in L5 se večinoma zadržujejo v pazduhah listnih pecljev sesajoč sokove iz stebel mladih poganjkov. Dinamika pojavljanja in razvoja posameznih razvojnih stadijev češpljeve bolšice v I. 2012 je prikazana na slikah 14 in 15.



Slika 14: Dinamika pojavljanja razvojnih oblik češpljeve bolšice (*C. pruni*) na domači češplji - Kromberk 2012



Slika 15: Dinamika pojavljanja imaga prezimitvene in nove generacije češpljeve bolšice (*C. pruni*) na domači češplji - Kromberk 2012

Ena ključnih preliminarnih ugotovitev v raziskavi bionomije češpljeve bolšice je relativno zelo dolgo obdobje, ko se imaga dopolnilno prehranjujejo na primarnih gostiteljih iz rodu *Prunus*, po tem, ko se spomladi preselijo s prezimitvenih rastlin. Populacija imagov prezimitvene populacije je bila na vseh opazovanih mestih razmeroma številčna. Dopolnilna prehrana je za oba spola potrebna, da spolno dozorita in za preživetje v času parjenja in ovipozicije. Ta čas lahko traja od enega, pa celo do dveh tednov. Imaga prezimitvene generacije se pojavljajo na primarnih gostiteljih od konca februarja pa vse do sredine maja, v Brkinih od sredine marca do konca maja. Zadnja prezimitvena imaga češpljeve bolšice še vedno najdemo na primarnih gostiteljih v času, ko se že pojavijo prvi odrasli osebki nove, poletne generacije. Imaga poletne generacije razmeroma zelo kmalu zapustijo primarne gostitelje in se preselijo na prezimitvene rastline, najpogosteje v višje ležeče gozdove, v naših klimatskih razmerah v glavnem na smreke, jelke in bore. Raziskave na Češkem kažejo, da je razmeroma hitra preselitev poletnih imagov na prezimitvene rastline preživitvenega pomena, saj v ujetništvu na primarnih gostiteljih preživijo največ dva tedna (Lauterer in Čermák, 2006).

Po naselitvi na primarnih gostiteljih je migracija imagov razmeroma skromna in v veliki meri odvisna tudi od vremenskih razmer. Češpljeva bolšica je razmeroma slab letalec, zato aktivno preleta le krajše razdalje. Je pa odličen jadralec, zato jih zračni tokovi lahko prenašajo tudi na daljše razdalje. Poletna selitev s primarnih gostiteljev na prezimitvene rastline je vezana predvsem na poletno termiko, ki jih dvigne v višave in odloži v zavetrju bližnjih gora (Lauterer in Čermák, 2006). Obratno jih hladni spomladanski pobočni tokovi odnašajo z višjih leg na primarne gostitelje v nižjih legah. Orografske razmere, struktura naravne vegetacije in sadovnjakov koščičastega sadja so tako v Vipavski dolini kakor tudi v Brkinih naravnost idealni za razvoj češpljeve bolšice in za nenadzorovano širjenje 'Ca. P. prunorum'. V primeru Vipavske doline so idealne razmere za prezimovanje prenašalca v iglastih gozdovih Trnovskega gozda, v dolini pa obilica naravnih in gojenih primarnih

gostiteljev. V Brkinih pa na istih območjih rastejo tako primarni gostitelji češpljeve bolšice (zlasti slive in češplje) kot tudi njene prezimitvene rastline (smreka, jelka, bori). Preseljevanje je zato zelo enostavno in tudi učinkovito.

Zelo dolgo zadrževanje in prehranjevanje imaga in ličink na gostiteljskih rastlinah iz rodu *Prunus*, ki traja vsaj 2 in pol meseca, je več kot zadosti dolgo obdobje za uspešno akvizicijo in prenos *Ca Phytoplasma prunorum* z okuženih na neokužene gostiteljske rastline. Poleg tega kažejo nekatere raziskave celo na možnost transovarialnega prenosa fitoplazme '*Ca. P. prunorum*' z okuženih samic na potomstvo (Tedeschi et al., 2005).

V letu 2012 smo skupno testirali 46 vzorcev češpljeve bolšice, ki so bili vzorčeni v okviru raziskave njene bionomije. Vzorci nabrani v spomladanskem obdobju so bili iz petih različnih lokacij, vzorci nabrani v poletnem obdobju pa iz ene lokacije. Posamezen vzorec je bil sestavljen iz enega do petih osebkov. Za namen določanja prisotnosti fitoplazme v enem osebku smo optimizirali postopek izolacije DNA ter preizkusili različne endogene gene, ki lahko služijo kot kontrola uspešnosti izolacije DNA.

Iz Kromberga so bili testirani tako poletni, kot tudi spomladanski imagi. Od 20 testiranih posameznih poletnih imagov, smo okužbo z ESFY dokazali le v enem. Po oceni je torej okuženih 5% poletnih imagov. Rezultati analiz za spomladanske image nabrane v Kromberku, kažejo na to, da je bilo okuženih vsaj 20% spomladanskih imagov. Bolj natančne številke za odstotek okuženosti spomladanskih imagov ne moremo podati, saj so bili testirani kumulativni vzorci - po 5 osebkov: ker so bili pozitivni vsi kumulativni vzorci lahko zaključimo, da je bil v vsakem vzorcu okužen vsaj en od petih osebkov. Podoben procent okuženosti osebkov je ocenjen tudi za spomladanske image nabrane v Lokah pri Novi Gorici. Za ostale tri lokacije ocene ne moremo narediti, saj je bilo analiziranih premalo osebkov/vzorcev.

Kot najbolj privlačne gostiteljske rastline iz rodu *Prunus* za češpljevo bolšico so (vrstni red glede na preference): *Prunus spinosa*, *P. cerasifera*, *P. domestica*, *P. instititia*, *P. salicina*, *P. armeniaca*. V tej raziskavi nam z metodo otresanja oziroma uporabo entomološke mreže doslej ni uspelo najti češpljeve bolšice na breskvi (*P. persica*). Naravni prenos '*Ca. Phytoplasma prunorum*' na breskvah in hitro širjenje bolezni je zato še vedno v veliki meri nepojasnen. Obstaja sum, da bi to lahko bil breskov škržatek - *Asymmetrasca decedens*. Vzorci breskovega škržatka (*A. decedens*), ki je eden od potencialnih prenašalcev ESFY so bili nabrani 26.10.2012 v Orehovljah v nasadu breskev s skoraj epifitotičnim širjenjem bolezni. V nasadu je bila vsaj četrtina dreves z izraženimi bolezenskimi znamenji okužbe z ESFY. Osebki breskovega škržatka so bili nabrani le na drevesih s tipičnimi bolezenskimi znamenji in shranjeni v 96 % etanolu.

Vzorec osebkov breskovega škržatka (laboratorijska ID oznaka vzorca: D1310/12) smo razdelili na 12 podvzorcev po 5 osebkov. Iz podvzorcev smo izolirali DNA in jo analizirali s PCR v realnem času (amplikon za ESFY in univerzalni amplikon za fitoplazme). Nizko koncentracijo fitoplazme ESFY smo potrdili v vsaj 8 od 12 testiranih podvzorcev (Tabela 6). Nizka koncentracija ESFY v vzorcih ne potrjuje nujno, da je breskov škržatek resnični prenašalec fitoplazme, temveč je lahko le posledica prehranjevanja osebkov na okuženih rastlinah. Do pomnoževanja ESFY v teh osebkih najverjetneje ni prišlo, ali pa je bilo le v zelo majhnem obsegu. Za potrditev breskovega škržatka kot pomembnega prenašalca fitoplazme

ESFY so nujna dodatna testiranja ter dokaz o sposobnosti prenosa fitoplazme z enega gostitelja na drugega.

Tabela 6: Prikaz rezultatov analiz izvedenih na podvzorcih vzorca z laboratorijsko ID oznako D1310/12 (v tabeli so prikazane vrednosti analiz s PCR v realnem času za vse vzporedne ponovitve na istem podvzorcu).

št. podvzorca	Uni					ESFY				
	testirana ekstrahirana DNA		testirana koncentrirana DNA*			testirana ekstrahirana DNA		testirana koncentrirana DNA*		
1**	34.7	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet
2	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet
3	undet	undet	undet	39.8	35.8	36.9	undet	undet	undet	37.3
4	undet	undet	undet	undet	undet	undet	undet	37.6	undet	undet
5	36.9	36	36.5	37.6	38.7	undet	36.2	undet	36.5	undet
6	undet	undet	undet	undet	38.2	36.6	undet	undet	undet	undet
7	undet	37.5	undet	undet	38.7	undet	undet	undet	undet	undet
8	undet	38	undet	37.2	41.4	undet	undet	undet	38.7	undet
9	34.8	undet	35.5	35	35	undet	undet	35.8	35.5	36.1
10	36.5	36.8	undet	undet	undet	undet	undet	37.8	undet	38.5
11	undet	undet	undet	undet	39	undet	undet	undet	undet	undet
12	37	undet	36.3	38	36.3	undet	undet	36.1	undet	38.6

*v primeru testiranja koncentrirane DNA smo v podvzorcih 2-12 opazili inhibicijo (Ct za 18S: 27.2-39.2). Ct vrednosti za 18S v primeru testiranja nekoncentrirane DNA in v primeru konc. DNA za podvzorec št. 1 so v območju od 16.1-17.6.

**podvzorec je bil testiran tudi z dvema drugima univerzalnima amplikonoma za fitoplazme - rezultati analiz: undet (za vse ponovitve).

Roza obarvana polja: pozitiven rezultat (meja detekcije za Uni amplikon: 37,5; za ESFY amplikon: 38,0);

Zeleno obarvana polja: signal, ki pa je pod mejo detekcije;

Undet – ni signala

Na podlagi ugotovljene bionomije češpljeve bolšice in znan način prenašanja 'Ca. P. prunorum' je morebitno zatiranje češpljeve bolšice smiselno v času, ko se večina prezimitvenih osebkov preseli s prezimitvenih rastlin na primarne gostitelje. Naseljevanje na primerne gostitelje je v veliki meri vezano na fenologijo primarnih gostiteljev. Največja številčnost odraslih bolšic na primarnih gostiteljih je v času brstenja in cvetenja koščičarjev v fenoloških fazah 53 do 67 po BBCH. Najprimernejši čas za zatiranje odraslih bolšic je zato v času brstenja, a pred cvetenjem, to je v fenoloških fazah 51 - 57 po BBCH. Morebitno dopolnilno zatiranje zapoznelih naselitev je mogoče še takoj po končanem cvetenju (FF 69-71).

Zaključki prvih rezultatov študije bionomije češpljeve bolšice:

- Prezimitvene osebkove lanskega rodu smo na rastlinah *Prunus* lahko našli do sredine maja, z viškom v 2. polovici marca in prvi polovici aprila v fenoloških fazah 53- 65 po BBCH.
- Potrebno je relativno dolgo obdobje 2 do 3 tednov dopolnilnega prehranjevanja na primarnem gostitelju, da odrasli osebki spolno dozori.
- Prva jajčeca so bila odložena šele približno 3 tedne po prvem pojavu imaga na rastlinah *Prunus*;
- Samica odlaga jajčeca na spodnjo stran listov večinoma vzdolž debelejših žil ali v njihovih pazduhah;

- L1 ličinke se v glavnem prehranjujejo na mestu izleganja ob glavnih žilah na spodnji strani listov;
- L2 se postopno selijo z listov v listne pazduhe; deloma ostanejo tudi na listih; na listih se prehranjujejo na debelejših žilah;
- L3, L4 in L5 se pretežno zadržujejo v listnih pazduhah; prehranjujejo se z vsebino stebelnega floema.
- Najboljša gostitelja češpljeve bolšice sta *Prunus spinosa* in *P. cerasifera* sledijo *P. domestica*, *P. instititia*, in *P. salicina*. Manj primerna gostitelja pa sta *P. armeniaca* in *P. persica*.
- Zelo dolgo (vsaj 2 in pol meseca) zadrževanje in prehranjevanje imaga in ličink na gostiteljskih rastlinah iz rodu *Prunus* je več kot dovolj dolgo obdobje za uspešno akvizicijo in prenos fitoplazme ESFY.
- Morebitno zatiranje češpljeve bolšice je smiselno le v času, ko se večina prezimitvenih osebkov že preseli na primarne gostitelje, to je v fenološki fazi 51 - 57 po BBCH in takoj po končanem cvetenju (FF 69-71).

V naslednjem letu (2013) smo spremljali dinamiko razvoja češpljeve bolšice, poleg tega pa smo opravili še naslednje aktivnosti:

- Sukcesivno vzorčenje odraslih češpljevih bolšic in njenih preimaginalnih stadijev ter breskovega škržatka z namenom ugotavljanja stopnje okuženosti in stopnjevanja okuženosti s fitoplazmo ESFY.
- Preizkušati učinkovitost lepljivih plošč različnih barv na ulov češpljeve bolšice in breskovega škržatka;
- Povečan poudarek na spremljanju potencialnih prenašalcev na marelicah in breskvah;

Na področju raziskave bionomije češpljeve bolšice so bile v letu 2013 izvedene naslednje aktivnosti:

- Na istih lokacijah kot v letu 2012 (Kromberk in Loke pri Novi Gorici ter Zavrhek in Prelože v Brkinih) smo od zadnje dekade februarja do sredine julija tedensko spremljali nalet in velikost prezimitvene populacije češpljeve bolšice. Pri tem smo uporabljali metodo lova na rumene in modre lepljive pasti ter lov z entomološko mrežo ali otresanje imagov na entomološko ponjavo.
- Na dveh lokacijah (Kromberk in Loke pri Novi Gorici) smo tedensko spremljali pojavljanje in dinamiko razvojnih stadijev češpljeve bolšice z vzorčenjem gostiteljskih rastlin (domača češplja, črni trn). V laboratoriju smo pod stereomikroskopom ugotavljali pojavljanje in razmerja posameznih razvojnih stadijev češpljeve bolšice.
- Odvzetih je bilo skupaj 19 vzorcev različnih razvojnih stopenj češpljeve bolšice za laboratorijsko testiranje okuženosti s fitoplazmo "*Ca Phytoplasma prunorum*", od tega 8 vzorcev zimskih imagov, 2 vzorca letnih imagov, 1 vzorec jajčec ter 8 vzorcev mladostnih stadijev (L₁ do L₅).
- Odvzet je bil tudi en vzorec črnega trna na lokaciji Loke, kjer smo spremljali dinamiko razvoja češpljeve bolšice.

Uporaba modrih lepljivih plošč za lov odraslih bolšic, ki naj bi bile bolj vabljive za češpljevo bolšico kot rumene, se v naših razmerah ni izkazala kot prednost, saj ulov nanje ni bil značilno boljši kot na rumene, ob tem da je odčitavanje z modrih lepljivih plošč zaradi slabšega kontrasta veliko težje. Na splošno je ulov na lepljive plošče razmeroma skromen,

zato ta metoda za kvantitativno analizo številčnosti populacije ni ustrezna. Metoda otresanja na entomološko ponjavo ali v entomološko mrežo daje neprimerno stvarnejšo sliko.

Rezultati spremljanja bionomije češpljeve bolšice v letu 2013 so zbrani v Tabeli 7:

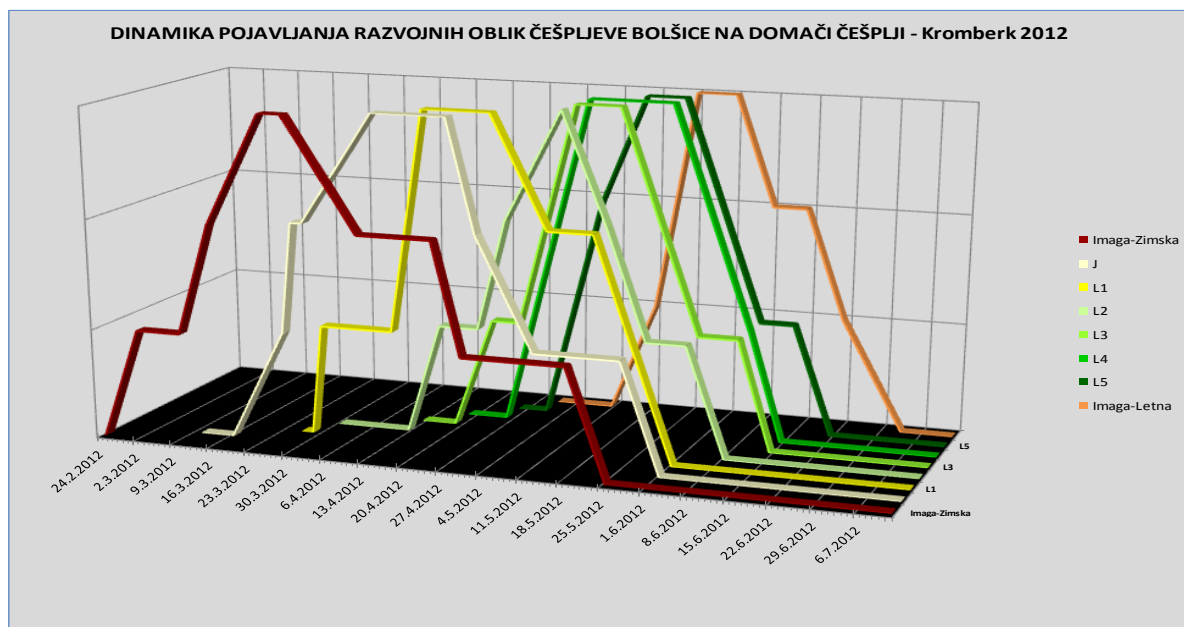
Tabela 7: Začetek pojavljanja posameznih razvojnih stadijev češpljeve bolšice v I. 2013

Lokacija	Začetek naleta	Višek naleta zimskih imaga	Prva odložena jajčeca	Višek odlaganja jajčec	Prve L1	Prve L2	Prve L3	Prve L4	Prve L5	Pojav poletnih imaga	Zadnji poletni osebki
Kromberk	15.3.2013	20.4.2013	20.4.2013	9.5.2013	29.4.2013	9.5.2013	16.5.2013	16.5.2013	23.5.2013	19.6.2013	4.7.2013
Loke	4.4.2013	20.4.2013	20.4.2013	4.5.2013	4.5.2013	9.5.2013	15.5.2013	23.5.2013	23.5.2013	19.6.2013	17.7.2013
Zavrhek	12.4.2013	22.4.2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prelože	16.4.2013	ni bilo ulova	-	-	-	-	-	-	-	-	-

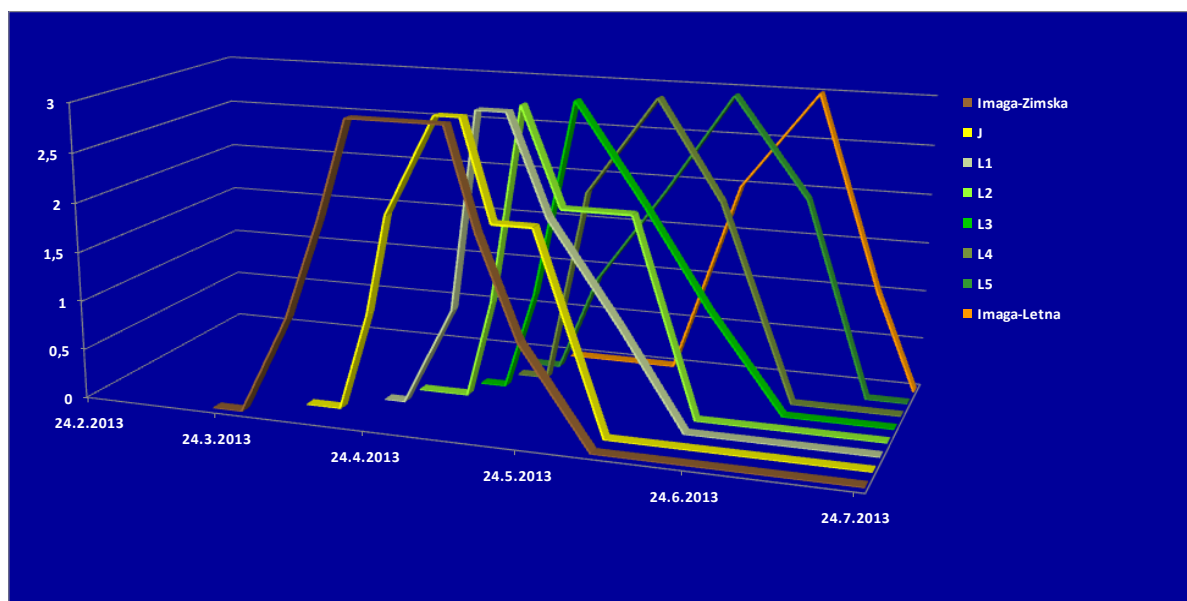


Prvi nalet odraslih osebkov češpljeve bolšice na primarne gostitelje je bil v letu 2013 zaznan šele v sredini marca, množični pa v prvi polovici aprila. Zaradi zapoznele pomladi je bil začetek naleta približno sočasen v Vipavski dolini in Brkinih. Kljub zamiku za skoraj en mesec, pa so bile fenološke faze primarnih gostiteljev približno enake kot leto poprej (fenološka faza 01-03 po BBCH lestvici). Višek ulova češpljeve, ne glede na uporabljeno metodo spremljanja, je bil tik pred ali v času cvetenja črnega trna v fenoloških fazah BBCH 55-72. V vsem tem obdobju sta bila bolj ali manj enakovredno zastopana oba spola (samci in samice). Zadnji odrasli osebki prezimivne generacije so se pojavljali do konca druge dekade maja (Slika 8). Proti koncu so bile v populaciji v glavnem samo še samice, kar je kazalo na zaton generacije.

Sinhrono zakasnitvi naleta odraslih bolšic je sledil tudi časovni zamik pojavljanja mladostnih stadijev češpljeve bolšice. Dinamika pojavljanja in razvoja posameznih razvojnih stopenj češpljeve bolšice v I. 2012 in 2013 je primerjalno prikazana na Slikah 16 in 17.

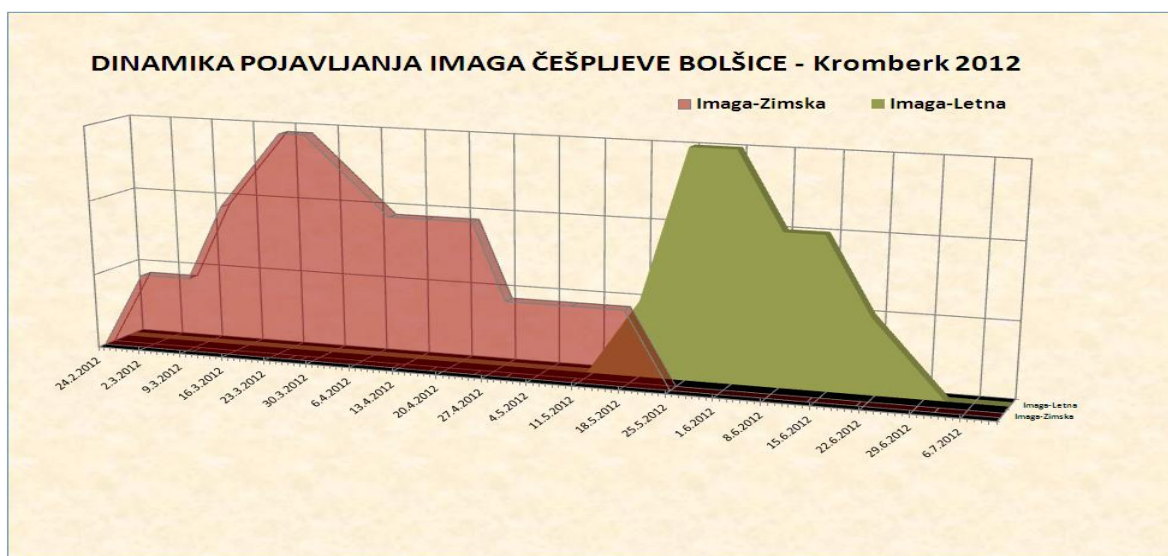


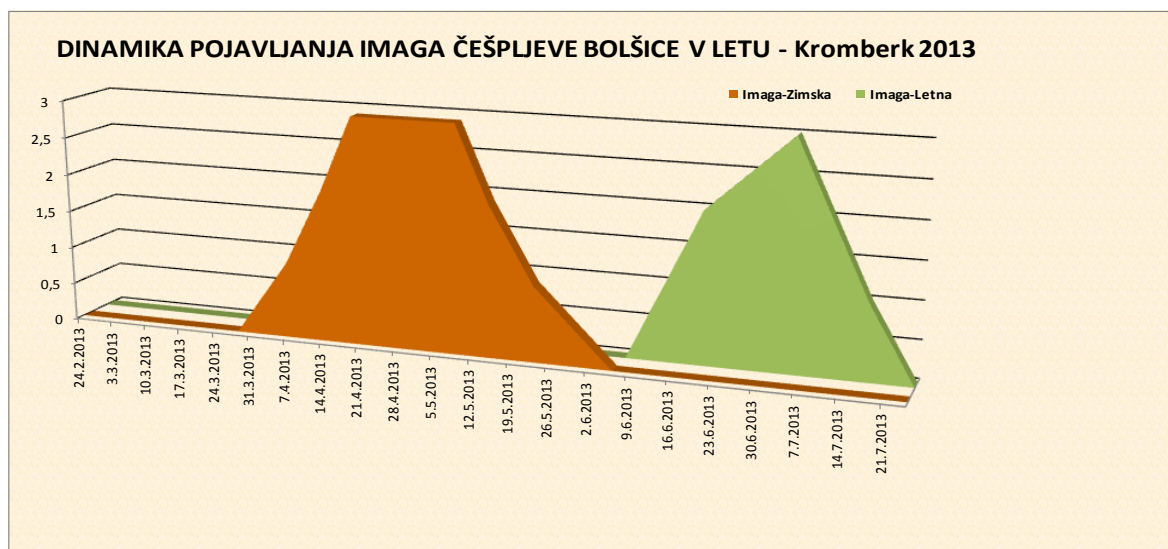
Slika 16: Dinamika pojavljanja razvojnih stopenj češpljeve bolšice (*C. pruni*) na domači češplji - Kromberk 2012



Slika 17: Dinamika pojavljanja razvojnih stopenj češpljeve bolšice (*C. pruni*) na domači češplji - Kromberk 2013

Ena ključnih ugotovitev v raziskavi bionomije češpljeve bolšice je relativno zelo dolgo obdobje, ko se imagi dopolnilno prehranjujejo na primarnih gostiteljih iz rodu *Prunus*, po tem ko se spomladi preselijo s prezimitvenih rastlin. Populacija imagov prezimitvene populacije je bila v letu 2013 zelo različna. Medtem, ko je bila v spodnji Vipavski dolini razmeroma zelo številčna, so bili na lokaciji Prelože v Brkinih v celotnem obdobju ulovljeni le trije osebki. Imagi poletne generacije so se v letu 2013 pojavila v drugi polovici junija, približno pol meseca pozneje kot leto poprej. Osebki poletnega rodu razmeroma kmalu zapustijo primarne gostitelje in se preselijo na prezimitvene rastline v naših klimatskih razmerah v glavnem na smreke, jelke in bore. Zadnji osebki poletne generacije so bili na črnem trnu najdeni sredi julija.





Slika 18: Dinamika pojavljanja imaga prezimitvene in nove generacije češpljeve bolšice (*C. pruni*) na domači češplji - Kromberk 2012 in 2013

Laboratorijske analize v letih 2012 in 2013 kažejo visoko stopnjo okuženosti prezimitvene generacije s fitoplazmo 'Ca. Phytoplasma prunorum' že v začetku naleta. Iz tega je mogoče ugotoviti, da je za širjenje ESFY najpomembnejša prezimitvena populacija češpljeve bolšice, ki se v nasade koščičastega sadja naseli iz različnih razpršenih populacij prejšnje rastne dobe. Laboratorijske analize vzorcev različnih razvojnih stopenj češpljeve bolšice v letu 2013 kažejo, da so lahko okužene že prav vse razvojne stopnje, vključno z jajčeci. Slednje potrjuje ugotovitve nekaterih predhodnih raziskovalcev (Tedeschi et al., 2005), da se fitoplazmo 'Ca. Phytoplasma prunorum' lahko prenaša tudi transovarialno s staršev na potomce.

Kot najbolj privlačne gostiteljske rastline iz rodu *Prunus* za češpljevo bolšico so (vrstni red glede na preference): *Prunus spinosa*, *P. cerasifera*, *P. domestica*, *P. institia*, *P. salicina*, *P. armeniaca*. Z metodo otresanja na entomološko ponjavo in vizualnim pregledom smo v letu 2013 tudi nesporno ugotovili, da se tudi v razmerah Vipavske doline češpljeva bolšica zadržuje in prehranjuje tudi na breskvah. Zaradi skromnejše populacije mladostnih stadijev na tej sadni vrsti nismo našli.

Na prisotnost ESFY smo analizirali različne stadije češpljeve bolšice in en vzorec črnega trna (črni trn na katerem so bili vzorčeni osebki češpljeve bolšice iz lokacije Loke). Skupno je bilo analiziranih 105 podvzorcev (Tabela 8). Vzorci češpljeve bolšice so bili nabrani na treh različnih lokacijah (Vogrsko, Loke, Kromberk). Okužbo osebkov z ESFY smo dokazali na vzorcih iz vseh treh lokacij. Z ESFY so bili okuženi vsi stadiji češpljeve bolšice: zimski imago, jajčeca, ličinke L1-5, letni imago. Glede na rezultate analiz posameznih imagov lahko sklepamo, da je odstotek okuženosti imagov od 10-80%.

Tabela 8: Prikaz rezultatov analiz na ESFY izvedenih na vzorcih in podvzorcih različnih stadijev češpljeve bolšice in na vzorcu črnega trna.

Češpljeva bolšica (<i>Cacopsylla pruni</i>):																														
	D78/13	D90/13	D91/13	D123/13	D125/13	D182/13	D183/13	D184/13	D77/13	D88/13	D89/13	D121/13	D122/13	D124/13	D185/13	D186/13	D127/13	D181/13	D126/13											
stadij	zimski imago	jajčeca	ličinke	ličinke L1-L3	ličinke L1-L4	ličinke L1-L5	ličinke L3-L5	ličinke L4-L5	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago	zimski imago											
čas vz.	20.4.2013	25.4.2013	3.5.2013	15.5.2013	23.5.2013	6.6.2013	19.6.2013	4.7.2013	20.4.2013	25.4.2013	3.5.2013	9.5.2013	15.5.2013	23.5.2013	4.7.2013	12.7.2013	23.5.2013	6.6.2013	23.5.2013											
lokacija vz.	Vogrsko																	Loke		Kromberk										
vzorčeno na:	P. domestica																	P. spinosa		P. domestica										
št. enot v podvz.	1	vse	vse	vse	vse	polovica	vse	vse	1	1	1	1	1	1	1	1	polovica	vse	1											
rezultat	podvz.1	35,8	32,1	31,7	35,1	34,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	35,4	neg	neg	neg	25,1	37,3*	34,9											
	podvz.2	20,7					32,7		neg	26,9	neg	33,1	neg	neg	neg	37,1	33,4		36,9*											
	podvz.3	19,5							neg	neg	18,8	35,7	neg	37,1*	neg	35,3			neg											
	podvz.4	34,5							neg	neg	34,8	neg	36	neg	35,81	neg			neg											
	podvz.5	neg							neg	37,0*	neg	34,7	neg	neg	neg	20,9			18,3											
	podvz.6	21							neg	18,4	neg	35,5	neg	neg	20,8	36,8*			17,3											
	podvz.7	36,8							neg	neg	neg	36,6*	35,2	neg	neg				32,5											
	podvz.8	neg							neg	33,5	34,3	33,4	neg	20,2	neg															
	podvz.9	37,1*							21,1	neg	neg	neg	neg	sum	32,4															
	podvz.10	20,9							neg	neg	neg	neg	36,9	neg	neg															
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Črni trn (<i>Prunus spinosa</i>)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>D92/13</td> <td></td> </tr> <tr> <td>čas vz.</td> <td>3.5.2013</td> </tr> <tr> <td>lokacija vz.</td> <td>Loke</td> </tr> <tr> <td>rezultat</td> <td>36,4* (mer: 33,9)</td> </tr> </tbody> </table>																					Črni trn (<i>Prunus spinosa</i>)		D92/13		čas vz.	3.5.2013	lokacija vz.	Loke	rezultat	36,4* (mer: 33,9)
Črni trn (<i>Prunus spinosa</i>)																														
D92/13																														
čas vz.	3.5.2013																													
lokacija vz.	Loke																													
rezultat	36,4* (mer: 33,9)																													
<p>Legenda:</p> <p>število številke pomeni, da je okužba potrjena (manjša številka pomeni več ESFY)</p> <p>*ena paralelka negativna, dve pozitivni (okuženo zelo nizko koncentracijo)</p> <p>sum - ena paralelka pozitivna, dve negativni (sum na okužbo z nizko koncentracijo)</p> <p>neg - negativno</p>																														

Iz pridobljenih podatkov o bionomije češpljeve bolšice v okviru te raziskave ter znanega način prenašanja 'Ca Phytoplasma prunorum' je mogoče izluščiti naslednje ključne ugotovitve:

- Najpomembnejši infekcijski potencial za širjenje ESFY predstavlja prezimitvena generacija češpljeve bolšice, ki spomladi priletijo v nasade koščičastega sadja iz različnih razpršenih populacij prejšnjega leta. Laboratorijske analize so pokazale razmeroma velik delež okuženosti populacije s fitoplazmo 'Ca Phytoplasma prunorum'.
- Naknadna migracija odraslih bolšic spomladi po naselitvi na primernem gostitelju iz rodu *Prunus* je zelo omejena in ne predstavlja pomembnejše grožnje za epifitotično širjenje EFSY. Zelo široki varovalni pasovi okoli varovanih nasadov zato nimajo posebno velikega pomena in učinka. Ocenjujemo, da bi bil 50 m varovalni pas okoli drevesnic in matičnih nasadov povsem zadovoljiv in ne pomembno slabši kot 100 m pas.
- Vse razvojne stopnje češpljeve bolšice so lahko nosilci fitoplazme 'Ca Phytoplasma prunorum' in zato potencialni prenašalci ESFY. Mladostni stadiji so potencialni prenašalci na zelo omejeni razdalji, ki zajema isto rastlino in kvečjemu še sosednje dotikajoče se rastline.
- Vse kaže, da je akvizicija fitoplazme 'Ca Phytoplasma prunorum' mladostnih stadijev češpljeve bolšice vsaj tako pomembna kot poletnih odraslih bolšic, saj je čas od pojava poletnih imagov do njihove preselitve na prezimitvene rastline razmeroma kratek.
- Za omejevanje širjenja ESFY je zato najpomembnejše zatiranje prezimitvene generacije v času množičnega naleta na primarne gostitelje spomladi.
- Začetek in višek tega naleta je v tesni korelaciji s fenologijo najpomembnejših primarnih gostiteljev, zlasti črnega trna in sliv in ni vezan na koledarski čas. Največja številčnost odraslih bolšic na primarnih gostiteljih je v času brstenja in cvetenja koščičarjev v fenoloških faza 53 do 67 po BBCH.
- Najprimernejši čas za zatiranje odraslih bolšic je zato v času brstenja, a pred cvetenjem, to je v fenoloških fazah 51 - 57 po BBCH. Morebitno dopolnilno zatiranje zapoznelih naselitev je mogoče še takoj po končanem cvetenju (FF 69-71).

V letu 2014 smo za potrditev okužb različnih razvojnih stadijev češpljeve bolšice ponovno analizirali različne stadije češpljeve bolšice, ki so bili nabrani na različnih lokacijah. Jajčeca

(2 vzorca) in ličinke (12 vzorcev; od tega smo 4 vzorce razdelili na dva podvzorca in ju ločeno analizirali) so bile analizirane kot skupek večjega števila jajčec oz. ličink (18 analiz). Posamezne osebke zimskih (11 vzorcev) in letnih imagov (5 vzorcev), ter v enem primeru stadij L5, smo analizirali ločeno, z namenom, da ugotovimo procent okužbe v populaciji (149 analiz). Analizirali smo tudi 5 vzorcev listnih žil z namenom, da preverimo ali so poganjki na katerih so bili vzorčeni začetni stadiji češpljeve bolšice (jajčeca oz. ličinke L1) okuženi. Rezultati analiz so podrobneje opisani v nadaljevanju.

Zimski imagi: Tudi v letu 2014 smo potrdili, da so zimski imagi okuženi z ESFY. Zimski imagi okuženi z ESFY so bili ulovljeni na različnih lokacijah (Loke pri Novi Gorici, Vrtojba, Vogrsko, Kromberk in Banjšice, ki ležijo na nadmorski višini 750 m in so izven sadjarskega območja), na različnih gostiteljskih rastlinah (*P. spinosa*, *P. cerasifera*, *P. domestica*), ter v različnih časovnih obdobjih (od marca do maja). V posameznih vzorcih je bilo okuženih od 10 do 100% osebkov.

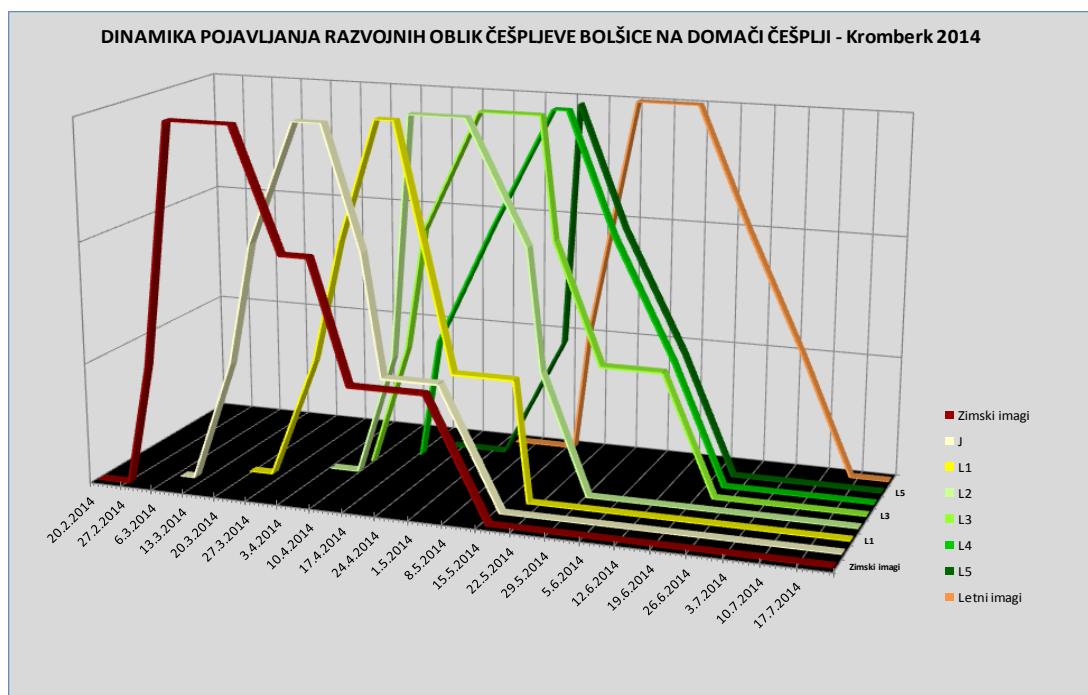
Jajčeca: V letu 2013 smo prejeli en vzorec jajčec, v katerem smo dokazali prisotnost ESFY. V letu 2014 smo analizirali dva vzorca jajčec in listne žile poganjkov na katerih so bila le-ta nabrana. Prisotnosti ESFY nismo potrdili v vzorcu jajčec, ki so bila nabrana na poganjku *P. spinosa*, v katerem prisotnosti ESFY nismo dokazali. V vzorcu jajčec, ki so bila nabrana na okuženem poganjku *P. cerasifera*, pa glede na rezultate analiz sklepamo, da je količina ESFY izredno nizka. Glede na rezultate analiz ne moremo nedvoumno trditi, da so okužena jajčeca, saj obstaja možnost, da s PCR v realnem času zaznamo prisotnost ESFY kot posledica kontaminacije jajčec s fitoplazmo v listih (jajčeca so »zasidrana« v list).

Ličinke: V letu 2013 smo z analizami ugotovili, da je ESFY prisotna tudi v ličinkah. Z ločenimi analizami posameznih stadijev (L1-L5) smo v letu 2014 želeli preveriti kateri stadiji so okuženi. Okužbe stadija L1 nismo potrdili v nobenem izmed dveh analiziranih vzorcev, ne glede na to, da so bile ličinke L1 nabrane na poganjkih v katerih smo potrdili okužbo z ESFY. Okužba z ESFY je bila potrjena v enem izmed treh analiziranih vzorcev stadija L2. V dveh vzorcih okužba stadija L2 z ESFY ni bila potrjena, ne glede na to, da so bile ličinke nabrane na okuženem poganjku. Okužbe stadija L3 nismo potrdili v nobenem izmed dveh analiziranih vzorcev, je pa bila potrjena v vseh treh analiziranih vzorcih stadija L4, in v večini vzorcev stadija L5 (v treh od šestih analiziranih skupkih večjega števila ličink, in v vseh 10 analiziranih posameznih osebkih L5).

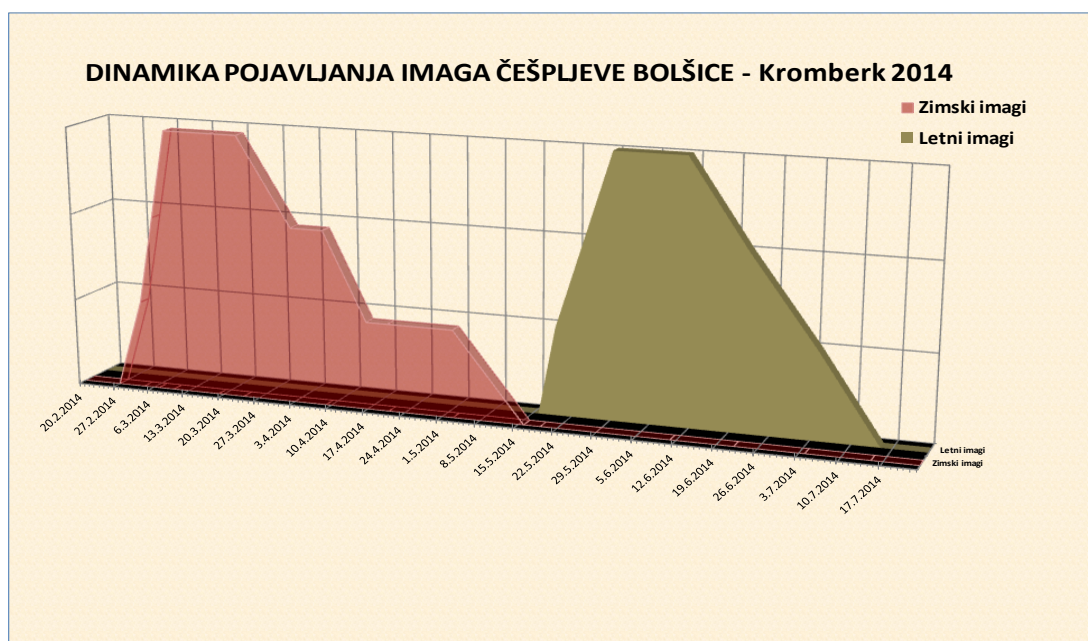
Letni imagi: Okužba letnih imagov je bila potrjena tudi v letu 2014, kar je glede na rezultate navedene zgoraj pričakovano. V dveh letih je bilo skupno analiziranih 50 osebkov letnih imagov, okužbo z ESFY pa smo dokazali v 34 (68%).

V letu 2014 smo za spremljanje naleta prezimitvene populacije češpljeve bolšice poleg rumenih lepljivih plošč uporabljali tudi tehniko otresanja gostiteljskih rastlin v entomološko mrežo. Slednja se je izkazala kot najboljši pokazatelj časovne dinamike populacije češpljeve bolšice. Terenski del raziskave smo za l. 2014 zaključili konec julija, ko na primarnih gostiteljih z nobeno uporabljeno metodo ni bilo mogoče več najti češpljeve bolšice in se je ta preselila na prezimitvene rastline (smreka, jelka, bori).

Dinamika naleta prezimitvenih odraslih osebkov na primarne gostitelje (črni trn, domača češplja, slive) je bila podobna kot v letu 2012 (slika 19 in 20). Nalet prvih osebkov smo na Goriškem zabeležili prve dni marca z viškom v drugi polovici marca in v začetku aprila. V primerjavi z letom 2013 je začetek in višek naleta prezimitvenih imagov na primarne gostitelje iz rodu *Prunus* precej zgodnejši. V Brkinih je bil višek ulova prezimitvenih imagov na rumene plošče v prvi polovici aprila. Ponovno se je izkazalo, da sta migracija in razvoj češpljeve bolšice vezana na fenološko fazo primarnega gostitelja in ne na čas. Potrjeno je bilo pojavljanje in prehranjevanje češpljeve bolšice tudi na breskvah.



Slika 19: Dinamika pojavljanja razvojnih stopenj češpljeve bolšice (*C. pruni*) na domači češplji v letu 2014



Slika 20: Dinamika pojavljanja imagov prezimitvene in nove generacije češpljeve bolšice (*C. pruni*) na domači češplji v letu 2014

Zaključki triletne študije bionomije češpljeve bolšice:

- Začetek in višek naleta prezimitvene generacije češpljeve bolšice na primarne gostitelje iz rodu *Prunus* spomladi je v tesni korelaciji s fenologijo najpomembnejših primarnih gostiteljev zlasti črnega trna in sliv in ni vezan na koledarski čas. Največja številčnost odraslih bolšic prezimitvenega rodu na primarnih gostiteljih je v času brstenja in cvetenja črnega trna in sliv v fenoloških fazah 53 do 67 po BBCH, običajno je to v drugi polovici marca.
- Po naletu na primarne gostitelje je potrebno relativno dolgo obdobje dopolnilnega prehranjevanja na primarnem gostitelju, da odrasli osebki spolno dozori. To traja od 1 do 2 tedna.
- Prva jajčeca so bila odložena približno 3 tedne po prvem pojavu imaga na gostiteljskih rastlinah. Samica odlaga jajčeca na spodnjo stran listov večinoma vzdolž debelejših žil ali v njihovih pazduhah;
- Ličinke 1. razvojne stopnje (L1) se v glavnem prehranjujejo na mestu izleganja ob glavnih žilah na spodnji strani listov. Ličinke 2. razvojne stopnje (L2) se postopno selijo z listov v listne pazduhe. Tiste, ki še ostanejo na listih se prehranjujejo na debelejših žilah.
- Ličinke (nimfe) L3, L4 in L5 se pretežno zadržujejo v listnih pazduhah in se prehranjujejo z vsebino stebelnega floema.
- Prezimitvena generacija češpljeve bolšice predstavlja najpomembnejši infekcijski potencial za širjenje ESFY. Populacija, ki spomladi prileti na primarne gostitelje, izvira iz različnih razpršenih populacij prejšnjega leta. Laboratorijske analize so pokazale velik delež okuženosti te populacije s fitoplazmo '*Ca Phytoplasma prunorum*'.
- Naknadna migracija odraslih bolšic spomladi po naselitvi na primernem gostitelju iz rodu *Prunus* je precej omejena in ne predstavlja pomembnejše grožnje za epifitotično širjenje ESFY. Zelo široki varovalni pasovi okoli varovanih nasadov zato nimajo posebno velikega pomena in učinka. Ocenjujemo, da bi bil 50 m varovalni pas okoli drevesnic in matičnih nasadov povsem zadovoljiv in ne pomembno slabši kot 100 m pas.
- Zelo dolgo zadrževanje in prehranjevanje zimskih imagov (od konca februarja do začetka maja) in ličink na gostiteljskih rastlinah iz rodu *Prunus* je več kot dovolj dolgo obdobje za uspešno akvizicijo in prenos fitoplazme ESFY.
- Vse razvojne stopnje češpljeve bolšice so lahko nosilci fitoplazme '*Ca Phytoplasma prunorum*' in zato potencialni prenašalci ESFY. Laboratorijske analize so pokazale razmeroma visoko stopnjo okuženosti višjih preimaginalnih razvojnih stopenj (L4, L5), ki se prenese v naslednjo prezimitveno generacijo. Akvizicija fitoplazme '*Ca Phytoplasma prunorum*' mladostnih stadijev je zato vsaj tako pomembna kot poletnih odraslih bolšic, saj je čas zadrževanja poletnih imagov na primarnih gostiteljih do njihove preselitve na prezimitvene rastline razmeroma kratek.
- Za omejevanje širjenja ESFY je zato najpomembnejše zatiranje prezimitvene generacije v času množičnega naleta na primarne gostitelje spomladi. Najprimernejši čas za zatiranje odraslih bolšic je zato v času brstenja, a pred cvetenjem, to je v fenoloških fazah 51 - 57 po BBCH. Za to tretiranje bi bili najprimernejši insekticidi iz skupine piretroidov (deltametrin, lambda-cihalotrin, beta-ciflutrin). Morebitno dopolnilno zatiranje zapoznelih naselitev se izvaja čim prej po končanem cvetenju (FF 69-71 po BBCH), po možnosti

sočasno z zatiranjem listnih uši in grizlic z neonikotinskimi insekticidi (imidakloprid, acetamiprid, tiametoksam).

Literatura:

- Carraro L., Osler R., Loi N., Ermacora P., Refatti E., 1998. Transmission of the European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*.- *Journal of Plant Pathology*, 80(3): 233-239.
- Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi N., 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stonefruit yellows.- *Plant Pathology*, 51: 513–517.
- Carraro L., Ferrini F., Labonne G., Ermacora P., Loi N., 2004. Seasonal infectivity of *Cacopsylla pruni*, vector of European stone fruit yellows phytoplasma.- *Annals of Applied Biology*, 144: 191-195.
- Lauterer, P., Čermák, 2006: Biology of the psyllid vectors of AP and ESFY phytoplasmas (Hemiptera, Psylloidea). Proceedings of XVII. Czeck and Slovak Plant Protection Conference, Prague, 12. - 14. 9. 2006: 482-487.
- Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J., Alma A. 2006: Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55: 18–24.
- Thébaud G., Yvon M., Alary R., Sauvion N., Labonne G. 2009. Efficient transmission of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector.- *Phytopathology*, 99: 265-273.

1.10. Izdelava protokola za vrednotenje tolerantnosti sort in tipov marelice proti ESFY

V okviru projekta smo na osnovi podatkov iz literature izdelali protokol za vrednotenje občutljivosti oziroma tolerantnosti sort in tipov marelice na okužbo s fitoplazmo ESFY.

Sadne vrste iz rodu *Prunus* so za okužbo s fitoplazmo ESFY različno občutljive, z različnim izražanjem bolezenskih znamenj. Med njimi je marelica (*P. armeniaca*) za okužbo z ESFY zelo dovzetna in občutljiva sadna vrsta, saj okužena drevesa kažejo izrazita bolezenska znamenja in precejšnje odmiranje dreves. Ob dejstvu, da so fitoplazemska obolenja neozdravljiva, je za omejevanje in preprečevanje širjenja bolezni bistvenega pomena izvajanje preventivnih ukrepov. Tovrstni ukrepi, ki zmanjšujejo pojavljanje ESFY ter vplivajo na zmanjševanje škod, ki jih le-ta povzroča, vključujejo sajenje zdravega sadilnega materiala, nadzor žuželčjega prenašalca češpljeve bolšice, odstranjevanje obolelih rastlin, primerno oskrbo sadovnjakov in odstranjevanje koreninskih poganjkov, kakor tudi sajenje tolerantnih rastlin.

V okoljih z velikim infekcijskim pritiskom fitoplazme, s kakršnim se soočamo tudi pri nas, je uporaba tolerantnih sort smiselna oziroma lahko omogoči pridelavo občutljivih sadnih vrst, kot je marelica. S tem namenom smo pripravili protokol, navodila za proučevanje občutljivosti oziroma tolerantnosti različnih sort/tipov pri marelici na okužbo s fitoplazmo ESFY. Znano je, da je na nekaterih pridelovalnih območjih marelice v Sloveniji še prisotnih nekaj domačih, lokalnih tipov oziroma avtohtonih sort marelice s kakovostnimi plodovi, ki so se uspeli ohraniti do danes. Primerjalno lahko poleg odbranih lokalnih tipov ali avtohtonih sort vrednotimo občutljivost tudi nekaterih novejših sort marelic, ki se širijo v pridelavi.

Za proučevanje občutljivosti oziroma tolerantnosti sort uporabimo metode prenosa fitoplazme ESFY s cepljenjem z okuženimi cepiči na zdrave rastline sort, ki jih želimo vrednotiti (inokulirane rastline). Poskus proučevanja občutljivosti oziroma tolerantnosti sort se izvaja v zavarovanem prostoru.

- Vse proučevane sorte/tipe, ki jih želimo vrednotiti cepimo na zdravo podlago (sejanec marelice, *P. 'Marianna'* GF 8/1, ...) Pred cepljenjem sort preverimo zdravstveno stanje matičnih dreves, od katerih pridobimo cepiče, da so brez okužbe z ESFY.
- Za prenos fitoplazme uporabimo cepiče iz okuženega drevesa marelice (drevo, pri katerem je potrjena prisotnost ESFY), s katerimi cepimo enoletne sadike. Za vsako sorto/tip uporabimo po 10 sadik, za izvedbo inokulacije cepimo vsako sadiko s 3 okuženimi cepiči. Vzoredno pustimo 3 sadike necepljene, ki služijo za kontrolo. Za preverjanje okuženosti oziroma uspešnega prenosa fitoplazme se vse rastline v poskusu testira na prisotnost fitoplazme enkrat v času opazovanj z metodo PCR. Za vzorčenje se uporabi lahko poganjek nadzemnega dela, vendar se v primeru negativnih rezultatov vzorči še korenine. Opazovanja bolezenskih znamenj potekajo najmanj 3 leta po inokulaciji.
- Vsako leto v obdobju opazovanja se po posamezni sorti ali tipu beleži izražanje bolezenskih znamenj in število rastlin z bolezenskimi znamenji; število rastlin, ki propade, odmre; število rastlin, ki so brez bolezenskih znamenj. O tolerantnosti rastline govorimo, ko je pri rastlini potrjena prisotnost fitoplazme, pa le-ta ne kaže bolezenskih znamenj.

Izdelan protokol omogoča vrednotenje obnašanja sort v primeru okuženosti z ESFY, torej vrednotenje njihove občutljivosti oziroma tolerantnosti, s čimer želimo prispevati k odbiru tolerantnejših sort ali tipov za gojenje pri marelici.

1.1.1. Priprava tehnoloških ukrepov in izračun gospodarnosti pridelave koščičarjev

Pri oceni gospodarnosti pridelave koščičarjev v proučevanih razmerah s prisotnimi karantenskimi boleznimi sadnih vrst *Prunus* spp. (PPV, *Monilinia* sp. in ESFY) smo se zaradi pomanjkanja dejanskih podatkov o ekonomiki pridelave koščičarjev v Sloveniji odločili za modelni pristop. V okviru sistema modelnih kalkulacij Kmetijskega inštituta Slovenije (<http://www.kis.si/pls/kis/!kis.web?m=177>) smo v začetku leta 2014 izdelali kalkulacijo za marelice in slive, ki nam omogočata izračun različnih ekonomskih kazalcev, glede na izbrane vhodne parametre. Pri trajnih nasadih je modelna kalkulacija za posamezno sadno vrsto sestavljena iz dveh pod modelov. Prvi je model za oceno napravne vrednosti nasada, ki vključuje vse stroške naprave v letih do polne rodnosti. Drugi model, je model za oceno stroškov pridelave v posameznem letu, ki vključuje vse stroške pridelave v tekočem letu (material in storitve, amortizacija, domače delo).

Glede na opazovanja v projektu v rastnih sezonah 2012, 2013 in 2014, izkušnje članov projektne skupine s proučevanimi boleznimi v preteklosti, podatke iz dosedanjih raziskav (različni projekti, proučevanja tako novejših kot tudi tolerantnejših sort v introdukcijskih nasadih Sadjarskega centra Bilje, opazovanja svetovalcev) ter literature in smo modelirali

velikost pridelka, življenjsko dobo nasadov ter ukrepe za preprečitev oziroma blažitev posledic proučevanih karantenskih boleznih na gospodarnost pridelave marelic in sliv. Zaradi prisotnosti ESFY in drugih karantenskih boleznih smo v zadnjih letih pričali pogostemu propadanju dreves marelic, zaradi okužb s PPV pa prihaja pri slivah, razširjenih na področju Brkinov ('Brkinska češplja'), do množičnega odpadanja plodov pred obiranjem. V sklopu raziskave gospodarnosti pridelave koščičarjev smo glede na stanje v pridelavi tako pri marelicah kot pri slivah predvideli tri različne načine pridelave. Razen pri pridelavi sliv v neoskrbovanih travniških nasadih, smo pri obeh sadnih vrstah predvideli nasad na terasah.

Pri marelicah smo predvideli:

- pridelavo sort občutljivih na ESFY in druge proučevane bolezni (M1),
- pridelavo tolerantnih sort (M2) ter
- pridelavo stare sorte 'Debeli flokarji', ki kaže tolerantnost na proučevane karantenske bolezni (M3).

Pri slivah za pridelavo smo predvideli pridelavo:

- sorte 'Brkinska češplja' v slabo oskrbovanih travniških nasadih (S1),
- pridelavo sorte 'Brkinska češplja' v dobro oskrbovanih intenzivnih nasadih (S2) ter
- pridelavo sort sliv tolerantnih na PPV v intenzivnih nasadih (S3).

Marelice

Zaradi prisotnosti ESFY prihaja pri občutljivih sortah marelic do pogostega predčasnega propadanja dreves, PPV pa izredno negativno vpliva na količino in kakovost pridelka pri teh sortah. Pri pridelavi občutljivih sort marelic (M1) smo zato, ob siceršnjem doslednem izvajanju tehnoloških ukrepov, upoštevali krajšo življenjsko dobo nasadov in pridelek 10kg/drevo. Od pomembnejših tehnoloških ukrepov smo predvideli zimsko in poletno rez, osnovno gnojenje in dognojevanje, štirikratno mulčenje, dvakratno uporabo herbicida v vrsti ter devet škropljenj proti boleznim in škodljivcem. Med uporabljenimi sredstvi za varstvo rastlin smo predvideli tudi škropljenje proti češpljevi bolšici, breskovi pepelovki in boleznim lesa, s sredstvi za katere bi bila potrebna dodatna registracija. Pri pridelavi tolerantnih sort marelic (M2) smo predvideli daljšo življenjsko dobo nasadov ter večje in bolj stabilne pridelke ob upoštevanju izvajanju enakih tehnoloških ukrepov kot pri pridelavi občutljivih sort marelic. V zadnji različici smo predvideli pridelavo sorte marelic 'Debeli flokarji' (M3), ki kaže tolerantnost na okužbo z ESFY. Drevesa te sorte v travniških nasadih ne propadajo in ob povprečni oskrbi dosegajo starost tudi 40 let in več, rodijo obilno vsako drugo leto, v vmesnih letih pa pridelka skoraj ni.

Tabela 9 : Tehnološka izhodišča pri pridelavi marelic

Marelice	Enota	Marelice, občutljive sorte (M1)	Marelice, tolerantne sorte (M2)	Marelice, 'Debeli flokarji' (M3)
Gostota sajenja	dreves/ha	667	667	500
Pridelek (povp. več let)	kg/ha	6.667	20.000	13.750
Pridelek	kg/ drevo	10	30	27,5 (50 kg vsako drugo leto; 5 kg vmesno leto)
Doba polne rodnosti	let	12	17	40
Tehnološke faze				
Zimska rez		da	da	da
Poletna rez		da	da	ne
Št. gnojenj		2 x	2 x	2 x
Mulčenje		4 x	4 x	2 x
Herbicid v vrsti		da (2 x)	da (2 x)	ne
Št. škropljenj		9 x	9 x	4 x

S pomočjo modelnih kalkulacij smo za marelice ocenili stroške pridelave pri različnih načinih pridelave in izračunali dohodek pri različnih doseženih odkupnih cenah. Pri marelici smo upoštevali odkupne cene v razponu od 0,75 EUR/kg do 1,75 EUR/kg.

Pri pridelavi občutljivih sort marelic in pri pridelavi tolerantnih sort smo predvideli nasad z gostoto 667 dreves/ha in 3 leta do polne rodnosti. V nasadih občutljivih sort smo zaradi propadanja dreves predvideli le 12 let polne rodnosti in 5% sadik letno za podsajevanje do vključno 5. leta polne rodnosti. Pri pridelavi sort marelic tolerantnih na fitoplazme pričakujemo daljšo življenjsko dobo nasadov in manjše propadanje sadik v prvih letih, zato smo predvideli, da bo potrebno zamenjati le 2% sadik letno v času do polne rodnosti.

Stroški naprave nasada občutljivih sort marelic so zaradi večjega obsega podsajevanja v primerjavi z nasadom tolerantnih sort višji za 7%. Letni strošek amortizacije nasada pa je tudi zaradi daljšega obdobja rodnosti pri pridelavi tolerantnih sort nižji za tretjino. Stroški naprave nasada Debelih flokarjev s 500 dreves/ha so zaradi daljšega obdobja do polne rodnosti višji kot pri pridelavi občutljivih in tolerantnih sort, po drugi strani pa je strošek amortizacije na leto, zaradi daljše življenjske dobe nasada nižji kot pri občutljivih in tolerantnih sortah in znaša 725 EUR/ha. **Stroški na enoto proizvoda** so pri pridelavi občutljivih sort za več kot dvakrat višji kot pri pridelavi tolerantnih sort, medtem ko so stroški na enoto proizvoda ob upoštevanju predpostavk v modelu pri pridelavi tolerantnih sort marelic in pridelavi debelih flokarjev zelo podobni. **Dohodek** (vrednost pridelave – stroški kupljenega materiala in storitev – stroški amortizacije) s katerim pridelovalci pokrivajo stroške svojega dela in stroške kapitala, je pričakovano najnižji pri pridelavi občutljivih sort marelic. Dohodek pri pridelavi marelic se pri odkupni ceni 1 EUR/kg giblje od 330 EUR/ha pri občutljivih sortah do več kot 11 tisoč EUR/ha pri pridelavi tolerantnih sort. Dohodek pridelovalcev občutljivih sort marelic, ki so trenutno v večji meri razširjene, niti pri odkupni ceni 1,75 EUR/kg ne doseže dohodka pridelovalcev sort tolerantnih na fitoplazme pri odkupni ceni 0,75 EUR/kg.

Tabela 10 : Ekonomski kazalci pri pridelavi marelic

Marelice	Enota	Marelice, občutljive sorte (M1)	Marelice, tolerantne sorte (M2)	Marelice, 'Debeli flokarji' (M3)
Stroški naprave nasada	EUR/ha	26.850*	25.000**	29.000**
Amortizacijska doba	let	12	17	40
Pridelek (povp. več let)	kg/ha	6.667	20.000	13.750
STROŠKI SKUPAJ	EUR/ha	11.168	14.825	10.094
Od tega:				
Sredstva za varstvo	EUR/ha	1.197	1.197	355
Gnojila	EUR/ha	79	199	134
Amortizacija nasada	EUR/ha	2.238	1.471	725
Stroški domačih strojnih storitev	EUR/ha	707	845	765
Stroški domačega dela	EUR/ha	4.312	5.942	3.739
STROŠKI NA ENOTO PROIZVODA	EUR/kg	1,68	0,74	0,73
Indeks LC (dobro oskrbovan nasad = 100)		2,26	1,00	0,99
VREDNOST PRIDELAVE (1)				
Vrednost pridelave 1 (0,75 EUR/kg)	EUR/ha	5.000	15.000	10.313
Vrednost pridelave 2 (1 EUR/kg)	EUR/ha	6.667	20.000	13.750
Vrednost pridelave 3 (1,25 EUR/kg)	EUR/ha	8.333	25.000	17.188
Vrednost pridelave 4 (1,50 EUR/kg)	EUR/ha	10.000	30.000	20.625
Vrednost pridelave 5 (1,75 EUR/kg)	EUR/ha	11.667	35.000	24.063
Stroški kupljenega mat. in storitev (2)	EUR/ha	3.794	6.408	4.668
Amortizacija (3)	EUR/ha	2.543	1.950	1.133
DOHODEK (1) – (2) –(3)				
Dohodek 1 (0,75 EUR/kg)	EUR/ha	-1.336	6.642	4.511
Dohodek 2 (1 EUR/kg)	EUR/ha	330	11.642	7.948
Dohodek 3 (1,25 EUR/kg)	EUR/ha	1.997	16.642	11.386
Dohodek 4 (1,50 EUR/kg)	EUR/ha	3.664	21.642	14.823
Dohodek 5 (1,75 EUR/kg)	EUR/ha	5.330	26.642	18.261

* vključno s sadikami za podsajevanje (5% letno do 5. leta polne rodnosti)

** vključno s sadikami za podsajevanje (2% letno do polne rodnosti)

Slive

Po vdoru šarke v Brkine se je izkazalo, da je 'Domača sliva' oz. njen tip 'Brkinska češplja' na virus šarke izjemno občutljiv. Občutljivost se kaže kot masovno odpadanje plodov tik pred zrelostjo, kar povzroča ogromno gospodarsko škodo, še posebej se to kaže v slabo oskrbovanih nasadih in v letih z neugodnimi vremenskimi razmerami. Pri pridelavi sliv smo zato v prvi različici predvideli pridelavo sorte 'Brkinska češplja' v slabo oskrbovanih travniških nasadih, ki so razširjeni v Brkinih (S1). Od pomembnejših tehnoloških ukrepov smo predvideli le osnovno gnojenje, dvakratno

mulčenje ter štiri škropljenja proti boleznim in škodljivcem. V drugi različici, S2, smo predvideli pridelavo sorte 'Brkinska češplja' v sodobnih oskrbovanih nasadih, kjer predvidoma dosegajo vsakoletni pridelek 20 kg/ drevo. Od pomembnejših tehnoloških ukrepov smo predvideli zimsko in poletno rez, osnovno gnojenje in dognojevanje, trikratno mulčenje, dvakratno uporabo herbicida v vrsti ter enajst škropljenj proti boleznim in škodljivcem. Med uporabljenimi sredstvi za varstvo rastlin smo predvideli tudi škropljenje proti češpljevi bolšici in češpljevi rji za katere bi bila potrebna dodatna registracija. V različici S3 smo predvideli pridelavo sort sliv tolerantnih na šarko, ki so v preizkušanju in dajejo spodbudne rezultate tako v velikosti pridelka kot tudi v kakovosti. Ob upoštevanju enakih tehnoloških predpostavk kot pri različici S2, se pri tujih tolerantnih sortah predvideva redna vsakoletna rodnost s povprečnim pridelkom 25 kg/ drevo.

Tabela 11 : Tehnološka izhodišča pri pridelavi sliv za predelavo

Slive za predelavo	Enota	Slive, 'Brkinska češplja', slabo oskrbovan travniški nasad (S1)	Slive, 'Brkinska češplja', dobro oskrbovan nasad (S2)	Slive, tuja sorta tolerantna na PPV (S3)
Gostota sajenja	dreves/ha	333	833	833
Pridelek (povp. več let)	kg/ha	6.667	16.652	20.815
Pridelek	kg/ drevo	40 kg/drevo vsako drugo leto	20 kg/drevo vsako leto	25 kg/drevo vsako leto
Doba polne rodnosti	let	30	20	20
Tehnološke faze				
Zimska rez		ne	da	da
Poletna rez		ne	da	da
Št. gnojenj		1 x	2 x	2 x
Mulčenje		2 x	3 x	3 x
Herbicid v vrsti		ne	da (2 x)	da (2 x)
Št. škropljenj		4x	11 x	11 x

S pomočjo modelnih kalkulacij smo tudi za slive ocenili stroške pridelave pri različnih načinih pridelave in izračunali dohodek pri različnih doseženih odkupnih cenah. Pri slivi smo upoštevali odkupne cene med 0,50 EUR/kg in 0,70 EUR/kg.

Pri postavitvi pridelovalnih modelov sliv smo upoštevali stanje na terenu, zato smo pri **napravi nasada** Brkinske češplje v neoskrbovanih nasadih upoštevali manjše število sadik na hektar (333 dreves) in nižje stroške priprave tal pred sajenjem v primerjavi z napravo nasada Brkinskih češpelj v oskrbovanih intenzivnih nasadih in napravo intenzivnega nasada tujih tolerantnih sort (833 dreves/ha). Stroški naprave nasada tolerantnih sort in naprave nasada Brkinske češplje v oskrbovanih nasadih so za 40% višji kot pri slabo oskrbovanih nasadih Brkinske češplje, poleg tega so zaradi daljše življenjske dobe travniških nasadov češpelj za dvakrat višji tudi letni stroški amortizacije intenzivnih nasadov Brkinske češplje in nasadov tolerantnih sort. **Stroški na enoto proizvoda** so pri pridelavi Brkinskih češpelj v neoskrbovanih travniških nasadih zaradi slabe oskrbe in alternativne rodnosti za 8% višji kot pri pridelavi Brkinske češplje v oskrbovanih nasadih in za skoraj petino višji kot pri pridelavi

tolerantnih sort. **Dohodek** (vrednost pridelave – stroški kupljenega materiala in storitev – stroški amortizacije) s katerim pridelovalci pokrivajo stroške svojega dela in stroške kapitala, je najnižji pri pridelavi sliv v neoskrbovanih nasadih. Dohodek pri pridelavi sliv se pri odkupnih cenah med 0,50 EUR/kg in 0,70 EUR/kg giblje od 705 EUR/ha pri neoskrbovanih nasadih in do največ 8.502 EUR/ha pri pridelavi tolerantnih sort.

Tabela 12 : Ekonomski kazalci pri pridelavi sliv za predelavo

Slive za predelavo	Enota	Slive, 'Brkinska češplja', slabo oskrbovan travniški nasad (S1)	Slive, 'Brkinska češplja', dobro oskrbovan nasad (S2)	Slive, tuja sorta tolerantna na PPV (S3)
Stroški naprave nasada	EUR/ha	24.600	34.500	34.500
Amortizacijska doba	let	30	20	20
Pridelek (povp. več let)	kg/ha	6.667	16.652	20.815
STROŠKI SKUPAJ	EUR/ha	4.890	11.284	12.754
Od tega:				
Sredstva za varstvo	EUR/ha	253	1.071	1.071
Gnojila	EUR/ha	140	159	199
Amortizacija nasada	EUR/ha	820	1.725	1.725
Stroški domačih strojnih storitev	EUR/ha	358	712	767
Stroški domačega dela	EUR/ha	1.770	5.133	5.831
STROŠKI NA ENOTO PROIZVODA	EUR/kg	0,73	0,68	0,61
Indeks LC (dobro oskrbovan nasad = 100)		1,08	1,00	0,90
VREDNOST PRIDELAVE (1)				
Vrednost pridelave 1 (0,50 EUR/kg)	EUR/ha	3.333	8.326	10.408
Vrednost pridelave 2 (0,55 EUR/kg)	EUR/ha	3.667	9.159	11.448
Vrednost pridelave 3 (0,60 EUR/kg)	EUR/ha	4.000	9.991	12.489
Vrednost pridelave 4 (0,65 EUR/kg)	EUR/ha	4.333	10.824	13.530
Vrednost pridelave 5 (0,70 EUR/kg)	EUR/ha	4.667	11.657	14.571
Stroški kupljenega mat. in storitev (2)	EUR/ha	1.655	3.303	4.001
Amortizacija (3)	EUR/ha	973	2.032	2.068
DOHODEK (1) – (2) –(3)				
Dohodek 1 (0,50 EUR/kg)	EUR/ha	705	2.991	4.339
Dohodek 2 (0,55 EUR/kg)	EUR/ha	1.039	3.824	5.379
Dohodek 3 (0,60 EUR/kg)	EUR/ha	1.372	4.656	6.420
Dohodek 4 (0,65 EUR/kg)	EUR/ha	1.705	5.489	7.461
Dohodek 5 (0,70 EUR/kg)	EUR/ha	2.039	6.321	8.502

V proučevanih razmerah s prisotnimi karantenskimi boleznimi sadnih vrst Prunus spp. je za doseganje dobrih ekonomskih rezultatov ključna pravilna izbira sort marelic in sliv (če se le da tolerantnih sort) ter dosledno izvajanje tehnoloških ukrepov. S primerno tehnologijo se ohranja dobro kondicijo dreves in omogoča ekonomično pridelavo tudi v slabših

pridelovalnih pogojih, ki jih povzročajo spremenljive vremenske razmere in nepričakovani izbruhi bolezni. Pomembno je tako zatiranje bolezni in škodljivcev s sredstvi za varstvo rastlin kot tudi vsakoletno izvajanje drugih tehnoloških ukrepov (gnojenje, zimska rez, poletna rez, mulčenje ali košnja, vzdrževanje herbicidnega pasu ter zaradi prisotnosti *Monilinia* sp. tudi dosledno odstranjevanje gnilih plodov in mumij z dreves).

1.12. Izvedene predstavitve aktivnosti in rezultatov projekta:

Pripravljeni so bili trije protokoli za vrednotenje odpornosti/tolerantnosti vrst in sort koščičarjev na obravnavane bolezni:

- Protokol za vrednotenje tolerantnosti sort in tipov marelice na leptonekrozo koščičarjev (ESFY) (pripravila Barbara Ambrožič Turk)
- Protokol za vrednotenje odpornosti vrst in sort koščičarjev na okužbo z glivami iz rodu *Monilinia* (pripravila Alenka Munda)
- Protokol za preizkušanje imunosti, odpornosti oz. tolerantnosti koščičarjev na PPV (pripravila Mojca Viršček Marn)

Na 3. Slovenskem sadjarskem kongresu z mednarodno udeležbo, ki je potekal od 21. do 23. novembra 2012, je bil predstavljen naslednji prispevek:

- VIRŠČEK MARN, M., MAVRIČ PLEŠKO, I. Preizkušanje občutljivosti sort koščičarjev za obvladovanje šarke v Sloveniji.

Na 11. slovenskem posvetovanju o varstvu rastlin, ki je potekalo 5. in 6. marca 2013 na Bledu smo predstavili več prispevkov vezanih na tematiko projekta. Nekateri med njimi so bili objavljeni tudi v zborniku posvetovanja.

- Barbara AMBROŽIČ TURK, Nikita FAJT, Nataša MEHLE, Marina DERMASTIA , Irena MAVRIČ PLEŠKO Vrednotenje tolerantnosti sort in tipov marelice na leptonekrozo koščičarjev (ESFY) – predavanje
- Mojca VIRŠČEK MARN, Irena MAVRIČ PLEŠKO Možnosti za preprečevanje škod zaradi virusnih okužb – predavanje
- Gabrijel SELJAK, Mojca ROT Preučevanje bionomije češpljeve bolšice (*Cacopsylla pruni*) na Primorskem – predavanje
- Mojca VIRŠČEK MARN, Irena MAVRIČ PLEŠKO Raznolikost slovenskih izolatov PPV (*Plum pox virus*) – poster
- Alenka MUNDA, Barbara GERIČ STARE Spremljanje gliv iz rodu *Monilinia* na cvetovih, listih in plodovih breskev in marelic z metodo PCR v realnem času – poster

Fajt, N. Predstavitev strokovnega dela Sadjarskega centra Bilje na področju sortimenta sliv s poudarkom na odbiri tolerantnejših sort na šarko. Predavanje na delavnici "Od njive do mize" v okviru projekta LAS Krasa in Brkinov in povabilo k sodelovanju iskanja dreves brkinske češplje, ki kažejo večjo odpornost na okužbo z virusom PPV. Markovščina, 19. nov. 2012.

FAJT, N. Predstavitev strokovnega dela Sadjarskega centra Bilje na področju marelic. predavanje na razstavi marelic z degustacijo, s poudarkom na pomenu zdravstvenega stanja izhodiščnega materiala, proučevanja in odpravljanja vzrokov za karantenske in druge bolezni koščičarjev. Planina (pri Ajdovščini), 13.7.2012.

V začetku leta 2013 smo pripravili letak za pridelovalce, s katerim jih pozivamo k sodelovanju pri iskanju manj občutljivih dreves 'Brkinske češplje'. Letak smo v začetku marca posredovali pospeševalcem na področju Brkinov, ki ga bodo razdelili pridelovalcem češpelj. V letaku smo pojasnili pomen šarke, cilje dela znotraj programskega sklopa »Viri odpornosti PPV«, vrste odpornosti proti šarki in izražanje znakov okužbe s PPV na slivah. Letak smo opremili tudi s slikami znakov okužbe na listih sliv in v mesu ter na površini plodov 'Domače slive'.

FAJT, N., KOMEL, E., USENIK, V., DONIK PURGAJ, B., BEBER, M., AMBROŽIČ TURK, B., VIRŠČEK MARN, M., MAVRIČ PLEŠKO, I. 2013. Kajsija u Sloveniji - problemi i perspektive. 'Inovacije u voćarstvu', IV. savetovanje, Zbornik radova, Tema savetovanja: Unapređenje proizvodnje breskve i kajsije. Beograd, 11. feb., str. 171-180.

VIRŠČEK MARN, Mojca, MAVRIČ PLEŠKO, Irena. Preizkušanje občutljivosti sort koščičarjev za obvladovanje šarke v Sloveniji = Testing of stone fruit cultivars susceptibility for containment of sharka in Slovenia. V: HUDINA, Metka (ur.). Zbornik referatov 3. Slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 21.-23. november 2012. Ljubljana: Strokovno sadjarsko društvo Slovenije, 2012, str. 333-340. [COBISS.SI-ID 3967592]

MEHLE Nataša, RAVNIKAR Maja, SELJAK Gabrijel, KNAPIČ Vlasta, DERMASTIA Marina. 2011. The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. Phytopathogenic mollicutes, vol. 1, issue 2, str. 65-76.

MEHLE, Nataša, NIKOLIĆ, Petra, GRUDEN, Kristina, RAVNIKAR, Maja, DERMASTIA, Marina. Real-time PCR for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. V: DICKINSON, Matthew (ur.), HODGETTS, Jennifer (ur.). Phytoplasma : methods and protocols, (Methods in Molecular Biology, vol. 938), (Springer Protocols). New York: Humana Press, 2012, str. 1-13, [in press], doi: 10.1007/978-1-62703-089-2_23. [COBISS.SI-ID 2613839]

Ambrožič Turk B, Fajt N, Mehle N, Dermastia M, Mavrič Pleško I. 2013: Vrednotenje tolerantnosti sort in tipov marelice na leptonekrozo koščičarjev (ESFY). V: Trdan, S, in Maček, J. (ur.) Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Bled, 5.-6. marec 2013. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2013. 78-83.

Munda A, Gerič Stare B. 2013: Spremljanje gliv iz rodu *Monilinia* na cvetovih, listih in plodovih breskev in marelic z metodo PCR v realnem času. V: Trdan, S, in Maček, J. (ur.) Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Bled, 5.-6. marec 2013. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2013. 397-400.

Seljak G, Rot M. 2013: Preučevanje bionomije češpljeve bolšice (*Cacopsylla pruni*) na Primorskem. V: Trdan, S, in Maček, J. (ur.) Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Bled, 5.-6. marec 2013. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2013. 89-95.

Viršček Marn M, Mavrič Pleško I. 2013: Raznolikost slovenskih izolatov PPV (*Plum pox virus*). V: Trdan, S, in Maček, J. (ur.) Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Bled, 5.-6. marec 2013. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2013. 89-95.

Viršček Marn M, Mavrič Pleško I. 2013. Genetic diversity of *Plum pox virus* isolates in Slovenia. V: ŠAFÁŘOVÁ, Dana (ur.). Book of abstracts. Olomouc: Palacký University, str. 29.

Fajt, N. Old and auchthon fruit varieties in Slovenia and their importance for our rural landscape. International Conference 'Using Genetic Biodiversity to Increase the Quality of Organically Grown Fruits', Skierniewice (Poland), 27-29. October, Abstract book, p.18

5. julija 2014 smo se udeležili (dr. Fajt Nikita, Ivan Kodrič in Mojca Viršček Marn) srečanja pridelovalcev marelic iz Vipavske dolini na Planini pri Ajdovščini in udeležencem predstavili povzročitelja ESFY in šarke ter rezultate projekta.