

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/7



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1103
Naslov projekta	Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja
Vodja projekta	8280 Marina Dermastia
Naziv težišča v okviru CRP	1.01.03 Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja
Obseg raziskovalnih ur	1493
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	10.2011 - 09.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	105 Nacionalni inštitut za biologijo
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	401 Kmetijski inštitut Slovenije 416 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
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 4.05 Druge kmetijske vede

2. Sofinancerji

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje
	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Pomemben evropski gospodarski sektor proizvodnje sadilnega materiala vinske trte in vina ogroža epidemija zlate trsne rumenice (FD), ki jo povzroča fitoplazma FDp – fitopatogena bakterija iz razreda Mollicutes. FD je najbolj uničujoča in najnevarnejša med različnimi trsnimi rumenicami, ki povzročajo bolezenska znamenja, ki na oko niso ločljiva. Od 2005, ko je bila FD prvič potrjena v Sloveniji, se je število novih žarišč hitro povečevalo in v 2010 so bili v nekaterih vinorodnih deželah že zaznani vzorci epidemije. FDp je v Evropi karantenski organizem, uvrščen na seznam II/All direktive Sveta Evrope 2000/29/ES o škodljivih organizmih in na seznam karantenskih organizmov EPPO A2. Za preprečevanje širjenja bolezni je zakonsko določeno uničenje obolelih rastlin, rastlin z bolezenskimi znamenji in sosednjih rastlin v vseh državah, kjer se bolezen pojavlja.

Fitoplazme med rastlinami prenašajo žuželke, ki se hranijo s floemskim sokom. Razmnožujejo se v citoplazmi žuželk in floemskih celic rastlin. Edini znani naravni prenašalec FDp med trtami je monofagni ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus*). Za vzdrževanje zdravih vinogradov je tako nujna uporaba zdravega razmnoževalnega rastlinskega materiala, vzporedno z učinkovitim zatiranjem prenašalca. Za doseg tega cilja so nujni novi ustrezni, zanesljivi in hitri sistemi, ki pa so odvisni od poglobljenega razumevanja biologije ameriškega škržatka in FDp. Predvsem slednje omejujejo slabo poznani mehanizmi fitopatogenosti, gostiteljev, odpornosti in prenosa z žuželkami ter karantenski status FDp.

V predlaganem projektu smo se osredotočili na uvajanje analiz, ki temeljijo na daljinskem zaznavanju trsnih rumenic z uporabo visoko ločljivostnih večspektralnih podatkov. Metoda je že bila uporabljena za detekcijo različnih rastlinskih plevelov in škodljivcev, a še ne za zaznavanje trsnih rumenic. Raziskave bionomije ameriškega škržatka v Sloveniji bodo uporabljene za izboljšavo strategij njegovega zatiranja. Uvedli smo preizkušeno metodo namakanja dormantnega materiala vinske trte v vročo vodo, ki se je že izkazala kot učinkovita proti fitoplazmi, kot tudi za uničenje odloženih jajčec ameriškega škržatka. Metoda ne poškoduje rastlinskega materiala, če je temperatura nadzorovana in je toplotna terapija pravilno časovno umeščena v proizvodnjo rastlin. V projektu smo raziskali nekaj alternativnih metod za zatiranje prenašalca. Težave z nedostopnostjo raziskovalnega materiala FDp smo reševali z bioinformatično raziskavo genov vinske trte po okužbi s splošno razširjeno fitoplazmo, ki povzroča navadno trsno rumenico (BNp) z enakimi znamenji in z domnevno podobnimi mehanizmi. V tej raziskavi smo odkrili nekatere gene, ki se po okužbi spremenijo. Take gene bi v diagnostiki lahko uporabili kot označevalce bolezni.

ANG

The important economic sector in Europe for producing grapevine planting material and wine is facing an epidemic threat caused by FD phytoplasma (FDp), phytopathogenic bacteria in the Mollicutes class that is responsible for *Flavescence dorée* (FD). FD is the most destructive and dangerous disease of grapevines among various grapevine yellows with the disease symptoms indistinguishable by a visual inspection. Since 2005 when FD was diagnosed in Slovenia for the first time, the disease incidence has been raising rapidly and in 2010 shows a clear epidemic pattern in some winegrowing regions. FDp is a quarantine pest in Europe, listed in Annex II/All in the 2000/29/EU Council Directive on harmful organisms, as well as in the EPPO A2 quarantine list of pests. The destruction of diseased stocks, plants showing symptoms and surrounding plants is mandatory in countries affected by the disease in order to limit its spread.

Phytoplasmas are transmitted from plant to plant by sap-feeding insect vectors and propagates within the cytoplasm of both insects and sieve elements of plant phloem. The only known natural insect vector of FDp in grapevine is the monophagous leafhopper *Scaphoideus titanus*. Therefore, for the complete sanitation of vineyards both, the use of healthy planting material, in parallel with the efficient control of the vector, is critical. To achieve these goals, the development of new suitable, accurate and timely detection systems, which are urgently needed, depends on a profound knowledge of biology of S.

titanus and FDp. The later is severely limited at the moment due to the lack of understanding of the mechanisms of phytoplasma phytopathogenicity, hosts, resistance and insect transmission in general and because of the quarantine status of FDp.

In the project we focused on the introducing of remote sensing based analysis of grapevine yellows by using high resolution multispectral data. Method has been applied in detection of various plant weeds and pathogen, but not in grapevine yellows. Research of the bionomy of *S. tatanus* in Slovenia has been implemented in the improvement of strategies for its eradication. We introduced a well worked method of soaking dormant grapevine material in hot water, which has been proved to be efficient against phytoplasmas and *S. tatanus* eggs and harmless to plant material, providing that the temperature is carefully regulated and the treatment is included properly in the schedule of plant production. During the project we also investigated some alternative methods for the eradication of *S. tatanus*. To overcome the problems of unavailability of research FDp material we introduced a bioinformatic study of grapevine genes after the phytoplasma infection with the widespread stolbur phytoplasma *Bois Noir* (BNp), which causes the same disease symptoms on the grapevine as FDp, presumably by very similar mechanisms. With this study we have found some significant genes that are changed upon the infection and might be used as disease markers in diagnostics.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

V okviru projekta smo ugotavljali možnosti zgodnjega odkrivanja zlate trsne rumenice, s čimer bi povečali učinkovitost nadzora in zmanjšali njegove stroške. Za doseg vseh ciljev projekta je bil jasno določen program dela razdeljen v 5 delovnih sklopov. Taka zgradba projekta je v času njegovega poteka zagotavljala pregled nad prispevkom in izvedbo dela vsakega posameznega partnerja.

Pokazali smo, da je daljinsko zaznavanje žarišč zlate trsne rumenice možno. V postopku 10-kratne navzkrižne validacije sta se kot najzanesljivejša izkazala algoritma RandomForest in KStar. Validacija na novih podatkih pa je pokazala slabšo zanesljivost algoritma KStar, kjer je odstotek pravilno uvrščenih rastrskih celic padel na 50%. Algoritem RandomForest se je obnesel bolje, s približno 70% zanesljivostjo. Ločevanje vrstnega in medvrstnega prostora je pod izrazitim vplivom lege vinogradov, ki vpliva na kot med vinogradom in soncem. Med vinogradi se tako spreminja zasenčenost medvrstnega prostora. Lega ima tudi vpliv na kot med vinogradom in satelitom. Prevelik kot bo privedel do prekrivanja vrstnega prostora (medvrstni prostor postane praktično neviden z zornega kota satelita), ločevanje vrstnega in medvrstnega prostora je s tem onemogočeno. Dodatna posledica je mešanje spektralnega podpisa, kar zmanjša zanesljivost določevanja obolelih rastlin. V modele za napovedovanje smo zato začeli vključevati dodatne meta-podatke (lega vinograda in smer poteka vrst), s čimer želimo povečati njihovo zanesljivost.

Toplotna terapija je primerna metoda za obdelavo rastlinskega materiala za pripravo cepljenk. Terapija ne vpliva bistveno na vitalnost vzorcev vinske trte, hkrati pa uniči fitoplazmo FD v rozgah. Po toplotni terapiji se na enoletnem lesu ameriški škržatek ne razvije, saj je razvoj jajčec uspešno zavrt.

Potrdili smo, da imajo ostre zime vpliv na hitro izleganje ličink ameriškega škržatka. Dolžina izleganja ličink pa je neodvisna od zime, je enaka tako v krajih z ostro kot z milo zimo. Dolžina posameznih razvojnih stopenj ličink je bila med lokacijami enaka. Glede na vse pridobljene podatke v rastni komori in na prostem (meteorološkem vrtu), smo preliminarno preračunali temperaturne vsote začetka izleganja ličink, pri čemer smo vzeli spodnji temperaturni prag 5°C, ki ga pričnemo računati od 15. novembra do začetka izleganja ličink. Za nadaljnji razvoj ličink ameriškega škržatka smo vzeli spodnji temperaturni prag 8,7°C in izračunali dolžine posameznih razvojnih stadijev ličink ameriškega škržatka. Vse učinkovite temperature nad obema pragovoma smo preliminarno preverjali z dejanskim pojavom ameriškega škržatka v vinogradih. Pri preračunu smo ugotovili, da pridobljene vsote učinkovitih temperatur nad pragom 8,7 °C,

potrebni za razvoj posamezne faze v nadzorovanih razmerah, bistveno ne odstopajo od podatkov na prostem v meteorološkem vrtu v Žalcu.

Ugotovili smo, da obstaja migracija ameriškega škržatka v nasadu - vinogradu, ki je tudi omejena. Migracija izven vinograda, v oddaljenosti cca. 50 m od vinograda pa je redka.

Bioinformatična in statistična orodja, ki smo jih uporabili v tej raziskavi so nam odkrila pomembne nove informacije o zelo slabo poznani interakciji med fitoplazmo BNp in vinsko trto. Odkrila so nam gen VvDmr6, s še neznano fiziološko vlogo, kot najpomembnejši za določitev zdravstvenega stanja v odnosu do okužbe vinske trte s fitoplazmama BNp in FDp zgodaj v rastni sezoni, še pred pojavom bolezenskih znamenj. Analiza je odkrila še nekaj genov, ki imajo napovedno uporabno vrednost v zgodnji diagnostiki trsnih rumenic, ko fitoplazem ni mogoče določiti v vzorcu niti z najboljčutljivimi molekularnimi pristopi, zaradi njihovega izjemno nizkega titra.

Na osnovi rezultatov projekta in izvedene delavnice smo pripravili priporočila za učinkovito in za okolje sprejemljivo obvladovanje trsnih rumenic in preprečevanje gospodarske škode, ki jo povzročajo v vinogradništvu.

Priporočila na osnovi rezultatov raziskav v delovnih sklopih

- Ustrežno izbran in terenu prilagojen model daljinskega zaznavanja za zgodnje odkrivanje žarišč, pripravljen na osnovi obdelave satelitskih slik z metodami strojnega učenja lahko odkrije okužene rastline z 80 % zanesljivostjo. Priporočamo, da se v prihodnosti model še izpopolni in začne uporabljati na terenu.
- Toplotna terapija (45 minutno segrevanje rastlinskega materiala v vodi pri 50°C) učinkovito zatira FDp v materialu za sajenje ali cepljenje in uniči jajčeca ameriškega škržatka, hkrati pa nima negativnega vpliva na viabilnost sadilnega oz. cepilnega materiala. Priporočamo, da se toplotna terapija uvede kot pomemben ukrep pri pripravi cepljenk in potaknjencev.
- Zasnovan je bil model za napovedovanje zatiranja ličink in odraslih osebkov ameriškega škržatka na osnovi njegove bionomije in validiran na osnovi podatkov s terena. Priporočamo, da opazovalno napovedovalna služba zdravstvenega varstva rastlin začne model rutinsko uporabljati za napovedovanje rokov zatiranja ameriškega škržatka.
- Biostatistična analiza izražanja genov vinske trte, okužene s FDp je odkrila gen VvDMR6, ki se vedno statistično značilno izraža v okuženih trtah pred pojavom bolezenskih znamenj. Priporočamo, da se razvije diagnostična metoda za zgodnje odkrivanje okužbe s FDp na osnovi tega gena.

Priporočila na osnovi rezultatov delavnice o trsni rumenici

- Ker nista standardizirani niti barva niti lepilo, se na nekaterih rumenih ploščah ne ulovi nič, na drugih pa celo ptiči. Priporočamo, da se rumene plošče standardizirajo.
- Nadzor nad FDp je zelo otežen, če se ne odstrani trt, okuženih z BNp. Priporočamo odstranjevanje trt, okuženih z BNp.
- Zlasti manjši vinogradniki zaradi premajhne obveščенosti in posledično premajhnega znanja dvomijo o možnih obsegih okužb s FDp in posledicah takih okužb. Priporočamo, da se nadaljuje z obveščevalnimi in izobraževalnimi kampanjami.
- Prisotnost inšpektorjev na terenu je zelo pomembna (brez »nadzora« vinogradniki pogosto ne izvajajo ukrepov).
- Zavedamo se problema, da je tudi strokovna javnost proti škropljenju za zatiranje prenašalca FDp. Priporočamo, da se nadaljuje z raziskavami za iskanje novih tehnologij in pristopov za boj proti FDp in njenemu glavnemu prenašalcu, ameriškemu škržatku.

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

Vsi zastavljeni cilji projekta so bili realizirani.

- Na testnih območjih Primorske in Dolenjske smo preverili, katera analzna tehnika posnetkov, bi omogočila dovolj zanesljivo identifikacijo območij z okuženimi rastlinami. Poudarek je bil na nadzorovani klasifikaciji posnetkov ter iskanju izboljšanja identifikacije obolelih rastlin s »sub-piksel« klasifikacijo.
- Kot enega najučinkovitejših ukrepov zatiranja trsnih rumenic smo preizkusili metode toplotne terapije za pridobivanje zdravega razmnoževalnega materiala vinske trte.
- Določili smo življenjski prostor in migracijske poti populacij ameriškega škržatka v Sloveniji. Z določitvijo temperaturnih pragov razvoja ameriškega škržatka v slovenskih razmerah in določili najoptimalnejši čas za učinkovito rabo insekticidov.
- Interakcije med vinsko trto in fitoplazemskima povzročiteljicama trsnih rumenic smo na molekularni ravni proučevali predvsem v stopnjah, ko bolezenska znamenja še niso izražena in določili potencialne genske označevalce bolezni, ki bi bili vključeni v identifikacijske metode bolezni.
- V zadnjem letu projekta smo izvedli delavnico o zlati trsni rumenici.
- Na osnovi rezultatov raziskave smo izdelali priporočila za učinkovito in za okolje sprejemljivo obvladovanje trsnih rumenic in preprečevanje gospodarske škode, ki jo povzročajo v vinogradništvu.

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

V programu ni bilo sprememb.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	2614351	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Sistem na osnovi PCR v realnem času za detekcijo fitoplazem BN in FD ter kvantifikacija tarčne DNA
		ANG	A real-time PCR detection system for the bois noir and flavesence dorée phytoplasmas and quantification of the target DNA
	Opis	SLO	Opisan sistem za detekcijo fitoplazem trsnih rumenic sestavljata dva testa za skupino specifično detekcijo fitoplazme FD in BN ter univerzalni test za fitoplazme. Sistem temelji na sondah TaqMan-MGB. Dodatke testa za pomnoževanje rastlinske DNA, ki jo ekstrahiramo sočasno s fitoplazemsko DNA zagotavlja dodaten nadzor kakovosti ekstrakcije DNA in pomnoževanja s PCR za vsak posamezen vzorec. Detekcijski sistem je zanesljiv, specifičen, občutljiv in lahko uporabljen pri hitri diagnostiki velikega števila vzorcev fitoplazem trsnih rumenic. Kot dodatek detekcijskemu sistemu, je opisan tudi postopek za kvantifikacijo fitoplazem v vzorcu.
		ANG	The real-time PCR detection system for grapevine yellows phytoplasmas described here is composed of two assays for group-specific detection of flavesence dorée (FD) and bois noir (BN) phytoplasmas and a universal phytoplasma assay. It uses hydrolysis minor groove binder probes (TaqMan-MGB). The addition of an assay for amplification of plant DNA co-extracted with phytoplasma DNA provides a further quality control for the DNA extraction and PCR amplification for each sample. The detection system described is reliable, specific, sensitive, and easily applicable to fast, high-throughput diagnosis of grapevine yellows phytoplasmas. In addition to the detection system, an approach for the quantification of phytoplasmas in the sample is described.
			Humana Press; Phytoplasma; 2013; Str. 253-268; A': 1; Avtorji / Authors:

	Objavljeno v	Mehle Nataša, Prezelj Nina, Hren Matjaž, Boben Jana, Gruden Kristina, Ravnikar Maja, Dermastia Marina	
	Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji	
2.	COBISS ID	4315240	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Uvajanje metode daljinskega zaznavanja pri nadzoru zlate trsne rumenice (Flavescence dorée)
		ANG	Application of remote sensing in grapevine yellows (Grapevine Flavescence dorée) control
	Opis	SLO	Zlato trsno rumenico (Grapevine Flavescence dorée) povzroča karantenska fitoplazma 'Ca. Phytoplasma vitis', ki se v slovenskem prostoru vztrajno širi in se v različnem obsegu pojavlja že v vseh treh vinorodnih deželah. Zaradi obsežnega terenskega dela in s ciljem, da terensko delo postane bolj usmerjeno, smo avgusta in septembra 2011 naročili satelitsko snemanje celotnega razmejenega območja na Primorskem ter del razmejenega območja na Dolenjskem. Snemanje je bilo opravljeno s satelitom WorldView 2, za katerega je značilna visoka prostorska in spektralna ločljivost, ki omogoča podrobnejšo ločevanje objektov na zemeljski površini. V prispevku so predstavljeni prvi rezultati analize satelitskih podob na omejenem nizu podatkov iz vinogradov žarišča Viližan pri Izoli, kjer smo v času snemanja v nekaterih vinogradih žarišča popisali izraženost bolezenskih znamenj na posameznih rastlinah vinograda. Z analizo satelitskih podob smo na temelju različnega odboja elektromagnetnega valovanja določili vinogradniško rabo, vrstni prostor vinograda, kot tudi potencialno okuženost rastlin. Ustrezen algoritem za ločevanje zdravih trt od trt z bolezenskimi znamenji gradimo z uporabo indeksov, ki predstavljajo različna razmerja med odbojem posameznih valovnih dolžin. Primernost indeksov za vključitev v algoritem smo v prvi fazi statistično ovrednotili z analizo variance (ANOVA). Pri določenih indeksih smo ugotovili statistično značilne razlike med skupinami rastlin z bolezenskimi znamenji. Uporabnost indeksov smo ilustrirali s podrobnejšim prikazom dveh indeksov, kjer med povprečni indeksa posameznih skupin rastlin obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,001$). Samostojno indeksa ne uspeta zadovoljivo ločiti posameznih skupin rastlin. Kot člena algoritma, skupaj v kombinaciji z nekaterimi ostalimi indeksi, prispevata k razmejitvi rastlin s približno 70% natančnostjo. V nadaljnje analize vključujemo nove metode, kot je strojne učenje oziroma rudarjenje s podatki.
		ANG	Grapevine Flavescence dorée yellows is caused by quarantine phytoplasma 'Ca. Phytoplasma vitis', is steadily spreading in Slovenian vineyards, and is occurring in all three wine regions in varying degrees. In order to carry out more focused field work, and due to its extensiveness, satellite images of the entire demarcated area in Primorska region and part of the demarcated area in Dolenjska region, were acquired in August and September 2012. Recordings were made by the satellite WorldView 2, which's high spatial and spectral resolution enables object distinction on earth's surface. First results of analyses performed on a limited dataset are presented. At the time of satellite recording, vine plants in the vineyards under study were attributed depending on visible signs of disease. Based on unique electromagnetic reflections from the objects we separated ground, vineyard row space and potentially infected plants. To identify potentially diseased plants we used several indices, calculated from reflections at different wavelengths. The suitability of each index was tested with a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistically significant differences between healthy and plants with different disease signs were found in certain indices. The applicability of these indices was illustrated in more detail for two of them,

		both with statistically significant differences between healthy and diseased plants ($p < 0,001$). Individually indexes were not capable to differentiate plants with different disease signs in a useful manner. However, using an algorithm that combines several indices, overall accuracy reached approximately 70%. In future analyses we plan to employ new methods, such as machine learning.
	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. 216-221; Avtorji / Authors: Knapič Matej, Rutar Rok, Žibrat Uroš
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
3.	COBISS ID	597388 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Preučevanje bionomije ameriškega škržatka (<i>Scaphoideus titanus</i> Ball)
		<i>ANG</i> The study on bionomics of leafhopper <i>Scaphoideus titanus</i> Ball
	Opis	<i>SLO</i> Ameriški škržatek (<i>Scaphoideus titanus</i> Ball) je glavni naravni prenašalec zlate trsne rumenice, bolezni vinske trte, ki jo povzroča karantenska fitoplazma Grapevine Flavescence dorée (FD). Eden od osnovnih fitosanitarnih ukrepov za preprečevanje širjenja in zatiranja FD je uspešno varstvo pred ameriškim škržatkom, za kar je potrebno natančno poznavanje njegove bionomije. Bionomijo ameriškega škržatka smo spremljali in preučevali v nadzorovanih razmerah in na prostem. V nadzorovanih razmerah v rastni komori smo spremljali izleganje ličink ameriškega škržatka na dvoletnih rozgah vinske trte, nabranih v treh vinorodnih deželah Slovenije. Pri temperaturi 23 °C, 70 % relativni zračni vlagi ter 15 urni dolžini dneva, je izleganje ličink ameriškega škržatka trajalo več kot 67 dni. Najdaljši razvoj so imele ličinke stopnje L2, in sicer v povprečju 11 dni. Razvoj ameriškega škržatka smo v vinogradih na območju šmarsko-virštanjskega vinorodnega okoliša spremljali vizualno s pregledi listov vinske trte ter s pomočjo rumenih lepljivih plošč. Rezultati raziskave bodo v pomoč pri pripravi strategije zatiranja ameriškega škržatka.
		<i>ANG</i> <i>Scaphoideus titanus</i> Ball is a leafhopper natural vector of the phytoplasma that causes "flavescence dorée" (FD), the most important vector grapevine yellow diseases. One of the main phytosanitary measures to prevent the spread and control of FD is successful protection against the leafhopper <i>Scaphoideus titanus</i> . For this measure is needed knowledge of bionomics. Bionomic characteristics of leafhopper <i>S. titanus</i> were monitored and studied in growing chamber and in vineyards. Under growing chamber conditions were assessed the hatching of leafhopper <i>S. titanus</i> larvae on the biennial shoots of grapevine which were collected in three different vineyard regions of Slovenia. At temperature 23 °C, 70 % relative humidity and 15-hour day length, leafhopper <i>S. titanus</i> larvae hatched more that 67 days. The maximum development had second larvae stage (L2), in average of 11 days. Leafhopper <i>S. titanus</i> development was also monitored in vineyards in the area Šmarsko - Virštanj region by visual inspection of vine leaves and using yellow sticky traps. Results of the research will assist in leafhopper <i>S. titanus</i> control strategies.
	Objavljeno v	Društvo za varstvo rastlin Slovenije = Plant Protection Society of Slovenia; Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Podčetrtek, 1.-2. marec 2011; 2011; Str. 133-138; Avtorji / Authors: Rak Cizej Magda, Ferlež Rus Alenka, Persolja Jolanda, Radišek Sebastjan
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
4.	COBISS ID	29453017 Vir: COBISS.SI

Naslov	SLO	Novi podatki o razširjenosti zlate trsne rumenice v Sloveniji, biologiji prenašalca in obvladovanju bolezni
	ANG	New data of prevalence of flavescence Dorée in Slovenia, the biology of vectors and control of disease
Opis	SLO	Bolezen vinske trte – zlata trsna rumenica (Flavescence dorée, FD), ki jo povzroča karantenska fitoplazma FD (FDp), lahko močno prizadene vinogradništvo in povzroči veliko izgubo pridelka. V Sloveniji smo jo prvič dokazali leta 2005, od leta 2009 dalje je navzoča v vseh vinorodnih deželah. Do večjih izbruhov je doslej prišlo na Dolenjskem in Primorskem. Najdbe na novih območjih v letu 2011 kažejo, da se ta nevarna bolezen pri nas širi, zato je potrebno dosledno izvajanje ukrepov, da se prepreči gospodarska škoda. Fitoplazma FD se širi z okuženim sadilnim in razmnoževalnim materialom trte in z žuželkami. Glavni žuželčji prenašalec v naravi je ameriški škržatek <i>Scaphoideus titanus</i> , ki je pri nas razširjen v vseh vinorodnih deželah. Pojavljanje fitoplazme FD v drugih rastlinah, ki bi lahko predstavljale vir okužbe, ter možnost širjenja te fitoplazme z drugimi žuželčji prenašalci je še precej neraziskano, vendar pa je poznavanje teh odnosov ključno za razumevanje epidemiologije in pravilno načrtovanje ukrepov zatiranja FDp. V prispevku so zato poleg novih podatkov o razširjenosti FDp v Sloveniji ter novih rezultatov o možnosti obvladovanja te bolezni predstavljeni tudi podatki o najdbah drugih gostiteljskih rastlin in drugih potencialnih prenašalcev.
	ANG	Grapevine quarantine disease Flavescence dorée (FD) may affect large areas of vineyards and cause significant yield losses. In Slovenia, it was confirmed for the first time in 2005; since 2009, it has been confirmed in all Slovenian wine-growing regions. Significant outbreaks have been recorded at Dolenjska and Primorska. New findings in 2011 show that this dangerous disease has been spreading in Slovenia; therefore, implementation of strict measures is needed to prevent economic damage. The phytoplasma FD spreads through infected planting and propagation material of <i>Vitis</i> and insect vectors. Its main natural vector is American leafhopper <i>Scaphoideus titanus</i> , which transmits the phytoplasma by moving from vine to vine to feed. There are only a few data about other potential plant hosts and vectors of the FD phytoplasma; however, such data is needed for an efficient control of the disease. Therefore, in this paper, besides the new data about FD distribution in Slovenia and new possibility of the disease control, the current knowledge about alternative plant hosts and vectors is presented.
Objavljeno v	Biotehniška fakulteta = Biotechnical Faculty; Zbornik referatov; 2012; Str. 81-86; Avtorji / Authors: Mehle Nataša, Ravnikar Maja, Dermastia Marina, Nikolić Petra, Rupar Matevž, Naglič Tina, Seljak Gabrijel, Žežlina Ivan, Orešek Erika	
Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	818551 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Molekulske interakcije fitoplazemskih povzročiteljic trsnih rumenic z vinsko trto (<i>Vitis vinifera</i> L.)
	ANG	Molecular interactions between phytoplasmal causal agents of grapevine yellows disease and grapevine (<i>Vitis vinifera</i> L.)
Z metodo kvantitativnega PCR v realnem času smo med rastno sezono		

Opis	SLO	<p>spremljali količino fitoplazme <i>Flavescence dorée</i> (FDf) v različnih tkivih vinske trte. Njeno prisotnost smo prvič dokazali v cvetovih in viticah, visok titer pa smo določili v jagodah. Med rastno sezono je titer FDf v tkivih z bolezenskimi znamenji naraščal. Ugotovili smo, da FDf lahko detektiramo že v začetku rastne sezone, pred pojavom bolezenskih znamenj, kadar je infekcijski pritisk velik. Študija izražanja izbranih štirinajstih genov med rastno sezono je pokazala statistično značilno različno izražanje genov v zdravih in s FDf okuženih rastlin avgusta, v času bolezenskih znamenj. Izražanje je bilo podobno kot v predhodnih raziskavah interakcije trte s fitoplazmo Bois noir (BNf). Statistična analiza PCA je pokazala, da na podlagi izražanja izbranih genov lahko poleti ločimo rastline glede na njihov zdravstveni status. V času bolezenskih znamenj smo v listih rastlin okuženih s fitoplazmama BNf ali FDf pokazali povečano količino sladkorjev, predvsem saharoze in škroba. V rastlinah okuženih s FDf smo pokazali tudi višjo aktivnost encima saharoza sintaza (SUSY), ne pa tudi spremenjene aktivnosti encimov ADP-glukoza pirofosforilaza (AGPaza) in nevtralnina invertaza (nINV). S pomočjo tehnike GC-MS smo ugotovili, da fitoplazmi BNf in FDf povzročata različni metabolni profil, ki pa je lahko posledica različne sorte trte pri obeh interakcijah in/ali različnega tipa fitoplazme. Na podlagi količine vseh metabolitov je analiza PCA pokazala, da se rastline lahko ločijo glede na njihov zdravstveni status, vendar pa so metaboliti, ključni za ločevanje, različni pri obeh interakcijah. Pri obeh interakcijah pa smo pokazali statistično značilno višjo vsebnost heksoza 6-fosfatov, ki so kot začetne komponente glikolize domnevni vir energije za fitoplazme. Predpostavljamo, da je patogenost fitoplazem med drugim posledica slabšega nalaganja saharoze v floem, kar zmanjša transport sladkorjev do drugih ponornih tkiv, predvsem jagod, ki ne morejo kopičiti zadostne količine sladkorjev.</p>
	ANG	<p>Quantitative real time PCR was used to follow the seasonal changes of the <i>Flavescence dorée</i> phytoplasma (FDp) titre in different grapevine tissues. FDp presence was determined in flowers and tendrils with a high concentration in berries. In tissues with symptoms a trend of an increasing FDp titre throughout the growing season was recorded. Early detection of FDp in symptomless tissues was possible and positively correlated with high infection pressure. A gene expression analysis of fourteen selected genes during the growing season revealed that statistically significant differences between healthy and FDp infected plants occur in August at the time of symptoms. At this time the gene expression was similar to previous studies on the grapevine - Bois noir phytoplasma (BNp) interaction. From gene expression profiles we could distinguish the health status of plants sampled in summer. In August we determined higher amounts of sugars, mainly sucrose and starch, in BNp and FDp infected plants compared to healthy plants. Additionally, we determined higher activity of the sucrose synthase (SUSY) enzyme but unchanged activity of the ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) and neutral invertase (nINV) enzymes in FDp infected plants. Using the GC-MS technique we determined that both phytoplasmas (BNp and FDp) cause a different metabolic fingerprint, which can be the consequence of a different grapevine cultivar used in the interaction study and/or a different phytoplasma type. The PCA analysis based on all metabolites showed a separation of healthy and phytoplasma infected samples. The main metabolites responsible for the health status separation are however different in both interactions. Both phytoplasmas induce higher levels of hexose 6-phosphates, which as the starting molecule of glycolysis could be the main energy source for phytoplasmas. Phytoplasma pathogenicity is presumably due to a decreased sucrose loading in phloem, which slows down sugar transport to sink tissues, this leading to an insufficient sugar accumulation in berries and harvest loss.</p>
Šifra	F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj

	Objavljeno v	[N. Prezelj]; 2014; XIV, 116 f., [4] f. pril.; Avtorji / Authors: Prezelj Nina	
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija	
2.	COBISS ID	615820	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Razvoj modela za napovedovanje zatiranja ameriškega škržatka (<i>Scaphoideus titanus</i> Ball)
		ANG	Development phenology model for management American leafhopper (<i>Scaphoideus titanus</i> Ball)
	Opis	SLO	Ameriški škržatek (<i>Scaphoideus titanus</i>) je glavni naravni prenašalec zlate trsne rumenice, boleznin vinske trte, ki jo povzroča karantenska fitoplazma <i>Grapevine Flavescence dorée</i> (FD). Eden od pomembnih ukrepov za uspešno preprečevanje širjenja FD v vinogradih je pravočasno zatiranje ameriškega škržatka. V ta namen smo začeli z razvojem modela, ki bo pripomogel k pravočasnemu napovedovanju uporabe insekticidov za zatiranje ličink in odraslih škržatkov. Najpomembnejši podatki za razvoj modela so: začetek izleganja ličink, dolžina izleganja ličink, trajanje razvojnih stopenj ličink in nimf ter razvoj odraslih škržatkov. V prispevku bodo predstavljeni podatki o bionomiji ameriškega škržatka, ki so bili pridobljeni v letu 2012, tako v nadzorovanih razmerah, rastni komori, kot tudi na prostem, v vinogradih. Podatki bodo prispevali k razvoju modela za napovedovanje zatiranja ameriškega škržatka.
		ANG	<i>Scaphoideus titanus</i> is a leafhopper, the natural vector of the phytoplasma that causes "flavescence dorée" (FD), the most important causer of grapevine yellow diseases. The most important measure for successful prevention of FD in vineyards is timely management of <i>Scaphoideus titanus</i> . For this purpose we began to develop a phenology model that will contribute to predict timely application of insecticides to control larva and adult leafhoppers. The most important data which are necessary to include into phenology model are: post-dormancy egg development, patterns of egg hatching, duration of developmental stages of larvae and nymphs and development of adult leafhoppers. In the following contribution present the bionomics data of American leafhopper, which were obtained in 2012, under controlled conditions, growing chamber, as well as outdoors in vineyards. The data will contribute to development of phenology model for predict the management of American leafhopper.
	Šifra	F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Objavljeno v	Društvo za varstvo rastlin Slovenije = Plant Protection Society of Slovenia; Izvlečki referatov; 2013; Str. 78-79; Avtorji / Authors: Rak Cizej Magda, Ferlež Rus Alenka, Persolja Jolanda, Radišek Sebastjan, Dermastia Marina	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
3.	COBISS ID	2872143	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Klasifikacijska drevesa osnovana na informaciji o genski ekspresiji izbranih genov za napoved, da je vinska trta okužena z BN
		ANG	Classification trees based on the gene expression information from selected genes for the prediction of the BN disease status of grapevine
	Opis	SLO	Različne fitoplazemske skupine po vsem svetu na vinski trti povzročajo trsne rumenice. Med njimi je fitoplazma iz skupine stolbur, povezana z boleznijo BN zelo pogosta. V prejšnji raziskavi smo pokazali primerjavo globalnega transkriptomskega profila zdravih in z BN okuženo vinsko trto sorte chardonnay. V dveletnem poskusu smo analizirali komplet 17 izbranih različno izraženih genov iz različnih poti. Pokazali smo njihovo primernost

		za zanesljivo klasifikacijo okuženih rastlin in karakterizacijo dovzetnostih lastnosti v vinogradu. V tej raziskavi smo na osnovi prejšnje komplet genov povečali na 22 in eksperiment podaljšali na pet let. Da bi odkrili potencialne označevalske gene, ki bi jih lahko uporabili v diagnostičnih testih smo uporabili klasifikacijska drevesa.
	ANG	In grapevine, phytoplasmas cause grapevine yellows (GY) diseases, which were identified in the majority of grapevine growing countries worldwide. Several molecularly distinct phytoplasma groups which cause the GY were identified; however, a phytoplasma from the stolbur group/16SrXII-A, associated with the GY disease Bois noir (referred herein to as BNp), is very common. In our previous study we have shown a comparison of the global transcriptome profile of healthy and BNp infected grapevine (<i>Vitis vinifera</i>) cv. Chardonnay. In the two-year-long field experiment a set of 17 selected genes from several differentially expressed pathways was analyzed and confirmed to be suitable for a reliable classification of infected plants and for the characterization of susceptibility features in the field conditions. Based on those results, in the following study this set was increased to 22 genes, and the experiment was prolonged to five years. Classification trees were used in order to reveal possible marker genes that may be used in new diagnostic assays.
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje
	Objavljeno v	2013; Avtorji / Authors: Dermastia Marina
	Tipologija	3.16 Vabljeno predavanje na konferenci brez natisa
4.	COBISS ID	3805544 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Metode daljinskega zaznavanja pri nadzoru zlate trsne rumenice (Flavescence dorée)
		ANG Remote sensing analysis of high resolution satellite images as a support to targeted monitoring of Grapevine Flavescence dorée phytoplasma
	Opis	SLO Predstavljeni so bili poskusi uvedbe metode daljinskega zaznavanja pri nadzoru zlate trsne rumenice.
		ANG Remote sensing analysis of high resolution satellite images as a support to targeted monitoring of Grapevine Flavescence dorée phytoplasma was presented.
	Šifra	F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)
	Objavljeno v	2012; Avtorji / Authors: Knapič Matej
	Tipologija	3.15 Prispevek na konferenci brez natisa

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine^Z

Obnovitveni tečaji iz varstva rastlin na področju karantenskih škodljivih organizmov – bolezniza prodajalce FFS.

Vsakoletna udeležba s predavanji na srečanjih fitosanitarnih uprav Slovenije, Avstrije, Hrvaške in Madžarske na temo zlate trsne rumenice.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine^S

10.1. Pomen za razvoj znanosti^S

SLO

V projektu smo uspešno uvedli daljinsko zaznavanje na osnovi analize trsnih rumenic z uporabo

visoko resolucijskih multispektralnih podatkov. To predstavlja kvalitativni korak pri tej aplikaciji od rastlinskih plevelov in patogenov k fitoplazmam.

Uvedba različnih bioinformatičnih orodij v raziskave fitoplazem je odprla povsem novo področje raziskav, ki so že odkrile potencialne genske označevalce fitoplazemskih bolezni in so vodile do prve izdelave bolezenskega trikotnika – starega koncepta za opis bolezni, na osnovi resničnih eksperimentalnih podatkov.

ANG

In this project we have successfully introduced a remote sensing based analysis of grapevine yellows by using high resolution multispectral data. This is a qualitative step of this application from plant weeds and pathogens to phytoplasmas.

The introducing of various bioinformatics tools into phytoplasma research have opened a completely new area of studies which has already revealed potential genetic markers of phytoplasma infection and led to the first construction of a disease triangle – an old concept describing the diseases, based on the real experimental data.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

V okviru tega projekta smo prvič v Sloveniji testirali terapijo z vročo vodo, ki je znana uspešna metoda za odstranjevanje fitoplazme FD in jajčec njenega vektorja. Poskusi so že dali zelo obetavne rezultate.

Prav tako smo implementirali študijo o bionomiji ameriškega škržatka v Sloveniji z namenom, da bi ga lahko uspešno zatirali.

ANG

In the frame of this project the hot water treatment as a known successful method for the eradication of FD phytoplasma and the eggs of its vector has been tested for the first time in Slovenia with very promising results.

In addition, a study of the bionomy of *S. titanus* in Slovenia has been implemented in the improvement of strategies for its successful eradication.

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

Pridelovalci vinske trte iz vseh slovenskih vinorodnih dežel.

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

1. Sodelovanje v evropskih projektih, povezanih z zlato trsno rumenico, kot je bil projekt VITISENS (<http://www.vitisens.eu/>).
2. Sodelovanje v akciji COST FA0807 o fitoplazmah
3. S partnerji v akciji COST FA0807 prijava na nove evropske in ARRS projekte, povezane s fitoplazmami (univerza v Bolonji, CRA, INRA).
4. Formalno sodelovanje z Univerzo v Nottinghamu in firmo FERA (oboje VB) pri razvoju novih detekcijskih metod za fitoplazme.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

Projekt VITISENS: izdelava prototipa naprave na osnovi tehnologije LAMP za detekcijo fitoplazme FD na terenu in odobren evropski projekt GRAFDEPI, v katerem se preizkuša izdelana metoda.

Dokončan doktorat mlade raziskovalke s sodelovanjem Univerze v Nottinghamu.

12. Izjemni dosežek v letu 2014¹⁴

12.1. Izjemni znanstveni dosežek

12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

V sklopu projekta smo 23. 5. 2015 organizirali delavnico o zlato trsni rumenici, ki se je udeležilo 50 predstavnikov KGZS, resornega ministrstva in raziskovalcev. Na delavnici so bili predstavljeni izsledki projekta. Vabljeni predavatelj I. Kopacka iz AGESa (Avstrija) je predstavil modeliranje epidemioloških posledic zlate trsne rumenice na avstrijsko vinogradništvo kot novo odločitveno orodje pri strategijah nadzora, G. Seljak iz KGZS Nova Gorica je predstavil bolezenska znamenja, ki jih povzročajo trsne rumenice in vse razvojne stadije ameriškega škržatka, vključno z znaki za ločevanje od drugih podobnih škržatkov. E. Orešek z MKO je podala pregled stanja zlate trsne rumenice v Sloveniji in ukrepe, ki se izvajajo. V praktičnem delu delavnice pa smo popisali uveljavljene prakse pri ravnanju v preventivi in ob najdbah FD v različnih vinorodnih deželah, ugotavljali odziv pridelovalcev, poiskali morebitne težave in določili področja za izboljšavo.

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 zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Nacionalni inštitut za biologijo

Marina Dermastia

ŽIGKraj in datum:

Ljubljana	25.2.2015
-----------	-----------

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/7

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 priponko/-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

71-64-3A-60-36-9D-16-49-AA-61-5F-29-93-BA-B4-D8-0B-9F-A4-F0

Raziskovalni projekt **V4-1103** v sklopu Ciljnega raziskovalnega programa
»Zagotovimo.si hrano za jutri«

Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja

KONČNO POROČILO

Delovni sklop 1:

Preizkus uporabnosti daljinskega zaznavanja za zgodnje odkrivanje žarišč in zatiranje ameriškega škržatka ter uvedba prostorsko analitskih metod za zgodnje odkrivanje okuženih rastlin

Izvajalec: Kmetijski inštitut Slovenije

Poročilo pripravila:

Uroš Žibrat in Matej Knapič

Ljubljana, 15. september 2014

Vsebina

Vsebina.....	2
Uvod.....	3
Zajem terenskih podatkov	4
Analiza daljinskih podob.....	4
Sklepi.....	12
Diseminacija rezultatov	14
Literatura	15

Uvod

Vsa telesa, ki imajo temperaturo večjo od absolutne ničle, sevajo lastno sevanje in večinoma odbijajo valovanje, ki ga sevajo druga telesa. Spektralni zapis je lasten vsakemu objektu posebej, kar omogoča prepoznavanje posameznih elementov na površju Zemlje (Oštir, 2006). Tako so podatki satelita Linsat služili kot osnova projektu klasifikacije pokrovnosti tal, ki ga je vodila Evropska okoljska agencija. Analiza satelitskih posnetkov omogoči zaznavanje problemov v rasti (suša, napad boleznin in škodljivcev). Slabša prostorska in spektralna resolucija satelitskih posnetkov je sprva omogočala le določitev obsega napada boleznin ali škodljivca na določenem območju, z izboljšano resolucijo pa so več spektralne analize omogočile identifikacijo posamezne boleznin, škodljivca ali celo invazivne vrste. Pri neposredni identifikaciji patogena se v veliki meri uporabljajo hiperspektralni posnetki (ozek, zvezen interval valovnih dolžin) in/ali kombinacija z večspektralnimi satelitskimi posnetki (Laudien s sod., 2004; Mirik s sod., 2006). Jones in sodelavci (2010) navajajo uspešen poskus identifikacije invazivne plevelne vrste-japonskega dresnika, z uporabo visoko ločljivih večspektralnih posnetkov in z objektno klasifikacijo posnetka.

Klasifikacija oziroma ločevanje elementov posnetka je eden najpomembnejših postopkov pri obdelavi daljinskih podob (slik), saj predstavlja povezavo z GIS (Oštir, 2006). Pri klasifikaciji posnetkov ločimo nenadzorovano in nadzorovano klasifikacijo (uporabnikova določitev elementa posnetka oziroma razredov). Pogosto se pri analizi daljinskih podob kmetijskih površin rastlin uporabljata obe tehniki. Veliko raziskav na področju varstva rastlin je potrdilo uporabnost tehnike daljinskega zaznavanja. Večina dosedanjih raziskav, kjer se je ugotavljal obseg prizadetosti kmetijskih posevkov zaradi boleznin in škodljivcev na večjih površinah, je pri analizi daljinskih podob uporabljala nenadzorovano klasifikacijo (Laudien in sod., 2004, Hatfield in Pruger, 2010), kjer lahko z ustaljenimi indeksi, razmerji posameznih spektrov, ločimo obolelo vegetacijo od zdrave. Med najbolj uporabljenimi vegetacijskimi indeksi je NDVI (normiran diferencialni vegetacijski indeks), obstaja pa cela zbirka vegetacijskih indeksov, ki so prirejeni namenu analize (Hatfield in Pruger, 2010). Tehnika analize daljinskih podob je bila večkrat uporabljena tudi v vinogradništvu. V projektu GRAPES (Loebitz in sod., 1997) so uspešno uporabili NDVI za določitev zgodnje faze stresa vinske trte zaradi napada trsne uši. Kot perspektivna se je pokazala uporaba analiza daljinskih podob inducirane fluorescence za določitev pojava oidija. Tehnologija daljinskega zaznavanja je bila večkrat uporabljena v povezavi s proučevanjem okoljskih dejavnikov na kakovost grozdja. V pregledu literature nismo našli zapisa o uporabi daljinskega zaznavanja in identifikacije okuženih trt z zlato trsno rumenico.

V projektu bomo razvili metodo uporabe 8-spektralnih visoko ločljivih satelitskih posnetkov za daljinsko detekcijo mest okužbe vinske trte s FDp. Analizirali bomo zanesljivost in kakovost identifikacije okuženih rastlin vinske trte s FDp z 8-spektralnimi posnetki. Analiza in razvoj ustrezne metode obdelave daljinskih podob bo omogočila identifikacijo okuženih rastlin ob zelo zmanjšanem številu terenskih pregledov, ki se bodo lahko opravljali bolj tarčno – za preverjanje suma na okužbo s FDp. Prednost tovrstnega analiznega pristopa pri monitoringu zdravstvenega stanja rastlin bomo širši javnosti predstavili na tematskem posvetu in nakazali možnosti širše uporabe te neinvazivne metode, ki hkrati zajame veliko število rastlin oziroma tarčne površine. Pričakovani rezultati bodo omogočili pregled težje dostopnih lokacij kot tudi večjega obsega območja, kjer je glavna omejitev v analizi zajetih površin daljinskih podob, razpoložljivost sredstev za nabavo posnetkov. Metoda identifikacije okuženih rastlin na osnovi daljinskega zaznavanja, omogoča večjo sistematičnost v nadzoru ogroženih površin, saj z usmerjenim snemanjem lahko izvajamo nadzor na najbolj ogroženih območjih. Zgodnja identifikacija žarišč okužb s FDp v vinorodnem okolju s pomočjo daljinskega zaznavanja bo pripomogla k učinkovitemu obvladovanju in preprečevanju širjenja zlate trsne rumenice.

Zajem terenskih podatkov

Delo je bilo osredotočeno na žarišče Viližan (Slika 1), kjer je bilo v naprej določeno ugodno razmerje med obolelimi in zdravimi rastlinami. Dne 11.8.2011 je satelit WorldView-2 fotografiral to območje. Za posnetke tega satelita je značilno, da imajo največjo spektralno, radiometrično in prostorsko ločljivost od vseh komercialno dostopnih satelitskih posnetkov. Senzor tega satelita zajame spektralni podpis v osmih spektralnih pasovih v vidnem delu svetlobnega spektra. To pomeni, da vsaka posamezna rastrska celica nosi informacijo z vseh osmih pasov (Tabela 1).

V istem tednu kot je potekalo snemanje, smo opravili terensko mapiranje štirih vinogradov. Vsaki trti posameznega vinograda smo pripisali prisotnost oziroma odsotnost vidnih znakov zlate trsne rumenice. Znake prisotnosti fitoplazme smo razvrstili v 4 razrede: N (ni vidnih znakov obolezosti), M (malo izraženi znaki), S (srednje izraženi znaki) in V (visoko izraženi znaki). Posebej smo označevali propadle rastline oziroma prazna mesta.



Slika 1: Satelitski posnetek dela žarišča Viližan.

Tabela 1: Spektralni pasovi satelita WorldView-2.

Pas	Centralna valovna dolžina [nm]	Spodnja meja pasu [nm]	Zgornja meja pasu [nm]
Coastal	427	401	453
Blue	478	447	508
Green	546	511	581
Yellow	608	588	627
Red	659	629	689
Rededge	724	704	744
NIR1	831	772	890
NIR2	908	862	954

Analiza daljinskih podob

Dobljene posnetke smo georeferencirali (določili položaj v GK koordinatnem sistemu) in ortorektificirali (odpravili napake v natančnosti določitve položaja zaradi razgibanosti reliefa). V naslednjem koraku smo opravili ostrenje multispektralnih podob s pankromatsko podobo, ki ima boljšo prostorsko ločljivost. Na ta način smo pridobili multispektralne podobe s prostorsko ločljivostjo 0,5 m. Čeprav je bila osnovna atmosferska korekcija narejena že na strani dobavitelja satelitskih podob, smo primerjalno opravili korekcijo podob zaradi vpliva atmosfere s programskim paketom ATCOR. Navkljub bolj kontrastni in jasni podobi po opravljeni atmosferski korekciji smo zaradi nevarnosti, da so se ob tem preveč spremenile osnovne radiometrične vrednosti, v nadaljevanju uporabili posnetke brez dodatne atmosferske korekcije.

Pred obdelavo podatkov smo morali slednje temeljito očistiti, da smo v podatkih zmanjšali šum, robni učinek in količino rastrskih celic z mešanimi spektralnimi podpisi. Na ta način smo bolje definirali vrstni oziroma medvrstni prostor, in posamezne trte. Ker smo poznali število trsov v posamezni vrsti vsakega vinograda, smo lahko tudi določili njihovo lego neposredno na posnetkih. Tako smo izmerili razdaljo med obema koncema vsake vrste in dobljeno število delili s številom trsov v tej vrsti. Dobljena številka predstavlja povprečno razdaljo trt. Da smo zmanjšali mešanje spektralnih podpisov in verjetnost uvrstitve posameznih rastrskih celic k napačni rastlini, smo mejne celice odstranili iz nabora podatkov za nadaljnjo obdelavo. Vsako rastrsko celico smo nato uvrstili k določeni trti, vrsti in vinogradu, ter jo uvrstili v enega izmed petih razredov zdravstvenega stanja (N,M,S,V in odmrle rastline). Šele primerno urejene podatke smo nato uporabili za analize.

Iz osmih kanalov satelita WorldView-2 smo izračunali 31 spektralnih indeksov (Tabela 2). Podatke smo normalizirali na enotno povprečje in varianco.

Tabela 2: Indeksi, uporabljeni v procesu treniranja algoritmov. R: valovna dolžina reflektance. Uporabljen v: v katerem koraku treniranja algoritmov smo uporabili ta indeks. Številke (1 do 3) pomenijo nivo raziskave; »r« in »w« pomenita rdečo oziroma belo trto; VS:MN okužene proti sumljivim; M:N sumljive proti zdravim.

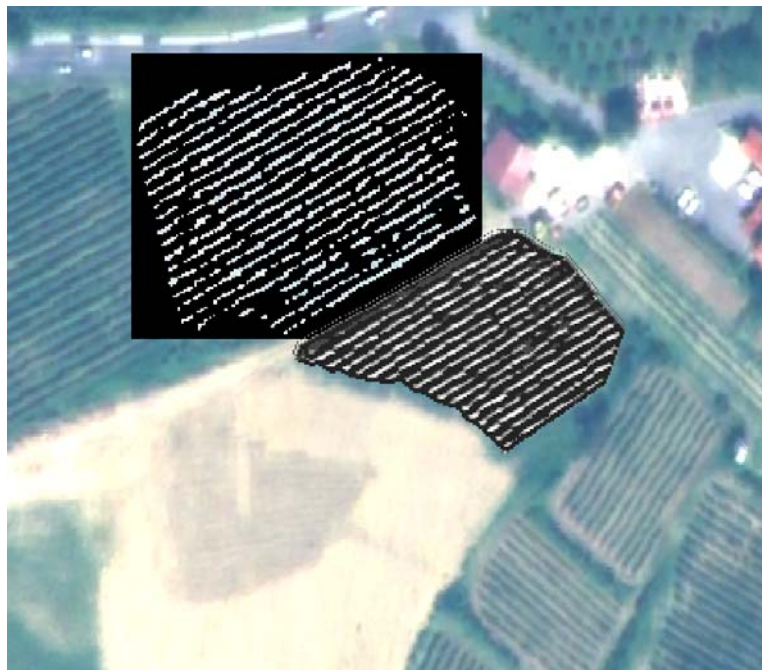
Št.	Indeks	Enačba	Referenca	Uporabljen v:
1	RRI	$\frac{R_{724} - R_{659}}{R_{724} + R_{659}}$	po Thenkabail <i>in sod.</i> 2000	3r(VS:MN), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
2	GY	$\frac{R_{546} - R_{608}}{R_{546}}$	Uporabljeno v tej raziskavi	3r(VS:MN), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
3	EqCoastal	$\frac{R_{427} - 282}{R_{724}} \square 100$	Uporabljeno v tej raziskavi	2wr, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(M:N)

4	EqRed	$\frac{R_{659} - 125}{R_{724}} \square 100$	Uporabljeno v tej raziskavi	1, 2wr, 3r(VS:MN), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
5	EqGreen	$\frac{R_{546} - R_{659}}{R_{659}}$	po Rodríguez-Pérez <i>in sod.</i> 2007	1, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
6	NIR1diffRededge	$R_{831} - R_{724}$	Uporabljeno v tej raziskavi	2wr, 3r(VS:MN), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
7	Rededge/Green	$\frac{R_{724}}{R_{546}}$	po Gamon in Surfus 1999	3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
8	Yellow/Rededge	$\frac{R_{608}}{R_{724}}$	po Jordan 1969, Pearson in Miller 1972	3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
9	yREDVI	$\frac{R_{724} - R_{608}}{R_{724} - R_{831}}$	po Thenkabail <i>in sod.</i> 2000	1, 3w(VS:MN), 3w(M:N)
10	Coastal/Rededge	$\frac{R_{427}}{R_{724}}$	po Jordan 1969, Pearson in Miller 1972	1, 2wr, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
11	Red/Blue	$\frac{R_{659}}{R_{478}}$	po Rodríguez-Pérez <i>in sod.</i> 2007	1, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
12	Rededge/Blue	$\frac{R_{724}}{R_{478}}$	po Jordan 1969, Pearson in Miller 1972	1, 2w, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
13	NDVI	$\frac{R_{831} - R_{659}}{R_{831} + R_{659}}$	po Rouse <i>in sod.</i> 1974	3w(VS:MN)
14	NDVIRededge	$\frac{R_{831} - R_{724}}{R_{831} + R_{724}}$	po Rouse <i>in sod.</i> 1974, Gitelson <i>in sod.</i> 2003	1, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
15	NIR2RededgeNDVI	$\frac{R_{908} - R_{724}}{R_{908} + R_{724}}$	po Rouse <i>in sod.</i> 1974	1, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)

16	NIR2RedNDVI	$\frac{R_{908} - R_{659}}{R_{908} + R_{659}}$	po Rouse <i>in</i> sod. 1974	3w(VS:MN), 3w(M:N)
17	PSRI	$\frac{R_{659} - R_{478}}{R_{724}}$	po Lee <i>in</i> sod. 2008	1, 2r, 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
18	Clorofil	$\frac{R_{831}}{R_{546}} - 1$	po Gitelson <i>in</i> sod. 2003, Gitelson <i>in</i> sod. 2005	1, 3r(VS:MN), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
19	Savi	$1.5 \frac{R_{831} - R_{659}}{R_{831} + R_{659} + 0.5}$	Huete 1988	3r(M:N), 3w(VS:MN)
20	Foliar Index	$\frac{2 \frac{R_{831} - R_{908}}{R_{831} + R_{908}}}{2 \frac{R_{831} - R_{908}}{R_{831} + R_{908}}}$	Uporabljeno v tej raziskavi	1, 3r(VS:MN), 3w(M:N)
21	GNDVI	$\frac{R_{831} - R_{546}}{R_{831} + R_{546}}$	po Gitelson <i>in</i> sod. 2003	3r(VS:MN), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
22	YNDVI	$\frac{R_{831} - R_{608}}{R_{831} + R_{608}}$	po Gitelson <i>in</i> sod. 2003	3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
23	TCARI/OSAVI	$\frac{3 \frac{(R_{724} - R_{659}) - 0.2 \frac{(R_{724} - R_{546})}{R_{659}}}{(1+0.16) \frac{R_{831} - R_{659}}{R_{831} + R_{659} + 0.16}}}{(1+0.16) \frac{R_{831} - R_{659}}{R_{831} + R_{659} + 0.16}}$	Malenovskiy <i>in</i> sod. 2006	1, 2wr, 3r(VS:MN), 3r(M:N), 3w(M:N)
24	GY/RR1	$\frac{(R_{546} - R_{608})/R_{546}}{(R_{724} - R_{659})/(R_{724} + R_{659})}$	Uporabljeno v tej raziskavi	3r(M:N), 3w(VS:MN)
25	GY/REG	$\frac{(R_{546} - R_{608})/R_{546}}{R_{724}/R_{546}}$	Uporabljeno v tej raziskavi	3r(VS:MN), 3w(VS:MN)
26	Red Index	$\frac{R_{831}}{R_{659}} - 1$	Tripathi <i>in</i> sod. 2013	3r(VS:MN), 3w(VS:MN), 3w(M:N)

27 NDWI	$\frac{R_{831} - R_{908}}{R_{831} + R_{908}}$	po Gao 1995	1, 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
28 ALI	$1.835 \cdot e^{\frac{1.51 \cdot R_{831} - R_{659}}{R_{831} + R_{659}}}$	Uporabljeno v tej raziskavi	3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)
29 CC	$4.45 \cdot \frac{R_{831}}{R_{659}} + 9.45$	Uporabljeno v tej raziskavi	3w(VS:MN), 3w(M:N)
30 EWT	$\frac{0.23 \cdot R_{831} - R_{908}}{R_{831} + R_{908}} + 0.02$	Uporabljeno v tej raziskavi	1, 3r(VS:MN), 3w(M:N)
31 Stressphoto	$\frac{R_{608} - R_{546}}{R_{831}} \cdot 100$	Uporabljeno v tej raziskavi	1, 3r(M:N), 3w(VS:MN), 3w(M:N)

Najprej smo želeli najti ustrezen način za identifikacijo vrstnega prostora. Sprva smo uporabili filtre, ki so že v standardnem naboru programske opreme Erdas Imagine. Ti temeljijo na optičnem ostrenju detajlov posnetka, kar pa se je v nadaljnjih analizah pokazalo kot neprimerno. Filter-i so izostrili mejni prostor med vrsto in medvrstnim prostorom, kar seveda ne ustreza našim željam. Kasneje smo z ustrežno obdelavo podatkov prvega kanala (Obalno modrim spektrom) uspeli lepo zožiti vrstni prostor, nato pa to obdelavo dopolnili s kombiniranim indeksom, ki je vključeval tudi robni rdeči kanal (Slika 2).



Slika 2: Ločevanje na vrstni in medvrstni prostor s pomočjo filtrov opreme Erdas Imagine.

Vendar smo pri validaciji te metode ugotovili, da ni dovolj zanesljiva oziroma, da je izrazito odvisna od lastnosti posameznega vinograda. Tudi uporaba razmerij posameznih pasov in nekaterih spektralnih indeksov te težave ni odpravila. Zato smo pričeli z uporabo klasifikacijskih algoritmov strojnega učenja.

Statistične analize in rezultati strojnega učenja so pokazali še vedno prisoten problem robnega učinka in mešanja spektralnih podpisov. Zato smo ponovno izvedli določitev trt in vrstnega ter medvrstnega, ter odstranili robne rastrske celice, vendar tokrat s strožjimi kriteriji. Vključili smo tudi dodatne vinograde, s čimer smo dosegli boljšo napovedno sposobnost modelov.

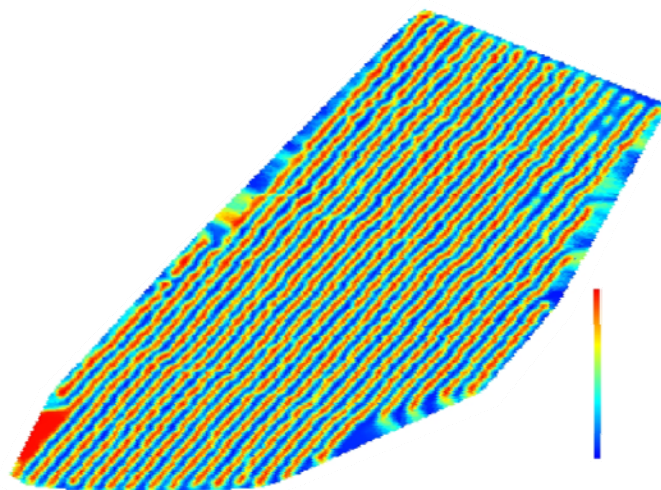
Podatke iz vseh obravnavanih vinogradov smo združili, premešali in razdelili v dve skupini: 70% podatkov smo uporabili za treniranje algoritmov, preostalih 30% za testiranje in validacijo dobljenih modelov. Iz podatkov za treniranje algoritmov smo nato naredili podvzorce, da smo dosegli enako število podatkov v vseh razredih. Začetni rezultati so pokazali tudi potrebo po združevanju razredov. Zato smo združili razreda V in S (nov razred VS), ter razreda M in N (nov razred MN).

Pri strojnem učenju smo opravili izbor indeksov z metodo Relief (Robnik-Sikonja & Kononenko 1997) v kombinaciji z vrednotenjem spremenljivk Ranker. Za vsak korak modeliranja smo naredili nove podvzorce, z enakomerno porazdelitvijo števila podatkov v razredih. Uporabili smo štiri klasifikacijske algoritme: RandomForest (RF) (Breiman 2001), Functional Trees (FT) (Gamma 2004), KStar (Clearly & Trigg 1995) in IBk (Aha & Keibler 1991). Vse algoritme smo trenirali v skupinah (angl. assembly learning). Postopke strojnega učenja smo opravljali v programskem okolju Weka (Waikato Environment for Knowledge Acquisition; Hall *in sod.* 2009) in R (R Core team 2014). V okolju R smo uporabili pakete RWeka, randomForest, gstat, automap, plyr, ggplot2 in reshape2.

Pri ločevanju vrstnega in medvrstnega prostora so vsi štiri algoritmi dosegli več kot 96% pravilno klasifikacij (Tabela 3, Slika 3). Pri rdečih sortah je bil najuspešnejši algoritem RandomForest, pri belih KStar. Vendar so razlike v zanesljivosti majhne, algoritem KStar pa je pri obdelavi večjih količin podatkov zelo počasen. Kot končno rešitev smo zato določili algoritem RandomForest. Oba algoritma sta sicer imela tudi najmanjšo varianco v napakah.

Tabela 3: Uspeh algoritmov pri ločevanju vrstnega in medvrstnega prostora. CCI: odstotek pravilno uvrščenih celic; Kappa: kappa statistika; MAE: povprečna absolutna napaka; RMSE: koren kvadrata povprečne napake; RRSE: koren kvadrata relativne napake.

	Algoritem	CCI	Kappa	MAE	RMSE	RRSE	RMSE-MAE
Bele	KStar	97.19	0.94	0.046	0.151	30.31	0.105
	IBk	96.3	0.92	0.04	0.168	33.84	0.13
	RF	96.76	0.93	0.046	0.152	30.96	0.11
	FT	96.61	0.93	0.037	0.153	30.82	0.12
Rdeče	KStar	98.88	0.97	0.016	0.093	18.65	0.077
	IBk	98.79	0.97	0.013	0.098	19.52	0.085
	RF	99.12	0.98	0.014	0.083	16.71	0.069
	FT	99.09	0.98	0.011	0.085	17.01	0.074



Slika 3: Ločitev na vrstni in medvrstni prostor, dobljena z algoritmom RandomForest. Rdeča barva pomeni 100% verjetnost, da rastrska celica pripada trti.

Pri ločevanju trte od tal predstavljata naklon in usmerjenost vinograda poseben izziv. Oba neposredno vplivata na kot med vinogradom in satelitom. Najboljše rezultate smo dosegli pri vinogradih, kjer so vrste potekale pravokotno na smer leta satelita in z majhnim naklonom. Vrste, vzporedne s smerjo leta satelita, in veliki nakloni privedejo to prekrivanja medvrstne prostora in s tem do mešanja spektralnih podpisov in oteževanja klasifikacije. V vinogradih z redkejšimi listi lahko pride do presevanja skozi vrste, torej mešanja spektralnih podpisov trt. Klasifikacija je ponovno otežena, v najboljšem primeru je kot obolela uvrščena rastlina v napačni vrsti. To utrjuje potrebo po ciljnem terenskem nadzoru, koordiniranem na osnovi rezultatov teh modelov.

Preverili smo tudi ločevanje med belimi in rdečimi sortami. Pri tem problemu je bil najuspešnejši algoritem IBk, vendar je imel najvišjo varianco v napakah. Kappa statistika nakazuje zelo nizko ujemanje med iteracijami algoritmov, torej so napovedi naključne (Tabela 4).

Tabela 4: Uspešnost algoritmov pri ločevanju na bele in rdeče sorte.

Algoritem	CCI	Kappa	MAE	RMSE	RMSE-MAE
KStar	61.63	-0.006	0.392	0.577	0.185
IBk	62.48	0.029	0.375	0.612	0.24
RF	59.76	-0.068	0.43	0.547	0.12
FT	61.22	0.1	0.389	0.599	0.21

Za določanje zdravih oziroma obolelih rastlin smo algoritme trenirali ločeno na rdečih in belih sortah. Pri ločevanju obolelih (VS) in sumljivih (MN) trt je bil najuspešnejši algoritem RandomForest (Tabela 5), z 85.4% pravih klasifikacij. Ločevanje sumljivih (M) in zdravih (N) rastlin je bilo manj zanesljivo, najboljši rezultat sta dosegla IBk in Kstar, z 67.6% pravih uvrstitev (Tabela 6). Zanesljivost pravih uvrstitev je bila višja pri sumljivih (TP = 0.84), kot pri zdravih (TP = 0.4). Vendar pa je bila tudi verjetnost lažnih pozitivnih visoka (FP = 0.6) (Tabela 7). Med tem, ko je ločevanje obolelih in sumljivih razmeroma zanesljivo, je ločevanje sumljivih in zdravih nezanesljivo.

Tabela 5: Uspešnost algoritmov pri ločevanju sumljivih in obolelih rastlin rdečih sort.

Algoritem	CCI	Kappa	MAE	RMSE	RRSE	RMSE-MAE
KStar	83.99	0.68	0.146	0.297	72.89	0.15
IBk	83.47	0.67	0.14	0.304	74.44	0.16
RF	85.36	0.71	0.196	0.28	69.4	0.087
FT	78.7	0.57	0.22	0.318	78.12	0.098

Tabela 6: Uspešnost algoritmov pri ločevanju sumljivih in zdravih rastlin rdečih sort.

Algoritem	CCI	Kappa	MAE	RMSE	RRSE	RMSE-MAE
KStar	67.59	0.32	0.144	0.305	98.09	0.16
IBk	67.59	0.32	0.144	0.31	102.04	0.17
RF	66.32	0.26	0.17	0.29	94.29	0.12
FT	63.37	0.19	0.17	0.3	96.89	0.13

Tabela 7: Rezultati evalvacije modelov algoritma KStar. TP: dejanski pozitivni; FP: lažni pozitivni; NatačnostROC: površina pod krivuljo ROC.

Razred	TP	FP	ROC
M	0.842	0.596	0.69
N	0.404	0.158	0.69

Pri belih sortah je bil najuspešnejši algoritem KStar. Sicer je imel algoritem IBk največ pravilno uvrščenih primerov, je imel tudi razmeroma visoko varianco v napakah, in slabše ocene napak, kot Kstar (Tabela 7). Pri ločevanju sumljivih in zdravih trt pa je bil uspešnejši IBk (Tabela 8). Sicer je bilo pri klasifikaciji sumljivih več lažnih pozitivnih, kot pri zdravih, vendar površina pod krivuljo ROC nakazuje zanesljivo klasifikacijo obeh razredov (Tabela 9).

Tabela 7: Uspešnost algoritmov pri ločevanju sumljivih in obolelih rastlin belih sort.

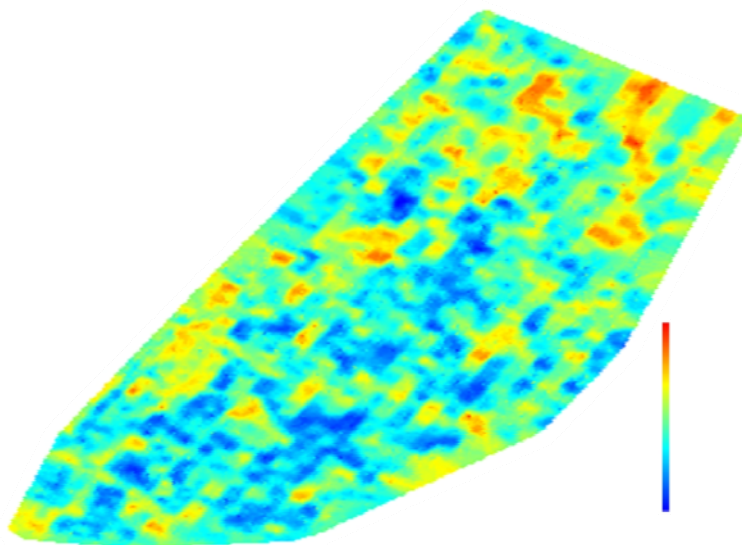
Algoritem	CCI	Kappa	MAE	RMSE	RRSE	RMSE-MAE
KStar	77.1	0.514	0.14	0.2	83.99	0.06
IBk	80.24	0.588	0.117	0.281	81.25	0.16
RF	75.18	0.421	0.178	0.29	85.19	0.11
FT	74.4	0.411	0.16	0.34	86.15	0.18

Tabela 8: Uspešnost algoritmov pri ločevanju sumljivih in zdravih rastlin belih sort.

Algoritem	CCI	Kappa	MAE	RMSE	RRSE	RMSE-MAE
KStar	80.76	0.582	0.087	0.227	74.6	0.14
IBk	83.66	0.645	0.082	0.224	73.83	0.14
RF	76.95	0.468	0.139	0.252	82.88	0.11
FT	75.2	0.424	0.141	0.36	85.15	0.22

Tabela 9: Rezultati evalvacije modelov algoritma IBk.

Razred	TP	FP	ROC
M	0.878	0.236	0.882
N	0.764	0.122	0.883



Slika 4: Verjetnost za okužbo pri rdeči sorti. Rdeča barva pomeni 100% verjetnost, da rastrska celica pripada okuženi trti.

Sklepi

V okviru projekta smo potrdili uporabnost multispektralnih posnetkov za bolj usmerjen terenski nadzor potencialnih žarišč zlate trsne rumenice. Hkrati smo identificirali parametre, ki vplivajo na zanesljivost modelne napovedi. Modelna napoved prisotnosti trsnih rumenic v vinogradih temelji na metodah in modelih podatkovnega rudarjenja.

Modelno napoved sestavlja več stopenj. Najprej je potrebno na satelitskih posnetkih ločiti vrstni in medvrstni prostor, temu sledi ločevanje belih in rdečih sort ter v končni fazi določitev trt s simptomi trsnih rumenic oziroma določitev trt brez simptomov. Velik vpliv na zanesljivost modela imata podatka o naklonu in ekspoziciji vinograda.

Ločevanje med vrstnim in medvrstnim prostorom je zanesljivo pod določenimi pogoji. Vsi ti pogoji so vezani na lego in potek vrst vinograda. Te podatke (naklon in ekspozicijo) pridobimo z analizo podatkov digitalnega modela reliefa. Zanesljivost modelov povečamo, ko v proces določevanja trt z vidnimi znamenji trsnih rumenic vključimo podatke reliefa kot dodatne metapodatke.

Prav tako se razlikuje metoda za določanje potencialno okuženih trt pri rdečih in belih sortah. Ta korak v izgradnji modelne napovedi se da premostiti z dvojnimi računanjem za posamezen vinograd (za bele in rdeče sorte) ali s pomočjo podatkov registra vinogradov. Seveda v registru niso zajeti vsi vinogradi, kar nekoliko zmanjšuje uporabnost podatkov registra.

Pri preverjanju pravilnosti posameznih stopenj modelne napovedi, se je potrdilo, da so ključni modeli za določanje rastlin z zunanjimi znamenji trsnih rumenic zanesljivi do te mere, da jih lahko vključimo v praktično uporabo. Za še boljše modelno napoved moramo v modelno napoved vključiti metapodatke reliefa. Ta del je zaradi velike obilice podatkov v fazi preverjanja in izgradnje. Čeprav so bili uporabljeni najboljše komercialno dostopni satelitski posnetki, se je pri delu izpostavilo, da sta glavni oviri uporabljenih modelov spektralna in prostorska resolucija posnetkov.

Boljša prostorska resolucija (trenutna znaša 0.5m, po pankromatskem ostrenju) je premajhna in prinaša izrazit robni učinek ter mešanje spektralnih podpisov. Prostorska resolucija okrog 20 do 30 cm bi v veliki meri izboljšala to stanje. Podobno je s spektralno resolucijo oziroma številom kanalov. Večje število kanalov (torej boljša spektralna resolucija) bi omogočila boljšo determinacijo obolelih rastlin. Poleg tega bi omogočila tudi t.i. subpixel modeling, s čimer bi povečali prostorsko resolucijo. Obe izboljšavi sta enostavno dosegljivi z uporabo hiperspektralnega snemanja, kjer so kamere lahko montirane na letalu.

Čeprav so modeli za določanje rastlin z vidnimi znamenji trsnih rumenic natančni do mere, ki že dopuščajo praktično uporabo, jih lahko z vpeljavo nekaterih metapodatkov še izboljšamo. Kot rečeno lahko upravičeno računamo, da bi povečana prostorska in spektralna ločljivost posnetkov odločilno pripomogla k še večji uporabnosti metode daljinskega zaznavanja pri bolj usmerjenem terenskem nadzoru zato priporočamo nadaljnje raziskovalno delo tudi z uporabo hiperspektralnega snemanja, ki je od letošnjega poletja na voljo tudi v Sloveniji..

Diseminacija rezultatov

KNAPIČ, Matej, RUTAR, Rok, ŽIBRAT, Uroš. Uvajanje metode daljinskega zaznavanja pri nadzoru zlate trsne rumenice (Flavescence dorée) = Application of remote sensing in grapevine yellows (Grapevine Flavescence dorée) control. V: TRDAN, Stanislav (ur.). *Izvečki referatov = Abstract volume*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2013, str. 81-82. [COBISS.SI-ID [4099176](#)]

ŽIBRAT, Uroš. *Preizkus uporabnosti daljinskega zaznavanja za zgodnje odkrivanje žarišč in zatiranje ameriškega šrkžatka ter uvedba prostorsko analitskih metod za zgodnje odkrivanje okuženih rastlin : predavanje na Delavnici o zlati trsni rumenici, Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovneije, 23. maj 2014*. 2014. [COBISS.SI-ID [4472680](#)]

ŽIBRAT, Uroš, KNAPIČ, Matej. *Možnost uporabe hiperspektralne kamere za ugotavljanje fiziološkega in zdravstvenega stanja rastlin : predavanje v okviru CropSustaln seminarja WP2 Krepitev interdisciplinarnih raziskav, Ljubljana, 11. okt. 2013*. 2013. [COBISS.SI-ID [4332136](#)]

ŽIBRAT, Uroš, KNAPIČ, Matej. *Seeing the invisible : detecting Grapevine flavescence dorée foci using satellite imaging : predstavitev posterja na delavnici Agricultural Omics, European Bioinformatics Institut, Hinxton, Velika Britanija, 17.-21.feb.2014*. 2014. [COBISS.SI-ID [4418664](#)]

ŽIBRAT, Uroš, KNAPIČ, Matej. *First attempt at a data mining in remote sensing approach to detecting grapevine yellows foci. Remote sensing of the environment (in prep.)*.

Literatura

- Aha D., Kibler D. 1991. Instance-based learning algorithms. *Machine Learning*, 6: 37 – 66.
- Breiman L. 2001. Random Forests. *Machine Learning*. 45(1): 5 – 32.
- Cleary J.G., Trigg L.E. 1995. K*: An Instance-based Learner Using an Entropic Distance Measure. 12th International Conference on Machine Learning: 108 – 114.
- Gama J. 2004. Functional Trees. *Machine learning*, 55(3): 219 – 250.
- Hall M., Frank E., Holmes G., Pfahringer B., Reutemann P., Witten I.H. 2009. The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Explorations*, Volume 11(1): 10 – 18.
- Hatfield, J.L., Prueger J.H. 2010. Value of using different vegetative indices to quantify agricultural crop characteristics at different growth stages under varying management practices. *Remote Sensing* 2: 562 – 578.
- Jones D., Pike S., Thomas M., Murphy D. 2011. Object-based image analysis for detection of japanese knotweed s.l. taxa (Polygonaceae) in Wales (UK). *Remote Sensing* 3: 319 – 342.
- Laudien R., Bareth G., Doluschitz R. 2004. Comparison of remote sensing based analysis of crop diseases by using high resolution multispectral in hyperspectral data – case study: *Rhizoctonia solani* in sugar beet. In: Proc. 12th Int. Conf. on Geoinformatics – Geospatial Information Research: Bridging the Pacific in Atlantic, University of Gävle, Sweden.
- Loebitz, B., Johnson L., Armstrong R., Hlavka C. in Bell. C. 1997. Grapevine remote sensing analysis of phylloxera early stress (GRAPES): remote sensing analysis summary. *NASA Technical Memorandum* No. 112218.
- Oštir K. 2006. Daljinsko zaznavanje. Založba ZRC, Ljubljana, s. 250
- R Core Team 2014. R: A language in environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Robnik-Sikonja M., Kononenko I. 1997. An adaptation of Relief for attribute estimation in regression. In: Fourteenth International Conference on Machine Learning: 296 – 304.

Raziskovalni projekt **V4-1103** v sklopu Ciljnega raziskovalnega programa
»Zagotovimo.si hrano za jutri«

Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja

KONČNO POROČILO

Delovni sklop 2:
Toplotna terapija

Izvajalec: Kmetijski inštitut Slovenije
Poročilo pripravila: dr. Jaka Razinger, Vojko Škerlavaj

Ljubljana, 15. september 2014

Vsebina

1. Uvod.....	3
2. Vpliv toplotne terapije na fitoplazmo zlate trsne rumenice (FDp).....	3
3. Prenos FDp s cepljenjem.....	4
4. Vpliv toplotne terapije na živost in vitalnost rastlinskega materiala	6
4. 1 Vpliv toplotne terapije na vitalnost potaknjencev	7
4. 2 Toplotna terapija cepljenk.....	8
5. Učinkovitost uničevanja jajčec ameriškega škržatka s toplotno terapijo	9
6. Sklepi.....	11
7. Diseminacija rezultatov	12
8. Literatura	14

1. Uvod

Uporaba toplotne terapije kot fitosanitarne tehnike za ustvarjanje brezvirusnih rastlin je bila uporabljena tudi za zatiranje fitoplazem, že kmalu po prvem pojavu zlate trsne rumenice v Franciji (Caudwell, 1966). Ugotovili so, da potopitev rastlinskega material v vodo, ki ima temperaturo med 45 °C in 55 °C za 10 do 150 minut, učinkovito uniči fitoplazme in tudi druge patogene (Caudwell s sod., 1997). Kombinacija dolgega časa obdelave pri nizki temperaturi (10 ur pri 40°C) ali visoke temperature in kratkega časa (10 min pri 55°C) učinkovito uniči fitoplazme in jajčeca ameriškega škržatka. Kot najboljša varianta, v smislu doseganja zelenega razkuževanja ob hkratni odsotnosti negativnih vplivov na rastlinski material, se je izkazala srednja pot, to je 45 minutna obdelava pri 50 °C. Tehnologijo rutinsko uporabljajo npr. v Franciji in Avstraliji (Caudwell s sod., 1997); priporočljiva pa je pred cepljenjem ali pred prodajo cepljenk povsod, kjer pridelujejo razmnoževalni material (Panattoni in Triolo, 2010). Do sedaj metoda v slovensko vinogradniško prakso ni bila vpeljana, prav tako še ni bil preizkušen odziv sort v slovenski pridelavi na toplotno obdelavo.

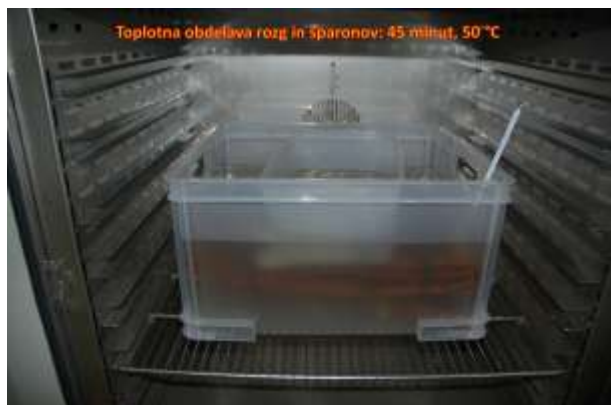
V projektu smo v slovenskem prostoru testirali metodo toplotne terapije (TT). Preskusili smo:

- 1) kako uspešno TT uničuje FDp,
- 2) ali se FDp prenaša s cepljenjem,
- 3) kako TT vpliva na živost in vitalnost rastlinskega materiala namenjenega cepljenju ali neposrednemu sajenju, in
- 4) kako TT vpliva na preživetje jajčec ameriškega škržatka.

Z vpeljavo le-te v slovenski prostor bi trsničarska panoga dobila učinkovito orodje, s katerim bi lahko zagotovila višjo kakovost trsov. Rezultat tega delovnega sklopa je testiranje postopka TT, ki lahko dolgoročno odstrani pomemben vir potencialne širitve zlate trsne rumenice, prek uporabe okuženega sadilnega ali cepilnega materiala.

2. Vpliv toplotne terapije na fitoplazmo zlate trsne rumenice (FDp)

Na začetku projekta smo določili uspešnost zatiranja FDp s toplotno terapijo (TT). Postopek TT je bil sestavljen iz potopitve rastlinskega materiala v vodo segreto na 50°C za 45 minut ob konstantnem mešanju. Toplotno obdelavo smo izvedli v termostatirani kopeli, kjer smo konstantno spremljali temperaturo. Po dodatku trsnega lesa smo dodali ustrezno količino toplejše vode, da smo ohranili konstantno temperaturo 50°C (Slika 1).



Slika 1: Postopek toplotne terapije. Rastlinski material smo potopili v vodo segreto na 50°C za 45 minut ob konstantnem mešanju

Cilj TT dormantnih cepičev ali cepljenk je odprava FDp brez zmanjšanja reproduktivnega potenciala ali vitalnosti in preživetja cepljenk (Boudon-Padieu in Grenan, 2002). Iz literature je znano, da poleg zdravljenja ZTR kaže TT pozitiven sanitarni učinek proti več bakterijskim boleznim, škodljivcem in insektom (Panattoni in Triolo, 2010). S tem namenom smo v vasi Dane na Primorskem nabrali rastlinski material. Skupno smo vzorčili 22 vzorcev. Vse vzorce so sodelavci z NIB analizirali za prisotnost FDp pred toplotno terapijo. Po končanemu postopku TT so sodelavci z NIB ponovno naredili analize za prisotnost fitoplazme FDp. Pozitivna sta bila le dva vzorca, ki sta bila z okuženih trsov in neobdelana s TT. Rezultati so tako pokazali, da je TT uspešno uničila FDp v okuženih rozgah (Tabela 1):

Tabela 1: Okužene rozge iz vasi Dane pred in po toplotni terapiji. Prikazani so samo 4 vzorci od skupno 22.

Pred poskusom	Po poskusu
okužene rozge refoška IV/16 (=4. vrsta, 16. trs) iz vasi Dane	okužene rozge refoška IV/16 (=4. vrsta, 16. trs) iz vasi Dane – brez TT
okužene rozge refoška IV/16 iz vasi Dane	okužene rozge refoška IV/16 iz vasi Dane – TT
okužene rozge refoška IV/3 iz vasi Dane	okužene rozge refoška IV/3 iz vasi Dane – brez TT
okužene rozge refoška IV/3 iz vasi Dane	okužene rozge refoška IV/3 iz vasi Dane – TT

Legenda: qPCR analize: Vzorec **pozitiven** / **negativen** za ZTR pred in po končanem poskusu.

Izsledki qPCR analiz kažejo, da TT uspešno uniči Fd v rozgah, namenjenih cepljenju: rozga z okuženega trsa, ki je bila obdelana s TT ni bila pozitivna na FDp, medtem, ko je bila v toplotno neobdelani rozgi z istega trsa potrjena prisotnost FD fitoplazme.

3. Prenos FDp s cepljenjem

V nadaljevanju projekta smo skladno z načrtanim programom preskušali možnost prenosa FDp s cepljenjem. S tem namenom smo ponovno nabrali okužen material iz žarišča v vasi Dane. Nadaljnje analize s strani sodelavcev z NIB so potrdile prisotnost FDp v vseh vzorcih vinske trte sorte refošk, ki smo jih predvideli za cepljenje. Cepljenje smo izvedli na kupljenih cepljenkah sorte chardonnay. Cepljenje smo izvedli s tehniko 'chip-grafting' (Slika 2).



Slika 2: Postopek cepljenja. Biološki material, okužen s FDp smo nabrali v vasi Dane. 1 – okužen oleseneli šparon; 2 – odvzem kosa lesa z brstom za cepljenje; 3 – vstavljanje cepiča v zarezo na neokuženi cepljenki; 4 – pritrditev cepiča z elastičnim trakom; 5 – cepljena trta; 6 – posajena cepljenka.

Izvedli smo dva poskusa cepljenja:

1. Prvi poskus cepljenja – jesenski poskus cepljenja (11.11.2011)
 - a. rozge so bile nabrane oktobra 2011
 - b. cepljenje je bilo opravljeno novembra 2011
2. Ponovitev poskusa cepljenja – pomladanski poskus cepljenja (20.3.2012)
 - a. rozge so bile nabrane februarja 2012
 - b. cepljenje je bilo opravljeno marca 2012

Iz okuženega materiala iz območja Dan smo cepili brste ali les. Uporabili smo nedozorel in dozorel, vitalen les. Kot negativno kontrolo smo uporabili brste sorte refošk, ki smo ga dobili v Ravnjah - Štjak (negativna kontrola cepljenja). Pet cepljenk nismo cepili, da smo preverili kakovost cepljenk samih. Po cepljenju smo opazovali cepljen material z namenom ugotovitve morebitnega pojava simptomov FDp. Po podatkih iz literature se FDp laboratorijsko zelo težko prenaša z umetnim okuževanjem (Weintraub in Jones, 2010).

Od preko 70 cepljenih rastlin smo le na eni opazili simptome okužbe s FDp (Slika 3). Prisotnost FDp v tej simptomatični rastlini je bila potrjena tudi s qPCR. Rastlina, ki smo jo uspešno okužili preko cepljenja z okuženim materialom, je bila zavrtá v rasti in je tekom rastne sezone izkazovala tipične znake okužbe s FDp. FDp smo uspešno umetno prenesli v okviru pomladnega nabiranja materiala in cepljenja z brstom.



Slika 3: Cepljena rastlina, ki smo jo umetno okužili s FDp prek 'chip-grafting' cepljenja z olesenelim brstom.

4. Vpliv toplotne terapije na živost in vitalnost rastlinskega materiala

Poleg vpliva TT na fitoplazmo FD smo želeli proučiti tudi morebitne (negativne) vplive TT na živost in vitalnost rastlinskega materiala, ki smo ga želeli razkužiti s TT. S tem namenom smo izvedli serijo rastlinjaških poskusov v katerih smo preverjali posledice TT na potaknjence in na cele cepljenke.

4. 1 Vpliv toplotne terapije na vitalnost potaknjencev

Maja 2013 smo izvedli dva poskusa v katerih smo s toplotno terapijo obdelali dve skupini rozg. V prvi skupini so bili potaknjenci iz rozg, ki niso bile okužene s FDP, v drugi skupini pa potaknjenci, ki so bili pripravljene iz okuženih rozg (Tabela 2).

Tabela 2: Vzorci iz poskusa vpliva toplotne terapije na vitalnost neokuženih in okuženih potaknjencev. Skupno smo s TT obdelali 111 vzorcev.

Neokuženi potaknjenci (N=81)		Okuženi potaknjenci (N=30)	
TT	Brez TT	TT	Brez TT
Neokužene rozge (enoleten les)	neokužene rozge (enoleten les)	žlahtna, okužena s FDP	žlahtna, okužena s FDP
		samorodnica, okužena s FDP	samorodnica, okužena s FDP



Slika 4: Preskus vpliva TT na živost in vitalnost potaknjencev.

Poskus smo ocenili dvakrat: prvič, tri tedne po TT, smo ocenjevali vitalnost potaknjencev (odganjanje potaknjencev), to je, pri koliko potaknjencih so se odprli brsti in vsaj nakazali začetne faze rasti. Poskus smo ponovno ocenjevali tri mesece po TT. Takrat smo ocenjevali živost (viabilnost) potaknjencev, to je, število potaknjencev, ki so se uspešno ukoreninili in bili v dobrem fiziološkem stanju ob ocenjevanju poskusa.

Rezultati kažejo, da TT ni negativno vplivala na vitalnost ali živost neokuženih potaknjencev (Tabela 3), in je celo statistično značilno izboljšala vitalnost (delež odgnalih potaknjencev) s FDP okuženih potaknjencev (Tabela 4).

Tabela 3: Vpliv TT na neokužene potaknjence. Prikazane so povprečne vrednosti (N=81).

FDP -	Delež odgnalih potaknjencev (vitalnost)	Delež živih potaknjencev (viabilnost)
Kontrola	77,50%	27,50%
Toplotna terapija	90,00%	55,00%

Tabela 4: Vpliv TT na s FDp okužene potaknjence. Prikazane so povprečne vrednosti (N=30). Zvezdica (*) označuje statistično razlikovanje od negativne kontrole.

FDp +	Delež odgnalih potaknjencev (vitalnost)	Delež živih potaknjencev (viabilnost)
Kontrola	30,95%	25,40%
Toplotna terapija	64,29% *	35,71%

4.2 Toplotna terapija cepljenk

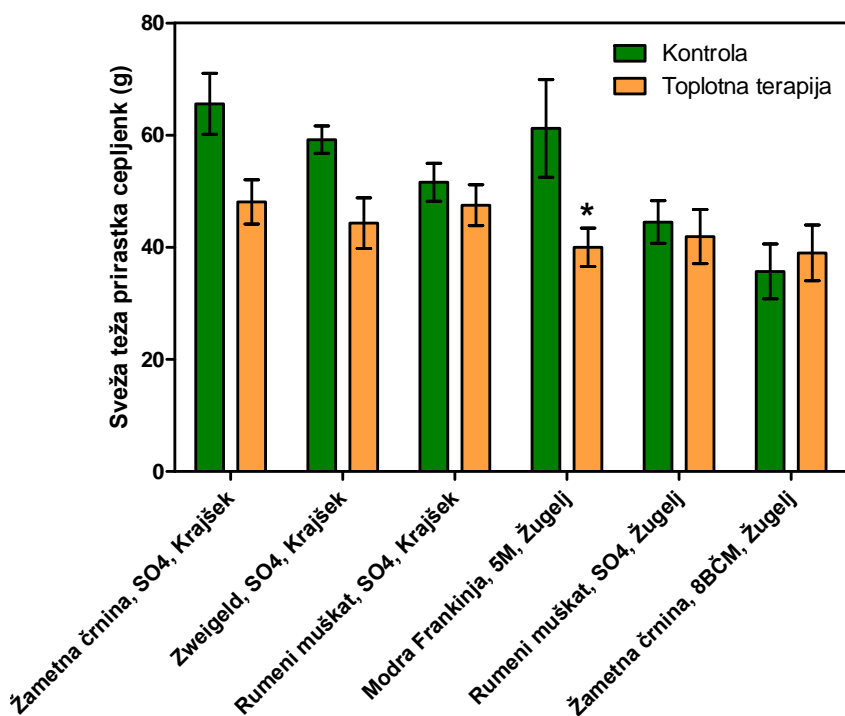
Maja 2014 smo izvedli poskus v katerem smo s toplotno terapijo (TT) obdelali več različnih sort, cepljenih na različne podlage. Izvedli smo TT zdravih cepljenk treh sort (modra frankinja, žametna črnina in rumeni muškat), ki so bile cepljene na različne podlage (SO4, 5M in 8BČM). S poskusom smo želeli odgovoriti na vprašanje, ali ima toplotna terapija morebiten negativen vpliv na živost in vitalnost cepljenk. Želeli smo pridobiti konkretne rezultate, ki nam bodo koristili pri argumentaciji s končnimi uporabniki (trsničarji) o koristnosti in predvsem neškodljivosti te metode za razkuževanje matičnega (sadilnega in cepilnega) materiala. Po toplotni obdelavi smo s TT obdelan rastlinski material posadili v mrežnik na vrtu KIS. Zasnova poskusa je obrazložena tudi v tabeli (Tabela 5).

Tabela 5: Zasnova poskusa TT cepljenk. Vse kombinacije sorta-podlaga so bile izvedene v dvajsetih ponovitvah (N=20).

Sorta	Podlaga	Pridelovalec cepljenk	Tretma	Ponovitve
Žametna črnina	SO4	Krajšek, Loka	kontrola	20
Žametna črnina	SO4	Krajšek, Loka	TT	20
Zweigeld	SO4	Krajšek, Loka	kontrola	20
Zweigeld	SO4	Krajšek, Loka	TT	20
Rumeni muškat	SO4	Krajšek, Loka	kontrola	20
Rumeni muškat	SO4	Krajšek, Loka	TT	20
Modra Frankinja	5M	Žugelj, Metlika	kontrola	20
Modra Frankinja	5M	Žugelj, Metlika	TT	20
Rumeni muškat	SO4	Žugelj, Metlika	kontrola	20
Rumeni muškat	SO4	Žugelj, Metlika	TT	20
Žametna črnina	8BČM	Žugelj, Metlika	kontrola	20
Žametna črnina	8BČM	Žugelj, Metlika	TT	20

Rezultati odganjanja in prirastka so pokazali, da TT ne vpliva negativno na živost in le rahlo negativno na prirast tretiranih cepljenk. Vse cepljenke so preživele proces TT. Tretirane cepljenke so odganjale z rahlo zakasnitvijo, vendar razlike v razvoju niso bile vidne s prostim očesom (avgust 2014). Septembra 2014 smo poskus ocenili s tehtanjem prirastka cepljenk. Rezultati dvosmerne analize variance so pokazali, da imata na težo prirastka statistično značilen vpliv faktorja 'toplotna terapija' in pa 'sorta-podlaga' ($F_{1, 108}=12,0$; $P=0,001$ in $F_{5, 108}=4,22$; $P=0,002$), ne pa tudi njuna interakcija ($F_{5, 108}=2,1$; $P=0,07$), kar z drugimi besedami pomeni, da toplotna terapija različno vpliva na različne kombinacije sorta-podlaga. Naknadni Bonferonnijski post-testi so pokazali, da je TT le pri sorti modra frankinja cepljeni na podlago 5M statistično značilno zmanjšala prirastek cepljenk podvrženih TT (Slika 5).

Poskus bomo ponovno ovrednotili ob koncu rastne sezone 2014 in tudi v 2015.



Slika 5: Rezultati poskusa vpliva TT na živost in vitalnost cepljenk. Cepljenke so bile podvržene TT 22.5.2014. Prirastek je bil ocenjen 4.9.2014. Prikazane so povprečne vrednosti \pm standardna napaka (N=10). Zvezdica (*) označuje statistično značilen vpliv TT na težo prirastka.

5. Učinkovitost uničevanja jajčec ameriškega škržatka s toplotno terapijo

V zadnji fazi projekta smo v seriji poskusov ugotavljali učinkovitost uničevanja jajčec ameriškega škržatka s toplotno terapijo (TT). Spremljali smo preživetje ameriškega škržatka na enoletnem in dvoletnem lesu vinske trte z in brez TT. Toplotno obdelan les smo povezali v snopiče in jih pričvrstili na prej pripravljene cepljenke (chardonnay), ki so služile kot prehrana razvijajočim škržatkom. Skupno smo pripravili 20 vzorcev: 2 tipa lesa (enoletni les, dvoletni les) x 2 postopka (toplotna terapija in brez TT) x 5 ponovitev). Skupna dolžina dvoletnega lesa je bila v ponovitvi 3,2 m, skupna dolžina enoletnega lesa pa 5,6 m. Tako pripravljen toplotno obdelan in neobdelan material smo prekrili s fino mrežo, ki je preprečevala gibanje ličink in škržatkov v okolje (Slika 6). Poskus je potekal od 7.5.2013 do 7.11.2013, ko smo prešteli število odraslih ameriških škržatov, ki so se ujeli na rumene lepljive plošče.



Slika 6: Levo: cepljenke (chardonnay) pripravljene za prehrano razvijajočim škržatom. Sredina: snopiči toplotno obdelanega lesa (in neobdelanega), pričvrščeni na trse namenjene prehrani škržatkom in rumene lepljive plošče, kamor so se lovili uspešno razviti škržatki. Desno: Končna postavitev lončnega poskusa preverjanja preživetja ameriških škržatkov po toplotni obdelavi.

Poskus smo v celoti ponovili v 2014, a se ni v nobenem obravnavanju ulovilo nič škržatov. Verjetno zaradi uspešne vseslovenske kampanje zatiranja škržatka že na izvornem lesu ni bilo dovolj jajčec ameriškega škržatka. Zato prikazujemo le rezultate prve ponovitve poskusa.

Izmed vseh ponovitev in variant poskusa, se je 13 odraslih škržatkov razvilo le na kontrolnih šparonih, se pravi na dvoletnih poganjkih, ki niso bili podvrženi toplotni obdelavi. V obravnavah z enoletnim lesom (rozge), ki je bil bodisi obdelan bodisi neobdelan s TT, se nič škržatkov ni ulovilo na rumene lepljive plošče. Dodatno se ni nič odraslih škržatkov ujelo na rumene lepljive plošče, obešene v mrežnikih z dvoletnim lesom, ki je bil podvržen TT (Slika 7, Tabela 6). Tako rezultati poskusa nakazujejo, da TT poleg razkuževanja FDP, tudi uspešno zatira jajčeca ameriškega škržatka.



Slika 7: Levo: Ameriški škržatki na rumeni lepljivi plošči (kontrola, dvoletni les). Desno: Na enoletnem lesu ni bilo škržatkov.

Tabela 6: Rezultati poskusa zatiranja jajčec *S. titanus* s toplotno terapijo. Prikazane so povprečne vrednosti odraslih škržatov, ulovljenih na rumeno lepljivo ploščo \pm standardna napaka (N=5). Zvezdica (*) označuje statistično značilen vpliv TT število razvitih odraslih ameriških škržatkov.

	Kontrola		Toplotna obdelava	
	Enoletni les	Dvoletni les	Enoletni les	Dvoletni les
Povprečje \pm SN	0,00 \pm 0,00	2,60 \pm 1,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00*
St. deviacija	0,00	2,41	0,00	0,00

6. Sklepi

1. Vpliv toplotne terapije na FDp:

- a. Toplotna terapija uspešno uniči FDp v rozgah, namenjenih cepljenju.

2. Prenos FDp s cepljenjem:

- a. FDp se lahko prenese s cepljenjem, čeprav je to malo verjetno. Od več kot 70 ponovitev cepljenja smo uspešno okužili le eno rastlino v okviru pomladnega cepljenja.

3. Vpliv toplotne terapije na viabilnost in vitalnost potaknjencev:

- a. Toplotna terapija ni negativno vplivala na preživetje (viabilnost) s FDp okuženih ali neokuženih potaknjencev.
- b. Toplotna terapija je izboljšala odganjanje (vitalnost) potaknjencev, okuženih s FDp.

4. Vpliv toplotne terapije na viabilnost in vitalnost cepljenk:

- a. Toplotna terapija ni negativno vplivala na preživetje (viabilnost) cepljenk.
- b. Toplotna terapija je različno vplivala na različne kombinacije sorta-podlaga.
- c. Toplotna terapija je le pri sorti modra frankinja, cepljeni na podlago 5M, statistično značilno zmanjšala prirast cepljenk.

5. Vpliv toplotne terapije na preživetje ameriškega škržatka:

- a. Toplotna terapija je uspešno zavrla razvoj, oziroma uničila jajčeca ameriškega škržatka.
- b. Ameriški škržatek se je razvil le na dvoletnem lesu, ki ni bil podvržen toplotni terapiji.

7. Diseminacija rezultatov

1. ZIDARIČ, Igor, **RAZINGER, Jaka**, **ŠKERLAVAJ, Vojko**. Biotična učinkovitost insekticidov pri zatiranju ameriškega škrtatka *Scaphoideus titanus* Ball (1932), v vinorodni deželi Posavje v letih 2011 in 2012 = Field efficacy evaluation of several insecticides against *Scaphoideus titanus* Ball (1932) in wine-growing region Posavje conducted in years 2011 and 2012. V: TRDAN, Stanislav (ur.), MAČEK, Jože (ur.). 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 = Lectures and papers presented at the 11th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation (and The Round Table of Risks Reduction in Phyto-pharmaceutical Products Use in the Frame of CropSustaIn Project), Bled, March 5-6 2013. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2013, str. 348-353. [COBISS.SI-ID 4314984]
2. ZIDARIČ, Igor, **RAZINGER, Jaka**, **ŠKERLAVAJ, Vojko**, URBANČIČ ZEMLJIČ, Meta. Biotična učinkovitost insekticidov pri zatiranju ameriškega škrtatka *Scaphoideus titanus* Ball (1932), v vinorodni deželi Dolenjska v letih 2011 in 2012 = Field efficacy evaluation of several insecticides against *Scaphoideus titanus* Ball (1932) in wine-growing region Dolenjska conducted in years 2011 and 2012. V: TRDAN, Stanislav (ur.). Izvlečki referatov = Abstract volume. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2013, str. 113-114. [COBISS.SI-ID 4106856]
3. **RAZINGER, Jaka**. Preučevanja bionomije ameriškega škrtatka *Scaphoideus titanus* BALL : predavanje na delavnici Zlata trsna rumenica, Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije, 6. dec. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3730280]
4. **RAZINGER, Jaka**. Prenos zlate trsne rumenice s cepljenjem in toplotna terapija : predavanje na Delavnici o zlati trsni rumenici, Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije, 23. maj 2014. 2014. [COBISS.SI-ID 4472424]
5. **ŠKERLAVAJ, Vojko**. Preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Golobinjek (Mirna peč), 19. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3673448]
6. **ŠKERLAVAJ, Vojko**. Preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Kostrevnica pri Litiji, 2. sep. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3673704]
7. **ŠKERLAVAJ, Vojko**. Preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Nova Gora (Straža), 14. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3671144]

8. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Novi Ljuben (Uršna sela), 18. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3673192]
9. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Soteska pri Novem mestu, 15. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3671656]
10. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Stara Gora (Dolenja Straža), 14. jul. 2011., 2011. [COBISS.SI-ID 3671400]
11. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Straška Gora, 15. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3672936]
12. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Zatiranje ameriškega škržatka in drugi preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Gradišče pri Trebnjem, 29. jun. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3669608]
13. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Zatiranje ameriškega škržatka in drugi preventivni ukrepi za preprečevanje širjenja zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Šentrupert, 6. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3669864]
14. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Zatiranje ameriškega škržatka, prenašalca zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Boršt (Dvor pri Žužemberku), 7. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3670120]
15. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Zatiranje ameriškega škržatka, prenašalca zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Liseč, Dobrnič, 8. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3670376]
16. **ŠKERLAVAJ, Vojko.** Zatiranje ameriškega škržatka, prenašalca zlate trsne rumenice : predavanje in delavnica, Stara gora (Dvor pri Žužemberku), 12. jul. 2011. 2011. [COBISS.SI-ID 3670632]

8. Literatura

- Boudon-Padieu E., Grenan S., 2002. Hot water treatment. INRA, Dijon, 3 pp.
- Caudewell A., Larrue J., Boudon-Padieu E., McLean G. D. 1997. Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. Australian Journal of Grape and Wine Research 3: 21-25.
- Caudewell, A. 1966. L'inhibition in vivo du virus de la FD par la chaleur. Annales des Epiphyties.
- Panattoni A., Triolo E., 2010. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. Scientia Horticulturae 125, 63–67.
- Weintraub in Jones, 2010, PHYTOPLASMAS, Genomes, Plant Hosts and Vectors. CAB International, ISBN-13: 978 1 84593 530 6, Cambridge, MA 02139 2010, 348 pp.

Raziskovalni projekt **V4-1103** v sklopu Ciljnega raziskovalnega programa
»Zagotovimo.si hrano za jutri«

Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja

KONČNO POROČILO

Delovni sklop 3:

**Izdelava modela za napovedovanje zatiranja ameriškega
škržatka na osnovi njegove bionomije in določitev
življenjskega prostora ter migracij njegovih populacij**

Izvajalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
Poročilo pripravil: dr. Magda Rak Cizej

Ljubljana, 15. september 2014

Vsebina

Uvod	3
Spremljanje dinamike razvoja ameriškega škržatka v nadzorovanih razmerah.....	3
Določitev temperaturnih pragov (začetek izleganja ličink, čas za zatiranje nimf ameriškega škržatka) in izdelava modela za napovedovanje zatiranja	9
Določitev življenjskega prostora in migracij populacij ameriškega škržatka	12
Sklepi.....	12
Diseminacija rezultatov	13
Literatura	13

Uvod

V Evropi je edini znani prenašalec FDP na vinski trti ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball.) (Cicadellidae). *S. titanus* je edina vrsta tega severnoameriškega rodu, ki je bila uvedena v Evropo (Bonfils in Schvester, 1960) in je danes razširjena v Franciji, Italiji, Španiji, Portugalski, Balkanu (Boudon-Padieu, 2002; Bertin in sod., 2007). V zahodni Sloveniji je bil prvič najden leta 1983, danes pa je razširjen v vseh vinorodnih deželah (Seljak, 2008).

Ameriški škržatek se pojavlja povsod, kjer so zimske temperature dovolj nizke za prekinitev diapavze, poletne temperature pa omogočajo dokončanje življenjskega cikla. Samice odlagajo jajca v razpoke v lubju ali v brste. Izlegati se začno v začetku maja in izleganje lahko traja do 8 tednov. Razvoj vključuje pet larvalnih stopenj. Brezkrile ličinke se hranijo na spodnji strani listov vinske trte. Čeprav zadnja larvalna stopnja lahko traja do konca avgusta, se lahko, odvisno od podnebja, prvi odrasli primerki pojavijo že sredi julija. Odrasle samice živijo dlje kot samci in do smrti v septembru odlagajo jajca. Hitro širjenje FD v vinogradu je povezano z monofagnostjo ameriškega škržatka na vinski trti. V Severni Ameriki je ameriški škržatek omejen le na divji vrsti *Vitis* sp., v Evropi pa je vrsta prisotna na gojeni vinski trti (*Vitis vinifera*) kot tudi na matičnih podlagah vinske trte (Bertin in sod., 2007). Privzem fitoplazme FDP je povezan s hranjenjem z okuženim floemskim sokom. Žuželka postane kužna 30 dni po prevzemu. V tej latentni fazi se FDP premika od črevesa do žlez slinavk. Ker se fitoplazme ne prenesejo na potomce ameriškega škržatka, je njihovo preživetje povezano s privzemom v vsaki novi generaciji. Privzem se v vinogradu začne z izleganjem. Če je rastlina okužena, lahko FDP privzamejo že s prvim hranjenjem. Ličinke bodo postale kužne po štirih do petih tednih in ostale kužne do smrti. Razvojni krog ameriškega škržatka je odvisen predvsem od klimatskih dejavnikov. Medtem ko se izleganje ličink začne prej, če so jajčeca izpostavljena mrzlim zimam, na dolžino izleganja zimske temperature ne vplivajo bistveno (Chuche s sod., 2009; Rak Cizej s sod., 2011).

Ameriški škržatek se s preletom lahko premika le na kratke razdalje (Bressan in sod., 2006). Na dolge razdalje se lahko širi le z rastlinskim sadilnim materialom – trsi, cepiči, podlagami in cepljenimi rastlinami, na katerem so njegova jajčeca.

V Evropi ameriški škržatek nima pomembnih naravnih sovražnikov, tako da ga učinkovito nadzorujemo le z insekticidi. Zaradi nevarnosti širjenja FDP z okuženimi cepiči, podlagami in trsnimi cepljenkami, je obvezno zatiranje ameriškega škržatka v vseh matičnih vinogradih, matičnjakih, trsnicah, v žariščih okužbe in v varnostnih območjih. Za učinkovito zatiranje ameriškega škržatka s pravočasno uporabo insekticidov za zatiranje nimf je izjemno pomembni začetek izleganja ličink, dolžina izleganja in dolžina posameznih razvojnih stadijev ličink (Rigamonti in sod. 2011).

ZAPISAN CILJ_USTREZNO PRILAGODITI

Z boljšim poznavanjem binomije ameriškega škržatka, z ugotovitvijo dolžine razvoja posameznih stadijev ličnik in nimf bodo rezultati projekta pomembno prispevali za izdelavo modula za pravočasno in učinkovito uporabo insekticidov za njegovo zatiranje v skladu s smernicami IPM in posledično zmanjšanje prenosa fitoplazme GFD.

Spremljanje dinamike razvoja ameriškega škržatka v nadzorovanih razmerah

Za preučevanje bionomije ameriškega škržatka v nadzorovanih razmerah smo v letu 2012 in 2013 v nadzorovanih razmerah (rastni komori) natančno spremljali dinamiko razvoja ameriškega škržatka. V ta namen smo iz štirih vinogradov, različnih vinorodnih območij (Primorska, Posavje, Podravje,

Štajerska; Šmarsko -Virštanjski podokoliš), v katerih je bila v predhodnih letih ugotovljena večja prisotnost ameriškega škržatka, nabrali dvoletni les vinske trte. Pogoji v komori (proizvajalca Kambič iz Novega mesta) so bili 21 °C in 70 % relativna zračna vlaga in dolžina osvetlitve 15 ur. Za vsako lokacijo posebej smo pripravili 15 insektarijev, v vsakega smo dali po 10 dvoletnih rozg, dolžine 15 cm. Premer rozg je bil v povp. 1,1 - 1,3 cm. Na dnu insektarija smo dali vermikulit za vzdrževanje vlage, nanj položili filter papir in nato dodali narezane rozge. V vsakem insektariju je bila epruveta z vodo, v njej svež list vinske trte, sorte Chardonnay, za prehrano škržatkov, in o dejstvu, da na listu tudi najhitreje opazimo izlegle ličinke ameriškega škržatka. Bionomijo ameriškega škržatka v rastni komori smo v letu 2012 pričeli spremljati 30. marca, v letu 2013 pa 11. aprila. Izleganje ličink v insektarijih smo pregledovali na vsaka dva dni, kjer smo preštevali na novo izlegle ličinke.



Slika 1: Gojenje ameriškega škržatka v rastni komori (foto: Rak Cizej M.)

Prve izlegle ličinke ameriškega škržatka smo v komori v letu 2012 našli 30. aprila in sicer na rozgah iz Vipave in Maribora. Na lokaciji Vrenska Gorca so se ličinke pričele izlegati 3 dni kasneje. Na rozgah nabranih v bližini Novega mesta pa smo na žalost našli le 2 ličinke ves čas opazovanja, zato za to lokacijo ne moremo podati relevantnih zaključkov. Razlog za to je, da je lastnik vinograda že dve leti zapored izvajal načrt ukrepov zatiranja ameriškega škržatka in ga tudi uspešno zatrl.

Dolžina izleganja ličink ameriškega škržatka v rastni komori pri temp. 21 °C in 70 % vlagi, fotoperiodi 15/9 je bila v povprečju 74 dni, torej več kot 2 meseca.

Preglednica 1: Rezultati gojenja ameriškega škržatka v rastni komori v letu 2012

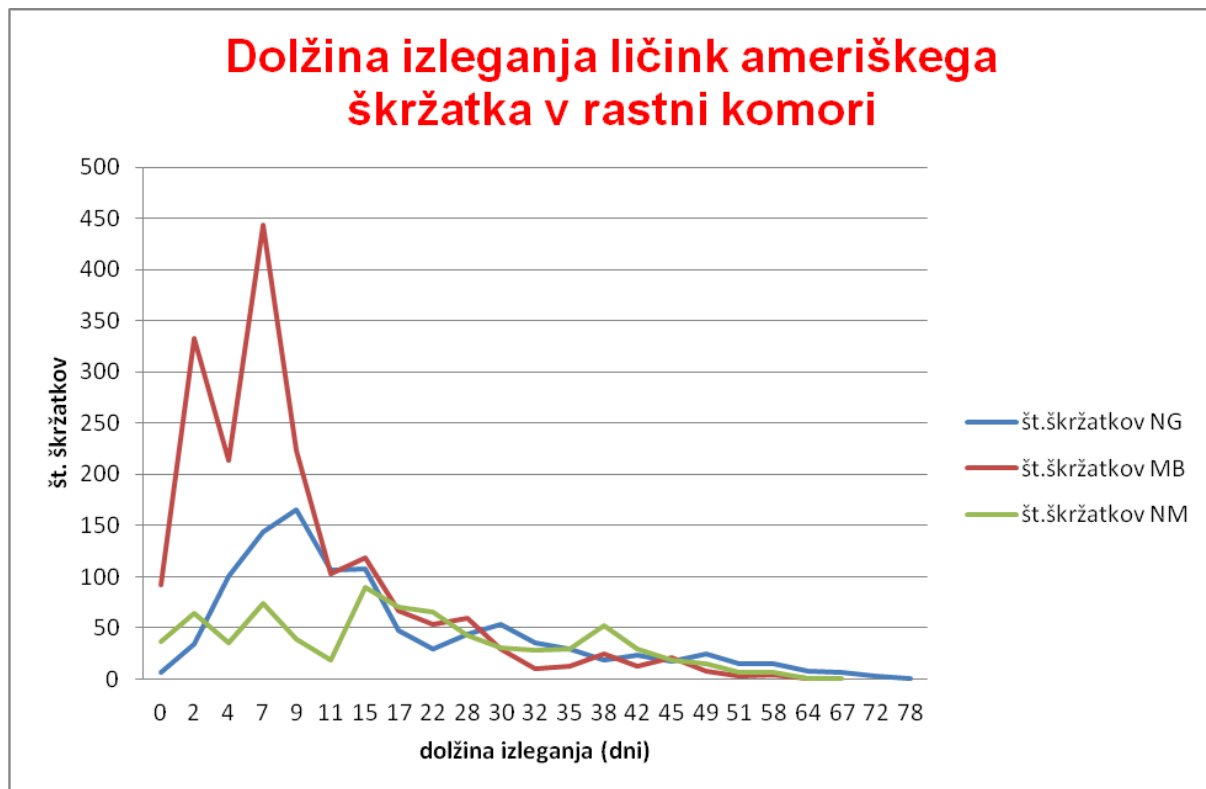
Lokacija	Sorta vinske trte	Začetek gojenja	Začetek izleganja ličink	Konec izleganja ličink	Dolžina izleganja ličink (dni)	Skupno št. izleglih ličink/lokacijo
Nova Gorica	Cabernet sauvignon	30.3.2012	30.4.2012	16.7.2012	75	599
Stražnji vrh (Črnomelj)	Laški rizling	30.3.2012	*	*	*	2*
Košaki (Maribor)	Rizvanec	30.3.2012	30.4.2012	16.7.2012	75	445
Vrenska Gorca (Imeno)	Laški rizling	30.3.2012	3.5.2012	16.7.2012	72	538

*skupno sta se izlegli le dve ličinki

Dejstvo je, da vpliv zimskih temperatur, katerim so izpostavljene rozge, nima vpliva na celotno dolžino izleganja ličink, ima pa velik vpliv na intenziteto izleganja, saj se ličinke v krajih, kjer so mrzle zime hitreje izleže večji del ličink, kot v krajih z blago, milo zimo. Da se izleže 50 % ličink ameriškega škržatka se v krajih z mrzlo zimo v povprečju potrebuje 21 dni, v krajih z milimi zimami je za enak delež izleglih ličink potrebno 36 dni.

Preglednica 2: Dolžina izleganja ličink ameriškega škržatka v rastni komori v letu 2012

Lokacija	Št. dni od začetka izleganja		
	25 % izleženih	50 % izleženih	75 % izleženih
Vrenska Gorca	14	25	39
Maribor	9	18	32
Nova Gorica	21	36	49



Preglednica 3: Rezultati gojenja ameriškega škrdatka v rastni komori v letu 2013

Lokacija	Sorta vinske trte	Začetek gojenja	Začetek izleganja ličink	Konec izleganja ličink	Dolžina izleganja ličink (dni)	Skupno št. izleglih ličink/lokacijo
Nova Gorica	Cabernet sauvignon	11.4.2013	13.5.2013	19.7.2013	68	152*
Novo mesto	Laški rizling	11.4.2013	10.5.2013	31.7.2013	82	152*
Maribor	Rizvanec	11.4.2013	13.5.2013	12.7.2012	63	39*
Vrnska Gorca (Imeno)	Laški rizling	11.4.2013	17.5.2013	5.8.2013	86	57*

*Št. skupno izleženih ličink ameriškega škrdatka je bilo manjše v primerjavi z l. 2012, kajti v vinogradih se uporabljajo insekticidi, ki uspešno zmanjšujejo populacijo.

Preglednica 4: Dolžina izleganja ličink ameriškega škrdatka v rastni komori v letu 2013

Lokacija	Št.dni od začetka izleganja		
	25%	50%	75%
VG	10	17	35
MB	7	10	19
NG	14	19	45
NM	10	14	26
Povp. mrzle zime	9	14	27
Povp. mile zime	14	19	45

Zaradi ekstremne zime 2012/13 je razlika med kraji z blagimi in mrzlimi zimami ni velika tako je bilo potrebno za 50 % izleglih ličink v krajih z mrzlimi zimami 14 dni, z milimi pa 19 dni. Da se je v letu 2013 v komori izleglo 75 % ličink ameriškega škržatka, pa v milih zimah potrebujemo 45 dni, v primerjavi s kraji z mrzlimi zimami, kjer se je v letu 2013 potrebovalo le 27 dni (preglednica 4).

Izlegle ličinke ameriškega škržatka smo dali ločeno v Mungerjeve komore, kjer smo za prehrano ličink uporabili liste vinske trte, sorte Chardonnay. Tako smo nadalje spremljali dolžino razvoja posameznih stadijev ličink in nimf ameriškega škržatka, pod enakimi pogoji v rastni komori (21 °C in 70 % vlagi, fotoperiodi 15/9) kot smo spremljali izleganje ličink iz jajčec.



Slika 21: Gojenje posameznih stadijev ličink in nimf ameriškega škržatka v Mungerjevih komorah, katere smo dali v rastno komoro (foto: Rak Cizej M.)

Za razvoj posameznih stadijev ličink se potrebuje različno dolgo. Najdaljši razvoj so v letu 2012, poleg imaga, imele ličinke drugega razvojnega stadija L2 (v povp. 11 dni), najkrajše pa so imele razvoj ličinke L1 (v povp. le 6,5 dni) kot tudi L4. Skupno je v komori razvoj ličink ameriškega škržatka v letu 2012 (od L1 do L5) v povprečju trajal 44,56 dni (preglednica 5). Med posameznimi območji, kraji ni bilo razlik v dolžini razvoja posameznih razvojnih stopenj ličink in nimf ameriškega škržatka.

Preglednica 5: Dolžina razvoja posameznih razvojnih stadijev ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus*) v rastni komori v letu 2012

	Povp. dolžina izleganja (dni)					
	L1	L2	L3	L4	L5	SKUPAJ
Maribor	6,58	10,73	9,05	8,33	10,80	45,49
Nova Gorica	6,52	12,15	9,04	5,40	10,18	43,29
Vrenska Gorca (Celje)	5,50	10,66	11,95	6,12	10,20	44,43
Novo mesto*	6,87	12,83	8,80	7,20	7,30	43,00
Povp. (dni)	6,50	11,11	9,73	6,92	10,30	44,56

*izleglih le 10 ličink

Preglednica 6: Dolžina razvoja posameznih razvojnih stadijev ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus*) v rastni komori v letu 2013

	Povp. dolžina izleganja (dni)					
	L1	L2	L3	L4	L5	SKUPAJ.
Maribor	3,79	12,73	9,43	8,36	12,3	46,61
Nova Gorica	3,94	10,63	9,50	6,64	12,84	43,55
Vrenska Gorca (Celje)	3,80	10,26	10,42	9,24	12,57	46,29
Novo mesto	3,83	11,64	9,88	6,08	15,00	46,43
Povp. (dni)	3,84	11,32	9,81	7,58	13,18	45,72

Tudi v letu 2013 je bila dolžina razvoja ličink in nimf ameriškega škržatka različno dolga, podobno kot v letu 2012, le da je bila dolžina razvoja prve razvojne stopnje ličink L1 zelo kratka in je v povprečju trajala le 3,84 dni (preglednica 6). Za 3 dni daljši razvoj pa so imele v letu 2013 nimfe L5 in sicer skupaj v povp. 13,30. Druge faze pa so bile po dolžini primerljive z letom 2012. Skupna dolžina razvoja ličink in nimf od L1 do L5 pa je bila enaka kot v letu 2012 in sicer v povprečju 45,72 dni (preglednica 6).

Bionomijo ameriškega škržatka smo spremljali tudi na prostem - v meteorološkem vrtu na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu. V ta namen smo v večje insektarije (za vsako lokacijo imeli 4

ponovitve) dali dvoletne rozge (35 rozg dolžine 30 cm/insektarij). Po enakem postopku kot v rastni komori smo spremljali izleganje ličink in dolžino trajanja posameznih stadijev ličink.



Slika 2: Spremljanje bionomije ameriškega škržatka na prostem, meteorološki vrt, Žalec (foto: Rak Cizej M.)

Določitev temperaturnih pragov (začetek izleganja ličink, čas za zatiranje nimf ameriškega škržatka) in izdelava modela za napovedovanje zatiranja

Za izdelavo modela za napovedovanje zatiranja ameriškega škržatka na osnovi temperaturnih pragov razvoja posameznih razvojnih stadijev, določenih v rastni komori in spremljani na prostem (v vinogradu). Pri tem smo zabeležili začetek izleganja ličink (upoštevali temp. prag 5 °C, ter dolžino razvoja ličink in nimf glede na vsoto efektivnih temperatur nad pragom 8,7 °C.

Preglednica 7: Primerjava vsote efektivnih temperatur potrebnih za razvoj posamezne faze razvoja ličink ameriškega škržatka na prostem, v meteorološkem vrtu Žalec, v letu 2012

	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L1	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L2	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L3	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L4	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L5
Meteorološki vrt, Žalec	79,81	145,94	118,44	64,85	119,90
Vsota efekt. temp. nad pragom 8,7 °C:		225,75	344,19	409,05	523,94*

*V l. 2012 je glede na povp. temp. zraka to predstavljalo 39 dni.

Glede na vse pridobljene podatke v rastni komori in na prostem (meteorološkem vrtu), smo preliminarno preračunali temperaturne vsote začetka izleganja ličink, pri čemer smo vzeli spodnji temperaturni prag 5°C, ki ga pričnemo računati od 15. Novembra do začetka izleganja ličink. Za nadaljnji razvoj ličink ameriškega škržatka smo vzeli spodnji temperaturni prag 8,7°C in izračunali dolžine posameznih razvojnih stadijev ličink ameriškega škržatka. Vse efektivne temperature nad obema pragovoma smo preliminarno preverjali z dejanskim pojavom ameriškega škržatka v vinogradih, tako v Brnici, Liboje pri Žalcu kot tudi v Žičah pri Slovenskih Konjicah.

Preglednica 8: Primerjava vsote efektivnih temperatur nad pragom 8,7°C potrebnih za razvoj posamezne faze v rastni komori in na prostem, Žalec, v letu 2012

	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L1	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L2	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L3	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L4	Vsota efektivnih temperatur za izleganje L5
Rastna komora	76,64	136,59	119,65	85,07	136,64
Vsota efekt. temp.:		213,23	332,88	417,95	544,59
Žalec (meteorološki vrt) in Brnica	79,81	145,94	118,44	64,85	119,90
Vsota efekt. temp. nad pragom 8,7 °C:		225,75	344,19	409,05	523,94

Pri preračunu smo ugotovili, da pridobljene vsote efektivnih temperatur nad pragom 8,7 °C potreben za razvoj posamezne faze ameriškega škržatka v nadzorovanih razmerah bistveno ne odstopa od podatkov na prostem na lokaciji v Žalcu.

Preglednica 9: Vsota efekt. temp za razvoj ličink ST na prostem; (primerjalno Žalec in Maribor v letu 2012)

Leto 2012	Vsota temp. nad pragom 8,7 °C				
	L1	L2	L3	L4	L5
Žalec	79	145	118	64	119
Skupaj	79	225	344	409	523
MB	79	170	106	87	122
Skupaj	79	249	354	442	564

Med lokacijo Žalec in Maribor ni bistvenih v dolžini razvoja ličink ameriškega škržatka, saj gre za lokaciji s podobnimi vremenskimi razmerami tudi v času zime.

Preglednica 10: Napoved pojava ličink in imaga ameriškega škržatka v letu 2013, Šmarsko-Virštanjski okoliš (na prostem, v vinogradu)

Vsota efekt. temp. nad pragom 8,7 °C za razvoj ličink – v komori	DD				
	L1	L2	L3	L4	L5
	57	150	308	403	528
Datum pojava	28.5.2013	15.6.2013	25.6.2013	5.7.2013	15.7.2013
			23.6.- napovedali 1. aplikacijo insekticida 3.7.2013		Pojav imaga 9.7.2013
					17.7.2013- napovedali 2. aplikacijo (0b pojavu imaga) 22.7.2013

Določitev življenjskega prostora in migracij populacij ameriškega škržatka

Za določevanje življenjskega prostora ameriškega škržatka in njegove migracije smo na dveh lokacijah postavili rumene lepljive plošče v vinogradu kot tudi izven njega, ter ob robu gozda. Ugotovili smo, da obstaja migracija ameriškega škržatka v nasadu, ki je tudi omejena. Migracija izven vinograda, v oddaljenosti cca. 50 m od vinograda pa smo ameriškega škržatka na lepljivih ploščah našli le enkrat za razliko, da pa je bila populacija ameriškega škržatka v vinogradu številčna (preglednica 11).

Preglednica 11: Migracija ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus*) v letu 2013

Lokacija	Datum postavitve	Datum pobiranja	Perioda	Plošče v vinogradu			Skupaj ST	Plošče izven vinograda		
				Plošča 1	Plošča 2	Plošča 3		Plošča 50m	Plošča 100m	Plošča 150m
Vinska gora	30.7.2013	6.8.2013	7	4	21	33	58			1
	6.8.2013	20.8.2013	14	2	11	17	30		1	
	20.8.2013	4.9.2013	14	3	12	4	19		1	
Andraž nad Polzelo	29.7.2013	5.8.2013	7	24	28	2	54			
	5.8.2013	19.8.2013	14	12	7	2	21			1

Sklepi

1. Raziskava je pokazala, da nizke zimske temperature vplivajo na intenziteto začetnega izleganja ličink ameriškega škržatka. Tako se ličinke ameriškega škržatka najhitreje izlegajo v krajih z mrzlimi zimami, v nasprotju pa v krajih z milimi zimami potrebujejo za enak delež izleglih ličink tudi od 10 do 25 dni več.
2. Ni pa razlik med dolžina izleganja ličink ameriškega škržatka v nadzorovanih razmerah med območji z milimi zimami in pa bolj ekstremnimi niskimi temperaturami in se pri vseh trajala v povprečju 72 dni.
3. Najkrajši čas razvoja so imele ličinke L1 in sicer v povp. v letu 2013 tudi 3,84 dni, v letu 2012 pa 6,5 dni, sledile so ličinke L4 (v povp. med 7 in 8 dni), nato so sledile ličinke L2 in L3, ki so imele razvoj približno enako dolg in sicer 10 dni. Njadaljši razvoj so imele ličinke zadnjega razvojnega stadija L5 in sicer tudi do 12, 92 dni v letu 2013. Povprečna dolžina razvoja ličink ameriškega škržatka (od L1 do L5) v nadzorovanih razmerah v obeh letih je bila v povp. 44 dni.
4. Za začetek izleganja ličink ameriškega škržatka potrebujemo v krajih z milo zimo vsoto cca. 730 stopinj nad 5°C temp. pragom, za razliko v krajih z ostrimi zimami, kje rje ta vsota od 550 do 630.
5. Za celoten razvoj ličink in nimf ameriškega škržatka (od L1 do L5) se potrebuje vsota
6. Pridobljeni podatki razvoja (bionomije) ameriškega škržatka v nadzorovanih razmerah so zasnova za model napovedovanje zatiranja ličink in odraslih osebkov ameriškega škržatka

Diseminacija rezultatov

RAK CIZEJ, Magda, FERLEŽ RUS, Alenka, PERSOLJA, Jolanda, RADIŠEK, Sebastjan. Preučevanje bionomije ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus* Ball) = The study on bionomics of leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball. V: MAČEK, Jože (ur.), TRDAN, Stanislav (ur.). *Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Podčetrtek, 1.-2. marec 2011 = Lectures and papers presented at the 10th Slovenian Conference on Plant Protection, Podčetrtek, March 1-2 2011.* Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2011, str. 133-138. [COBISS.SI-ID [597388](#)]

PERSOLJA, Jolanda, LEŠNIK, Mario, KNAPIČ, Matej, KNAPIČ, Vlasta. Varnostni pasovi površinskih voda in vinogradništvo : omejitve in rešitve na primeru trsnih rumenic. V: MAČEK, Jože (ur.), TRDAN, Stanislav (ur.). *Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Podčetrtek, 1.-2. marec 2011 = Lectures and papers presented at the 10th Slovenian Conference on Plant Protection, Podčetrtek, March 1-2 2011.* Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2011, str. 145-150. [COBISS.SI-ID [3667048](#)]

LATINOVIĆ, Nedeljko, RAK CIZEJ, Magda, LESKOŠEK, Gregor, LATINOVIĆ, Jelena. Značaj količine vode i načina tertiranja u zaštiti vinove loze od plamenjače. V: *10. Simpozijum o zaštiti bilja u BIH, Sarajevo, 5-7. 11. 2013. godine : zbornik radova.* Sarajevo: Društvo za zaštitu bilja u Bosni i Heregovini, 2013, str. 63-64. [COBISS.SI-ID [632204](#)]

RAK CIZEJ, Magda, FERLEŽ RUS, Alenka, PERSOLJA, Jolanda, RADIŠEK, Sebastjan, DERMASTIA, Marina. Razvoj modela za napovedovanje zatiranja ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus* Ball) : preliminarni rezultati = Development phenology model for management American leafhopper (*Scaphoideus titanus* Ball) : preliminary results. V: TRDAN, Stanislav (ur.). *Izvečki referatov = Abstract volume.* Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2013, str. 78-79. http://www.dvrs.bf.uni-lj.si/izvlecki/Zbornik_%20izvleckov_13.pdf. [COBISS.SI-ID [615820](#)]

FERLEŽ RUS, Alenka (intervjuvanec). *Trsne rumenice : jutranji kmetijski nasveti.* Ljubljana: Radio Ognjišče, Jutranji kmetijski nasveti, 31.5.2012. [COBISS.SI-ID [581772](#)]

Literatura

- Boudon-Padieu E. 2002. Flavescence dorée of the grapevine: knowledge and new developments in epidemiology, etiology and diagnosis. *ATTI Giornate Fitopatologiche* 15-34.
- Bertin S., Guglielmino R.C., Karam N., Gomulski L.m., Malacrida A.R., Gasperi G., 2007. Diffusion of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball in Europe: a consequence of

- human trading activity. *Genetica* 131: 275-285.
- Bressan s sod. 2006. Patterns of phytoplasma-infected and infective *Scaphoideus titanus* leafhoppers in vineyards with high incidence of Flavescence dorée. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119: 61-69.
- Chuche J., Thiéry D., 2009. Cold winter temperatures condition the egg-hatching dynamics of a grape disease vector. *Naturwissenschaften* 96: 827-834.
- Rigamonti I., Jermini M., Fuog D., Baumgärtner J. 2011. Towards an improved understanding of the dynamics of vineyard-infesting *Scaphoideus titanus* leafhopper populations for better timing of management activities. *Pest Management Science*.
- Seljak G. 2008. Distribution of *Scaphoideus titanus* in Slovenia: its new significance after the first occurrence of grapevine "flavescence dorée. *Bulletin of Insectology* 61: 201-202.

Raziskovalni projekt **V4-1103** v sklopu Ciljnega raziskovalnega programa
»Zagotovimo.si hrano za jutri«

Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja

KONČNO POROČILO

Delovni sklop 4: **Določitev potencialnih genskih označevalcev okužbe s FDp v zgodnjih stopnjah okužbe**

Izvajalec: Nacionalni inštitut za biologijo
Poročilo pripravila: Marina Dermastia

Ljubljana, 15. september 2014

Vsebina

Uvod	3
Bioinformatška in biostatistična analiza diferencialno izraženih genov po okužbi vinske trte z BNp	3
Analiza izbranih genov na rastlinah vinske trte, okužene s FDp	5
Sklepi.....	7
Diseminacija rezultatov	8
Literatura	9

Uvod

Z današnjim poznavanjem interakcije med vinsko trto in povzročiteljicami trsnih rumenic ne moremo diagnostično slediti zgodnjim okužbam rastline ali prikritim okužbam. Geni, ki bi se v času odsotnosti bolezenskih znamenj izrazili v domnevno okuženih rastlinah, bi pomembno prispevali k zgodnjemu odkrivanju obolelih rastlin in njihovemu uničenju pred potencialno razširitvijo okužbe. Ker splošno razširjena fitoplazma BNp iz skupine stolbur (16SrXII) (Lee in sod., 1998) povzroča enaka bolezenska znamenja kot karantenska FDp, domnevno z enakimi mehanizmi, jo lahko uporabimo kot modelni organizem za proučevanje interakcije med fitoplazmo in gostiteljsko rastlino vinsko trto.

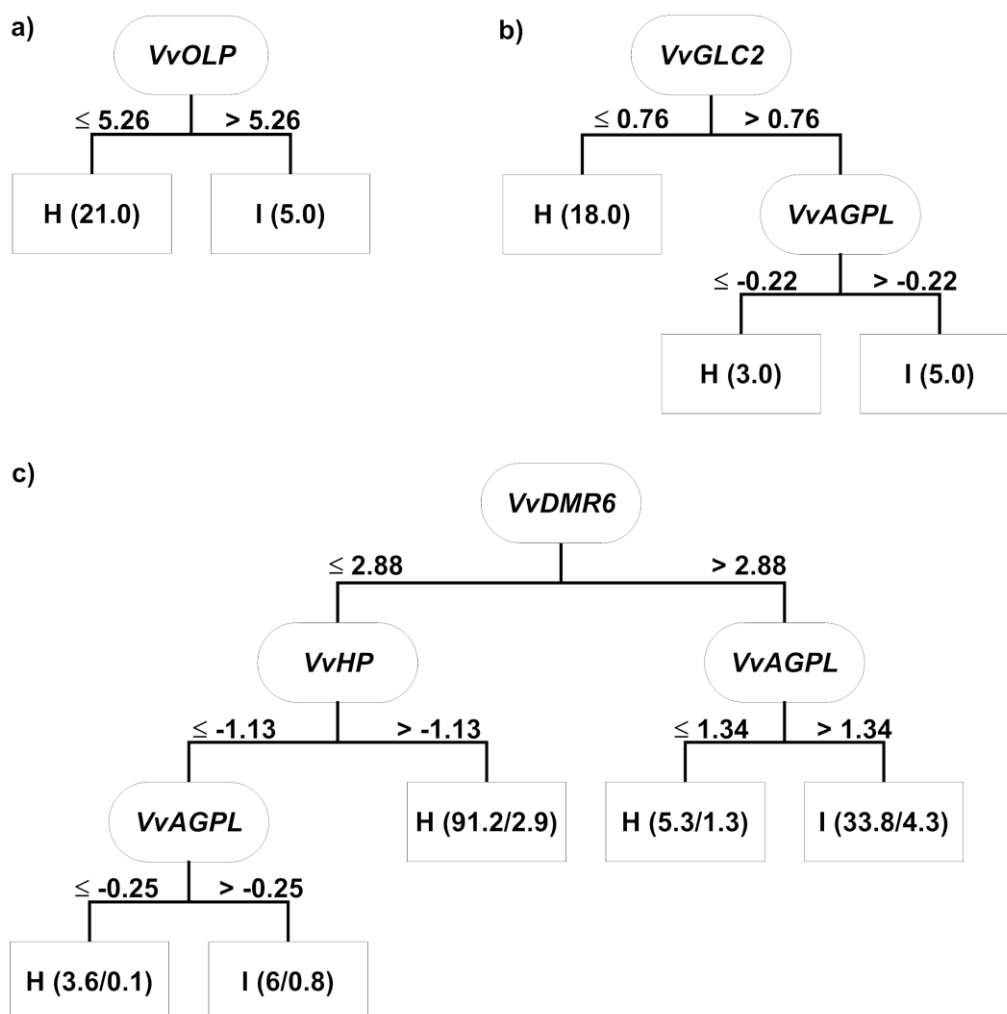
Transkriptomska analiza genov vinske trte po okužbi z BNp je pokazala korelacije med razvojem bolezni in določenimi geni, ki bi lahko pomagali pri detekciji bolezni v zgodnjih stopnjah okužbe pred pojavom bolezenskih znamenj ali pri prikritih okužbah (Hren s sod., 2009; Nikolić, 2011). Cilj tega sklopa raziskav je bil z bioinformatičnimi pristopi in statističnimi analizami med temi geni določiti take, ki bi že zgodaj določili zdravstveni status rastline po okužbi z BNp in FDp.

Bioinformatična in biostatistična analiza diferencialno izraženih genov po okužbi vinske trte z BNp

Na osnovi literaturnih podatkov smo za nadaljnje analize izbrali take statistične metode, ki so nam razkrile gene, ki vsebujejo največ informacij oz. katerih izražanje je najbolj informativno za opis sistema. Izrisali smo različna odločitvena drevesa, s katerimi smo z uporabo manjšega števila genov in določitvijo meje njihovega izražanja lahko zanesljivo ugotovili, ali je v neznanem vzorcu okužena ali zdrava rastlina. Z uporabo diskriminantne analize smo nato ugotavljali ali izbrani geni dovolj dobro ločujejo med razredoma zdrave / okužene rastline.

V predhodnih poskusih smo v šestih zaporednih sezonah spremljali iste rastline v delujočem vinogradu v Vipolžah v Goriških Brdih, zasajenem s sorto chardonnay in okuženem s fitoplazmo BNp. Na osnovi testiranja z metodo PCR v realnem času na pripadnost fitoplazme BNp (Hren s sod., 2007) smo analizirane rastline smo razdelili v 4 skupine: zdrave skozi celotno obdobje spremljanja, okužene skozi celotno obdobje spremljanja, ozdravele ter ozdravele in ponovno okužene. Analizo smo trikrat ponovili. Najprej smo uporabili samo rastline pred izraženimi bolezenskimi znamenji (vzorčene junija), nato samo rastline z bolezenskimi znamenji (vzorčene avgusta). Pri tretji analizi smo vse podatke združili. Na istih rastlinah iz šestih sezon smo z metodo PCR v realnem času testirali 22 genov, ki so bili diferencialno izraženi na mikromrežah. Statistične analize so pokazale, da so potencialno zanimivi genski označevalci zgodnje bolezni geni *VvDMR6* s še nepoznano fiziološko vlogo, *VvOLP*, gen za protein povezan s patogenezo iz razreda 5, *VvGLC2*, gen za glukanozo iz skupine proteinov povezanih s patogenezo iz razreda 2, *VvHP*, histidin vsebujoč protein za prenos fosfata, vpleten v citokininsko signalno transdukcijo in *VvAGPL*, gen vključen v sintezo škroba. V nadaljevanju smo nato z dodatnimi statističnimi analizami poskušali zožiti nabor genov in jih tudi testirati na realnih vzorcih tekoče sezone.

Pripravili smo tri tipe odločitvenih dreves (Slika 1). Prvo predvideva zdravstveni status rastlin spomladi pred pojavom bolezenskih znamenj, na osnovi podatkov o genskem izražanju v rastlinah pred pojavom bolezenskih znamenj. Drugo odločitveno drevo predpostavlja zdravstveni status poleti, po pojavu bolezenskih znamenj, na osnovi vzorčenja pred pojavom bolezenskih znamenj. Za tretje odločitveno drevo pa smo uporabili podatke o genskem izražanju iz poletnih simptomatičnih vzorcev za napoved zdravstvenega statusa poleti.



Slika 1: Odločitvena drevesa za določitev zdravstvenega statusa rastlin. Odločitveno drevo za napoved zdravstvenega statusa v rastlinah pred pojavom bolezenskih znamenj (a); odločitveno drevo za napoved zdravstvenega stanja v rastlinah z bolezenskimi znamenji, testiranimi pred njihovim pojavom (b); odločitveno drevo za napoved zdravstvenega statusa v rastlinah z bolezenskimi znamenji po njihovem razvoju. Številke nad vejami označujejo razliko v standardiziranem genskem izražanju med okuženimi in neokuženimi rastlinami. Številke v oklepajih predstavljajo število pravilno/neppravilno klasificiranih vzorceh po 10-kratni navzkrižni validaciji.

Z novim algoritmom lahko z 92-odstotno točnostjo pravilno uvrstimo vzorce vinske trte, okužene s fitoplazmo BNp nabrane spomladi, pred pojavom bolezenskih znamenj, v razreda neokuženi/okuženi. Na osnovi analize pomladanskih vzorcev lahko s 86-odstotno točnostjo določimo ali bodo po pojavu bolezenskih znamenj rastline okužene. Natančnost analize je bila za prvo odločitveno drevo (analiza pomladanskih vzorcev) 66 %, kar pomeni, da je bilo nekaj lažno pozitivnih vzorcev. Za drugo drevo (napoved za stanje rastlin po pojavu bolezenskih znamenj) je bila natančnost 100 %. To pomeni, da je bila v primeru pozitivnega testa rastlina zares okužena). Obratno je veljalo za občutljivost analize. Ta je bila 100 % za prvo drevo in 66 % za drugo. To v praksi pomeni, da nekaterih pozitivnih rezultatov (okuženih rastlin) ne moremo napovedati iz pomladanskih vzorcev. Najbolj nezanesljivo je bilo tretje odločitveno drevo. Statistično obnašanje tretjega drevesa, sestavljenega na osnovi vzorcev z bolezenskimi znamenji, nabranimi pozno poleti, za napoved zdravstvenega stanja rastlin pozno poleti,

je bilo med vsemi tremi najmanj točno in najmanj občutljivo. To morda nakazuje, da poleg izražanja izbranih genov v razvoju boleznih pozno v rastni sezoni sodelujejo tudi drugi dejavniki, ki prispevajo k nižji točnosti tega drevesa (Tabela 1).

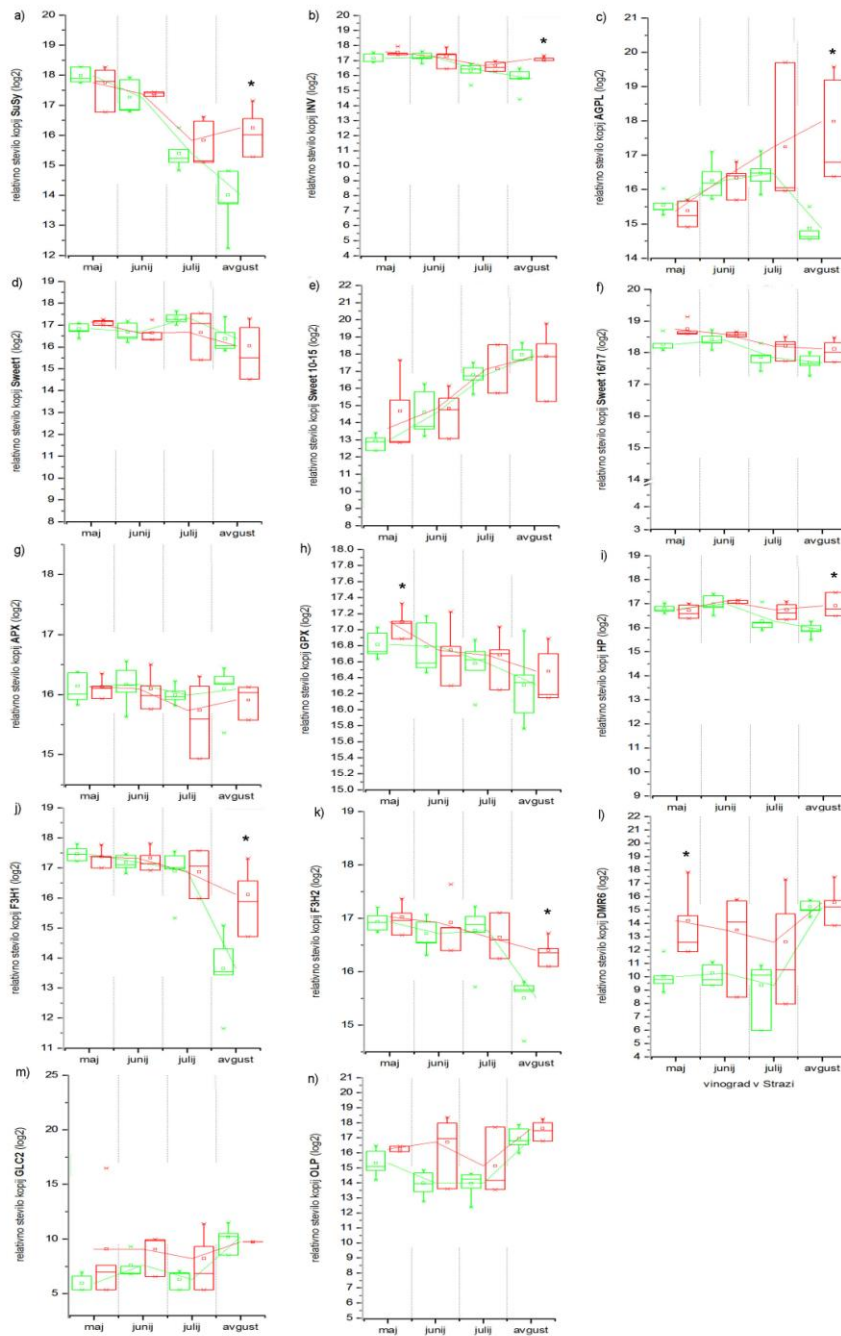
Tabela 1: Statistična analiza testov, uporabljenih za odločitvena drevesa.

	Prvo odločitveno drevo	Drugo odločitveno drevo	Tretje odločitveno drevo
Pravilno razvrščeni pozitivni vzorec	1	0.6	0.29
Pravilno razvrščeni negativni vzorec	0.9	1	1
Napačno razvrščeni pozitivni vzorec	0.1	0	0
Napačno razvrščeni negativni vzorec	0	0.4	0.71
Točnost razvrstitve	0.92	0.86	0.64
Natančnost razvrstitve	0.66	1	1
Občutljivost razvrstitve	1	0.6	0.29

Sledeča diskriminantna analiza je pokazala, da ima gen *VvDMR6* največjo diskriminantno moč med okuženimi in zdravimi vzorci. *VvOLP*, *VvGLC2* in *VvAGPL* so imeli majhen in nesignifikanten vpliv na razvoj bolezenskih znamenj.

Analiza izbranih genov na rastlinah vinske trte, okužene s FDP

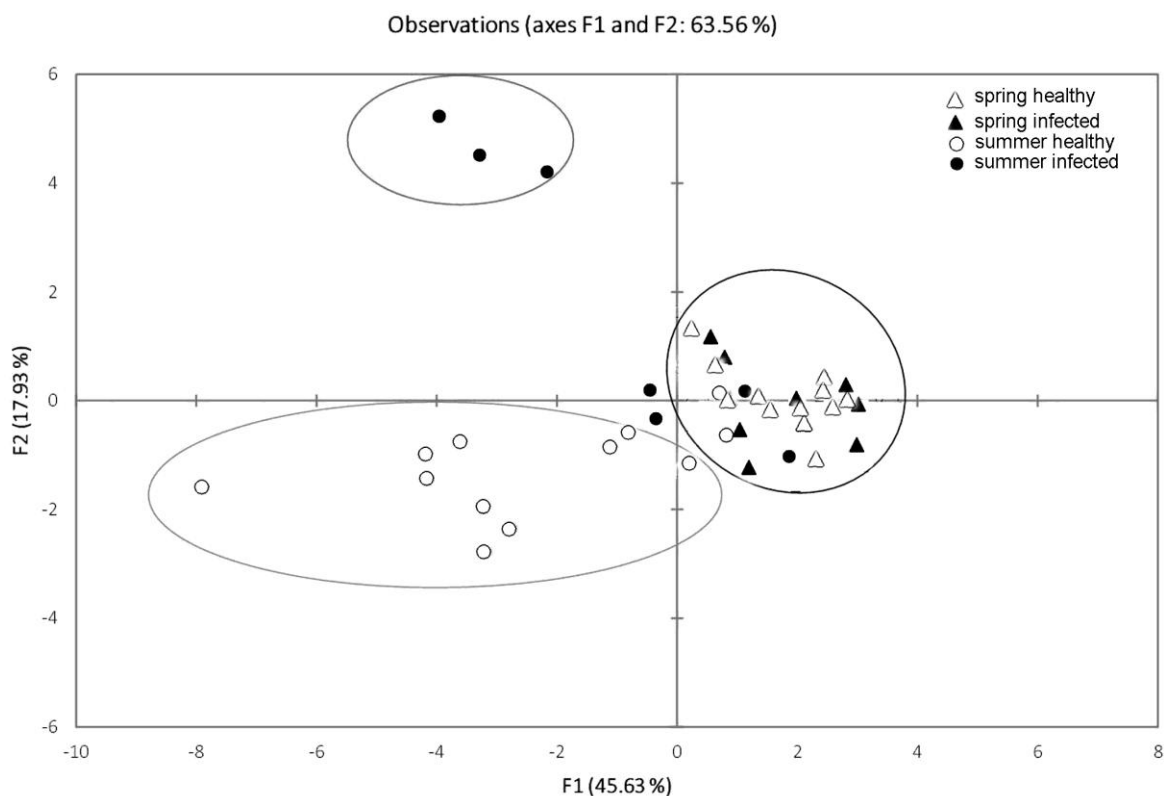
Izvedli smo poskuse ugotavljanja izražanja genov, ki smo jih določili kot potencialno zanimive v predhodni bioinformatični analizi transkriptoma modelne interakcije BNp – vinska trta, na vzorcih vinske trte, okužene s fitoplazmo FDP. Ta povzroča zlato trsno rumenico z enakimi bolezenskimi znamenji kot pri navadni trsni rumenici, domnevno z enakimi fiziološkimi mehanizmi. Za določitev potencialnih genskih označevalcev okužbe s FDP, smo vzorce vinske trte vzorčili enkrat mesečno od maja do avgusta v dveh delujočih vinogradih, v Izoli (sorta refošk) in v Straži (sorta modra frankinja). V zdravih in s FDP okuženih rastlinah smo ugotavljali izražanje gena za ADP-glukoza pirofosforilazo (*VvAGPL*), Downey mildew resistant gene 6 (*VvDMR6*), protein za prenos fosfata, ki vsebuje histidin in je vključen v citokininsko signalno transdukcijo (*VvHP*), osmotinu podoben protein (*VvOLP*), askorbat peroksidazo (*VvAPX*), glutation peroksidazo (*VvGPX*), glukanazo 2 (*VvGLC2*), vakuolno kislino invertazo 2 (*VvINV2*), saharoza sintazo (*VvSUSY*), flavanon 3-hidroksilazo (*VvF3H1* in *VvF3H2*) in dodatno še gene za membranske transporterje sladkorjev (*VvSWEET1*, *VvSWEET 10-15*, *VvSWEET 16/17*). Največja razlika v izražanju genov med zdravimi in okuženimi rastlinami je bila kot pričakovano avgusta, v času bolezenskih znamenj. Tako je bilo v obeh vinogradih izražanje genov *VvAGPL*, *VvSUSY*, *VvINV2* in *VvHP* statistično značilno različno v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi rastlinami. V vinogradu v Izoli so se v okuženih rastlinah v primerjavi z zdravimi statistično različno izražali še geni *VvGLC2*, *VvSWEET1*, *VvSWEET 10-15*, *VvSWEET 16/17* in *VvOLP*, v vinogradu v Straži pa oba *F3H* gena. Meseca julija so se v vinogradu v Izoli statistično značilno različno izražali geni *VvGLC2*, *VvDMR6* in *VvHP*. Pred pojavom bolezenskih znamenj, maja, sta se statistično značilno različno izražala le gena *VvDMR6* in *VvGPX* v vinogradu v Straži. V vinogradu v Izoli nam je za začetne mesece, pred pojavom bolezenskih znamenj, žal primanjkovalo zdravih rastlin, ki bi omogočale boljšo statistiko.



Slika 2: Časovno razmerje v relativnem izražanju genov (rezultati so transformirani \log_2), normalizirano z uporabo 18S/Cox (geometrijska sredina Ct vrednosti 18S in Cox) v vzorcih listnih žil neokuženih rastlin in rastlin, okuženih s Fdp v vinogradu v Straži. Prag statistične signifikance $p < 0,05$ je označen z zvezdico. Analizirani geni so: a) *VvSUSY*, b) *VvINV2*, c) *VvAGPL*, d) *VvSWEET1*, e) *VvSWEET 10-15*, f) *VvSWEET 16/17*, g) *VvAPX*, h) *VvGPX*, i) *VvHP*, j) *VvF3H1*, k) *VvF3H2*, l) *VvDMR6*, m) *VvGLC2*, n) *VvOLP*.

Dobljene vrednosti o relativni kvantifikaciji genskega izražanja smo analizirali z metodo glavnih osi (PCA), da bi ugotovili, če je na tej osnovi možna klasifikacija na zdrave in okužene vzorce (Slika 3). Prva komponenta PCA1 je ločila pomladne in poletne vzorce in je predstavljala 45,63 % celotne

variance. Zdravi in neokuženi vzorci so se ločili v drugi komponenti PCA2, ki je predstavljal 17,93% celote variance. Vzorci za analizo so vključevali tudi dve okuženi rastlini, pri katerih bolezenska znamenja ob v naslednji rastni sezoni niso bila več izražena (rastlina je bila v procesu ozdravljenja). Relativno gensko izražanje nekaterih genov teh rastlin bi mogoče prispevalo k slabšemu ločevanju teh vzorcev (Slika 3). Primerjava izražanja 14 genov je pokazala, da k PCA 1 največ prispevajo *VvF3H1*, *VvSUSY*, *VvF3H2*, *VvGPX* in *VvINV2* in k drugi *VvAGPL*.



Slika 3: Metoda glavnih osi (PCA) podatkov o relativni kvantifikaciji genskega izražanja v vzorcih listnih žil zdravih rastlin vinske trte in rastlin okuženih s FDp. PCA1 opisuje razlike med pomladanskimi in poletnimi vzorci, PCA2 pa med zdravimi in okuženimi vzorci.

Sklepi

Bioinformatika in statistična orodja, ki smo jih uporabili v tej raziskavi so nam odkrila pomembne nove informacije o zelo slabo poznani interakciji med fitoplazmo BNp in vinsko trto. Odkrila so nam gen *VvDmr6*, s še neznano fiziološko vlogo, kot najpomembnejši za določitev zdravstvenega stanja v odnosu do okužbe vinske trte s fitoplazmama BNp in FDp zgodaj v rastni sezoni, še pred pojavom bolezenskih znamenj. Analiza je odkrila še nekaj genov, ki imajo napovedno uporabno vrednost v zgodnji diagnostiki trsnih rumenic, ko fitoplazem ni mogoče določiti v vzorcu niti z najboljčutljivimi molekularnimi pristopi, zaradi njihovega izjemno nizkega titra.

Deseminacija rezultatov

- PREZELJ Nina. 2014. Molekulske interakcije fitoplazemskih povzročiteljic trsnih rumenic z vinsko trto (*Vitis vinifera* L.). Doktorska disertacija.
- ROTTER, Ana, NIKOLIĆ, Petra, TURNŠEK, Neža, KOGOVSŠEK, Polona, BLEJEC, Andrej, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina. 2014. Članek poslan v objavo.
- DERMASTIA, Marina. *Trsne rumenice : metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja : predavanje na: Delavnica o zlati trsni rumenici in predstavitev izsledkov projekta CRP V4-1103, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, 23. 5. 2014.* Ljubljana, 2014. [COBISS.SI-ID [31391961](#)]
- ROTTER, Ana, NIKOLIĆ, Petra, TURNŠEK, Neža, KOGOVSŠEK, Polona, BLEJEC, Andrej, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina. Construction of a disease triangle for the grapevine disease Bois noir caused by Candidatus Phytoplasma solani. V: *IOM 2014 : programme & abstracts.* [S. l.: International Organization for Mycoplasmaology, 2014], str. 35. [COBISS.SI-ID [3148111](#)]
- ROTTER, Ana, NIKOLIĆ, Petra, RAVNIKAR, Maja, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina. Classification trees based on the gene expression information from selected genes for the prediction of the BN disease status of grapevine. *Chih Wu Ping Li Hsueh Pao*, ISSN 0412-0914, 2013, vol. 43, suppl. , str. 202-203. [COBISS.SI-ID [3035727](#)]
- ROTTER, Ana, NIKOLIĆ, Petra, KOGOVSŠEK, Polona, TURNŠEK, Neža, PREZELJ, Nina, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina. Searching for new markers of the phytoplasma diseases of grapevine. V: BERTACCINI, Assunta (ur.). *COST Action FA0807, Final Meeting, Lisbon, Portugal, Carcavelos, September 30th - October 1st, 2013 : abstract book.* [S. l.: s. n., 2013], str. 48. [COBISS.SI-ID [2925135](#)]
kategorija: SU (S)
- ROTTER, Ana, NIKOLIĆ, Petra, RAVNIKAR, Maja, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina. Classification trees based on the gene expression information from selected genes for the prediction of the "bois noir" disease status of grapevine. V: TORRES, Ester (ur.), LAVIÑA, Amparo (ur.), BATLLE, Assumpció (ur.). *Proceedings of the 3rd European bois noir workshop, 20-21 March 2013, Barcelona, Spain.* [S. l.: s. n., 2013], str. 67-68, ilustr. [COBISS.SI-ID [2775375](#)]
- DERMASTIA, Marina. Phytoplasmal infection of crops - the darker side of Christmas decoration. V: 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011. JANEŽIČ, Sandra (ur.), et al. *Abstract book.* Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 88. [COBISS.SI-ID [29023193](#)]
- KERN PREZELJ, Nadja, NIKOLIĆ, Petra, MEHLE, Nataša, RAVNIKAR, Maja, DERMASTIA, Marina. Reliable in-field phytoplasma Flavescence Doree testing. V: 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011. JANEŽIČ, Sandra (ur.), et al. *Abstract book.* Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 171. [COBISS.SI-ID [29027545](#)]
- NIKOLIĆ, Petra, HREN, Matjaž, RAVNIKAR, Maja, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina. Gene expression pattern in grapevine infected with 'bois noir' phytoplasma. V: 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011. JANEŽIČ, Sandra (ur.), et al. *Abstract book.* Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 250. [COBISS.SI-ID [29028569](#)]
- ROTTER, Ana, NIKOLIĆ, Petra, GRUDEN, Kristina, BLEJEC, Andrej, DERMASTIA, Marina. When vine is not fine we fear for wine. V: 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th

- October 2011. JANEŽIČ, Sandra (ur.), et al. *Abstract book*. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 270. [COBISS.SI-ID [29030873](#)]
- NIKOLIĆ, Petra, HREN, Matjaž, RAVNIKAR, Maja, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina. Gene expression pattern in grapevine infected with Bois noir phytoplasma. *Petria*, ISSN 1120-7698, 2011, vol. 21, no. 2/3, str. 162-163. [COBISS.SI-ID [30366681](#)]
- ROTTER, Ana, NIKOLIĆ, Petra, GRUDEN, Kristina, BLEJEC, Andrej, DERMASTIA, Marina. When vine is not fine we fear for wine. V: International Conference Applied Statistics 2011, September 19-22, 2011, Ribno. LUSA, Lara (ur.), STARE, Janez (ur.). *Program and abstracts*. Ljubljana: Statistical Society of Slovenia, 2011, str. 55. [COBISS.SI-ID [28870617](#)]
- NIKOLIĆ, Petra. *Vzorci izražanja genov v listih vinske trte, okužene s fitoplazmo, povezano s počrnelostjo lesa : doktorska disertacija = Gene expression patterns in grapevine leaf infected with phytoplasma associated with bois noir disease : doctoral dissertation*. Ljubljana: [P. Nikolić], 2011. XII, 155 f., pril., ilustr. [COBISS.SI-ID [2401871](#)]

Literatura

- Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56:785-796.
- Hren M., Nikolić P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden K. 2009. Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* 10:460 doi:10.1186/1471-2164-10-460.
- Nikolić P. Vzorci izražanja genov v listih vinske trte okužene s fitoplazmo povezano s počrnelostjo lesa. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, 2011.
- Lee L.- M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszik I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.

Raziskovalni projekt **V4-1103** v sklopu Ciljnega raziskovalnega programa
»Zagotovimo.si hrano za jutri«

Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja

KONČNO POROČILO

Delovni sklop 5:
Vodenje projekta in deseminacija rezultatov

Izvajalec: Nacionalni inštitut za biologijo
Poročilo pripravila: Marina Dermastia

Ljubljana, 15. september 2014

Vsebina

Uvod	3
Priporočila za učinkovito in za okolje sprejemljivo obvladovanje trsnih rumenic in preprečevanje gospodarske škode, ki jo povzročajo v vinogradništvu	4
A. Priporočila na osnovi rezultatov raziskav v delovnih sklopih.....	4
B. Priporočila na osnovi rezultatov delavnice o trsni rumenici	4

Uvod

Pomemben evropski gospodarski sektor proizvodnje sadilnega materiala vinske trte in vina ogroža epidemija zlate trsne rumenice (FD), ki jo povzroča fitoplazma FDp – fitopatogena bakterija iz razreda Mollicutes. FD je najbolj uničujoča in najnevarnejša med različnimi trsnimi rumenicami, ki povzročajo bolezenska znamenja, ki na oko niso ločljiva. Od 2005, ko je bila FD prvič potrjena v Sloveniji, se je število novih žarišč hitro povečevalo in v 2010 so bili v nekaterih vinorodnih deželah že zaznani vzorci epidemije. FDp je v Evropi karantenski organizem, uvrščen na seznam IIA2 direktive Sveta Evrope EU2000/29 o škodljivih organizmih in na seznam karantenskih organizmov EPPO A2. Za preprečevanje širjenja bolezni je zakonsko določeno uničenje obolelih rastlin, rastlin z bolezenskimi znamenji in okolnih rastlin v vseh državah, kjer se bolezen pojavlja. Fitoplazme med rastlinami prenašajo žuželke, ki se hranijo s floemskim sokom. Razmnožujejo se v citoplazmi žuželk in floemskih celic rastlin. Edini znani naravni prenašalec FDp med trtami je monofagni ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus*). Za vzdrževanje zdravih vinogradov je tako nujna uporaba zdravega razmnoževalnega rastlinskega materiala, vzporedno z učinkovitim zatiranjem prenašalca. Za doseg tega cilja so nujni novi ustrezni, zanesljivi in hitri sistemi, ki pa so odvisni od poglobljenega razumevanja biologije ameriškega škržatka in FDp. Predvsem slednje omejujejo slabo poznani mehanizmi fitopatogenosti, gostiteljev, odpornosti in prenosa z žuželkami ter karantenski status FDp.

V izvedenem projektu smo se osredotočili na uvajanje analiz, ki temeljijo na daljinskem zaznavanju trsnih rumenic z uporabo visoko ločljivostnih večspektralnih podatkov. Metoda je že bila uporabljena za detekcijo različnih rastlinskih plevelov in škodljivcev, a še ne za zaznavanje trsnih rumenic. Raziskave bionomije ameriškega škržatka v Sloveniji bodo pripomogle k izboljšavi strategij njegovega zatiranja. Testirali smo preizkušeno metodo namakanja dormantnega materiala vinske trte v vročo vodo, ki se je že izkazala kot učinkovita metoda uničenja fitoplazem, kot tudi za uničenje jajčec ameriškega škržatka. Metoda ne poškoduje rastlinskega materiala, če je temperatura nadzorovana in je obdelava pravilno časovno umeščena v proizvodnjo rastlin. V projektu smo raziskali nekaj alternativnih metod za zatiranje prenašalca. Težave z nedostopnostjo raziskovalnega materiala FDp smo reševali z bioinformatiko raziskavo genov vinske trte po okužbi s splošno razširjeno fitoplazmo, ki povzroča navadno trsno rumenico (BNp) z enakimi znamenji in z domnevno podobnimi mehanizmi. V tej raziskavi smo odkrili nekatere gene, ki se po okužbi spremenijo. Take gene bi v diagnostiki lahko uporabili kot označevalce bolezni.

Na osnovi rezultatov raziskave smo pripravili enodnevno delavnico, ki so se je udeležili strokovnjaki s področja varstva rastlin različnih institucij. Na koncu delavnice so bila oblikovana priporočila za učinkovito in za okolje sprejemljivo obvladovanje trsnih rumenic in preprečevanje gospodarske škode, ki jo povzročajo v vinogradništvu.

Priporočila za učinkovito in za okolje sprejemljivo obvladovanje trsnih rumenic in preprečevanje gospodarske škode, ki jo povzročajo v vinogradništvu

A. PRIPOROČILA NA OSNOVI REZULTATOV RAZISKAV V DELOVNIH SKLOPIH

1. Ustrezno izbran in terenu prilagojen model daljinskega zaznavanja za zgodnje odkrivanje žarišč, pripravljen na osnovi obdelave satelitskih slik z metodami strojnega učenja lahko odkrije okužene rastline z 80 % zanesljivostjo. **Priporočamo, da se v prihodnosti model še izpopolni in začne uporabljati na terenu.**
2. V tujini preizkušena metoda toplote obdelave (45 min pri 50°C) učinkovito zatira FDp v materialu za cepljenje in uniči jajčeca ameriškega škržatka; ob enem pa nima negativnega vpliva na viabilnost potaknjencev. **Priporočamo, da se toplotna terapija uvede kot pomemben ukrep pri pripravi cepljenk in potaknjencev.**
3. Zasnovan je bil model za napovedovanje zatiranja ličink in odraslih osebkov ameriškega škržatka na osnovi njegove bionomije in validiran na osnovi podatkov s terena. **Priporočamo, da opazovalno napovedovalna služba zdravstvenega varstva rastlin začne model rutinsko uporabljati za napovedovanje rokov zatiranja ameriškega škržatka.**
4. Biostatistična analiza izražanja genov vinske trte, okužene s FDp je odkrila gen *VvDMR6*, ki se vedno statistično značilno izraža v okuženih trtah pred pojavom bolezenskih znamenj. **Priporočamo, da se razvije diagnostična metoda za zgodnje odkrivanje okužbe s FDp na osnovi tega gena.**

B. PRIPOROČILA NA OSNOVI REZULTATOV DELAVNICE O TRSNI RUMENICI

1. Ker nista standardizirani niti barva niti lepilo, se na nekaterih rumenih ploščah ne ulovi nič, na drugih pa celo ptiči. **Priporočamo, da se rumene plošče standardizirajo.**
2. V primerih da se z BNp okužene rastline vinske trte ne odstranijo, to zelo otežuje nadzor nad FD. **Priporočamo odstranjevanje trt, okuženih z BNp.**
3. Zlasti manjši vinogradniki zaradi premajhne obveščенosti in posledično premajhnega znanja dvomijo o možnih obsegih okužb s FDp in posledicah takih okužb. **Priporočamo, da se nadaljuje z obveščevalnimi in izobraževalnimi kampanjami.**
4. Prisotnost inšpektorjev na terenu je zelo pomembna (brez »nadzora« vinogradniki pogosto ne izvajajo ukrepov).

5. Zavedamo se problema, da je tudi strokovna javnost proti škropljenju za zatiranje prenašalca FDp. **Priporočamo, da se nadaljuje z raziskavami za iskanje novih tehnologij in pristopov za boj proti FD.**