

# Sušenje orehov – iskanje vzrokov in verifikacija molekularne metode za določanje *Geosmithia morbida* v različnih tipih vzorcev

Andreja KAVČIČ

Tašja CVELBAR

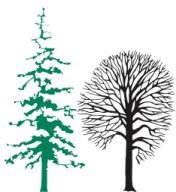
Zina DEVETAK

Nikica OGRIS

Barbara PIŠKUR

15. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo

Portorož, 1.–2. marec 2022



# SUŠENJE OREHOV





# SUŠENJE OREHOV

BOLEZEN TISOČERIH RAKOV ???





# BOLEZEN TISOČERIH RAKOV





# BOLEZEN TISOČERIH RAKOV

---

## GLIVA (GEOHMO)

***Geosmithia morbida* M.Kolařík, E.Freeland, C.Utley, & Tisserat 2010**

(Fungi: Ascomycota: Hypocreales, Bionectriaceae)

## VEKTOR (PITOJU)

***Pityophthorus juglandis* Blandford, 1894**

(Coleoptera: Curculionidae, Scolytiae)

**Sušenje orehov v ZDA in Italiji (*Juglans* spp.)**

## **Karantenski škodljivi organizmi**

Priloga II, del B Izvedbene uredbe Komisije (EU) 2019/2072.

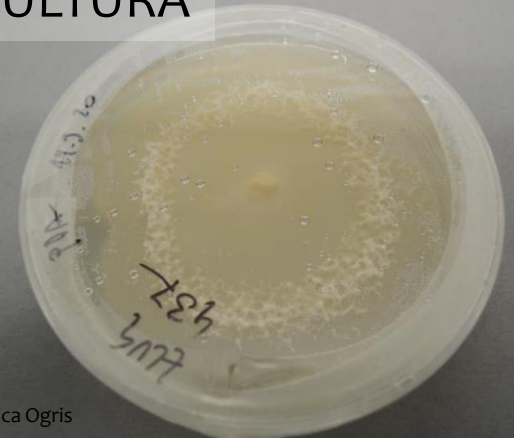


# Geosmithia morbida

KONIDIJI



KULTURA



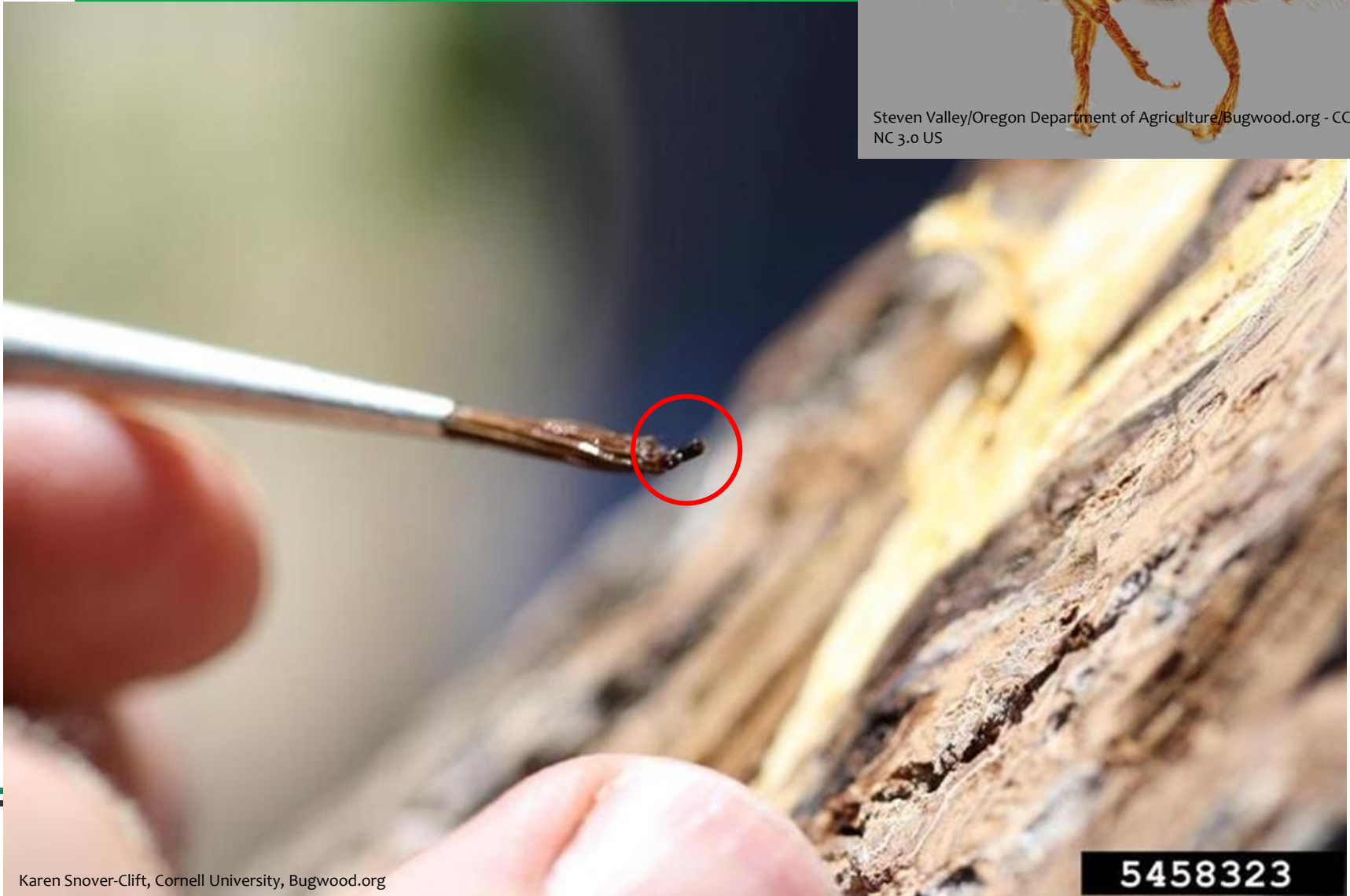
Nikica Ogris

KONIDIOFORI





# *Pityophthorus juglandis*



# Geografska razširjenost



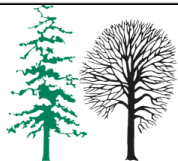
Geosmithia morbida (GEOHMO)

● Present

■ Transient

2022-02-23

(c) EPPO <https://gd.eppo.int>

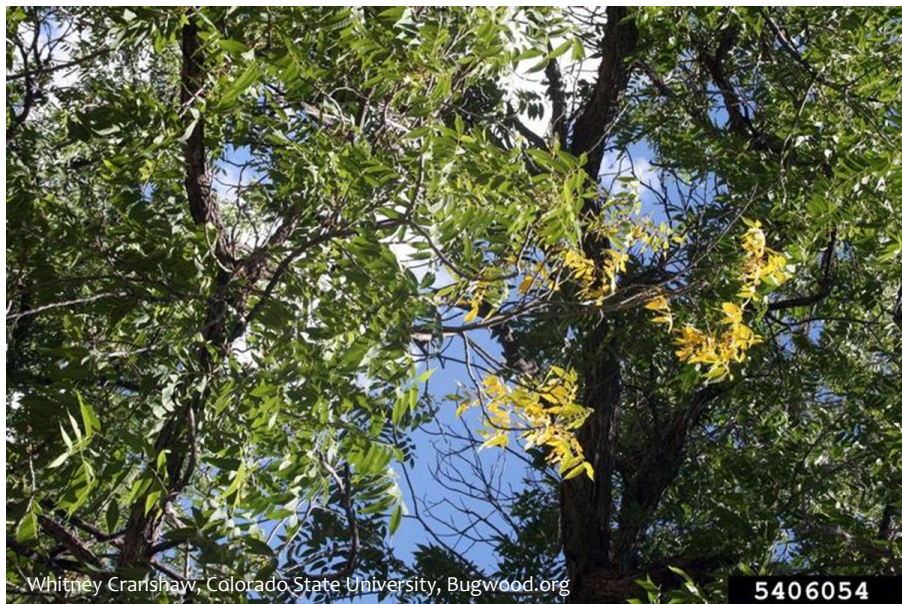


**GOZDARSKI INŠTITUT SLOVENIJE**  
SLOVENIAN FORESTRY INSTITUTE



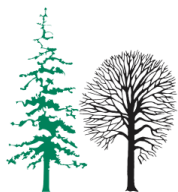
# Simptomi in znaki

---



## Progresivno sušenje drevesa

- venenje, rumenenje listov
- sušenje poganjkov in vej
- odmiranje krošnje



**GOZDARSKI INŠTITUT SLOVENIJE**  
**SLOVENIAN FORESTRY INSTITUTE**





# Simptomi in znaki

VHODNE/IZHODNE ODPRTINE (1 mm)



Ned Tisserat, Colorado State University, B 5406093

ČRVINA

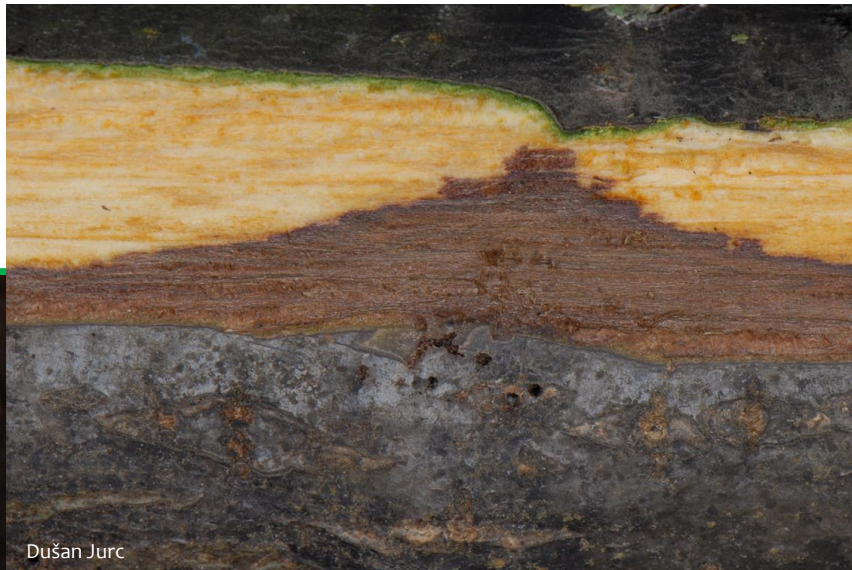


Dušan Jurc



# Simptomi in znaki

NEKROZE



ROVNI SISTEMI



# PROGRAMI PREISKAV

---

Programi preiskav za ugotavljanje navzočnosti škodljivih organizmov rastlin (PP)

PP *Geosmithia morbida* in prenašalec *Pityophthorus juglandis*

PP *Geosmithia morbida* (2021 – )

PP *Pityophthorus juglandis* (2021 – )

**(2017 – )**

Gozdarski inštitut Slovenije

Zavod za gozdove Slovenije

Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica

Kmetijsko gozdarski zavod Novo mesto

Kmetijsko gozdarski zavod Maribor

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije





# Metode dela

## Zdravstveni pregledi rastlin

- cela Slovenija
- celo leto
- gostiteljske rastline (*Juglans* spp.)
- **simptomi in znaki**

## Pasti

- **Z Slovenija**
- junij – september (2 tedna)
- lijakasta past + **feromon PITOJU**
- **prenašalec** (vektor)



# Zdravstveni pregledi rastlin

Vrsta lokacije:	Leto	Pregledi	Površina (ha)	Vzorci	Analize (gliva + žuželka)	Rezultat
Gozd	2017	48	102,71	3	0+3	negativen
(Ne)kmetijska površina	2018	127	344,71	14	14+4	negativen
Urbana površina	2019	142	236,00	12	12+4	negativen
Vrt	2020	128	162,08	17	31+1	negativen
Pridelava	2021	120	123,61	28	51	negativen
Drugo (nasad)						

## Gostitelj:

*Juglans regia, J. nigra*

## Predmet vzorčenja:

Cela rastlina, veja z listi, les, drugo

## Analiza:

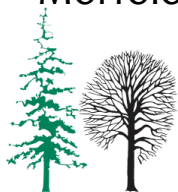
Morfološka analiza – Gliva

Molekularna analiza – Gliva

Morfološka analiza – Žuželka



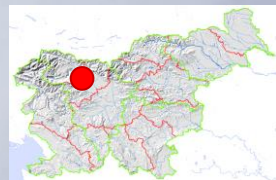
Andreja Kavčič





































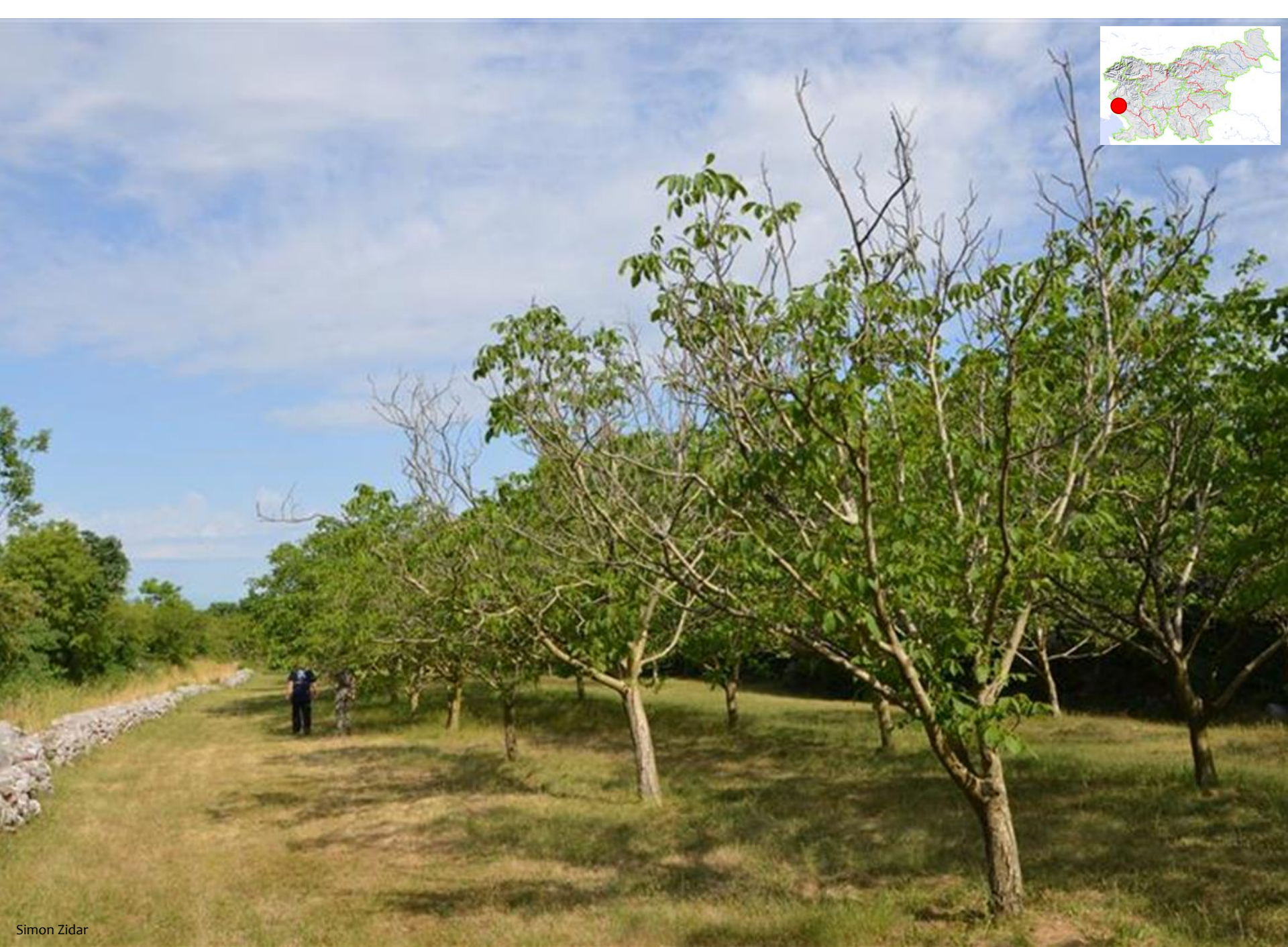


Andreja Kavcic



Simon Zidar









Andreja Kavčič









Andreja Kavčič





kaefer-der-welt.de

*Oberea linearis*  
(Coleoptera, Cerambycidae)



Andreja Kavčič













*Xylosandrus germanus*  
(Coleoptera: Curculionidae,  
Scolytinae)



Andreja Kavčič



























*Zeuzera pyrina*  
(Lepidoptera, Cossidae)



Andreja Kavčič



Andreja Kavčič

Andreja Kavčič



*Cossus cossus*  
(Lepidoptera, Cossidae)



lepiforum.org

Andreja Kavčič



Andreja Kavčič















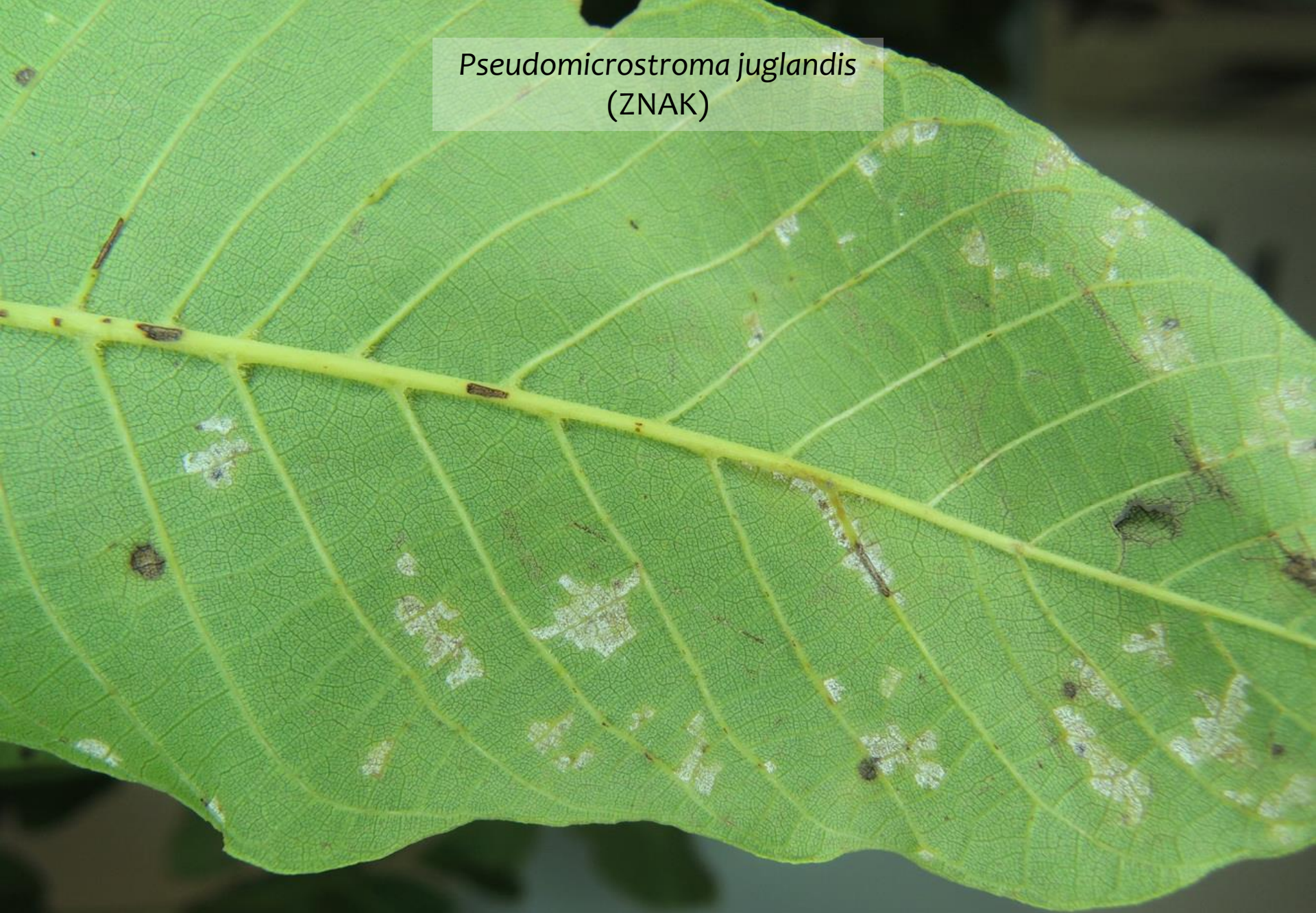
# Morfološka analiza – Gliva

Vrsta	Frekvenca
<i>Armillaria</i> sp.	1
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	2
<i>Diaporthe juglandina</i>	2
<i>Diplodia juglandina</i>	1
<i>Fusarium</i> sp.	1
<b><i>Juglanconis juglandina</i></b>	<b>10</b>
<b><i>Ophiognomonia leptostyla</i></b>	<b>3</b>
<b><i>Phomopsis</i> sp.</b>	<b>5</b>
<i>Pseudomicrostroma juglandis</i>	2





*Pseudomicrostroma juglandis*  
(ZNAK)





*Ophiognomonina leptostyla*  
(TROSIŠČA)

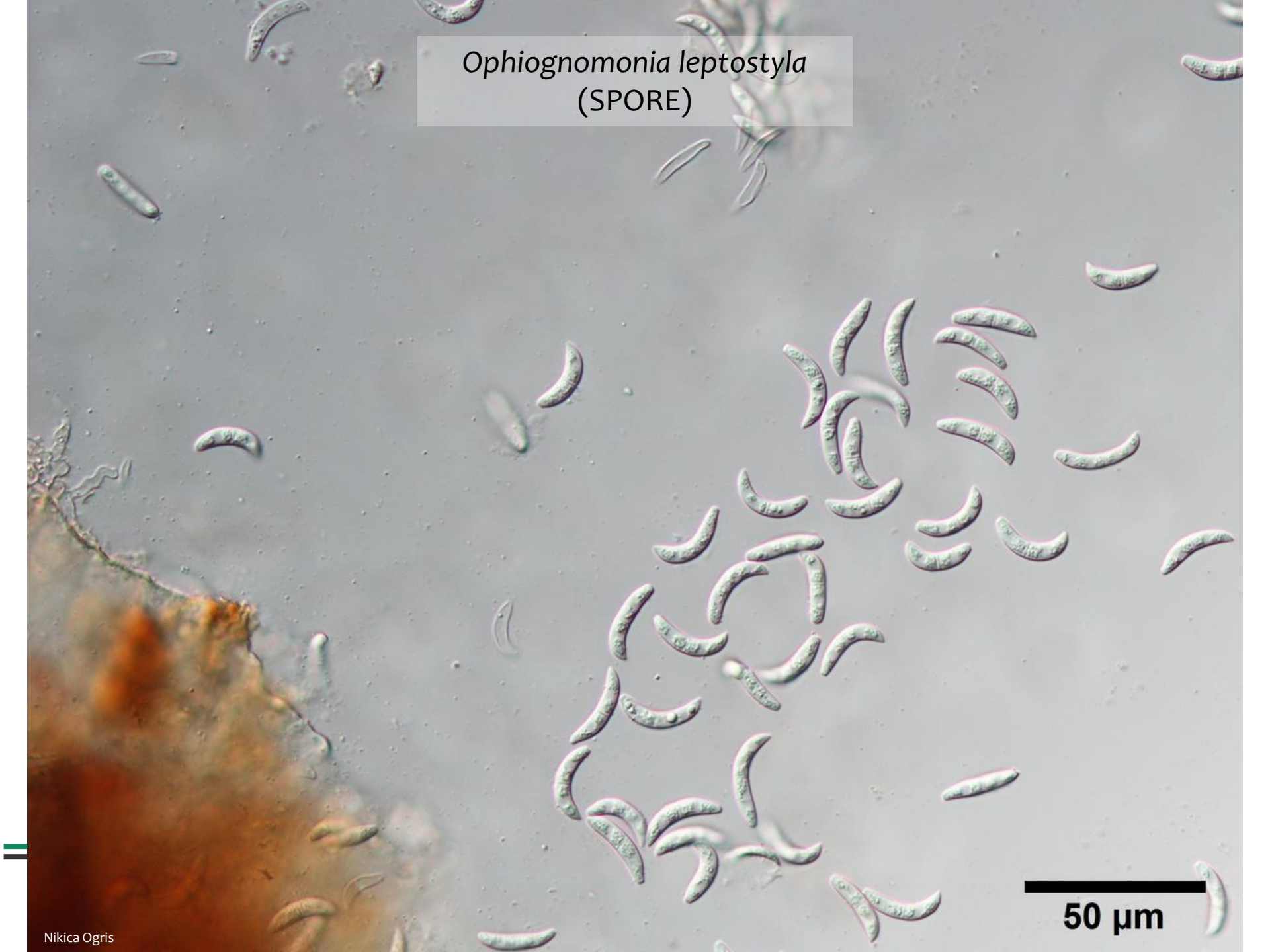


2 mm



*Ophiognomonina leptostyla*  
(SPORE)

50  $\mu\text{m}$





*Juglanconis juglandina*  
(NEKROZA)





*Juglanconis juglandina*  
(TROSIŠČA)





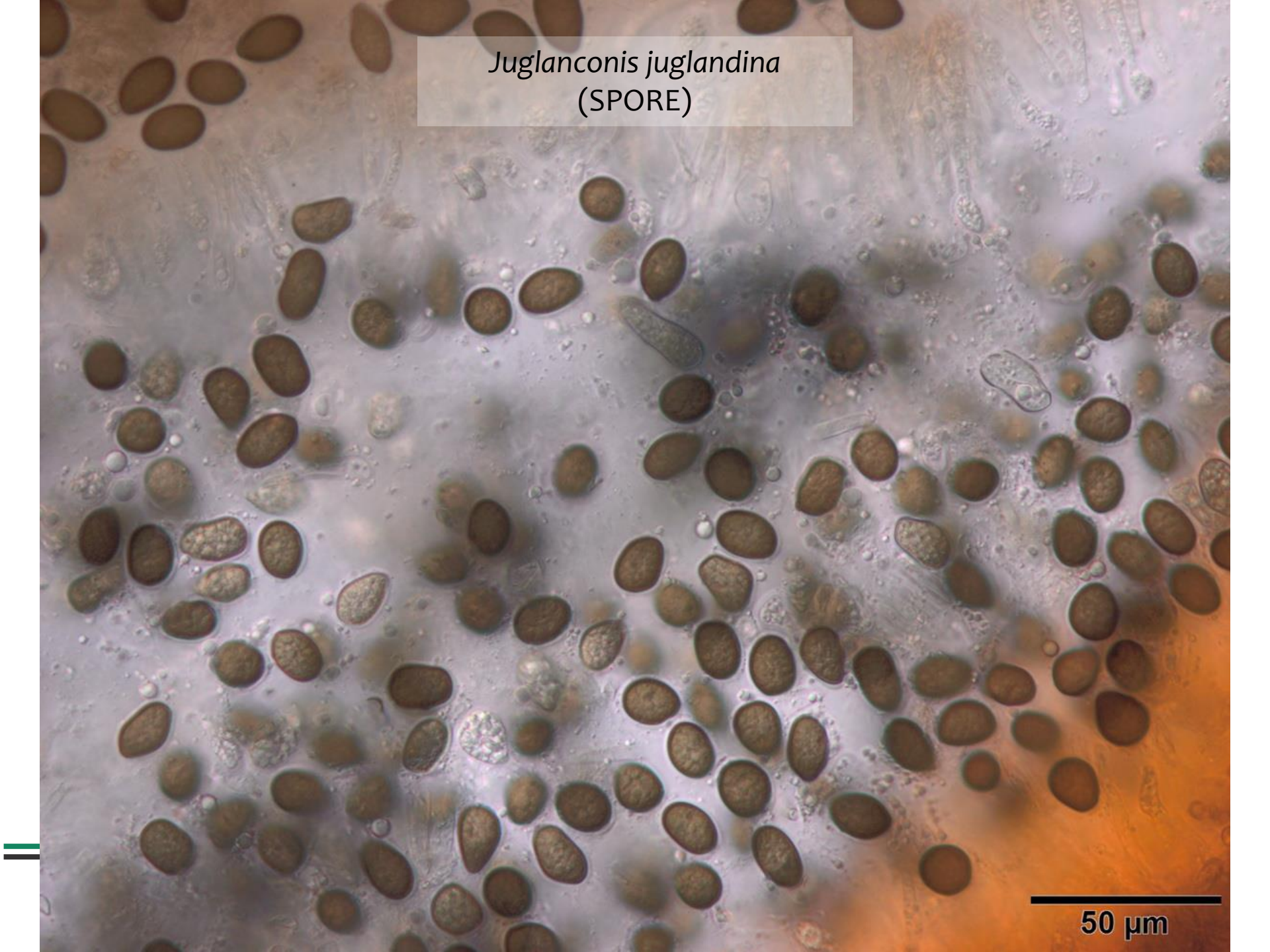
*Juglanconis juglandina*  
(TROSIŠČA)





*Juglanconis juglandina*  
(SPORE)

50  $\mu\text{m}$





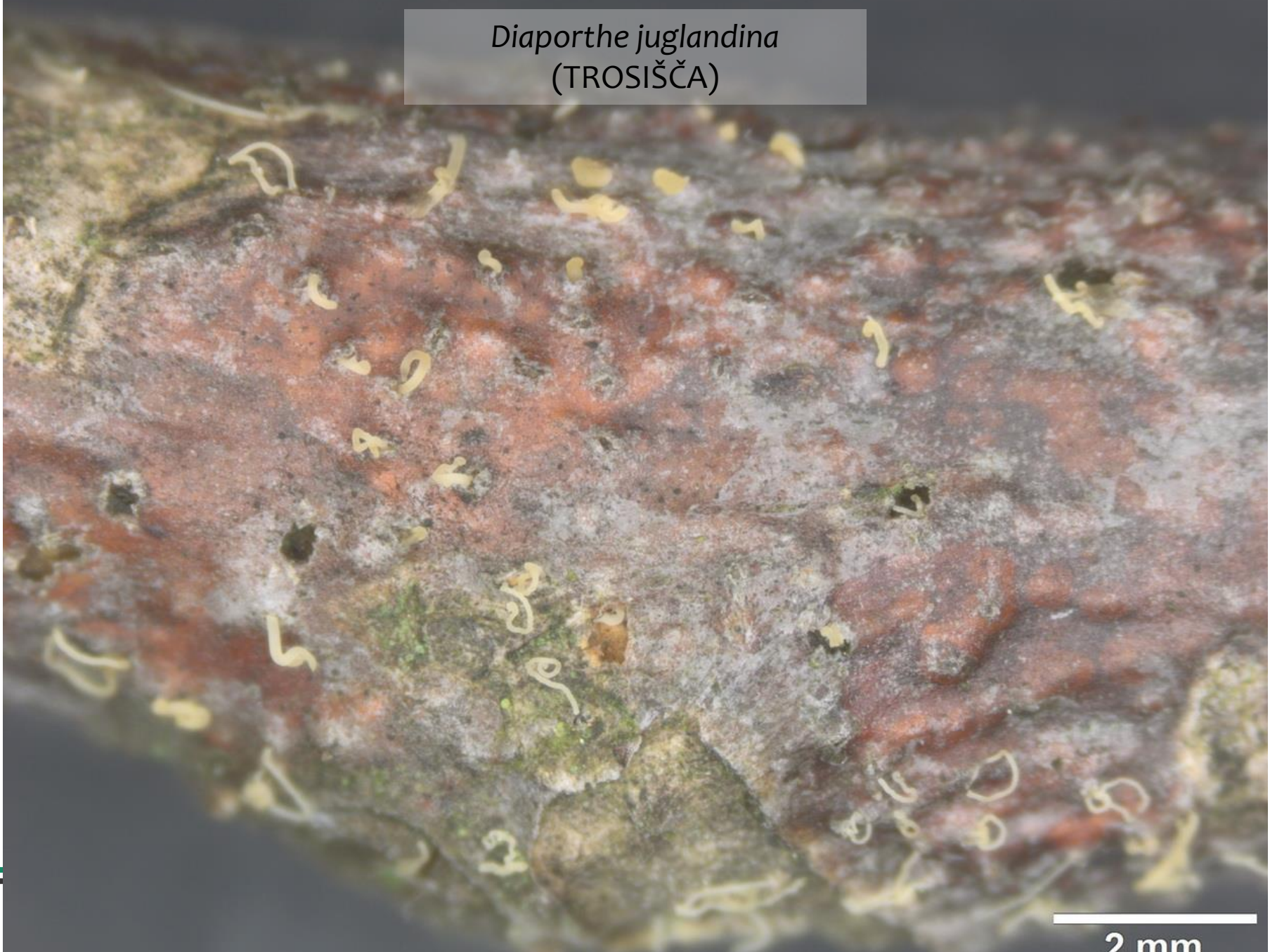
*Juglanconis juglandina*  
(SPORE)

50  $\mu$ m





*Diaporthe juglandina*  
(TROSIŠČA)



2 mm



*Diaporthe juglandina*  
(SPORE)

50  $\mu\text{m}$





*Botryosphaeria* sp.  
(TROSIŠČA)





*Botryosphaeria* sp.  
(TROSIŠČA)



*Botryosphaeria* sp.  
(SPORE)

50  $\mu$ m





# Molekularna analiza – Gliva

---

Izolacija glive iz rastlinskega materiala

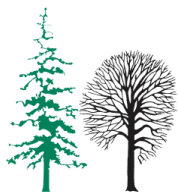
**Čista kultura**

**BARCODING** (markerji ITS rDNA, EF-1a in podobno)

163 izolatov

**Pogoste in patogene vrste:**

*Alternaria sp., Botryosphaeria sp., Diaporthe sp., Didymella sp., Diplodia sp., Dothiorella sp., Fusarium sp., Juglanconis juglandina, Neofusicoccum sp., Nothophoma sp., ...*





# Molekularna analiza – Gliva

---

2021 – vpeljava nove metode – hitra detekcija *G. morbida*

**Rastlinski material** (razen semen) / čista kultura

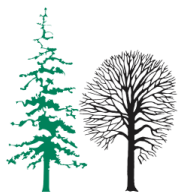
Ni metode, določene od EU, EPPO, EURL.

Moore in sod. 2019. *Plant Health Progress* – **konvencionalni PCR**

## VERIFIKACIJA METODE

Matriks (zdrav les) + GEOHMO

- ✓ Metoda je **občutljiva, selektivna, ponovljiva in obnovljiva**.
- ✓ Najnižja koncentracija tarče, ki jo še uspešno detektiramo je **8,9 pg** na reakcijo.
- ✓ Specifičnost (18 taksonov gliv): v primeru izolata ***Didymella sp.*** smo dobili **lažno pozitiven** rezultat – potreben **dodatni korak** (analiza sekvence).
- ✓ Matriks druge glive na detekcijo tarčne glive ne vpliva.





# Pasti

Vrsta lokacije:	Leto	Pasti	Vzorci	Analize	Rezultat
Gozd					
Drugo (nasad)	2017	-	-	-	-
	2018	6	42	42	negativen
<b>Gostitelj:</b>	2019	6	42	42	negativen
Feromonska vaba	2020	6	48	48	negativen
	2021	13	104	103	negativen

## Predmet vzorčenja:

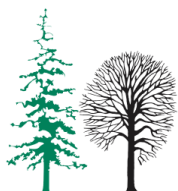
Vaba – feromonska

## Analiza:

Morfološka analiza – Žuželka



Andreja Kavčič





# Morfološka analiza – Žuželka

---

## INSECTA – žuželke

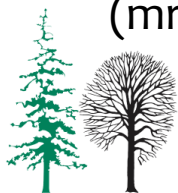
- Collembola – skakači
- Archaeognatha – pračeljstnice
- Hemiptera – polkrilci (škržatki, slinarice, stenice, listne uši)
- Diptera – dvokrilci (komarji, muhe, mušice)
- Lepidoptera – metulji
- Coleoptera – hrošči
- Blattoptera – ščurki
- Thysanoptera – resarji
- Dermaptera – strigalice
- Orthoptera – kobilice
- Mantoptera – bogomolke
- Hymenoptera – kožekrilci (mravlje, čebele)

## ARACHNIDA – pajkovci

- Araneae – pajki
- Acarina – pršice

## MAMMALIA (sesalci)

- Rodentia – Gliridae – *Muscardinus avellanarius* (podlesek)

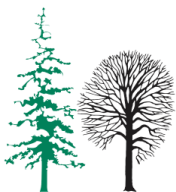




# ZAKLJUČKI

---

- V vzorcih nismo zaznali niti GEOHMO niti PITOJU.
- Identificirane glive so povezane s sušnim stresom.
- Rezultati metode za detekcijo GEOHMO direktno iz rastlinskega materiala so obetavni → nadaljevanje.
- Pričakovali smo ulov PITOJU → menjava feromonskega pripravka.
- GEOHMO ima več potencialnih prenašalcev → detekcija glive v/na različnih vrstah žuželk.





# ZAHVALA

---

- Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
- Q-entry – vpeljava hitrih testov za identifikacijo karantenskih škodljivih organizmov, povzročiteljev bolezni in poškodb na rastlinah (CRP V4-2003)
- Raziskovalni program Gozdna biologija, ekologija in tehnologija (P4-0107)

