# Priloga 7: Vzorčenje škodljivih organizmov

Škodljive organizme rastlin (v nadaljnjem besedilu: ŠO) delimo v pet skupin:

1. [Virusi, viroidi in fitoplazme](#_VIRUSI,_VIROIDI_IN)
2. [Bakterije](#_BAKTERIJE)
3. [Nematode (ogorčice)](#_NEMATODE_(OGORČICE))
4. [Žuželke in pršice](#_ŽUŽELKE_IN_PRŠICE)
5. [Glive in oomicete](#_GLIVE_IN_OOMICETE)

Za vsak ŠO so metode določanja lahko predpisane v evropski ali slovenski zakonodaji, v mednarodnih standardih ali pa metode razvije Evropski referenčni laboratorij, nacionalni referenčni laboratorij ali uradni laboratorij za določanje ŠO. Laboratorij določeno metodo uvede na način, da zagotavlja ustrezne rezultate analiz, ki jih v obliki analiznega izvida posreduje naročniku.

Ker so metode vzorčenja različne glede na skupini ŠO, na posamezen ŠO ali pa so vezane na metodo določanja se je najbolje posvetovati z laboratorijem, ki smo ga izbrali in ima za določen ŠO uvedene ustrezne metode.

# VIRUSI, VIROIDI IN FITOPLAZME

Vzorčimo liste, poganjke, cvetove, plodove (po možnosti skupaj s čašnimi listi) in/ali gomolje z bolezenskimi znamenji. Praviloma vzorčimo mlade, polno razvite liste.

V primeru suma na okužbo s fitoplazmami, ali če bolezenska znamenja na listih ali poganjkih rastlin kažejo splošno propadanje, kar nakazuje možnost koreninske poškodbe, je priporočljivo, da vzorec sestavljajo tudi korenine.

V primeru hmelja vzorčimo razvite liste. Vzorčenje rastlin na hmeljišču se praviloma izvede iz lateralnih poganjkov na višini 2-4 m. Če rastlina hmelja izraža bolezenska znamenja, vzorčimo simptomatične liste. V primeru vzorčenj v zgodnejših fazah razvoja rastlin hmelja pa priporočamo vzorčenje listov na mestih, ki se nahajajo najmanj 3 kolenca pod apikalnim meristemom. V primeru hmelja v rastlinjaku vzorčimo rastline, ko dosežejo višino najmanj 0,5 m (idealno od višine 1 m naprej).

Bolezenska znamenja so odvisna od številnih dejavnikov, kot na primer sorta in rastni pogoji, zato vzorčimo rastline z bolezenskimi znamenji že ob najmanjšem sumu na okužbo z virusi, viroidi ali fitoplazmami.

Vzorčenje zaradi suma na okužbo z virusi, viroidi ali fitoplazmami se izvede v rastni dobi, ko so listi še sveži.

Pri sadnih rastlinah vzorčenja za analizo na viruse ne opravljamo, kadar maksimalne dnevne temperature presežejo 28°C. V takem primeru se o vzorčenju obvezno predhodno dogovorimo z laboratorijem.

Vzorec naj bo reprezentativen, zajema naj celotno paleto bolezenskih znamenj.

Pri izbiri rastlinskega materiala poskušamo zajeti mejo med bolnim in zdravim tkivom.

Po možnosti se izognemo dotikanju rastlin z rokami (npr. uporabljamo zaščitne rokavice). Če vzorčimo več rastlin, si med rastlinami razkužimo roke ali zamenjamo rokavice.

Pri nabiranju vzorcev pazimo, da vzorci ne ovenijo in niso izpostavljeni povišani zunanji temperaturi. Po vzorčenju jih čim prej shranimo na hladno (na primer, vzorce ob nabiranju sproti spravljamo v prenosno hladilno torbo in pri tem pazimo, da ne zamrznejo oziroma da se neposredno ne dotikajo zamrzovalnih blazinic).

Za testiranje je dovolj nekaj gramov materiala, vendar naj ga bo dovolj za oceno simptomov (npr. 4-10 listov, odvisno od njihove velikosti).

Če je rastlina majhna, se lahko vzorči cela rastlina. Če je rastlina večja, se vzorec odvzame iz vsaj treh različnih delov rastline. V primeru vzorcev hmelja, se vzorčijo najmanj 4 razviti listi.

V enem vzorcu je lahko po dogovoru z laboratorijem združenih več rastlin (največje število rastlin v vzorcu je odvisno od namena testiranja, občutljivosti metode za laboratorijsko analizo, itd.). V kolikor je vzorec sestavljen iz več rastlin, naj bodo to zgolj rastline iste vrste, sorte, lota in enote pridelave.

Po odvzemu vzorca uporabljeno opremo očistimo in v kolikor je potrebno tudi razkužimo z uporabo ustreznih dezinfekcijskih sredstev.

**Priprava in pošiljanje vzorcev**

* Rastline s koreninami in zemljo ali rastline v lončkih: lonček ali koreninski splet ovijemo s plastično vrečko in jo dobro privežemo okoli stebla. Celotno rastlino položimo v dodatno, rahlo napihnjeno plastično vrečko, ki jo zapremo. V kolikor je vzorec sestavljen iz koščkov korenin in poganjkov/listov, koščke korenin položimo v eno plastično vrečko, poganjke/liste v drugo in nato obe vrečki povežemo ali zaprti položimo v dodatno vrečko.
* Listi, cvetovi in poganjki: če so ob vzorčenju listi mokri, jih dobro otresemo oziroma delno osušimo. Vzorec položimo v rahlo napihnjeno plastično vrečko in jo zapremo.
* Vzorci plodov, čebulic: vzorec zavijemo v suh vpojni papir, damo v rahlo napihnjeno plastično vrečko in jo zapremo.
* Vzorci gomoljev: vzorcev nikoli ne dajemo v plastično vrečko! Vzorce zavijemo v suh vpojni papir in položimo v močno kartonasto škatlo, ki jo dodatno zaščitimo s papirjem ali jih položimo v močno vrečo iz papirja.

V posebno vrečko priložimo izpolnjen zapisnik. Škatlo oziroma vrečo z zapisnikom in vzorcem zapremo, zalepimo in zapečatimo. Vzorce pošljemo s hitro pošto oziroma pošto, ki zagotavlja dostavo v laboratorij naslednji dan. Izogibamo se pošiljanju vzorcev ob vikendih in prazničnih dnevih. V primeru ko vzorcev listov, cvetov, poganjkov ali hitro pokvarljivih plodov, ne moremo poslati takoj, jih lahko največ za dva dni shranimo v hladilniku pri temperaturi od 4 do 7 ºC. Pri tem pazimo, da ostane nabran material svež, da ne zamrzne in da ne prične gniti.

# BAKTERIJE

Za vzorec odvzamemo svež del rastline, ki kaže okužbo na bakterije, skupaj z delom zdravega tkiva okoli okužbe ter ob tem pazimo, da okužbe ne prenesemo na sosednje zdrave rastline. Vzorec naj bo v primeru, da so v posevku vidne različne faze/stopnje okužbe sestavljen iz več rastlin ali posameznih delov rastline. Vzorčimo tako, da se material ne suši prekomerno npr. tudi v primeru bolezenskih znamenj le na listih, vzorčimo poganjke, ne le listov.

V primeru suma na nov ali neznan ŠO je priporočljivo ločeno vzorčiti in zapakirati tudi zdravo rastlino, če je to mogoče. V primeru bolezenskih znamenj sušenja upoštevamo, da je lahko povzročitelj prisoten tudi v drugih delih rastline ali to sušenje povzroča toksin zato vzorčimo po celotni rastlini, tudi dele, ki ne kažejo bolezenskih znamenj. Pri sušenju je priporočljivo vzorčiti tudi korenine. Vzorčenje dormantnih rastlin je smiselno kadar želimo testirati na ŠO, ki so bodisi prisotni v žilnem tkivu, ali v drugih delih, ki so na rastlini npr. brsti, listi,.. Za testiranje semena, vzorčimo seme.

Čas vzorčenja je odvisen od posamezne bakterije. Če je mogoče, rastline z bolezenskimi znamenji vzorčimo v času aktivne rasti rastline. Za rastline z bolezenskimi znamenji razjed na olesenelih delih, je najprimernejši čas vzorčenja spomladi. Če so bile rastline pred kratkim tretirane s pripravki, ki bi lahko vplivali na živost bakterij, na to opozorimo laboratorij, ki lahko ustrezno prilagodi izbiro testov.

Vzorčimo pazljivo, da ne prenašamo bolezni. Orodje, ki ga uporabljamo ob vzorčenju, med vzorci razkužujemo. V primeru vzorčenja rastlin pri katerih sumimo na bolezni, ki jih prenašajo žuželke, vzorčene poganjke pred pakiranjem dobro otresemo, da morebitnih okuženih prenašalcev z vzorčenjem ne prenesemo na novo lokacijo. Priporočljivo je, da rastline, ki smo jih vzorčili označimo, da jih lahko ob prejemu rezultatov, ponovno identificiramo.

V primeru, da vzorec vsebuje korenine, moramo preprečiti prenos zemlje na druge dele vzorca, zato korenine posebej ovijemo in vložimo v vrečko, ki jo zavežemo na mestu koreninskega vratu, še preden celotni vzorec vložimo v večjo vrečko.

Na prikrito okužbo znotraj pošiljke vzorčimo naključno.

Pri manjših rastlinah z bolezenskimi znamenji priporočamo vzorčenje ene ali več rastlin z reprezentativnimi bolezenskimi znamenji. Pri vzorčenju večjih rastlin vzorčimo več poganjkov, ki vključujejo bolezenska znamenja in/ali meje med zdravim in obolelim tkivom. Kadar postopek zahteva statistično zanesljiv rezultat ali pri vzorčenju semena, je količina vzorca odvisna od posamezne bakterije in velikosti pošiljke; priporočamo posvet z laboratorijem.

Po odvzemu vzorca uporabljeno opremo očistimo in v kolikor je potrebno tudi razkužimo z uporabo ustreznih dezinfekcijskih sredstev.

**Priprava in pošiljanje vzorcev**

Vzorce zapakiramo v plastično vrečko tako, da v njej pustimo tudi zrak, ki prepreči prekomerno mečkanje vzorca. Če je vzorec vlažen, ga pred pakiranjem ovijemo s papirnato brisačko. Če vzorčimo tudi zdravo rastlino, jo zapakiramo v ločeno vrečko.

Po vzorčenju material hranimo na hladnem, saj višje temperature uničijo bakterije in lahko povzročijo lažno negativne rezultate. Visoke temperature lahko vrečke dosežejo že na terenu, zato je priporočljivo, da jih sproti shranjujemo v primerno hlajeno embalažo npr. stiroporne škatle z ohlajenimi pingvinčki. V posebno vrečko ali kuverto damo izpolnjen zapisnik in jo damo v škatlo.

Škatlo zapremo, zalepimo, zapečatimo in označimo, da gre za 'vzorec za analizo' ter jih dostavimo v laboratorij v čim krajšem času. Če vzorcev ne moremo takoj dostaviti/poslati v laboratorij jih lahko za 24 do 48 ur shranimo v hladilnik. Koliko časa je vzorec primeren za testiranje je odvisno tako od bakterije kot od uporabljenih testov.

# NEMATODE (OGORČICE)

Vzorčimo lahko zemljo ali napadeno rastlinsko tkivo (korenine, listi, stebla, čebulice itd.) gostiteljskih rastlin, ki ga opravimo ob sumu v rastni sezoni.

Ob pregledu posevka smo pozorni na razne depresije in zaostalost v rasti rastlin. Pri pregledu napadenega rastlinskega tkiva smo pozorni na prisotnost zadebelitev, deformacij, razbarvanj idr., ki jih lahko povzročajo nematode.

Vzorec zemlje iz njivskih in ostalih kmetijskih površin vzamemo s pomočjo sonde iz različnih vzorčevalnih točk. Na 0,5 ha površine vzamemo med 0,5 in 1,5 l zemlje. Število odvzetih vzorcev je odvisno od homogenosti preučevanega zemljišča (talnega tipa) ter velikosti zemljišča. Za virusonosne nematode vzorčimo zemljo v območju korenin obolelih rastlin. Napadeno rastlinsko tkivo vzorčimo kot del rastline ali celo rastlino.

Po odvzemu vzorca uporabljeno opremo očistimo in v kolikor je potrebno tudi razkužimo z uporabo ustreznih dezinfekcijskih sredstev.

**Priprava in pošiljanje vzorcev**

Za detekcijo in identifikacijo vrst so potrebne žive nematode, ki so lahko zelo občutljive na šoke in mehanske poškodbe, zato z vzorcem ravnamo previdno, položimo v PVC vrečko in ne drobimo ipd.

Vzorce zemlje in napadenega rastlinskega tkiva dostavimo (osebno ali po pošti) v najkrajšem možnem času v nematološki laboratorij. Vzorci zemlje so lahko za krajši čas (do največ 48 ur) v zaprtih vrečkah shranjeni pri sobni temperaturi, vzorci napadenega rastlinskega materiala pa pri od 4 do 8⁰C.

# ŽUŽELKE IN PRŠICE

Kot vzorec odvzamemo celo rastlino, del rastline ali rastlinski proizvod, ki domnevno vsebuje osebke žuželk, ali osebke same ne glede na razvojni stadij. Pri odvzemu vzorca si lahko pomagamo s sekiro, žago, dletom, škarjami, pinceto, tankim čopičem. Vzorec odvzamemo tako, da morebitnih prisotnih osebkov ne poškodujemo!

Rastlinski material vzorčimo tako, da poleg osebkov čim bolj celovito zajamemo tudi morebitne prisotne poškodbe in druge znake, ki jih je po našem mnenju žuželka povzročila (obgrizena skorja, rovi, luknje, črvina). Rastlinski material razrežemo na ustrezno velike dele, ki se jih da prenašati, in jih shranimo v močne plastične vreče. Vreče tesno zapremo, tako da izhod organizmov ni mogoč na način, da zagotovimo dvojni ali trojni ovoj. Poleg dela rastline z znaki napada, je smiselno odvzeti tudi del brez znakov, ki služi kot primerjava in je lahko v pomoč pri diagnostiki.

Če najdemo osebke, jih shranimo v plastične ali steklene lončke s pokrovčkom, ki dobro tesnijo in ne prepuščajo tekočine (npr. pokrovčki z gumico in navojem). Osebke takoj po odvzemu usmrtimo, tako da jih z lončkom vred damo v zamrzovalnik za 1-2 uri, ali jih prelijemo z alkoholom (70 % lahko tudi v 96 % alkoholu). Za primerke z mehkim telesom (ličinke) priporočamo zamrzovanje, saj alkohol lahko povzroči obarvanje tkiv, kar lahko ovira postopek diagnostike. Po možnosti vzorčimo več osebkov žuželk in pršic, v različnih razvojnih stadijih, kar omogoča lažjo identifikacijo. Osebke v lončku rahlo imobiliziramo, da med transportom ne pride do poškodb (lomljenje anten, okončin) – za imobilizacijo uporabimo kos papirnate brisačke, vato ali rastlinski material.

**Priprava in pošiljanje vzorcev žuželk v različnih stadijih razvoja**

Pošiljamo izključno mrtve primerke. Primerke pošiljamo v plastičnih ali steklenih posodicah z varnim navojem, ki preprečuje izlitje tekočine. Za identifikacijo so potrebni nepoškodovani primerki žuželk in pršic. V primeru metuljev (*Lepidoptera*) osebke v ustrezni posodici za 24 ur postavimo v zamrzovalnik. Mrtve primerke nato obložimo z vato in shranimo v ustrezno posodico.

Ustrezno shranjene vzorce pošljemo v kartonski škatli ali oblazinjeni kuverti, ki jih predhodno obložimo z ustrezni mehkim materialom (vata, papir, idr.), da se med transportom ne poškodujejo. Če smo primerke predhodno že konzervirali, jih pošiljamo v tesno zaprtih posodah in navedemo kemikalije, v katerih so konzervirani.

Pri pošiljanju vzorcev žuželk in pršic je treba zagotoviti, da se vzorci med transportom ne poškodujejo – niti mehansko (npr. premetavanje) niti kemijsko (npr. pregrevanje)!

Vreče z rastlinskim materialom najlažje pošiljamo tako, da jih damo v škatle iz trdega kartona, s čimer tudi zagotovimo, da se vreče med transportom ne raztrgajo. Material dobro obložimo oz. ga v škatli čim bolj imobiliziramo, zato da ostane intakten.

**Pošiljanje lepljivih plošč**

Zaradi lažjega rokovanja pri jemanju in pošiljanju vzorcev ter še posebej zaradi njegove obdelave v laboratoriju lepljivo površino plošč po eni ali pa po obeh straneh na rahlo prekrijemo s čim bolj tanko in prozorno plastično folijo ali jih vložimo v plastično prozorno mapo. Tako obdane plošče na rahlo zložimo v kartonsko škatlo. V primeru, ko jih s folijo prekrijemo po obeh straneh, jih lahko zložimo eno na drugo, tako da damo po možnosti med vsako ploščo kos časopisnega ali drugega papirja, da se plošče med seboj ne sprimejo, žuželke na površini plošč pa ne poškodujejo. Če jih prelepimo samo po eni strani, jih lahko prepognemo z lepljivo stranjo navznoter, ovijemo z elastiko in položimo v trdo kartonsko škatlo.

Če je na vabi samo nekaj posameznih žuželk, lahko izrežemo košček vabe in ga pošljemo v plastični steklenički.

# GLIVE IN OOMICETE

Vzorec je lahko cela rastlina, del rastline, rastlinski proizvod (ali del njega), zemlja ali drug rastni substrat oziroma katerikoli proizvod, substrat, material, organizem, ki je okužen ali kontaminiran s ŠO. Vzorec je lahko tudi ulov v past, bris in podobno. V primeru lesnatih rastlin priporočamo, da ena rastlina predstavlja en vzorec, ki pa je lahko združen iz več enot iste rastline.

Vzorce za določanje gliv naberemo tako, da izbiramo rastlinske dele, kjer so izražena bolezenska znamenja, a je poleg tudi še na videz zdravo tkivo. Pri vzorčenju ran debel dreves režemo skorjo neposredno okoli rane ali izcejajočega se soka rane, dokler ni očitno viden rob nekroze. Izrežemo kose floema in ksilema (velikosti vsaj 10 x 10 cm) in jih shranimo v vrečko, ki jo dobro zapremo. V primeru sadik ali sejank vzorčimo celo rastlino, s koreninskim sistemom vred.

V primeru vzorčenja zemlje ali drugega substrata odvzamemo okrog vsaj 500 g (optimalno med 1000–1500 g vzorca). Vzorčimo zemljo v okolici (50 do 100 cm stran) debla drevesa na do treh mestih do globine 20 do 30 cm, tako da sprva odstranimo nekaj centimetrov zgornje plasti zemlje (ali vso organsko plast, če je prisotna) in naberemo od 300 do 500 g zemlje in rastlinskih ostankov. Zemljo iz vseh vzorčenih mest združimo in prenesemo v močno, zaprto plastično vrečko in shranimo na 4–10 ˚C.

V primeru vzorčenja semen se predhodno posvetujemo z diagnostičnim laboratorijem glede količine vzorčenega materiala. Če je na razpolago dovolj rastlinskega materiala, sestavimo vzorec iz več enot z različno razvitimi bolezenskimi znamenji.

Po odvzemu vzorca uporabljeno opremo očistimo in v kolikor je potrebno tudi razkužimo z uporabo ustreznih dezinfekcijskih sredstev.

**Priprava in pošiljanje vzorcev**

Vzorce pošiljamo v dobro zaprtih plastičnih vrečkah, da se ne izsušijo. Kadar so v vzorcu nežna tkiva (npr. sejanci, mladi poganjki, nežni listi, cvetovi), jih zavijemo v rahlo vlažen papir. Pri vzorcih, kjer lahko pride do iztekanja rastlinskih sokov (plodovi, gomolji), vsako enoto v vzorcu ovijemo v suh vpojni papir in nato zapremo v vrečko. Pri pošiljanju semen vzorec zapremo v platneno ali papirnato vrečko. Vzorec naj se dostavi v laboratorij v 24 urah in naj ob transportu in manipulaciji ne bo izpostavljen visoki temperaturi (nad 25 ºC) ali zmrzovanju. Če dostava v laboratorij 24 urah ni možna, se vzorec shrani v hladilniku (4–10 ºC) do največ 48 ur.