

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/5



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1405
Naslov projekta	Razvoj tehnologij za preprečevanje novih viroidnih obolenj hmelja. Development of technologies for preventing new viroid diseases of hop
Vodja projekta	20162 Sebastjan Radišek
Naziv težišča v okviru CRP	1.02.02 Razvoj tehnologij za preprečevanje novih viroidnih obolenj hmelja
Obseg raziskovalnih ur	981
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	07.2014 - 12.2016
Nosilna raziskovalna organizacija	416 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.03 Rastlinska produkcija in predelava 4.03.05 Fitomedicina
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.01 Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo

2. Sofinancerji

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

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Projekt je bil usmerjen k raziskavi in razvoju tehnologij preprečevanja širjenja novega viroidnega obolenja hmelja, ki od leta 2007 povzroča zakrnelost rastlin in odmiranje nasadov na okuženih območjih Slovenije. V okviru preteklih raziskav sta bila v simptomatičnih rastlinah odkrita dva viroida hop stunt viroid (HSVd) in citrus bark cracking viroid (CBCVd), od katerih slednji prevladuje pri analizah rastlin iz odkritih žarišč. Oba na novo odkrita viroida na hmelju predstavljata prvo najdbo v Evropi in v primeru CBCVd celo prvo znano najdbo na hmelju.

V epidemiološkem sklopu projektnih aktivnosti smo določali gostiteljsko specifičnost CBCVd in pri tem kot novega gostitelja določili grenkoslad (*Solanum dulcamara*). Rezultati testiranja plevelnih vrst v okuženih nasadih in umetnih okužb so pokazala, da plevelna vegetacija v hmeljiščih nima pomembne vloge pri ohranjanju CBCVd. Prav tako CBCVd ne ogroža pomembnejših kulturnih rastlin, ki se gojijo v bližini okuženih območij. Zelo pomembno ugotovitev predstavlja določitev CBCVd in HLVd v hmeljevi pršici in ovrednotenje agresivnosti CBCVd in HSVd na dveh slovenskih sortah. Določanje stabilnosti CBCVd v mehansko in s glifosatom uničenih okuženih rastlin so pokazala, da lahko CBCVd v nadzemnih ostankih hmelja zaznavamo do 6 tednov, medtem ko smo HLVd zaznavali še do časovne točke 3 mesecev. Pri analizi korenin uničenih rastlin smo ugotovili, da oba viroida propadeta v obdobju 6 mesecev. Pri razpadu tkiva in posledično viroidov močno prispeva uporaba totalnega herbicida na osnovi aktivne snovi glifosat. Analize ostankov hmelja v tleh na osnovi 3 različnih tkiv so pokazale, da lahko CBCVd v ostankih rastlin preživi do 10 mesecev, medtem ko HLVd tudi do 12 mesecev. Pri tem smo najvišjo obstojnost obeh viroidov zaznali v storžkih, najmanj pa v listih, ki se tudi najhitreje in najbolj razgradijo. Omenjeni podatki o preživetveni sposobnosti CBCVd na ostankih rastlin so pripomogli postavitvi potrebnih fitosanitarnih ukrepov, ki so potrebni pred obnovo nasadov na okuženih območjih.

V tehnološkem sklopu projekta smo ugotavljali korelacijo uporabe namakalnih sistemov in ostalih agrotehničnih ukrepov pri napredovanju v okužbe v nasadih. Pri tem nismo ugotovili povezav, smo pa povezavo potrdili na nivoju sort, kjer se kaže najnižja stopnja napredovanja okužbe pri sorti Savinjski golding. Razvili smo tehnološki postopek pravičnega kompostiranja hmeljevine za uničevanje viroidov ter prototip škropilnice, ki se uporablja kot dodaten element na traktorju pri razkuževanju rezalnikov in trgalnikov hmelja. Določili smo učinkovitost antivirusnih/viroidnih razkužil, ki so dostopni na slovenskem tržišču in kot najučinkovitejšega določili razkužilo Virocid v 2% konc. V podporo diagnostiki smo razvili LAMP detekcijo za CBCVd, HLVd in HSVd.

ANG

The project was focused to study and to the development of technologies for preventing spreading of newly discovered viroid disease which since 2017 causes stunting and decaying of hop plants in Slovenia. Previous diagnostics analysis of symptomatic plants confirmed presence of hop stunt viroid (HSVd) and citrus bark cracking viroid (CBCVd) from which CBCVd prevailed in infected plants. Both new viroids presents on hop first findings in Europe and in case of CBCVd first finding on hop plants.

In the epidemiological part of the project activities host specificity of CBCVd was tested where bittersweet (*Solanum dulcamara*) was found as a new host. The results of testing weed species from hop gardens and artificial infections showed that weed vegetation in hop gardens doesn't have important role in surviving of CBCVd. Similarly CBCVd doesn't threat important cultural plants which grow in the infected area. Important finding presents detection of CBCVd and HLVd in two spotted spider mites (*Tetranychus urticae*) and aggressiveness assessment of CBCVd and HSVd on two Slovene hop varieties. Stability testing revealed that CBCVd could be detected in hop remains for 6 weeks, whereas HLVd was detected for 3 months.

Root analysis of destroyed infected plants showed that both viroids decayed in the 6 month period. The decaying of plant tissue is strongly enhanced by using non-selective herbicide glyphosate. Analysis of hop remains based on three different tissues revealed that CBCVd could survive up to 10 months, whereas HLVd more than 12 months. The higher stability was detected in hop cones and lesser in hop leaves. These data help to made proper phytosanitary actions which are crucial before reestablishment of hop production in infected areas.

In the technological part of the project correlation analysis of irrigation systems and other agro-technical actions were performed to determine their influence in disease spreading. The analysis revealed correlation on the variety level where variety Savinjski golding showed the slowest disease spreading pattern. Developed was technological procedure for thermal composting for eradication of viroids from of hop waste and sprayer prototype for application of

disinfection agents on machinery. Tested was efficacy of different disinfection agents which are present in Slovene market. Analysis revealed higher efficacy of Virocid in 2% concentration against CBCVd. In order to support diagnostics LAMP detection was developed for detection of CBCVd, HLVd and HSVd.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev na raziskovalnem projektu²

Izhodišča in opis problematike

Leta 2007 smo na območju Šempetra v Savinjski dolini odkrili izbruh neznane in agresivne bolezni, ki na hmelju povzroča zakrnelost in odmiranje rastlin z zelo hitro dinamiko širjenja. Po obsežni diagnostični analizi je bila v obolelih rastlinah poleg vsesplošno razširjenega hmeljevega latentnega viroida (HLVd), odkrita še prisotnost dveh novih viroidov in sicer: viroida zakrnelosti hmelja (angl. hop stunt viroid - HSVd) in viroida razpokanosti skorje agrumov (angl. citrus bark cracking viroid - CBCVd). Oba na novo odkrita viroida na hmelju predstavljata prvo najdbo v Evropi in v primeru CBCVd celo prvo znano najdbo na hmelju. Ukrepi za preprečevanje in izkorenitev te bolezni temeljijo predvsem na uničevanju obolelih rastlin ter sanitarnih ukrepih. Neraziskane in nerazvite pa so bile rešitve in ukrepi v okviru tehnologije pridelave rastlin, ki bi pripomogle pridelovalcem omejevanje širjenja in odkritje kritičnih točk pri katerih prihaja do intenzivnega prenosa bolezni ali ohranjanja po uničenju okuženih nasadov. Namen projekta je bil tako razvoj novih tehnologij in pridobitev znanj na osnovi katerih so se nadgradili ukrepi za preprečevanje širjenja ter učinkovitejše eradikacije te nevarne bolezni.

S predlaganim projektom smo v okviru različnih delovnih paketov zajeli naslednje cilje:

1. Določitev gostiteljske specifičnosti CBCVd med kulturnimi rastlinami in plevelno vegetacijo ter identificirati potencialne vektorje.
2. Ovrednotiti agresivnost HSVd in CBCVd na hmelju
3. Proučiti stabilnost viroidov v hmeljevini in ostalih ostankih rastlin, ter analizirati vpliv namakalnih sistemov na širjenje bolezni
4. Preizkusiti učinkovitost termičnega kompostiranja za uničevanje viroidov v hmeljevini
5. Določiti učinkovitost in primernost razkužil za razkuževanje orodja in opreme
6. Razviti in vpeljati v prakso aplikacijski element za sprotno razkuževanje rezalnikov
7. Razviti novo in hitro diagnostično tehniko RT-LAMP za določanje HLVd, HSVd in CBCVd
8. Diseminacija rezultatov s pripravo navodil in tehnološkimi prikazi.

Rezultati projekta

Določanje gostiteljske specifičnosti CBCVd – kulturne rastline in pleveli

CBCVd je zaradi gostiteljske specifičnosti razširjen v državah pridelovalkah citrusov, medtem ko se ostala območja, ki niso primerna za gojenje agrumov, do sedaj niso štela za ogrožena. Tako pojav CBCVd v hmeljiščih oz. v okolju, kjer ni pričakovano, predstavlja nov moment v kmetijski proizvodnji Slovenije in tudi Evrope. Nabor gostiteljskih rastlin CBCVd je precej podoben tistemu, ki ga ima HSVd, zato smo v okviru poskusov določali ali je lahko CBCVd v našem okolju škodljiv tudi vinski trti, sadnem drevju in ostalim kulturnim rastlinam oz. ali se lahko na določenih rastlinah tudi latentno ohranja in s tem ustali na novem območju. Z namenom določitve vloge plevelne vegetacije pri ohranjanju CBCVd smo v okuženem hmeljišču vzorčili in testirali 15 različnih plevelnih vrst. Prve analize so v obliki šibkih PCR signalov pokazale prisotnost CBCVd le pri 2 rastlinah bele metlike. Ponovitvene analize in ponovno vzorčenje obeh rastlin pa prisotnosti CBCVd kasneje niso potrdile.

Gostiteljsko specifičnost izbranih kulturnih rastlin smo določevali z večkratnimi inokulacijami rastlin z nativno RNA in sokom pridobljenega iz donorskih rastlin. Med 15 rastlinskimi vrstami kulturnih rastlin smo kot gostitelja CBCVd potrdili le kumare in paradižnik, medtem ko smo med 20 različnimi plevelnimi vrstami kot zelo dobrega gostitelja potrdili le grenkoslad (*Solanum dulcamara*). Rastlina je v Sloveniji razširjena predvsem na grmovnatih obrežjih in svetlih gozdičih (vir. Mala Flora Slovenije), medtem ko grenkoslad ne spada med plevelne, ki bi jih našli v hmeljiščih. Rezultati testiranja plevelnih vrst v okuženih nasadih in umetnih okužbah so tako potrdili, da plevelna vegetacija v hmeljiščih nima pomembne vloge pri ohranjanju CBCVd. Prav tako

CBCVd ne ogroža pomembnejših kulturnih rastlin, ki se gojijo v bližini okuženih območij.

Določanje potencialnih vektorjev za CBCVd in HLVd

Dosedanje analize širjenja kažejo, da se CBCVd v nasadih širi izključno mehansko. Ne glede na to smo opravili poskus v katerem smo določali prisotnost CBCVd in HLVd v škodljivih organizmih, ki najpogosteje vzpostavijo parazitski odnos s hmeljem in bi lahko bili potencialni vektorji širjenja. Testiranja RNA izolirane iz 5 škodljivih organizmov (ŠO) hmelja, ki so vzpostavila parazitski odnos z rastlinami okuženimi z CBCVd in HLVd so pokazala prisotnost CBCVd v hmeljevi pršici z visoko stopnjo frekvence. V ostalih ŠO, razen v hmeljevi listni uši smo zaznali prisotnost HLVd. Rezultati tako odpirajo vprašanje v vlogi hmeljeve pršice pri širjenju okužbe CBCVd v okuženih nasadih.

Ocena agresivnosti HSVd in CBCVd na hmelju

Za HSVd je znano, da na hmelju povzroča zakrnelost rastlin in nastanek očitnih bolezenskih znamenj 5-7 let po okužbi v odvisnosti od sorte (Sano, 2003). V primeru CBCVd pa opažamo mnogo hitrejši in agresivnejši razvoj bolezenskih znamenj. Z namenom razjasnitve vloge posameznega viroida smo na slovenskih sortah Celeia in Bobek izvedli umetne okužbe rastlin z obema viroidoma v enojni in dvojni kombinaciji. Prva bolezenska znamenja smo opazili 4 mesece po okužbi na obeh sortah pri rastlinah, ki so bile okužene s CBCVd in kombinacijo CBCVd+HSVd. Rastline okužene s HSVd niso izrazile simptomov. Prav tako nismo opazili razlike v agresivnosti med rastlinami, ki so okužene samo s CBCVd in s kombinacijo HSVd + CBCVd.

Stabilnost CBCVd in HLVd v ostankih rastlin

Določitev stabilnosti viroidov v hmeljevini in ostalih ostankih rastlin je ključnega pomena za pravilno izvajanje ukrepov v okuženih nasadih ter na izkrčenih površinah. Ostanke rastlin predstavljajo potencialni vir novih okužb, zato smo določevali stabilnost viroidov v odmrlih rastlinah, določili pravi način uničenja in na ta način prilagodili obstoječe ukrepe.

Simulacija lokalnega uničevanja

V okuženem nasadu smo izbrali 10 rastlin okuženih z viroidoma HLVd in CBCVd. Petim rastlinam smo odrezali nadzemni del in ga pustili na vodilu, drugih pet rastlin pa smo poškopili s 5 % koncentracijo herbicida na osnovi aktivne snovi glifosat. Šest tednov po tretiranju rastlin s herbicidom in po mehanskem odrezu rastlin v vzorcih nismo več zaznali CBCVd. Med posameznima načinoma tretiranja rastlin ni večjih opaznih razlik, CBCVd pa smo glede na ponovitve večkrat zaznali v rastlinah, ki so bile mehansko odrezane. Viroida HLVd v rastlinah po uporabi 5% raztopine glifosata ali mehanskem odrezu po treh mesecih nismo več zaznavali. V časovni točki 6 mesecev po uporabi herbicida viroidov v koreninah nismo zaznali več.

Simulacija krčenja nasadov

Poskus stabilnosti CBCVd izvedli z vnosom talne sond s tremi različnimi tkivi hmelja; listje, storžke in trte. Sonde smo iz tal izkopavali v mesečnih intervalih in nato testirali z RT-PCR. Rezultati so pokazali, da lahko CBCVd v ostankih rastlin preživi do 10 mesecev, medtem ko HLVd tudi do 12 mesecev. Do časovne točke 6 mesecev smo zaznavali močne PCR signale, po sedmih mesecih pa je intenziteta pričela postopoma padati. Najvišjo obstojnost obeh viroidov smo zaznali v storžkih, najmanj pa v listih, ki se tudi najhitreje in najbolj razgradijo.

Analiza vpliva namakalnih sistemov na širjenje viroidov

Medsebojna primerjava med različnimi načini namakanja, vodnim virom ter okuženimi nasadi, kjer se namakanje ne izvaja, je pokazala primerljiv vzorec napredovanja okužbe, kar pomeni, da ta tehnološki ukrep ne vpliva na napredovanje okužbe v nasadu. Povezavo smo potrdili le na nivoju sort, kjer se kaže najnižja stopnja napredovanja okužbe pri sorti Savinjski golding. Pri ostalih sortah kot so Celeia, Aurora in Bobek je stopnja napredovanja okužbe primerljiva.

Učinkovitost termičnega kompostiranja za uničevanje viroidov v hmeljevini

V okviru projekta smo preizkušali možnost izkoriščanje termofilne faze kompostiranja za uničevanje viroidov v hmeljevini. Poskus je vključeval spremljanje temperaturnega profila in posledičnega propadanja viroidov v kompostnem kupu hmeljevine, ki smo ga prekrili s PVC folijo in na nepokritem kupu. Rezultati testiranja so pokazali, da viroidi v sredici kompostnega kupa, ki

doseže temperaturo nad 70C°, propadejo že po 3 dneh, ne glede na prekrivanje s PVC folijo. Bistvena razlika pa se je izkazala pri vseh ostalih točkah, saj smo v primeru kupa pokritega s PVC zaznali mnogo hitrejšo propadanje HLVD in CBCVD, ki je posledica višjih temperatur. Na osnovi časovne točke zadnjega zaznavanja HLVD in CBCVD v hmeljevini in dodanim varnostnim obdobjem 1 meseca smo kot minimalni čas kompostiranja hmeljevine določili 3 mesece, v primeru uporabe PVC folije pa 2 meseca.

Določanje učinkovitosti razkužil za razkuževanje orodja in opreme

Ker podatki o učinkovitosti razkužil za CBCVD in HLVD niso na voljo smo opravili poskus, v okviru katerega smo določali učinkovitosti razkužil, ki se najpogosteje uporabljajo pri razkuževanju delovne opreme v kmetijstvo in imajo v deklaracijah navedeno anti- virusno/viroidno delovanje. Razkužila smo uporabili v različnih koncentracijah v skladu s priporočili proizvajalcev ali podatkov iz literature in pri tem ugotovili najvišjo stopnjo učinkovitosti v primeru razkužila Virocid v 2% konc.

Razvoj in vpeljava v prakso aplikacijskega elementa za sprotno razkuževanje rezalnikov

V času trajanja projekta smo na IHPS zasnovali, izdelali načrt ter specifikacijo za izdelavo namenskih škropilnic za aplikacijo razkužila pri rezi ter obiranju hmelja. Omenjeni škropilnici smo v prototipni delavnici Poskusnega posestva tudi izdelali ter jih na lastnih površinah preizkusili pri delovanju v praksi. Specifičnost nasadov hmelja in delovnih strojev je zahtevala konstrukcijo takšnih škropilnic, ki so sestavni del združenega orodja tako, da lahko pri enem prehodu opravimo tri delovne operacije hkrati.

Razvoj nove in hitre diagnostične tehnike RT-LAMP za določanje HLVD, HSVd in CBCVD

LAMP (angl. loop-mediated isothermal amplification) tehnologija omogoča hitro pomnoževanje tarčnih regij in predstavlja hitro in cenovno ugodno alternativo za detekcijo patogenih zaporedij. Z razvitimi začetnimi oligonukleotidi smo uspešno pomnožili viroide v pozitivnih vzorcih, kar se je pokazalo kot značilen dvig ravni fluorescentnega signala med samim pomnoževanjem. V primeru direktne uporabe rastlinskega tkiva le-tega nismo zaznali, verjetno zaradi inhibicije rastlinskega materiala na samo reakcijo. Iz rezultatov je razvidno, da lahko v primeru viroidov hmelja LAMP tehnika služi samo kot hitri test, vsekakor pa ne kot dokončni test. Ne more se namreč primerjati z občutljivostjo RT-PCR ali RT-qPCR metodologij. LAMP detekcija hmeljnih viroidov se ni izkazala primerna za neposredno analizo hmeljnega soka, kar bi bila njena največja prednost.

Obdelava podatkov, diseminacija, navodila in tehnološki prikazi

Rezultati projekta so omogočili:

- Pripravo tehnoloških navodil za pravilno kompostiranje, ki so tudi del KOPOP navodil za hmeljarstvo
- Izdajo tehnološke knjižice z naslovom »Huda viroidna zakrenlost hmelja« avtorji Sebastjan Radišek, Tanja Guček, Gregor Leskošek, Anita Benko Beloglavec, Jernej Jakše, Branka Javornik
- Podatki o preživetju v tleh in v rastlinah so bili osnova za dopolnitev ukrepov Odločbe o nujnih ukrepih za preprečevanje vnosa in širjenja viroidnih zakrenlosti hmelja (Uradni list RS, št. 21/2015).
- Ugotovitve projekta so bile del PRA ocen tveganja, ki je bila predstavljena na stalnem odboru EU v Bruslju (STANDING COMMITTEE ON PLANTS, ANIMALS, FOOD AND FEED, Section: Plant Health, 25-26.1.2016 Brussels) in delovni skupini držav pridelovalk hmelja (Workshop on HSVd and CBCVD; Institute for Plant Protection, Freising, 10-11.2.2016
- Demonstracijski prikaz prototipov škropilnic na IHPS dne 20.8.2015

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

Izvajanje projekta je potekalo v skladu z zastavljenim programom dela in cilji. V obdobju prvega mejnika izvajanja smo opravili testiranje plevelne vegetacije v okuženih hmeljiščih in pričeli z izvajanjem poskusov stabilnosti in ohranjanja viroidov v ostankih okuženih rastlin. Prav tako smo izvedli prve inokulacije slovenskih sort z namenom določanja agresivnosti CBCVD. Veliko

aktivnosti je bilo namenjenih razvoju termičnega kompostiranja s katerim smo uničevali prisotnost viroidov v hmeljevini.

V času drugega in tretjega mejnika smo opravili in končali z izvedbo večine poskusov. Tako smo uspešno opravili obsežno testiranje gostiteljske specifičnosti CBCVd med kulturnimi rastlinami in pleveli. Opravili smo testiranje potencialnih vektorjev in ovrednotili agresivnost HSVd in CBCVd na dveh slovenskih sortah. Testirali smo učinkovitost različnih razkužil in razvili prototipe škropilnic za sprotno razkuževanje opreme. Razvili smo novo diagnostično metodo LAMP za detekcijo HSVd, CBCVd in HLVd ter pripravili tehnološka navodila za pravilno kompostiranje hmeljevine iz okuženih hmeljišč.

V obdobju zadnjega mejnika smo izvajali analize dobljenih podatkov in pripravili tehnološki priročnik za pridelovalce in strokovne službe. Na osnovi opravljenega dela ocenjujemo, da je bil projekt v celoti realiziran in da smo pridobili prve ključne podatke s katerimi smo razvili nove tehnologije za preprečevanje viroidnih okužb hmelja.

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

V programu in izvedbi projekta nismo izvedli sprememb dela, ki bi bistveno vplivale na potek in izvedbo dela.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	8522361	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Identifikacija in karakterizacija mikroRNA pri rastlini <i>Humulus lupulus</i> z uporabo sekvenciranja naslednje generacije in njihov odziv na okužbe citrus bark cracking viroida (CBCVd).
		ANG	Identification and characterization of microRNAs in <i>Humulus lupulus</i> using high-throughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection
	Opis	SLO	Mikro RNA (miRNA) spadajo v skupino nekodirajočih majhnih RNA molekul, ki imajo pomembno vlogo pri genski ekspresiji. Z namenom odkritja miRNA pri hmelju in njihovega odziva na okužbe s CBCVd smo s sekveniranjem nove generacije analizirali dve sRNA knjižnici, ki sta bili izdelani iz okuženih in neokuženih rastlin. Sekvenčna analiza je skupno odkrila 67 ohranjenih in 49 novih miRNA. Od teh je bilo 36 ohranjenih in 37 novih povezanih z odzivom na infekcije CBCVd. Skupno smo predvideli 311 tarč na osnovi primerjave s sekvencami iz hmeljnega transkriptoma. Večina tarč pripada transkripcijskim faktorjem, ki vplivajo na razvoj listja, korenin in razvoja storžkov. Poleg tega je bil ugotovljen potencialni vpliv identificiranih miRNA na celične in metabolne procese.
		ANG	MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding small RNAs that play important roles in gene expression regulation. To identify miRNAs in hop and their response to CBCVd-infection, two small RNA (sRNA) libraries were prepared from healthy and CBCVd-infected hop plants and were investigated by high throughput sequencing. A total of 67 conserved and 49 novel miRNAs were identified. Among them, 36 conserved and 37 novel miRNAs were found to be differentially recovered in response to CBCVd-infection. A total of 311 potential targets was predicted for conserved and novel miRNAs based on a sequence homology search using hop transcriptome data. The majority of predicted targets significantly belonged to transcriptional factors that may regulate hop leaf, root and cone growth and development. In addition, the identified miRNAs might also play an important roles in other cellular and metabolic processes, such as signal transduction, stress response and other physiological processes, including prenylflavonoid biosynthesis pathways.

	Objavljeno v	BioMed Central; BMC genomics; 2016; No. 17:919; str. 1-19; Impact Factor: 3.867; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.156; A': 1; WoS: DB, KM; Avtorji / Authors: Mishra Ajay Kumar, Duraisamy Ganesh Selvaraj, Matoušek Jaroslav, Radišek Sebastjan, Javornik Branka, Jakše Jernej	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	8472953	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Diagnostične tehnike določanja viroidov
		ANG	Diagnostic techniques for viroids
	Opis	SLO	V preglednem članku so predstavljene prednosti in slabosti tehnik določanja viroidov na različnih gostiteljskih rastlinah. Kljub razvoju novih molekularnih tehnik, ki omogočajo hitro in občutljivo detekcijo, nedvoumna identifikacija viroidov še vedno temelji na kombinaciji različnih diagnostičnih metod. Tako molekularne metode, ki predstavljajo prihodnost detekcije viroidov, še vedno pri sami identifikaciji ne morejo zamenjati tehnik biološkega indeksiranja, ki predstavlja osnovo pri epidemioloških in etioloških študijah.
		ANG	In this review, several methods for viroid detection in various host plants are discussed, including their advantages and disadvantages. Even though relatively new molecular methods enable fast and sensitive detection of viroids, a combination of different methods gives the most reliable identification. Techniques based on nucleic acids may be the future for viroid detection but they still cannot replace biological indexing, which is usually essential in epidemiological and aetiological studies.
	Objavljeno v	Her Majesty's Stationery Office; Plant Pathology; 2016; Vol. , no.; str. v tisku; Impact Factor: 2.383; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.303; A': 1; WoS: AM, DE; Avtorji / Authors: Guček Tanja, Trdan Stanislav, Jakše Jernej, Javornik Branka, Matoušek Jaroslav, Radišek Sebastjan	
	Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	8596089	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Optimizacija določanja hmeljevega latentnega viroida (HLVd) z uporabo RT-PCR v realnem času
		ANG	Optimization of detection of hop latent viroid (HLVd) with real time RT-PCR.
	Opis	SLO	Hmeljev latentni viroid (HLVd) na večini sort hmelja ne povzroča izrazitih bolezenskih znamenj, vendar pa negativno vpliva tako na količino kot tudi kvaliteto pridelka. Prav zaradi povzročanja neizrazitih znamenj okužbe in vegetativnega razmnoževanja je prisoten v večini svetovnih pridelovalnih območjih hmelja. V primeru viroidnih bolezni uporaba fitofarmaceutskih sredstev ni mogoča, zato preprečevanje širjena bolezni temelji na sanitarnih ukrepih in vzgoji neokuženega sadilnega materiala. Pri tem so ključnega pomena zanesljive in hitre metode za določanje viroidov. Za določevanje HLVd v hmelju so v uporabi poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) in hibridizacija, najpogosteje pa verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). Z namenom nadgradnje obstoječih metod določanja HLVd smo razvili metodo RT-PCR v realnem času (RT-qPCR), ki jo odlikuje visoka stopnja občutljivosti, hitrost, analitiku prijaznejše rokovanje in možnost nadgradnje za hkratno določanje tudi ostalih patogenov, ki jih določamo na hmelju.
			Hop latent viroid (HLVd) in most varieties does not produce visible symptoms; however, it has a negative impact on both the quantity and quality of the crop. The unexpressed symptoms of the infection and

	ANG	vegetative propagation are the reason, that it has been present in the majority of hop production regions. In the case of viroid diseases, the use of plant protection products is not possible, so the prevention of spread of the disease is based on sanitary measures and production of healthy planting material. In this case, reliable and rapid method for detection of viroids, are crucial. For identification of HLVD in hops polyacrylamide electrophoresis (PAGE) and hybridization are used, but the most commonly used is reverse transcription combined with polymerase chain reaction (RT-PCR). In order to upgrade the existing methods for HLVD detection, we have developed real time RT-PCR (RT-qPCR), which is distinguished by a high degree of sensitivity, speed, analyst-friendly handling and the possibility of upgrading to multiplex detection of other pathogens that are also detected in hop.
Objavljeno v		Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo; Hmeljarski bilten; 2016; 23; str. 27-40; Avtorji / Authors: Guček Tanja, Štajner Nataša, Jakše Jernej, Javornik Branka, Radišek Sebastjan
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	709772 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Biološko indeksiranje in detekcija viroidov na hmelju (<i>Humulus lupulus</i>)
		ANG Biological indexing and detection of viroids from hop (<i>Humulus lupulus</i> L.) in Slovenia
	Opis	SLO Tehnike umetnega okuževanja predstavljajo pomembno orodje v rastlinski virologiji in se lahko uporabljajo v različnih študijah kot so testiranje odpornosti rastlin, testiranje gostiteljske specifičnosti, pri epidemioloških analizah in študijah interakcij med rastlinami ter patogeni. Z namenom razvoja zanesljive inokulacijske tehnike za testiranje odpornosti hmelja in gostiteljske specifičnosti za CBCVd smo primerjali 4 različne tipe inokulov. Inokuli so temeljili na izvlečkih RNA in soka okuženih rastlin, pri čemu smo izvajali dva tipa inokulacij: injiciranje v steblo in okuževanje preko listov s pomočjo karborunduma. Analize so pokazale najvišjo stopnjo okužb v primeru slednjega.
		ANG Artificial plant inoculations methods present important tool in plant virology, and could be used in different studies such as resistance screening, biological indexing of host plants, epidemiological studies and analysis of plant-pathogen interactions. With the aim of developing a reliable bioassay for CBCVd for hop genotype resistance screening and analysis of CBCVd host range, we compared four different types of inoculum based on RNA and sap extract obtained from CBCVd infected donor plants. Inoculum was mechanically introduced using stem injections or rubbing the inoculum onto leaves treated with carborundum. Results of our study show that the best bioassay for CBCVd is rubbing the sap extract inoculum onto leaves treated with carborundum.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	s. n.; Mission possible; 2015; Str. 599; Avtorji / Authors: Guček Tanja, Radišek Sebastjan, Jakše Jernej, Matoušek Jaroslav, Javornik Branka
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
2.	COBISS ID	8301689 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Obvladovanje viroidov na hmelju v Sloveniji

	ANG	Management of hop (<i>Humulus lupulus</i>) viroids in Slovenia.
Opis	SLO	V okviru znanstvene konference smo predstavili raziskave obvladovanje viroidnih obolenj na hmelju v Sloveniji. Do sedaj so na hmelju poznani 4 viroidi, med katerimi so Hop latent viroid (HLVd), hop stunt viroid (HSVd) in Citrus bark cracking viroid (CBCVd) prisotni v Sloveniji. Največ škode nastaja zaradi okužb CBCVd, ki povzroča nevarno bolezen hudo viroidno zakrnelost hmelja. Predstavljene so bile epidemiološke raziskave usmerjene v proučevanje kritičnih točk širjenja, ki so bistveno prispevale k izboljšanju izvajanja ukrepov preprečevanja in eradikacije. Omenjene raziskave so bile podlaga za spremembo zakonodaje, ki v Sloveniji ureja preprečevanje širjenja viroidnih obolenj ter predlogov ukrepov na nivoju EU.
	ANG	In the frame of scientific conference we present viroid management studies in Slovenia. Until now 4 viroids are known on hop from which Hop latent viroid (HLVd), Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus bark cracking viroid (CBCVd) are present in Slovenia. The most harmful is CBCVd which causes severe hop stunt disease. We present epidemiological studies which were focused into study of critical viroids spreading points. These studies significantly contribute in improvement of management strategy and in eradication process. The results were also base for changes in legislation which cover hop viroids in Slovenia and prepositions for EU measures.
Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
Objavljeno v	Düsseldorf University Press; Viroid 2015; 2015; Str. 29-30; Avtorji / Authors: Radišek Sebastjan, Jakše Jernej, Guček Tanja, Čerenak Andreja, Matoušek Jaroslav, Javornik Branka	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
3.	COBISS ID	724108 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	PRA za hop stunt viroid (HSVd) in citrus bark cracking viroid (CBCVd) na hmelju
	ANG	PRA on Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus bark cracking viroid (CBCVd) on hop
Opis	SLO	Na povabilo stalnega odbora EU sekcija zdravje rastlin smo predstavili analizo tveganja za hop stunt viroid (HSVd) in citrus bark cracking viroid (CBCVd). Analiza tveganja (PRA) je bila izdelana na osnovi izbruhov omenjenih viroidov v Sloveniji in zajema več kriterijev na osnovi katere se poda zaključek o predlaganem statusu organizma ter ukrepih. Predstavljena PRA je bila prvi primer, ki je bil do sedaj poročan iz Slovenije.
	ANG	On the invitation of EU standing committee, section Plant health, we presented pest risk analysis (PRA) for hop stunt viroid (HSVd) and citrus bark cracking viroid (CBCVd). PRA was prepared based on new outbreaks of viroids in Slovenia and included several criteria which are important for future status of harmful organism and control measures. Presented PRA was the first case which was until now reported from Slovenia.
Šifra	F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
Objavljeno v	2016; Avtorji / Authors: Radišek Sebastjan, Orešek Erika	
Tipologija	3.16 Vabljen predavanje na konferenci brez natisa	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Izdaja priročnika z naslovom: Huda viroidna zakrnelost hmelja Avtorji: Sebastjan Radišek,

Tanja Guček, Gregor Leskošek, Anita Benko Beloglavec, Jernej Jakše, Branka Javornik Izdaja: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije ISBN 978-961-93322-1-4 Priročnik je dostopen tudi na spletni straneh IHPS in Uprave za varno hrano, veterino in varstvo rastlin: <http://www.ihps.si/> in <http://www.uvhvvr.gov.si/>

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Rezultati projektne dela imajo pomembno vlogo pri razvoju znanosti, saj smo proučevali epidemiologijo povsem nove bolezni » hude viroidne zakrnelosti hmelja«, ki je do sedaj odkrita samo v Sloveniji. Z uporabo novih raziskovalnih pristopov smo neposredno prispevali k razjasnitvi vloge ključnih povzročiteljev te kompleksne bolezni, kar je pomembno za določitev statusa posameznega viroida in razvoj nadaljnjih ukrepov preprečevanja. Ob tem smo razvili tehnike, ki omogočajo epidemiološke študije v različnih tehnoloških procesih proizvodnje in posledično razvoj strategij preprečevanja. Razvili smo nov aplikacijski element, ki bo z novim načinom razkuževanja opreme pripomogel zmanjšanju tveganja nastanka novih okužb. Rezultati raziskave bodo vplivali na pridobivanje novega znanja in posledično na vključevanje tega znanja v nove tehnologije v domačem prostoru ter tudi v širšem evropskem oziroma svetovnem prostoru.

ANG

Results of project activities have important contribution for science since we study epidemiology of new disease named severe hop stunt disease which is until now present only in Slovenia. By using new research approaches we clarify the role of main casual agents what is important for implementation of disease management actions. In the frame of the project we developed techniques which manage epidemiological studies in different technological processes and manage development of control strategies. We develop a new application prototype for disinfection of machinery and equipment which could be used for viroid control in hop gardens. The results will have impact in implementation of new knowledge in current technological process in Slovenia and also worldwide.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Rezultati projekta imajo zaradi aplikativne uporabe dolgoročne učinke na stabilnost hmeljarske proizvodnje v Sloveniji. Novi tehnološki pristopi bodo odločilno vplivali na preprečevanje širjenja bolezni in njihovo eradikacijo. Razvite tehnike se bodo v prihodnosti uporabljale pri izvajanju epidemioloških raziskav viroidnih obolenj in neposredno v programih, ki zahtevajo nadzor nad škodljivimi organizmi. Rezultati projekta so utrdili in povečali prepoznavnost slovenske znanosti in stroke. Intenzivirali smo mednarodna sodelovanja, hkrati pa smo s svojim znanjem zanimivi za tuje inštitucije in se tako vključujemo v mednarodne programe dela. Pomemben pomen rezultatov je viden tudi pri prenosu sodobnih znanj v različne izobraževalne procese. V izvajanju raziskav smo vključevali tudi dodiplomske in podiplomske študente, kar je izjemnega pomena, saj le tako lahko izobražujemo konkurenčen kader, ki bo lahko doma osvojeno znanje prenašal v gospodarstvo ter s tem prispeval k ustvarjanju nove vrednosti.

ANG

Results of the project are important for long-term stability of hop production in Slovenia. New technological approaches will significantly contribute in preventing disease spreading and eradication. The developed techniques will be in future important part of epidemiological studies of viroid diseases and in the control programs of harmful organisms. The results of the project increased recognition of Slovene science and expertise from plant protection. We intensify international cooperation and in the same time we become more interesting for foreign institutions and participation in international programs. Important part of projects results is seen also in implementation of knowledge in education processes. In the project we include bachelor and doctoral students, what is important for knowledge transferring and contribution of new added value.

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

Poleg sofinancerjev se za rezultate projekta zelo zanimajo pridelovalci hmelja iz Slovenije in ostalih pridelovalnih območij Evrope. Prav tako so rezultati zanimivi za raziskovalce na domačih in tujih inštitucijah, ki se ukvarjajo z diagnostičnimi in epidemiološkimi raziskavami viroidnih in virusnih obolenj rastlin. Rezultati so zanimivi tudi za kmetijske svetovalce in ostalo zainteresirano javnost predvsem iz področja hmeljarstva.

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

Projekti: COSTFA0603: Plant proteomics in Europe (2007- 2011) Hop industry lifelong learning program - LdV Hop school 7. Okvirni program EU, SEE.ERA.NET, ID10561, The use of SNPs and SSRs in order to reveal genetic diversity within cultivated olive germplasm from western balkan countries, 20082009 (št. pogodbe arrs: 100007380025) EU MODBIOLIN PROJECT, GA No. 316304 Bilateralni projekti: BIAR/0608/04, BIHR/0708/040, BI-ME/16-17-017

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

Rezultati sodelovanja s tujimi inštitucijami temeljijo na izmenjavi materiala in izkušenj, predvsem na področju varstva rastlin, biotehnologije in agronomije ter povezovanju za izvedbo skupnih prijav na različne projekte. Rezultati sodelovanja so objavljeni tudi v obliki znanstvenih in strokovnih objav.

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj	
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
	Zastavljen cilj <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text" value="V celoti"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
	Zastavljen cilj <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text" value="V celoti"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja
	Zastavljen cilj <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value="V celoti"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value="V celoti"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value="V celoti"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value="V celoti"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value="V celoti"/>

F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	

G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar**14.Izjemni dosežek v letu 2016¹⁴****14.1. Izjemni znanstveni dosežek**

CBCVd v svetu spada med slabo proučene viroide, zato testiranje gostiteljske specifičnosti predstavlja povsem nov in pomemben znanstveni prispevek k epidemiologiji CBCVd. Poleg določanja gostiteljev smo v okviru projektnega dela razvili tudi zanesljivo tehniko umetnega okuževanja, ki je primerna tudi za raziskave ostalih viroidov. Rezultati ugotovitev imajo neposredno uporabno vrednost, saj predstavljajo temelj za izvajanje ukrepov preprečevanja in

izkoreninjanja CBCVd v Sloveniji. Prav tako so rezultati postali del ocene tveganja (PRA), ki jo je naročil stalni odbor EU za zdravstveno varstvo rastlin. Na osnovi PRA je CBCVd na hmelju bil v letu 2015 uvrščen na opozorilni seznam škodljivih organizmov Evropske organizacije za varstvo rastlin.

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

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:

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo
Slovenije

Sebastjan Radišek

ŽIG

Datum:

14.3.2017

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/5

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 cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. 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 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 2016 (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/2017 v1.00

AC-B7-5D-42-2E-B7-D5-36-5E-DE-3A-B0-84-1D-3F-79-45-1E-2A-35

Priloga 1: Zaključno vsebinsko poročilo o realizaciji CRP projekta

Naslov: Razvoj tehnologij za preprečevanje novih viroidnih obolenj hmelja

Šifra projekta: V4-1405

Čas trajanja: 1.7.2014 do 31.12.2016

1 UVOD

1.1 Izhodišča in opis problematike

Viroidi spadajo med najmanjše rastlinske patogene, ki lahko povzročajo agresivna do latentna obolenja na različnih rastlinskih vrstah. Sestavlja jih enoverižna, krožna in nekodirajoča RNA molekula velikosti med 239-475 nukleotidov (nt). Do sedaj je bilo odkritih več kot 30 različnih vrst viroidov, ki so glede na način razmnoževanja razdeljeni v dve družini *Pospiviroidae* in *Avsunviroidae*. Tipična bolezenska znamenja viroidnih obolenj največkrat zajemajo zakrnelost rastlin, epinastijo, distorzije, nekroze tkiva in v najbolj agresivnih primerih tudi odmiranje rastlin (Diener, 1987; Flores et al., 1998). Znanih je več viroidnih obolenj, ki povzročajo visoko gospodarsko škodo. Tako npr. potato spindle tuber viroid (PSTVd) lahko na krompirju zmanjša pridelek tudi do 60%, chrysanthemum stunt viroid (CSVd) v okuženih rastlinjakih s povzročanjem zakrnelosti krizantem hitro uniči večino proizvodnje. Še precej večjo škodo lahko viroidi povzročajo v trajnih nasadih. Tako je pojav coconut cadang-cadang viroida (CCCVd) v obdobju 1920 do sedaj na Filipinih prisilil pridelovalce v uničenje več kot 40 milijonov kokosovih dreves, kar v sedanji vrednosti pomeni 4000 milijonov ameriških dolarjev. Pri proizvodnji avokada se že 70 let srečujejo s pojavom avocado sunbloch viroida (ASBVd), ki ga preprečujejo z vzgojo certificiranih sadik in stalno eradikacijo. Zelo pomembna skupina so viroidi, ki okužujejo citruse ter hop stunt viroid (HSVd), ki je s svojimi različicami zelo škodljiv hmelju, marelicam, slivam, citrusom in kumaram (Randles, 2003). Razvoj in intenzivnost bolezenskih znamenj je pri viroidnih obolenjih odvisen od različice viroida, sorte in rastlinske vrste. Posamezen viroid je lahko na določenem gostitelju prisoten samo latentno, medtem ko na drugem gostitelju povzroča zelo agresivna bolezenska znamenja. Poleg posameznih viroidnih okužb poznamo tudi obolenja, kot je npr. kaheksija in eksokortis citrusov, ki se razvijejo kot posledica prisotnosti več viroidov hkrati in predstavljajo kompleksne bolezni. Učinkovito preprečevanje viroidnih obolenj temelji predvsem na uničevanju obolelih rastlin, razkuževanju opreme, uničevanju vektorjev, vzgoji zdravega sadilnega materiala, prilagojeni agrotehniko ter odpornosti rastlin. Tako poleg neposredne škode na rastlinah, pojav viroidnega obolenja prisili pridelovalce v izvajanje dodatnih preventivnih ukrepov in prilagajanju agrotehniko, kar ima dodaten vpliv na samo gospodarnost pridelave.

Na osnovi filogenetskih študij so raziskovalci postavili pojav prvih viroidnih obolenj vsaj 2500 let v preteklost, vendar pa se je njihova škodljivost najbolj manifestirala šele zadnjih 150-200 let, čemur je predvsem pripomogla intenzivirana globalna izmenjava rastlin, ki se vegetativno razmnožujejo (Bar-Joseph, 2003). Tako pojav novih viroidnih obolenj največkrat nastane zaradi vnosa okuženih rastlin na nova območja, gojenja občutljivih rastlin ob latentno okuženih rastlinah, nastanka novih agresivnejših viroidnih različic ter sinergističnih interakcij med viroidi ali celo z virusi v okviru posameznih rastlin (Diener, 1995). Tipičen primer prenosa viroida iz ne-simptomatičnih rastlin na zelo občutljivega gostitelja, predstavlja

prenos HSVd iz vinske trte na hmelj, ki se je zgodil na Japonskem. HSVd je namreč precej razširjen viroid na vinski trti, vendar na tej rastlini ne povzroča bolezenskih znamenj. S prenosom na hmelj se je izkazalo, da lahko povzroča zakrnelost hmelja in da je precej bolj agresiven na tem gostitelju (Sano, 2003). V vsakem primeru je ob pojavu novega viroidnega obolenja eradikacija prvi cilj s katerim se poskuša preprečiti širjenje in doseči popolna izkoreninitve novega obolenja. V ta namen je poleg uničevanja okuženih rastlin ključnega pomena poznavanje epidemiologije nove bolezni, tehnologija pridelave gostiteljskih rastlin ter hitra in zanesljiva diagnostika. Samo s takšnim sistemskim pristopom lahko pričakujemo uspešnost ukrepov in reševanje ogrožene proizvodnje na okuženih območjih.

Predstavitev problema

Hmeljarstvo je v Sloveniji pomembna kmetijska panoga, ki s svojo proizvodnjo na približno 1400 ha predstavlja 3 % vseh svetovnih površin hmelja (<http://www.hmelj-giz.si>). Proizvodnja je z več kot 90 % izvoza neposredno vezana na svetovno tržišče, kjer obstaja visoka stopnja konkurence med državami pridelovalkami. Tako lahko vsak negativen pojav, ki vpliva na stabilnost proizvodnje, močno ogrozi eksistenco pridelovalcev, kar posledično vodi v opuščanje pridelave. Leta 2007 smo na območju Šempetra v Savinjski dolini odkrili izbruh neznane in agresivne bolezni, ki na hmelju povzroča zakrnelost in odmiranje rastlin z zelo hitro dinamiko širjenja. Po obsežni diagnostični analizi je bila v obolelih rastlinah poleg vsesplošno razširjenega hmeljevega latentnega viroida (HLVd), odkrita še prisotnost dveh novih viroidov in sicer: viroida zakrnelosti hmelja (angl. hop stunt viroid - HSVd) in viroida razpokanosti skorje agrumov (angl. citrus bark cracking viroid - CBCVd). Oba na novo odkrita viroida na hmelju predstavljata prvo najdbo v Evropi in v primeru CBCVd celo prvo znano najdbo na hmelju. Raziskave so pokazale, da je glavni povzročitelj bolezni v Sloveniji CBCVd, medtem ko je bil HSVd v rastlinah zaradi antagonističnega odnosa s CBCVd neaktiven in ga v okuženih rastlinah ne zaznavamo več. Bolezen, ki jo povzroča CBCVd smo zaradi povzročanja agresivnih bolezenskih znamenj poimenovali huda viroidna zakrnelost hmelja.

Ukrepi za preprečevanje in izkorenitev te bolezni temeljijo predvsem na uničevanju obolelih rastlin ter sanitarnih ukrepih. Neraziskane in nerazvite pa so bile rešitve in ukrepi v okviru tehnologije pridelave rastlin, ki bi pripomogle pridelovalcem omejevanje širjenja in odkritje kritičnih točk pri katerih prihaja do intenzivnega prenosa bolezni ali ohranjanja po uničenju okuženih nasadov. Prav tako je v primeru CBCVd neraziskana vloga plevelne vegetacije in ostalih potencialnih vektorjev v hmeljiščih ter nevarnost širjenja na ostale kulturne rastline kot je npr. vinska trta in sadno drevje. Zelo pomembno je pri tako pomembnih boleznih razvijati nove diagnostične tehnike, ki omogočajo hitro zaznavanje in natančnejše spremljanje epidemioloških značilnosti povzročiteljev bolezni. Namen projekta je bil tako razvoj novih tehnologij in pridobitev znanj na osnovi katerih so se nadgradili ukrepi za preprečevanje širjenja ter učinkovitejše eradikacije te nevarne bolezni.

1.2 Cilji raziskave

S predlaganim projektom smo v okviru različnih delovnih paketov zajeli naslednje cilje:

- (1) Določitev gostiteljske specifičnosti CBCVd med kulturnimi rastlinami in plevelno vegetacijo ter identificirati potencialne vektorje.
- (2) Ovrednotiti agresivnost HSVd in CBCVd na hmelju
- (3) Proučiti stabilnost viroidov v hmeljevini in ostalih ostankih rastlin, ter analizirati vpliv namakalnih sistemov na širjenje bolezni
- (4) Preizkusiti učinkovitost termičnega kompostiranja za uničevanje viroidov v hmeljevini
- (5) Določiti učinkovitost in primernost razkužil za razkuževanje orodja in opreme
- (6) Razviti in vpeljati v prakso aplikacijski element za sprotno razkuževanje rezalnikov
- (7) Razviti novo in hitro diagnostično tehniko RT-LAMP za določanje HLVd, HSVd in CBCVd
- (8) Diseminacija rezultatov s pripravo navodil in tehnološkimi prikazi.

2 MATERIAL IN METODE

Osnovo raziskave so predstavljali različni poskusi in vpeljava tehnologij, s poudarkom na proučevanju epidemioloških lastnosti povzročiteljev viroidnih zaknelosti hmelja, hitre diagnostike ter razvoja novih tehnoloških rešitev, ki bodo v praksi pripomogle k eradikaciji in preprečevanju širjenja te nevarne bolezni. Delo projekta je metodološko potekalo v okviru naslednjih delovnih programov:

Program 1: Gostiteljska specifičnost CBCVd med kulturnimi rastlinami in plevelno vegetacijo ter identifikacija potencialnih vektorjev (izvajalec IHPS)

PI.1 Določanje gostiteljske specifičnosti CBCVd - kulturne rastline

Z namenom ugotovitve gostiteljske specifičnosti CBCVd smo izvedli poskus umetnega okuževanja 10 različnih kulturnih rastlin, ki so najpogosteje zastopane na kmetijskih območjih in bi glede na pojav podobnih obolenj lahko bile potencialne gostiteljske rastline CBCVd. Te rastline so: vinska trta, breskev, marelica, sliva, hruška, jablana, malina, navadna konoplja, fižol in krompir.

Vsako rastlinsko vrsto smo inokulirali v obsegu 10 rastlin z 2 vrstama inokuloma:

- (1) Sok donorskih rastlin v fosfatnem pufru po protokolu Verhoeven in Roenhorst (2000),
- (2) Inokulum na osnovi RNA ekstrakta, ki bo pripravljen iz listov donorskih rastlin z uporabo komercialnega kita Spectrum® Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich).

V primeru inokula na osnovi rastlinskega materiala (1) smo rastline okužili preko listov s pomočjo ran povzročenih s silicijevim karbidom, v primeru inokula na osnovi RNA (2) pa z injiciranjem v stebela rastlin. Po inokulaciji smo inokulirane rastline vzdrževali na prostorsko izolirani lokaciji na Raziskovalni postaji IHPS v skladu z dobro agronomsko prakso. Prisotnost CBCVd smo prvič preverili 2-3 mesece po okuževanju ter ponovno pri trajnicah po dormanci v naslednjem letu v fazi polno razvitega habitusa rastlin. Testiranja smo izvedli z RT-PCR metodo in v primeru pozitivnih signalov izvedli tudi sekvenciranje reprezentativnih vzorcev. Po opravljenem poskusu smo vse rastline uničili s sežigom na primerni deponiji.

P1.2 Testiranje plevelnih vrst v okuženem hmeljišču:

Z namenom določitve vloge plevelne vegetacije pri ohranjanju CBCVd smo v okuženem hmeljišču vzorčili in testirali različne plevelne vrste. Vzorčili bomo po 4 rastline vsake plevelne vrste, ki smo jih našli v okuženem hmeljišču. Pri tem smo ocenili vzorčenje v obsegu najmanj 10 različnih plevelnih vrst, ki se pojavljajo v hmeljiščih. Vzorčili smo izključno rastline, ki so se nahajale v neposredni bližini okuženih rastlin in pri tem vsako rastlino z namenom ponovitve vzorčenja označili. Vzorce smo v času vzorčenja hranili na suhem ledu, nato pa do izolacije RNA zamrznili pri temperaturi -70°C. Prisotnost CBCVd smo preverili z RT-PCR in v primeru pozitivnih signalov izvedli tudi sekvenciranje reprezentativnih vzorcev.

P1.3 Določanje gostiteljske specifičnosti CBCVd - pleveli

Poleg analize plevelne vegetacije v okuženih hmeljiščih smo vlogo plevelov kot potencialnih gostiteljev CBCVd ovrednotili tudi z umetnimi okužbami v obsegu 16 izbranih plevelnih vrst z enako metodologijo, ki smo uporabili za inokulacijo kulturnih rastlin. Pri tem smo enoletne plevelne testirali v letu okuževanja, večletne pa 2-krat, pred in po dormanci. Po opravljenem poskusu smo vse rastline uničili s sežigom na primerni deponiji.

P1.4 Določanje vektorjev:

Nabor organizmov, ki v hmeljiščih prihajajo v stik z okuženimi rastlinami je širok, zato smo se v raziskavi osredotočili le na tiste, ki s hmeljem najpogosteje vzpostavijo parazitski odnos:

- Hmeljeva listna uš (*Phorodon humuli*)
- Hmeljeva pršica (*Tetranychus urticae*)
- Hmeljev bolhač (*Psylliodes attenuatus*)
- Hmeljeva pepelovka (*Podosphaera macularis*)
- Hmeljeva peronospora (*Pseudoperonospora humuli*)

Na okužene rastline smo v kontroliranih in zaprtih pogojih rastne komore umetno naselili omenjene organizme in jih po določenem času parazitskega odnosa vzorčili ter testirali na CBCVd in HLVd. Za vsak organizem smo opravili 10 ponovljenih RNA izolacij. Testiranja smo izvedli z RT-PCR metodo.

Program 2: Ocena agresivnosti HSVd in CBCVd na hmelju (izvajalec IHPS)

Poskus smo izvedli na slovenskih sortah Celeia in Bobek, na brezvirusnih rastlinah (certifikat A), ki smo jih vzgojili na IHPS. Vsako od sort smo ločeno okužili s HSVd, CBCVd in kombinacijo HSVd+CBCVd, v obsegu 10 rastlin za vsako obravnavanje. V poskus je bilo vključeno tudi kontrolno obravnavanje. Vir okužbe so predstavljale donorske rastline, ki so okužene s posameznim viroidom. Inokulum smo pripravili po metodi, ki je opisana v Programu 1. Po inokulaciji so se rastline ohranjale na prostorsko izolirani lokaciji v mrežnikih na Raziskovalni postaji IHPS. Rastline smo vzdrževali v skladu z dobro agronomsko prakso ter vzgajali v obliki 1 trte na žičnati opori višine 3m. V času 2-3 mesecev po inokulaciji smo izvedli RT-PCR testiranje z namenom potrditve uspešnosti okuževanja. Po RT-PCR potrditvi uspešnosti okuževanja smo okužene rastline periodično vizualno ocenjevali, glede na pojav bolezenskih znamenj. V drugem letu smo ponovili RT-PCR testiranje na rastlinah, ki so v okviru prvega testiranja pokazala negativne signale ter nadaljevali z meritvami in ocenjevanji. Na osnovi podatkov dveh vegetacijskih dob na dveh slovenskih sortah smo določili agresivnost posameznega viroida v enojni in dvojni kombinaciji. Po opravljenem poskusu smo vse rastline uničili s sežigom na primerni deponiji.

Program 3: Določitev stabilnosti viroidov v uničenih rastlinah, ter analiza vpliva namakalnih sistemov na širjenje bolezni (izvajalec IHPS)

P3.1 Stabilnost CBCVd in HLVd v ostankih rastlin – simulacija lokalnega uničevanja

V okuženem nasadu smo v času polnega habitusa določili 10 okuženih rastlin z viroidno zakrnelostjo od katerih smo na 5 rastlinah odrezali nadzemni del in ga pustili na vodilu, 5 rastlin pa smo poškropili s 5% koncentracijo herbicida na osnovi aktivne snovi glifosat. Rastline smo primerno označili in na njih izvajali vzorčenja vsakih 5 dni. Pri tem smo iz vsake rastline vzorčili 3 različna tkiva, listje, trte in storžke. Ob vsakem vzorčenju do popolnega odmrtnja smo ocenili splošno stanje propadanja rastlinskega tkiva po skali od 0-5 (0=ni propadanja; 1= 1-20%, 2= 21-40%, 3=41-60%, 4= 61-80%, 5=81-100%). Vzorce smo hranili na -70°C in jih analizirali pri točki odmrtnja z RT-PCR. V primeru pozitivnih signalov smo vzorčenja in analize nadaljevali do ugotovitve točke, pri kateri viroidi niso več prisotni. Poleg analize stabilnosti v nadzemnem delu rastlin, smo izvedli tudi analizo stabilnosti v koreninskem sistemu. Vzorčenja korenin smo izvedli v 1 mesečnih intervalih in pri tem ocenjevali tudi stopnjo razgradnje tkiva po skali 0-5.

P3.2 Stabilnost CBCVd in HLVd v ostankih rastlin v tleh – simulacija krčenja nasadov

Stabilnost viroidov v tleh smo določali na 3 različnih tkivih: listje, storžki in trte. Vir ostankov je predstavljala okužena rastlina iz nasada, ki smo jo predhodno testirali na prisotnost CBCVd in HLVd. Različna tkiva smo vnesli v 200ml najlonske vrečke (premer por 16µm) in jih zakopali v tla ter vzorčili v 14 dnevni intervalih. Ob vsakem talnem vzorčenju smo izkopali po 3 tkivno specifične najlonske vrečke in iz vsake pripravili 4 pod-vzorce za izolacijo RNA ter RT-PCR analizo.

P3.3 Analiza vpliva namakalnih sistemov na širjenje viroidov

Z namenom ocenitve potencialnega vpliva namakalnih sistemov na širjenje viroidne zakrnelosti v hmeljiščih, smo analizirali večletne podatke napredovanja bolezni v namakanih in nenamakanih nasadih istih sort. Za ta namen smo uporabili podatke sistematičnega nadzora in podatke ankete, ki smo ji opravili s pridelovalci v zvezi s sistemom namakanja in tehnologijo pridelave.

Program 4: Učinkovitost termičnega kompostiranja za uničevanje viroidov v hmeljevini (izvajalec IHPS)

V času obiranja hmelja smo pripravili 2 kupa hmeljevine dolžine 10m in višine 3 m. V vsakega od kupov smo vnesli najlonske vrečke (200 ml; premer por 16µm) v katerih so bili ostanki obolelih rastlin. En kup smo prekrili s folijo, medtem ko je drug kup ostal nepokrit. Najlonske vrečke so bile v obeh kupih razporejene v 4 prostorskih točkah: (1) sredica, (2) dno kupa pod sredico, (3) vrh kupa nad sredico in (4) dno ob strani kupa. Za vsako prostorsko točko smo v vsak kup vnesli 21 vrečk, ki bodo predstavljale dnevne časovne točke. Vzorčenje je potekalo vsak dan naslednjih 21 dni, kar pomeni čas v katerem v povprečju dosegamo temperature med 60-80°C. Za vsako prostorsko točko smo izvajali tudi meritve temperature, da smo lahko spremljali temperaturno dinamiko termofilne faze kompostiranja. Vse vrečke smo po vzorčenju hranili pri temperaturi -70°C in iz tkiva v prvi fazi analizirali 1 pod-vzorec na prisotnost viroidov CBCVd in HLVd. Vse vrečke pri katerih smo dobili negativne signale smo dodatno analizirali v obliki 4 pod-vzorcev in RT-PCR analiz.

Program 5: Določanje učinkovitosti razkužil za razkuževanje orodja in opreme (izvajalec IHPS)

V preizkušanje smo vključili 6 različnih razkužil, ki se najpogosteje uporabljajo pri razkuževanju delovne opreme v kmetijstvu in so tudi dostopni slovenskim pridelovalcem. Poleg razkužil smo v poskus vključili tudi razkuževanje z ognjem in kontrolna obravnavanja. Ker je učinkovitost razkuževanja odvisna od koncentracije in časovne izpostavljenosti smo razkužila preizkusili v različnih koncentracijah, ki so v skladu s specifikacijami posameznih razkužil. Protokol smo testiranja smo izvedli po metodi, ki so jo uporabili Matsuura s sod., (2010) za tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd). Za vsako obravnavanje smo uporabili 10 zdravih hmeljnih rastlin sorte Celeia, ki so bile inokulirane preko obrezovanja z različno razkuženimi skalpeli. Inokulum je predstavljal sok donorskih rastlin (CBCVd) v inokulacijskem pufru. Skalpele smo najprej izpostavili inokulu in jih v času 60min posušili pri temperaturi 20°C. Sledila je 15s izpostavljenost skalpelov posameznem razkužilu/postopku in 2-3s spiranje z destilirano vodo. Za vsako rastlino smo uporabili svoj skalpel in opravili 10 rezov na poganjkih. Inokulirane rastline smo prenesli v rastno komoro in jih po 3-4 mesecih testirali z RT-PCR na prisotnost CBCVd viroida.

Program 6: Razvoj in vpeljava aplikacijskega elementa za sprotno razkuževanje rezalnikov (izvajalec IHPS)

Koncept izdelave prototipa je temeljil na osnovi, da je škropilnica nameščena nad rezalnikom tako, da ne bo onemogočala rezi hmelja. Rezervoar prostornine med 80 in 120 l, naj bi zadoščal za tretiranje v dolžini cca. 1000 m, in hkrati sovpadal z rednimi brušenji rezalnih diskov. Uporabili smo batno membransko črpalko z kapaciteto pretoka do 25 l/min in tlakom 15 bar, ter šobe proizvajalcev Lechler ali Agrotop. Prototip smo v začetni vazi preizkušali na posestvu IHPS, kasneje pa smo za pridelovalce izvedli demonstracijske prikaze.

Program 7: Razvoj nove in hitre diagnostične tehnike RT-LAMP za določanje HLVd, HSVd in CBCVd (izvajalec BF)

Zaporedja viroidov HLVd, HSVd in CBCVd smo poiskali v bazi NCBI GenBank in jih dopolnili s podatki našega laboratorija. Osnova metode LAMP s predhodno reverzno transkripcijo temelji na uporabi šestih začetnih oligonukleotidov, ki na koncih tarčne RNA molekule omogočajo nastanek enoverižne zanke in sprotno razklapljanje dvojno verižne RNA med samim pomnoževanjem. Začetne oligonukleotide (2 zunanja, 2 notranja in 2 začetna oligonukleotida zanke) smo načrtovali na osnovi strategije Notomi s sod., 2000 in Nagamine s sod., 2002. Pri načrtovanju smo uporabili programsko opremo LAMP Designer (Premier Biosoft) in program PrimerExplorer V4. Specifičnost začetnih oligonukleotidov smo preverili *in silico*. RT-LAMP reakcijo smo izvedli v enem koraku z uporabo AMV reverzne transkriptaze in ustreznega izotermalnega kompleta reagentov.

Program 8: Obdelava podatkov, diseminacija, navodila in tehnološki prikazi (izvajalec IHPS in BF)

Rezultate vseh poskusov in razvitih tehnologij smo ustrezno statistično ovrednotili s programi Statgraphic in Excell. V obliki vsebinskih sestankov in poročil smo redno poročali naročniku o napredovanju dela v okviru posameznih delovnih paketov. Prav tako smo rezultate predstavljali v obliki tehnoloških navodil, predstavitev pridelovalcem in tudi v obliki strokovnih in znanstvenih objav.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Določanje gostiteljske specifičnosti CBCVd – kulturne rastline in pleveli

CBCVd je zaradi gostiteljske specifičnosti razširjen v državah pridelovalkah citrusov, medtem ko se ostala območja, ki niso primerna za gojenje agrumov, do sedaj niso štela za ogrožena. Tako pojav CBCVd v hmeljiščih oz. v okolju, kjer ni pričakovan, predstavlja nov moment v kmetijski proizvodnji Slovenije in tudi Evrope. Da obstaja možnost o širši gostiteljski specifičnosti CBCVd sta o tem poročala Semanchik in Vidalakis, (2005), ki sta z umetnimi okužbami dokazala patogenost tega viroida tudi kumaram, paradižniku, jajčevcu in nekaterim okrasnim rastlinam. Nabor gostiteljskih rastlin CBCVd je precej podoben tistemu, ki ga ima HSVd, zato smo v okviru poskusov določali ali je lahko CBCVd v našem okolju škodljiv tudi vinski trti, sadnem drevju in ostalim kulturnim rastlinam oz. ali se lahko na določenih rastlinah tudi latentno ohranja in s tem ustali na novem območju.

Testiranje plevelnih vrst v okuženem hmeljišču

Z namenom določitve vloge plevelne vegetacije pri ohranjanju CBCVd smo v okuženem hmeljišču vzorčili in testirali 15 različnih plevelnih vrst (Preglednica 1). Vzorčili smo po 4 rastline vsake plevelne vrste in pri tem izbirali rastline, ki so rastle v neposredni bližini okuženih rastlin. Vsako rastlino smo z namenom morebitne ponovitve vzorčenja in sledljivosti ustrezno označili. Prve analize so v obliki šibkih PCR signalov pokazale prisotnost CBCVd le pri 2 rastlinah bele metlike. Ponovitevne analize in ponovno vzorčenje obeh rastlin pa prisotnosti CBCVd kasneje niso potrdile.

Preglednica 1: Seznam plevelnih vrst, katerih rastline smo vzorčili v okuženem nasadu in testirali na prisotnost CBCVd.

Bela metlika	Breskovolistna dresen
Drobnocvetni rogovilček	Plešec
Enoletna latovka	Navadna škrbinka
Navadna kostreba	Osat
Ščir	Navadna zvezdica
Portulak	Topolistna kislica
Krvavordeča srakonja	Škrbinka
Oljna ogrščica	

Umetno okuževanje kulturnih in plevelnih rastlin

Gostiteljsko specifičnost izbranih kulturnih rastlin smo določevali z večkratnimi inokulacijami rastlin z nativno RNA in sokom pridobljenega iz donorskih rastlin. Rastline smo okuževali preko listov in stebela, predvsem na mestih mladih poganjkov. Vsako mesto inokulacije smo ustrezno označili. Pri trajnicah smo iste rastline okuževali v obdobju 2 let, medtem ko smo enoletnice okuževali vsako leto posebej. Pri tem smo RT-PCR analize izvajali najmanj 3 mesece po zadnji inokulaciji. Med 15 rastlinskimi vrstami kulturnih rastlin smo kot gostitelja CBCVd potrdili le kumare in paradižnik (Preglednica 2), medtem ko smo med 20 različnimi plevelnimi vrstami kot zelo dobrega gostitelja potrdili le grenkoslad (*Solanum dulcamara*) (Preglednica 3). Rastlina je v Sloveniji razširjena predvsem na grmovnatih obrežjih in svetlih gozdičih (vir. Mala Flora Slovenije), medtem ko grenkoslad ne spada med plevela, ki bi jih našli v hmeljiščih. Rezultati testiranja plevelnih vrst v okuženih

nasadih in umetnih okužb so tako potrdili, da plevelna vegetacija v hmeljiščih nima pomembne vloge pri ohranjanju CBCVd. Prav tako CBCVd ne ogroža pomembnejših kulturnih rastlin, ki se gojijo v bližini okuženih območij.

Preglednica 2: Rezultati testiranja gostiteljske specifičnosti CBCVd na 15 kulturnih rastlinah.

Št.	Rastlinska vrsta	Latinsko ime	Sorta	Št. inokulacij	Št. okuženih rastlin
1	Marelica	<i>Prunus armeniaca</i>	Ogrska	12	0
2	Breskev	<i>Prunus persica</i>	Redhaven	10	0
3	Sliva	<i>Prunus domestica</i>	Valjevka	10	0
4	Hruška	<i>Pyrus communis</i>	Hardijeva	13	0
5	Jablana	<i>Malus domestica</i>	Opal	13	0
6	Jajčevец	<i>Solanum melongena</i>	Halflange Violette	2	0
7	Malina	<i>Rubus idaeus</i>	Sugana	9	0
8	Krizanteme	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Jupiter Gialo	4	0
9	Paradižnik	<i>Solanum lycopersicum</i>	Heinz 1370	2	3
10	Kumare	<i>Cucumis sativus</i>	Pariški kornišon	3	2
11	Krompir	<i>Solanum tuberosum</i>	KIS Krka	3	0
12	Pelargonije	<i>Pelargonium zonale</i>	Alcantara	3	0
13	Konoplja	<i>Cannabis sativa</i>	Finola	3	0
14	Fižol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Supernano Giallo	3	0
15	Vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	Chardonnay	6	0
16	Vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	Modra frankinja	6	0

Preglednica 3: Rezultati testiranja gostiteljske specifičnosti CBCVd na 20 plevelnih vrstah

Št.	Rastlinska vrsta	Latinsko ime	Št. inokulacij	Št. okuženih rastlin
1	Osat	<i>Cirsium arvense</i>	2	0
2	Bela metlika	<i>Chenopodium album</i>	2	0
3	Srhkodlakavi ščir	<i>Amaranthus retroflexus</i>	3	0
4	Drobnocvetni rogovilček	<i>Galinsoga parviflora</i>	4	0
5	Topolistna kislica	<i>Rumex obtusifolius</i>	2	0
6	Plazeča pirnica	<i>Agropyron repens</i>	2	0
7	Navadna kostreba	<i>Echinochloa crus-galli</i>	2	0
8	Pasja kamilica	<i>Anthemis arvensis</i>	2	0
9	Slak	<i>Convolvulus arvensis</i>	2	0
10	Velika kopriva	<i>Urtica dioica</i>	4	0
11	Navadni plešec	<i>Capsella bursa pastoris</i>	3	0
12	Navadna zvezdica	<i>Stelaria media</i>	2	0
13	Breskovolistna dresen	<i>Polygonum persicaria</i>	2	0
14	Mrtva kopriva	<i>Lamium maculatum</i>	2	0
15	Plazeča zlatica	<i>Ranunculus repens</i>	2	0
16	Pasje zelišče	<i>Solanum villosum</i>	2	0
17	Grenkoslad	<i>Solanum dulcamara</i>	4	6
18	Ambrozija	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	2	0
19	Gabez	<i>Symphytum officinale</i>	3	0
20	Hren	<i>Armoracia rusticana</i>	/	0



Slika 1: Poskus določanja gostiteljske specifičnosti CBCVd na izbranih kulturnih rastlinah in plevelih v rastni komori.

3.2 Določanje potencialnih vektorjev za CBCVd in HLVD

Dosedanje analize širjenja kažejo, da se CBCVd v nasadih širi izključno mehansko. Ne glede na to smo opravili poskus v katerem smo določali prisotnost CBCVd in HLVD v škodljivih organizmih, ki najpogosteje vzpostavijo parazitski odnos s hmeljem in bi lahko bili potencialni vektorji širjenja. V ta namen smo na rastline okužene s CBCVd in HLVD umetno naselili različne škodljive organizme in ji nato po 2-3 tedenski inkubacijski dobi testirali na prisotnost CBCVd in HLVD. Vsak organizem smo testirali v 10 ponovitvah.

Preglednica 4: Rezultati testiranja različnih škodljivih organizmov hmelja na prisotnost viroidov CBCVd in HLVD.

Škodljiv organizem	CBCVd		HLVD	
	Prisotnost (+/-)	Delež (%)	Prisotnost (+/-)	Delež (%)
Hmeljeva listna uš (<i>Phorodon humuli</i>)	-	0	-	0
Hmeljeva pršica (<i>Tetranychus urticae</i>)	+	100	+	100
Hmeljev bolhač (<i>Psylliodes attenuatus</i>)	-	0	+	60
Hmeljeva pepelovka (<i>Podosphaera macularis</i>)	-	0	+	40
Hmeljeva peronospora (<i>Pseudoperonospora humuli</i>)	-	0	+	50

Testiranja RNA izolirane iz 5 škodljivih organizmov (ŠO) hmelja, ki so vzpostavila parazitski odnos z rastlinami okuženimi z CBCVd in HLVD so pokazala prisotnost CBCVd v hmeljevi pršici z visoko stopnjo frekvence. V ostalih ŠO, razen v hmeljevi listni uši smo zaznali prisotnost HLVD. Rezultati tako odpirajo vprašanje v vlogi hmeljeve pršice pri širjenju okužbe CBCVd v okuženih nasadih. Namreč ta škodljivka ima nizko stopnjo migracije med nasadi, se pa lahko v posameznem nasadu zelo prerazmnoži in migrira med posameznimi rastlinami. V ta namen bo v prihodnje potrebno izvesti poskus, ki bo ovrednotil ali je lahko hmeljeva pršica vektor za CBCVd.

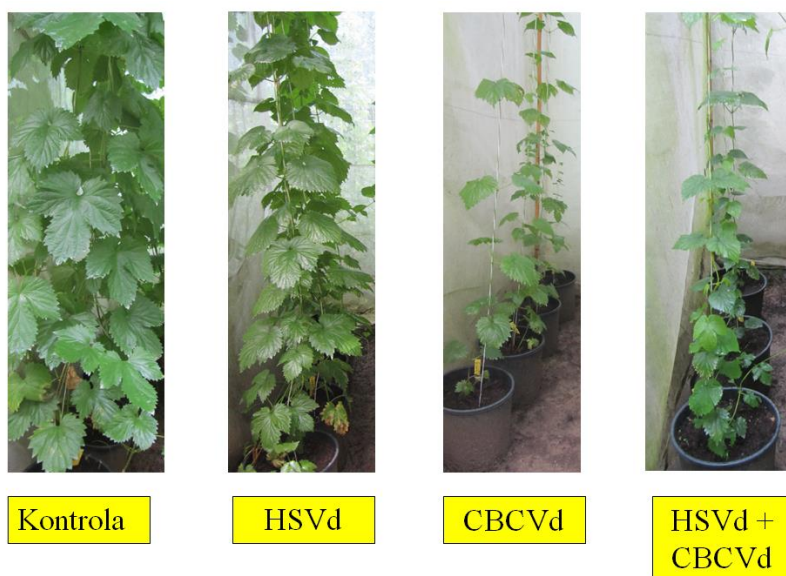
3.3 Ocena agresivnosti HSVd in CBCVd na hmelju

Za HSVd je znano, da na hmelju povzroča zakrnelost rastlin in nastanek očitnih bolezenskih znamenj 5-7 let po okužbi v odvisnosti od sorte (Sano, 2003). V primeru CBCVd pa opazamo mnogo hitrejši in agresivnejši razvoj bolezenskih znamenj. Z namenom razjasnitve vloge posameznega viroida smo na slovenskih sortah Celeia in Bobek izvedli umetne okužbe rastlin z obema viroidoma v enojni in dvojni kombinaciji. Umetne okužbe smo prvič izvedli septembra 2014 in nato še pomladi 2015. Prva bolezenska znamenja smo opazili 4 mesece po okužbi na obeh sortah pri rastlinah, ki so bile okužene s CBCVd in kombinacijo CBCVd+HSVd. Podobne rezultate smo dobili v letu 2016. Rastline okužene s HSVd niso izrazile simptomov. Prav tako nismo opazili razlike v agresivnosti med rastlinami, ki so okužene samo s CBCVd in s kombinacijo HSVd + CBCVd. Rezultati po 3 letnih opazovanjih kažejo, da je kombinacija HSVd + CBCVd lahko obstaja v hmelju, vendar HSVd zaznamo v nizkih koncentracijah in najverjetneje bistveno ne prispeva k razvoju simptomov. Pri tem je potrebno upoštevati, da gre za HSVd izolat iz kumar, medtem ko bi lahko različice iz drugih rastlin npr. agrumov odreagirale drugače.

Preglednica 5: Intenzivnost bolezenskih znamenj na sortah hmelja Bobek in Celeia, okuženima HSVd, CBCVd in kombinacijo HSVd + CBCVd v letu 2016.

Obravnavanje	Sorta/ intenzivnost bolezenskih znamenj ^a	
	Bobek	Celeia
HSVd	0	0
CBCVd	2	2
HSVd + CBCVd	2	2
Neokuženo	0	0

^a Skala: 0- ni simptomov; 1 – zaostajanje v rasti v primerjavi z neokuženimi rastlinami (10 - 20%); 2- zaostajanje v rasti v primerjavi z neokuženimi rastlinami (nad 21%).



Slika 2: Bolezenska znamenja HSVd, CBCVd in kombinacije HSVd+CBCVd na hmelju, sorta Celeia.

3.4 Stabilnost CBCVd in HLVd v ostankih rastlin

Določitev stabilnosti viroidov v hmeljevini in ostalih ostankih rastlin je ključnega pomena za pravilno izvajanje ukrepov v okuženih nasadih ter na izkrčenih površinah. Pridelovalci ob najdbi okužene rastline to nemudoma odstranijo iz hmeljišča ali pa okuženo in sosednje najprej poškopijo z neselektivnim herbicidom in nato po 10-14 dneh odstranijo nadzemne in podzemne dele rastlin ter jih s sežigom uničijo ob hmeljišču ali na deponiji. Podobni ukrepi se izvajajo tudi v primeru izkrčitve nasadov. Ostanki rastlin predstavljajo potencialni vir novih okužb, zato smo določevali stabilnost viroidov v odmrlih rastlinah, določili pravilen način uničenja in na ta način prilagodili obstoječe ukrepe.

Simulacija lokalnega uničevanja

V okuženem nasadu smo v zadnjem tednu avgusta 2014, ko so bile rastline v času polnega habitusa, izbrali 10 rastlin okuženih z viroidoma HLVd in CBCVd. Petim rastlinam smo odrezali nadzemni del in ga pustili na vodilu, drugih pet rastlin pa smo poškopili s 5 % koncentracijo herbicida na osnovi aktivne snovi glifosat. Rastline smo označili in tri različna tkiva (listje, trte, storžki) vzorčili vsake 5 dni. Šest tednov po tretiranju rastlin s herbicidom in po mehanskem odrezu rastlin v vzorcih nismo več zaznali CBCVd. Med posameznima načinoma tretiranja rastlin ni večjih opaznih razlik, CBCVd pa smo glede na ponovitve večkrat zaznali v rastlinah, ki so bile mehansko odrezane. Viroida HLVd v rastlinah po uporabi 5% raztopine glifosata ali mehanskem odrezu po treh mesecih nismo več zaznavali. Poleg analize stabilnosti viroidov v nadzemnem delu, smo vzorčili tudi koreninski sistem, z namenom analize podzemnega dela. Vzorčili smo tako koreninski sistem mehansko odrezanih in s herbicidom tretiranih rastlin, kot tudi koreninski sistem zdravih in z viroidno zakrnelostjo okuženih rastlin. Korenine smo vzorčili v mesečnih intervalih in pri tem ocenili tudi razpad tkiva ter z RT-PCR določali prisotnost obeh viroidov. Pri rastlinah, kjer je bil uporabljen herbicid, je po pričakovanjih bila stopnja razgradnje tkiva veliko intenzivnejša. Tako smo CBCVd po 5mesecih zaznali le pri še 1 rastlini v glavni koreniki, medtem ko smo HLVd zaznali tudi še v strohnenjem delu korenin. V časovni točki 6 mesecev po uporabi herbicida viroidov v koreninah nismo zaznali več.



Slika 3: Poskusno polje testiranja stabilnosti CBCVd in HLVd v nadzemnih ostankih hmeljnih rastlin, ki smo jih uničili mehansko in z uporabo glifosata.



Slika 4: Primerjava koreninskega sistema hmelja, ki je bil tretiran s glifosatom (levo) in mehansko uničene rastline (desno) 6 mesecev po uničenju.

Simulacija krčenja nasadov

Poskus stabilnosti CBCVd in HLVd v ostankih hmelja smo pričeli konec oktobra 2014, ko smo v talne sonde vnesli 3 različna tkiva hmelja; listje, storžke in trte. Vir ostankov so bile okužene rastlina iz nasada, ki smo jih predhodno testirali na prisotnost CBCVd in HLVd. Sonde smo iz tal izkopavali v mesečnih intervalih in nato testirali z RT-PCR. Rezultati so pokazali, da lahko CBCVd v ostankih rastlin preživi do 10 mesecev, medtem ko HLVd tudi do 12 mesecev (Preglednica 4). Do časovne točke 6 mesecev smo zaznavali močne PCR signale, po sedmih mesecih pa je intenziteta pričela postopoma padati. Najvišjo obstojnost obeh viroidov smo zaznali v storžkih, najmanj pa v listih, ki se tudi najhitreje in najbolj razgradijo. V zadnjih vzorcih, ki so bili v tleh več mesecev, ostanejo od listov samo še žilni sistem, zato so tudi ob analizi kvalitete RNA, signali slabši ali pa celo negativni.



Slika 5: Vzorci tkiv CBCVd in HLVd okužene hmeljne rastline, ki smo jih iz sond prenesli v laboratorij in testirali z RT-PCR.

Preglednica 6: Rezultati zadnjih 7 vzorčenj zaznavanja CBCVd in HLVd v različnih tkivih hmelja, ki so bili zakopani v tla 28.10.2014.

Vzorec/tkivo	Datum vzorčenja	CBCVd	HLVd
Trta	27.2.2015	+	+
List	27.2.2015	-	-
Storžek	27.2.2015	-	+
Trta	3.4.2015	+	++
Storžek	3.4.2015	+	++
List	3.4.2015	-	++
Trta	28.4.2015	+	++
Storžek	28.4.2015	+	++
List	28.4.2015	-	+
Trta	27.5.2015	+	+
List	27.5.2015	+	+
Storžek	27.5.2015	+	+
Trta	9.7.2015	+	+
List	9.7.2015	-	-
Storžek	9.7.2015	+	+
Trta	3.9.2015	-	+
List	3.9.2015	-	-
Storžek	3.9.2015	-	-
Trta	12.11.2015	-	-
List	12.11.2015	-	-
Storžek	12.11.2015	-	-

3.5 Analiza vpliva namakalnih sistemov na širjenje viroidov

V prvi fazi analize smo za vsako okuženo hmeljišče v Sloveniji izdelali popis, ki zajema podatke o namakalnem sistemu, gnojenju, sorti, vrsti in številu tehnoloških opravil. Iz te podatkovne baze smo v nadaljnjo obdelavo vključili hmeljišča za katere imamo vsaj 2-3 letne podatke o obsegu in napredovanju okužbe ter hmeljišča v katerih smo odkrili obsežna žarišča. Podatkovni bazi sta izdelani v programu Excel in sta dostopni na IHPS.

Analiza je pokazala, da hmeljarji v okuženih nasadih uporabljajo 3 vrste namakalnih sistemov: kapljično na vrhu žičnic, kapljično na grebenih in rolomate. Medsebojna primerjava med različnimi načini namakanja, vodnim virom ter okuženimi nasadi, kjer se namakanje ne izvaja, je pokazala primerljiv vzorec napredovanja okužbe, kar pomeni, da ta tehnološki ukrep ne vpliva na napredovanje okužbe v nasadu.

Izvajanje ukrepov osnovne obdelave kot so število obsipanj, kultiviranj in škropljenj je primerljivo med pridelovalci, zato je oceno o vlogi teh ukrepov težko podati. Ne glede na to gre za opravila, ki povzročajo rane na rastlinah in bi bilo potrebno razvijati tehnologijo v smeri minimalne obdelave oz. redukcije teh ukrepov. Uporaba podorin, izvajanje defoliacije in odmerki gnojenja v posameznih nasadih se razlikujejo med pridelovalci in okuženimi njivami, vendar niso v korelaciji z napredovanjem okužbe.

Povezavo smo potrdili le na nivoju sort, kjer se kaže najnižja stopnja napredovanja okužbe pri sorti Savinjski golding. Pri ostalih sortah kot so Celeia, Aurora in Bobek je stopnja napredovanja okužbe primerljiva.

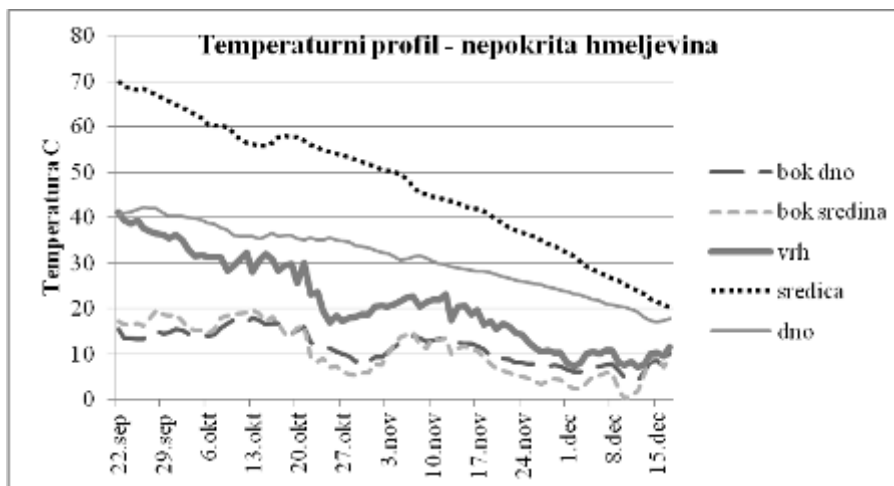
3.6 Učinkovitost termičnega kompostiranja za uničevanje viroidov v hmeljevini

Hmeljevina predstavlja glavni vir rastlinskih odpadkov, ki nastanejo po obiranju pridelka. V povprečju pri obiranju pridelka iz 1 ha hmeljišča nastane 30m³ zmlete hmeljevine, ki se odlaga na različne deponije ob obiralnih strojih, do naslednje vegetacije pa se razvaža kot organski odpadki na kmetijska zemljišča ali celo nazaj v hmeljišča. Hmeljevina je lahko pomemben vir širjenja sistemskih bolezni, ki jih povzročajo virusi, viroidi in nekatere glive. V primeru okuženih nasadov s hmeljevo uvelostjo je tako obvezno izvajati termično kompostiranje s katerim uničimo povzročitelje te bolezni, medtem ko za hmeljišča okužena z viroidno zakrnelostjo velja prepoved deponiranja hmeljevine nazaj v nasade. Termofilna faza kompostiranja je ključnega pomena pri uničevanju škodljivih organizmov, zadrževanje in bolj homogen gradient temperature pa lahko dosežemo s prekrivanjem kompostov s folijo.

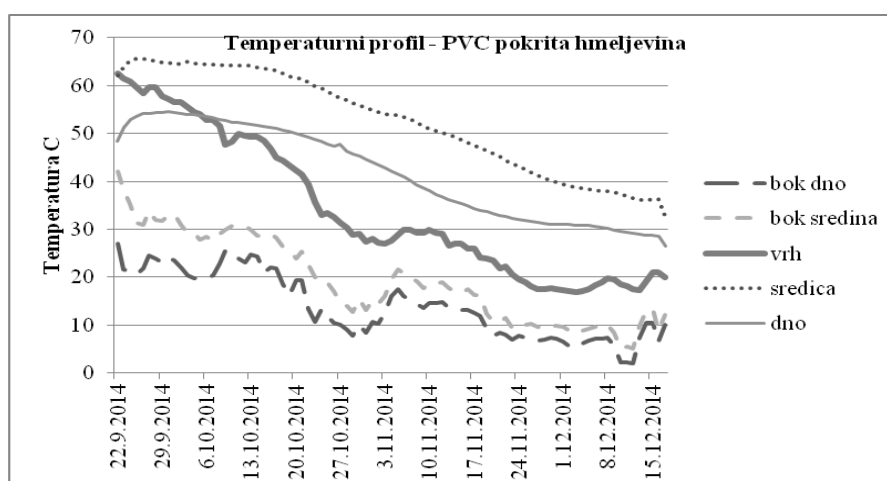
V okviru projekta smo preizkušali možnost izkoriščanje termofilne faze kompostiranja za uničevanje viroidov v hmeljevini. Poskus je vključeval spremljanje temperaturnega profila in posledičnega propadanja viroidov v kompostnem kupu hmeljevine, ki smo ga prekrili s PVC folijo in na nepokritem kupu. V začetku septembra 2014 smo pripravili 2 kupa hmeljevine dimenzije v-2,5m x š-3m x d-5m. V vsakega od kupov smo vnesli najlonske vrečke (200 ml; premer por 16µm) z ostanki obolelih rastlin (storžek, list, trta). En kup smo prekrili s PVC folijo, medtem ko je drug kup ostal nepokrit. Najlonske vrečke so bile v obeh kupih razporejene v 5 prostorskih točkah: (1) sredica, (2) dno kupa pod sredico, (3) vrh kupa nad sredico, (4) dno ob strani kupa in (5) vrh na sredini kupa. Za vsako prostorsko točko smo v vsak kup vnesli 20 vrečk, ki so predstavljale 3 dnevne časovne točke. Hkrati smo za vsako prostorsko točko izvajali meritve temperature, da smo kontinuirano spremljali temperaturno dinamiko termofilne faze kompostiranja. Vzorčenja smo izvajali v 3 – 6 dnevni intervalih in nato z RT-PCR določali prisotnost CBCVd in HLVd v tkivu. Rezultati testiranja so pokazali, da viroidi v sredici kompostnega kupa, ki doseže temperaturo nad 70C°, propadejo že po 3 dneh, ne glede na prekrivanje s PVC folijo. Bistvena razlika pa se je izkazala pri vseh ostalih točkah, saj smo v primeru kupa pokritega s PVC zaznali mnogo hitrejše propadanje HLVd in CBCVd, ki je posledica višjih temperatur (Preglednica 7; Slika 6; Slika 7). Na osnovi časovne točke zadnjega zaznavanja HLVd in CBCVd v hmeljevini in dodanim varnostnim obdobjem 1 meseca smo kot minimalni čas kompostiranja hmeljevine določili 3 mesece, v primeru uporabe PVC folije pa 2 meseca.

Preglednica 7: Čas preživetja HLVd in CBCVd v kompostnih kupih glede na uporabo PVC folije in točko vzorčenja.

Točka vzorčenja	Čas preživetja viroidov (HLVd/CBCVd)	
	Nepokrito	PVC
Sredica	3 dni	3 dni
Vrh – sredina	21 dni	6 dni
Dno – sredina	21 dni	15 dni
Bočno – vrh	33 dni	6 dni
Bočno - dno	63 dni	33 dni
Priporočen čas kompostiranja hmeljevine za uničenje viroidov	3 mesece	2 meseca



Slika 6: Temperaturni profil kompostnega kupa nepokrite hmeljevine glede na različne pozicijske točke meritev.



Slika 7: Temperaturni profil kompostnega kupa hmeljevine pokrite s PVC glede na različne pozicijske točke meritev.



Slika 8: Poskusno polje preizkušanja učinkovitosti dveh postopkov kompostiranja hmeljevine z namenom uničenja viroidov CBCVd in HLVd.

3.7 Določanje učinkovitosti razkužil za razkuževanje orodja in opreme

Razkuževanje predstavlja pomemben ukrep s katerim lahko preprečujemo širjenje okužbe z delovno opremo in mehanizacijo. Ker podatki o učinkovitosti razkužil za CBCVd in HLVd niso na voljo smo opravili poskus, v okviru katerega smo določali učinkovitosti razkužil, ki se najpogosteje uporabljajo pri razkuževanju delovne opreme v kmetijstvo in imajo v deklaracijah navedeno anti- virusno/viroidno delovanje. Razkužila smo uporabili v različnih koncentracijah v skladu s priporočili proizvajalcev ali podatkov iz literature. Za vsako obravnavanje smo uporabili 10 hmeljnih rastlin sorte Celeia, ki smo jih inokulirali z različno razkuženimi skalpeli. V mesecu septembru smo rastline testirali in ugotovili najvišjo stopnjo učinkovitosti v primeru razkužila Virocid v 2% konc. Ob tem smo izvedli tudi poskus degradacije viroidov v hmeljnem soku v 4 časovnih točkah (15s, 30s, 1min, 5min). Tudi pri tem testu je razkužilo Virocid pokazalo najboljše rezultate.

Preglednica 8: Razkužila, koncentracije in učinkovitost razkuževanja za preprečevanje CBCVd na hmelju.

Razkužilo	Koncentracija	Učinkovitost (15s)	Degradacija (5min)
Menno florades	1%	22%	-
Menno florades	2%	22%	-
Menno florades	3%	77%	+
Ekocid S	0.5%	66%	-
Ekocid S	1%	66%	-
Ekocid S	2%	66%	-
Virocid	0.5%	33%	-
Virocid	1%	55%	+
Virocid	2%	100%	+
Kickstart	0.5%	0%	-
Kickstart	1%	22%	-
Kickstart	2%	22%	+
Izosan	0,01%	22%	-
Izosan	0,02%	11%	-
Izosan	0,03%	33%	-
Etanol	70%	22%	-
Etanol	90%	55%	-
Destilirana voda*		/	-
Ogenj*		77%	-
Inokulum		/	-

3.8 Razvoj in vpeljava v prakso aplikacijskega elementa za sprotno razkuževanje rezalnikov

V času trajanja projekta smo na IHPS zasnovali, izdelali načrt ter specifikacijo za izdelavo namenskih škropilnic za aplikacijo razkužila pri rezi ter obiranju hmelja. Omenjeni škropilnici smo v prototipni delavnici Poskusnega posestva tudi izdelali ter jih na lastnih površinah preizkusili pri delovanju v praksi. Specifičnost nasadov hmelja in delovnih strojev je zahtevala konstrukcijo takšnih škropilnic, ki so sestavni del združenega orodja tako, da lahko pri enem prehodu opravimo tri delovne operacije hkrati.

Zasnova in izdelava načrtov

Zasnovo škropilnic smo načrtovali v dveh sklopih in sicer:

1. Rezervoarja s pogonskim sklopom, krmilno regulacijskim delom ter črpalko.

Omenjeni sklop je možno dograditi glede na potrebo, tako na rezalnik hmelja, kjer je škropilnica nameščena nad rezalnimi diski, kakor tudi na trgalnik hmelja z namestitvijo zadaj med nosilno konzolo. Glede na namen uporabe je zaradi specifičnosti dela možno menjati tudi pogonski sklop s črpalko. Tako smo pri uporabi škropilnice na rezalniku hmelja namestili batno membransko črpalko proizvajalca Vreček tip MP 25 s kapaciteto pretoka do 25 l/min in max. tlakom 20 bar. Črpalko poganja hidromotor Danfoss z močjo 2 kW preko traktorskega hidravličnega kroga in deluje neodvisno od števila vrtljajev priključne gred. Pri uporabi škropilnice ob spravilu hmelja smo na rezervoar namestili električno črpalko proizvajalca Agrotop tip ELOBRAN 760, ki zagotavlja max. pretok 2,2 l/min pri 7 bar. Za uporabo dveh tipov pogonskih sklopov in črpalk smo se odločili na osnovi dejstva, da je pri posameznem procesu dela posamezen pogonski sklop na traktorju že zaseden.

2. Škropilne letve z nosilcem in šobo.

Sklop je fiksno nameščen na posameznem orodju. Na rezalniku hmelja sta nameščeni dve šobi za zmanjšanje zanašanja proizvajalca Lechler, tip AD 120 015 (pretok pri 2 bar = 0, 48 l/min), od katerih je ena nameščena neposredno nad rezalnimi diski, druga šoba pa je nameščena za čistilnim diskom tako, da aplicira razkužilo na sveže odrezan sadež hmelja. Tretja šoba enakega tipa je nameščena nad odoralnimi diski. Pri trgalniku hmelja smo uporabili eno šobo proizvajalca Lechler, tip AD 120 02 (pretok pri 2 bar = 0, 65 l/min), ki je nameščena v ustju trgalnika in razkužuje rezilo, kakor tudi transportno verigo.

Izdelava in testiranje škropilnic

Pri rezi hmelja uporabljamo dva stroja – spredaj nameščeni odoralni hmelja, na zadnjem tritočkovnem priklopu pa rezalnik. Zaradi možnosti prenašanja okužb pri odoravanju in rezi hmelja želimo hkrati nanašati na orodje tudi razkužilo. Izdelali smo škropilnico, ki je samostojno nameščena nad rezalnikom tako, da ne onemogoča pogleda na delovni proces rezi hmelja. Rezervoar je prostornine 80 l, kar zadoščalo za tretiranje v dolžini 90 min, in hkrati sovпада z rednimi brušenji rezalnih diskov. Vgradili smo batno membransko črpalko proizvajalca Vreček tip MP 25 s kapaciteo pretoka do 25 l/min in max. tlakom 20 bar. Črpalko poganja hidromotor Danfoss z močjo 2 kW preko traktorskega hidravličnega kroga in deluje neodvisno od števila vrtljajev priključne gred. Uporabili smo ploske šobe za zmanjšanje zanašanja proizvajalcev Lechler, tip AD 120 015 (pretok pri 2 bar = 0, 48 l/min), od katerih je ena nameščena neposredno nad rezalnimi diski druga šoba pa je nameščena za

čistilnim diskom tako, da aplicira razkužilo na sveže odrezan sadež hmelja. V praksi smo ugotovili, da je predvsem slabši nanos razkužila na spodnjo stran rezalnih diskov kar je ključno za preprečevanje širjenja okužb. Tako smo po rezi hmelja v letu 2016 pristopili k izboljšavam škropilnice. Načrtovali smo pomični nosilec šobe, ki se bo s pomočjo hidravličnega cilindra spustil pod rezalne diske ter apliciral razkužilo na spodnjo stran le teh. Sistem je zasnovan tako da se bo pri vsakem prekinjenem procesu rezi (ob koncu vrste) šoba avtomatsko spustila pod rezalni disk. V ta namen smo morali dati razviti elektronsko opremo s senzorji, ki krmili mehanski sklop omenjenega nosilca. Prav tako kot sama rez je tudi obiranje hmelja eden od kritičnih momentov za prenos okužb saj pride rezalni nož trgalnika neposredno v stik z vsako rastlino. Ravno tako kot pri rezi tudi pri trganju in nakladanju hmeljskih trt opravljamo več delovnih operacij hkrati predvsem pa imamo tu izredno obremenjen hidravlični sklop traktorja. Namenska škropilnica ima tako vgrajeno je 12 V električno črpalko Delax s pretokom 7,6 l/min, in max. tlakom 5 bar. Rezervoar je nameščen na zadnji konzoli hmeljskega trgalnika in je prostornine 110L, ki zadošča za slabe 4 ure neprekinjenega dela. Šobo proizvajalca Lechler, tip AD 120 02 smo namestili v ustju rezalnega dela in nanaša razkužilo na nož in delno na dovajalno verigo.



Slika 9: Prototip škropilnice, ki omogoča razkuževanje rezalnikov hmelja ob rezi.



Slika 10: Prototip škropilnice, ki omogoča razkuževanje trgalne glave ob obiranju hmelja.

3.9 Razvoj nove in hitre diagnostične tehnike RT-LAMP za določanje HLVd, HSVd in CBCVd

LAMP (angl. loop-mediated isothermal amplification) tehnologija omogoča hitro pomnoževanje tarčnih regij in predstavlja hitro in cenovno ugodno alternativo za detekcijo patogenih zaporedij. Ravno zaradi teh dveh lastnosti smo preizkusili in uvedli to tehnologijo na primeru detekcije treh hmeljnih viroidov: hmeljevega latentnega viroida (HLVd), viroida razpokanosti agrumov (CBCVd) in hmeljevega stunt viroida (HSVd). Na področju detekcije viroidov se je pričujoča tehnologija že pokazala za uspešno pri detekciji potato spindle tube viroida (PSTVd) (Lenarčič et al., 2013, Tsutsumi et al., 2010), peach latent mosaic viroida (PLMVd) (Boubourakas et al., 2009) in chrysanthemum chlorotic mottle viroida (CChMVd) (Park et al., 2013).

Vzorci: Biolistično okužene rastline s posameznimi viroidi kot kontrole in poljske vzorce okužene s CBCVd in HLVd, kot kontrole so služile brezviroidne rastline hmelja. Pozitivne vzorce smo potrdili z RT-PCR pomnoževanjem. Uporabili smo izolirano čisto RNA in majhne delce svežega rastlinskega tkiva za preizkus direktnega pomnoževanja.

Razvoj začetnih oligonukleotidov: LAMP tehnika temelji na uporabi do večih začetnih oligonukleotidov, ki omogočijo krožno pomnoževanje. Le-te smo razvili s pomočjo dveh različnih orodij, 1) LAMP Designer (<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>) in 2) PrimerExplorer ver. 4 (<https://primerexplorer.jp/e/>).

Razvili smo sledeče začetne oligonukleotide:

LAMP DESIGNER

CBCVd:

F3 TGAGGAGGGAACATACCTG

B3 AACAAACCAAGAGTTGTATCC

FIP(F1c+F2) GAGACGAGCTCCTGTTCCGTCTTCAGACTCGTCGAGG

BIP(B1c+B2) CCATCGCTGGCTCCACATGGGTAGTTTCTTTCTCAGGTC

F2 TCTTCAGACTCGTCGAGG

B2 GGGTAGTTTCTTTCTCAGGTC

HLVd:

F3 CGTGAATTACCTGTATGGTG

B3 TGAAGTTCTGCAGGTAAAGC

FIP(F1c+F2) ACAAGAAGAAGCCGAAGCAACTGAAACCTACTCGAGCGAG

BIP(B1c+B2) AACGGCTCCTTCTTCACACCCTCAAGAGTTGTATCCACCG

F2 GAAACCTACTCGAGCGAG

B2 CTCAAGAGTTGTATCCACCG

HSVd:

F3 GGGAATTCTCGAGTTGCC

B3 GTCGCGTCTCATCGGA

FIP(F1c+F2) TCTCGCTGGATTCTGAGAAGAGTAAACAAGGCAGGGAGGA

BIP(B1c+B2) GGAGTAGAGGCTTCTTGCTTTCGAGAGCCAGGAGAAGGTAAA

F2 AAACAAGGCAGGGAGGA

B2 AGAGCCAGGAGAAGGTAAA

PRIMER EXPLORER

CBCVd:

F3_CBCVd ATTTCTCTGCGGGACCAAAT
B3_CBCVd TCAGGTCGCGAAGGAAGA
FIP_CBCVd TCCCCTCGACGAGTCTGAAGAGAAACAGCTTGAGGAGGGAAC
BIP_CBCVd GTCCAGCACCGGAACAGGAGCGATCGGATGTGGAGCCA
F2_CBCVd AACACAGCTTGAGGAGGGAAC
F1c_CBCVd TCCCCTCGACGAGTCTGAAGAG
B2_CBCVd CGATCGGATGTGGAGCCA

HLVd:

F3_HLVd CTGGGGAATACACTACGTGAC
B3_HLVd TGAAGAAGGAGCCGTTCCA
FIP_HLVd GCCTCGCTCGAGTAGGTTTCCTTACCTGTATGGTGGCAAGG
BIP_HLVd GGAGATCGAGCGCCAGTTCGGCAGGACGCGAACAAGAA
F2_HLVd TTACCTGTATGGTGGCAAGG
F1c_HLVd GCCTCGCTCGAGTAGGTTTCC
B2_HLVd GCAGGACGCGAACAAGAA

HSVd:

F3_HSVd CGCATGGGCAAGCAAAGA
B3_HSVd AAGCAGGTTGGAAGACGAAC
FIP_HSVd ACGCCTCTCGCTGGATTCTGACAAGGCAGGGAGGAGACTT
BIP_HSVd TCGAAACACCATCGATCGTCCCGGTCGCGTCTCATCGGAA
F2_HSVd CAAGGCAGGGAGGAGACTT
F1c_HSVd ACGCCTCTCGCTGGATTCTGA
B2_HSVd GGTCGCGTCTCATCGGAA

Pomnoževanje: Za pomnoževanje smo uporabili MasterMix podjetja Optigene (ISO-001 - Isothermal Master Mix - 400 reactions (http://www.optigene.co.uk/reagent_type/isothermal-master-mixes/) z dodanim encimom reverzno transkriptazo, saj gre za pomnoževanje RNA molekule, ki jo najprej prevedemo v cDNA matrico za LAMP reakcijo. Protokola za pomnoževanje sta bila sledeča:

- 1) 30 minut na 37°C in 30 ciklov 65°C 60 sekund in 64°C 60 sekund in
- 2) 30 minut na 37°C in 45 (50) ciklov 65°C 60 sekund in 64°C 60 sekund.

Protokol št. 2 smo uporabljali za povečanje fluorescentnega signala. Detekcija je potekala v qPCR napravi ABI7500, fluorescenco smo spremljali s filtri nastavljenimi za spremljanje FAM signala.

Po končani amplifikaciji smo preverili in primerjali rezultate pomnoževanja tudi na 2% agaroznem gelu (end-point analiza).

Z razvitimi začetnimi oligonukleotidi smo uspešno pomnožili viroide v pozitivnih vzorcih, kar se je pokazalo kot značilen dvig ravni fluorescentnega signala med samim pomnoževanjem. V primeru direktne uporabe rastlinskega tkiva le-tega nismo zaznali, verjetno zaradi inhibicije rastlinskega materiala na samo reakcijo. V nekaterih primerih smo zaznali tudi fluorescentni signal v negativnih vzorcih. V tem primeru nam je analiza z gelsko elektroforezo potrdila nastanek dimerov začetnih oligonukleotidov, kar se je odražalo v kopičenju fluorescentnega signala. Vzorec v takem primeru ni imel značilnega profila pomnoževanja multimernih kopij viroidne RNA, ki so bile značilne za vzorce s pristnimi

viroidi. Iz rezultatov je razvidno, da lahko v primeru viroidov hmelja LAMP tehnika služi samo kot hitri test, vsekakor pa ne kot dokončni test. Ne more se namreč primerjati z občutljivostjo RT-PCR ali RT-qPCR metodologij. LAMP detekcija hmeljnih viroidov se ni izkazala primerna za neposredno analizo hmeljnega soka, kar bi bila njena največja prednost. Naslednji korak je tako potreben v smeri optimizacije in iskanja rešitev za LAMP analizo hmeljnega soka, ki se lahko izvede na terenu.

LAMP Designer

CBCVd

F3 TGAGGAGGGAACATACCTG (
 B3 AACAAACCAAGAGTTGTATCC
 FIP(F1c+F2) GAGACGAGCTCCTGTTCCGTTCTCAGACTCGTCGAGG
 BIP(B1c+B2) CCATCGCTGGCTCCACATGGGTAGTTTCTTCTCAGGTC
 F2 TCTTCAGACTCGTCGAGG
 B2 GGGTAGTTTCTTCTCAGGTC

HLVd

F3 CGTGACTTACCTGTATGGTG
 B3 TGAACCTCTG CAGG TAAAGC
 FIP(F1c+F2) AC AAGAAGAAGCCG AAGCAACTGAAACCTACTCGAGCGAG
 BIP(B1c+B2) AACGGCTCCTTCTTCACACCTCAAGAGTTGTATCCACCG
 F2 GAAACCTACTCGAGCGAG
 B2 CTC AAGAGTTGTATCCACCG

HSVd

F3 GGG AATTCTCGAGTTGCC
 B3 GTCGCGTCTCATCGGA
 FIP(F1c+F2) TCTCGCTGGATTCTGAGAAGAGTAAACAAGGCAGGGAGGA
 BIP(B1c+B2) GGAGTAGAGGCTTCTTCTGCTTCGAGAGCCAGGAG AAGGTAAA
 F2 AAACAAGGCAGGGAGGA
 B2 AGAGCCAGGAG AAGGTAAA

CBCVd



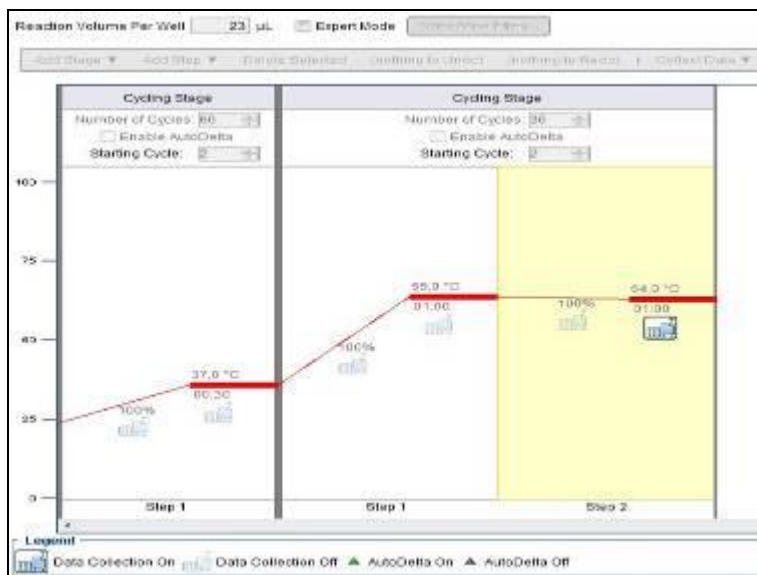
HLVd



HSVd



Slika 11: Razviti LAMP začetni oligonukleotidi za detekcijo CBCVd, HLVd in HSVd, ter sekundarne strukture omenjenih viroidov.



Slika 12: Temperaturni profil LAMP analize na CBCVd.

4. Obdelava podatkov, diseminacija, navodila in tehnološki prikazi

V projektnem obdobju sta bila izvedena dve sestanka projektne skupine skupaj s vsebinskim spremljevalcem na UVHVVR: 1. sestanek 14.4.2015 in 2. sestanek 10.3.2016.

Rezultati projekta so omogočili:

- Pripravo tehnoloških navodil za pravilno kompostiranje, ki so tudi del KOPOP navodil za hmeljarstvo
- Izdajo tehnološke knjižice z naslovom »Huda viroidna zakrenlost hmelja« avtorji Sebastjan Radišek, Tanja Guček, Gregor Leskošek, Anita Benko Beloglavec, Jernej Jakše, Branka Javornik (v tisku)
- Podatki o preživetju v tleh in v rastlinah so bili osnova za dopolnitev ukrepov Odločbe o nujnih ukrepih za preprečevanje vnosa in širjenja viroidnih zakrnelosti hmelja (Uradni list RS, št. 21/2015).
- Ugotovitve projekta so bile del PRA ocen tveganja, ki je bila predstavljena na stalnem odboru EU v Bruslju (STANDING COMMITTEE ON PLANTS, ANIMALS, FOOD AND FEED, Section: Plant Health, 25-26.1.2016 Brussels) in delovni skupini držav pridelovalk hmelja (Workshop on HSVd and CBCVd; Institute for Plant Protection, Freising, 10-11.2.2016
- Demonstracijski prikaz prototipov škropilnic na IHPS dne 20.8.2015

Objave v strokovnih in znanstvenih publikacijah in srečanjih, ki so povezane z rezultati projekta:

1.02 Pregledni znanstveni članek

GUČEK, Tanja, RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, JAVORNIK, Branka. Biologija interakcij med rastlinami in viroidi = Biology of plant viroid interactions. *Hmeljarski bilten*, ISSN 0350-0756, 2014, 21, str. 27-37, ilustr. [COBISS.SI-ID [8084089](#)]

1.04 Strokovni članek

RADIŠEK, Sebastjan, GUČEK, Tanja, JAKŠE, Jernej, JAVORNIK, Branka, MATOUŠEK, Jaroslav. Nova spoznanja pri proučevanju viroidnih zakrnelosti hmelja v Sloveniji. *Hmeljar*, ISSN 1318-6183, 2015, letn. 77, št. 1-12, str. 49-53, ilustr. [COBISS.SI-ID [719500](#)]

1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

POKORN, Tine, ŠTAJNER, Nataša, RADIŠEK, Sebastjan, JAVORNIK, Branka, JAKŠE, Jernej. Hop plant response after viroid infection. V: 7th Congress of the Genetic Society of Slovenia and 7th Meeting of the Slovenian Society of Human Genetics, 20-23 September 2015, Rogaška Slatina, Slovenia. JAKŠE, Jernej (ur.), et al. *Genetika 2015 : book of abstracts*. Ljubljana: Genetic Society of Slovenia: The Slovenian Society of Human Genetics, 2015, str. 13. [COBISS.SI-ID [8258937](#)]

GUČEK, Tanja, JAKŠE, Jernej, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka, RADIŠEK, Sebastjan. Diagnostic techniques for detection of causal agents of severe hop stunt disease. V: [Pannonian Plant Biotechnology Association Conference], Ljubljana, 8-10 June, 2015. *Integration of fundamental research into the practical agriculture : progress and perspectives*. [Ljubljana]: Pannonian Plant Biotechnology Association, 2015, str. 27. [COBISS.SI-ID [8174713](#)]

GUČEK, Tanja, RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Razvoj diagnostične metode za hkratno detekcijo viroidov na hmelju = Development of a diagnostic method for the simultaneous detection of multiple viroids on hop. V: 12. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Ptuj, 3.-4. marec 2015. TRDAN, Stanislav (ur.). *Izvečki referatov = Abstract volume*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2015, str. 62-63. [COBISS.SI-ID [8115065](#)]

JAKŠE, Jernej, RADIŠEK, Sebastjan, GUČEK, Tanja, POKORN, Tine, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) nov nevaren patogen na hmelju = Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a new aggressive hop pathogen. V: 12. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Ptuj, 3.-4. marec 2015. TRDAN, Stanislav (ur.). *Izvečki referatov = Abstract volume*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2015, str. 63-64. [COBISS.SI-ID [8115321](#)]

GUČEK, Tanja, RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Biological indexing and detection of viroids from hop (*Humulus lupulus* L.) in Slovenia. V: XVIII. International Plant Protection Congress, 24-27 August 2015, Berlin, Germany. *Mission possible : food for all through appropriate plant protection : abstracts*. [S. l.: s. n., 2015], str. 599. [COBISS.SI-ID [709772](#)]

JAKŠE, Jernej, RADIŠEK, Sebastjan, POKORN, Tine, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Metagenomics sequencing identified for the first time citrus bark cracking viroid (CBCVd) as an aggressive and harmful pathogen of hop (*Humulus lupulus* L.). V: XVIII. International Plant Protection Congress, 24-27 August 2015, Berlin, Germany. *Mission possible : food for all through appropriate plant protection : abstracts*. [S. l.: s. n., 2015], str. 718. [COBISS.SI-ID [710028](#)]

POKORN, Tine, ŠTAJNER, Nataša, RADIŠEK, Sebastjan, JAVORNIK, Branka, JAKŠE, Jernej. Viroid derived small RNAs can cause change of expression in selected genes of hops. V: *Plant and Animal Genome XXIII*. [s.l.: s.n.], 2014-2015, p1067. <https://pag.confex.com/pag/xxiii/webprogram/Paper15000.html>. [COBISS.SI-ID [8109433](#)]

JAKŠE, Jernej, POKORN, Tine, RADIŠEK, Sebastjan, JESENIČNIK, Taja, JAVORNIK, Branka. Določanje nukleotidnih zaporedij majhnih nekodirajočih RNA in njihova uporaba v genomiki. V: ANDERLUH, Gregor (ur.), KRAŠEVEC, Nada (ur.). *Proteinske pore, sekvenciranje in bioinformatika : mini simpozij 2015, [5. 11. 2015 Ljubljana]*. Ljubljana: Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut, 2015, str. 11, ilustr. [COBISS.SI-ID [8300153](#)]

JAKŠE, Jernej, RADIŠEK, Sebastjan, POKORN, Tine, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Identification and re-infection confirmed Citrus bark cracking viroid (CBDVd) as a new hop pathogen. V: International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs, České Budějovice, June 25-28, 2015. *Viroid 2015 : book of abstracts*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press, 2015, str. 25-26. [COBISS.SI-ID [8301177](#)]

GUČEK, Tanja, RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Comparison of different methods for viroid plant inoculation. V: International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs, České Budějovice, June 25-28, 2015. *Viroid 2015 : book of abstracts*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press, 2015, str. 27-28. [COBISS.SI-ID [8301433](#)]

RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, GUČEK, Tanja, ČERENAK, Andreja, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Management of hop (*Humulus lupulus*) viroids in Slovenia. V: International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs, České Budějovice, June 25-28, 2015. *Viroid 2015 : book of abstracts*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press, 2015, str. 29-30. [COBISS.SI-ID [8301689](#)]

MATOUŠEK, Jaroslav, SIGLOVÁ, Krystina, JAKŠE, Jernej, RADIŠEK, Sebastjan, PIERNIKARCZYK, Rajen J.J., GUČEK, Tanja, DURAISAMY, Ganesh Selvaraj, SVOBODA, Petr, SANO, Teruo, JAVORNIK, Branka, STEGER, Gerhard. Propagation characteristics of hop isolate of Citrus bark cracking viroid and its compatibility to other viroids during primary infections of *Humulus lupulus* cv. Osvald's 72. V: International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs, České Budějovice, June 25-28, 2015. *Viroid 2015 : book of abstracts*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press, 2015, str. 53-54. [COBISS.SI-ID [8301945](#)]

POKORN, Tine, RADIŠEK, Sebastjan, JAVORNIK, Branka, ŠTAJNER, Nataša, JAKŠE, Jernej. Change of expression in selected genes of viroid infected hops. V: International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs, České Budějovice, June 25-28, 2015. *Viroid 2015 : book of abstracts*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press, 2015, str. 57-58. [COBISS.SI-ID [8302201](#)]

POKORN, Tine, RADIŠEK, Sebastjan, JAVORNIK, Branka, ŠTAJNER, Nataša, JAKŠE, Jernej. Viroid-derived small RNA (vd-sRNA) target identification in hop. V: DOLENC KOCE, Jasna (ur.), URBANEK KRAJNC, Andreja (ur.), GREBENC, Tine (ur.). *Knjiga povzetkov = Book of abstracts*. Ljubljana: Slovensko društvo za biologijo rastlin: = Slovenian Society of Plant Biology, 2014, str. 57. [COBISS.SI-ID [7996025](#)]

RADIŠEK, Sebastjan, GUČEK, Tanja, JAKŠE, Jernej, KNAPIČ, Vlasta, BENKO-BELOGLAVEC, Anita, PAVLIČ, Ema, MATOUŠEK, Jaroslav, JAVORNIK, Branka. Appearance and management of hop stunt disease in Slovenia. V: 14th Mediterranean Phytopathological Union (MPU) Congress [and] International Society of Mycotoxicology (ISM) Congress, 25-29 August 2014 Istanbul, Turkey. HEPERKAN, Dilek (ur.), DASKAYA-DIKMEN, Ceren (ur.), ERTUGRUL-CENGIZ, Sibel (ur.). *Plant health management for ensuring food security, safety and quality in the Mediterranean area : challenges and prospects : [abstract book]*. Istanbul: Istanbul Technical University, Chemical & Metallurgical Engineering Faculty, Department of Food Engineering, 2014, str. 131. [COBISS.SI-ID [654476](#)]

GUČEK, Tanja, RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, JAVORNIK, Branka. Development of new detection methods for identification of causal agents of hop stunt disease in Slovenia. V: 4th Colloquium of Genetics, Piran, September 19th 2014. RAMŠAK, Andreja (ur.), POTOČNIK, Uroš (ur.). *Proceedings*. Ljubljana: Genetic Society of Slovenia, 2014, str. 12. [COBISS.SI-ID [7996537](#)]

3.15 Prispevek na konferenci brez natisa

RADIŠEK, Sebastjan. *Viroidna zakrnelost hmelja: stanje, aktivnosti in nova spoznanja : predavanje na 9. sestanku hmeljarjev, Petrovče, 30. 11. 2015*. [COBISS.SI-ID [714636](#)]

3.16 Vabljeno predavanje na konferenci brez natisa

RADIŠEK, Sebastjan, OREŠEK, Erika. *PRA on Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus bark cracking viroid (CBCVd) on hop : predavanje na Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed, Section Plant Health, 25. - 26. 1. 2016, Brussels*. [COBISS.SI-ID [724108](#)]

RADIŠEK, Sebastjan, BENKO-BELOGLAVEC, Anita. *PRA on Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus bark cracking viroid (CBCVd) on hop : predavanje na Workshop on HSVd and CBCVd, Freising, 10. - 11. 2. 2016*. [COBISS.SI-ID [724364](#)]

RADIŠEK, Sebastjan. *Hop viroid research in Slovenia : lecture at Institute of Plant Molecular Biology, Department for Molecular Genetics, Biology Centre ASCR, Czech Republic, 6th November 2014*. [2014]. [COBISS.SI-ID [656268](#)]

4 SKLEPI

- Pri določanju gostiteljske specifičnosti CBCVd smo med 15 kulturnimi rastlinami, ki se gojijo na okuženem območju potrdili le kumare in paradižnik, medtem ko smo med 20 različnimi plevelnimi vrstami kot zelo dobrega gostitelja potrdili le grenkoslad (*Solanum dulcamara*). Rezultati testiranja plevelnih vrst v okuženih nasadih in umetnih okužb so tako potrdili, da plevelna vegetacija v hmeljiščih nima pomembne vloge pri ohranjanju CBCVd. Prav tako CBCVd ne ogroža pomembnejših kulturnih rastlin, ki se gojijo v bližini okuženih območij. V prihodnje bi se bilo pri nadaljevanju testiranja gostiteljske specifičnosti CBCVd usmeriti na rastline družine razhudnikov (*Solanaceae*) in rutičevk (*Rutaceae*).
- Testiranja potencialnih vektorjev za CBCVd in HLVd so presenetljivo pokazala visoko zastopanost obeh viroidov v hmeljevi pršici. Rezultati tako odpirajo vprašanje v vlogi hmeljeve pršice pri širjenju okužbe CBCVd v okuženih nasadih. V ta namen bo v prihodnje potrebno izvesti poskus, ki bo ovrednotil ali je lahko hmeljeva pršica lahko vektor za CBCVd.
- Pri določanju agresivnosti smo ugotovili, da rastline okužene s CBCVd in kombinacijo CBCVd +HSVd izražajo enako agresivna bolezenska znamenja, medtem ko rastline okužene s HSVd po 3 letih niso izrazile simptomov. To pomeni, da HSVd v mešani okužbi s CBCVd ne deluje sinegistično. Določili smo 4 mesečno inkubacijsko dobo za CBCVd na hmelju.
- Določanje stabilnosti CBCVd v mehansko in s glifosatom uničenih okuženih rastlin so pokazala, da lahko CBCVd v nadzemnih ostankih hmelja zaznavamo do 6 tednov, medtem ko smo HLVd zaznavali še do časovne točke 3 mesecev. Pri analizi korenin uničenih rastlin smo ugotovili, da oba viroida propadeta v obdobju 6 mesecev. Pri razpadu tkiva in posledično viroidov močno prispeva uporaba totalnega herbicida na osnovi aktivne snovi glifosat.
- Analize stabilnosti ostankov hmelja v tleh na osnovi 3 različnih tkiv so pokazale, da lahko CBCVd v ostankih rastlin preživi do 10 mesecev, medtem ko HLVd tudi do 12 mesecev. Do časovne točke 6 mesecev smo zaznavali močne PCR signale, po sedmih mesecih pa je intenziteta pričela postopoma padati. Najvišjo obstojnost obeh viroidov smo zaznali v storžkih, najmanj pa v listih, ki se tudi najhitreje in najbolj razgradijo.
- Medsebojna primerjava med različnimi načini namakanja, vodnim virom ter okuženimi nasadi, kjer se namakanje ne izvaja, je pokazala primerljiv vzorec napredovanja okužbe, kar pomeni, da ta tehnološki ukrep ne vpliva na napredovanje okužbe v nasadu. Izvajanje ukrepov osnovne obdelave kot so število obsipanj, kultiviranje in škropljenje je primerljivo med pridelovalci, zato je oceno o vlogi teh ukrepov težko podati. Uporaba podorin, izvajanje defoliacije in odmerki gnojenja v posameznih nasadih se razlikujejo med pridelovalci in okuženimi njivami, vendar niso v korelaciji z napredovanjem okužbe. Povezavo smo potrdili le na nivoju sort, kjer se kaže najnižja stopnja napredovanja okužbe pri sorti Savinjski golding. Pri ostalih sortah kot so Celeia, Aurora in Bobek je stopnja napredovanja okužbe primerljiva.

- Termična faza kompostiranja bistveno prispeva k uničevanju viroidov v hmeljevini. Na osnovi časovne točke zadnjega zaznavanja HLVd in CBCVd v hmeljevini in dodanim varnostnim obdobjem 1 meseca smo kot minimalni čas kompostiranja hmeljevine določili 3mesece, v primeru uporabe PVC folije pa 2 meseca.
- Testiranja razkužil so pokazala najvišjo stopnjo učinkovitosti v primeru razkužila Virocid v min 2% konc. Omenjeno razkužilo je pokazalo tudi najvišjo učinkovitost pri testiranju degradacije viroidov.
- Razvili smo prototip škropilnice, ki se dogradi na traktor in omogoča razkuževanje rezalnikov hmelja ob rezi, hkrati pa se v času obiranja hmelja prilagodi za razkuževanje trgalne glave trgalnika. Oba elementa omogočata hkratno razkuževanje orodja in s tem preprečujeta mehanski prenos viroidov ob povzročanju ran na rastlinah.
- Razvili smo LAMP diagnostično metodo za detekcijo CBCVd, HLVd in HSVd. Pri tem metoda služi samo kot hitri test, vsekakor pa ne kot dokončni test. Ne more se namreč primerjati z občutljivostjo RT-PCR ali RT-qPCR metodologij. LAMP detekcija hmeljnih viroidov se ni izkazala primerna za neposredno analizo hmeljnega soka, kar bi bila njena največja prednost.
- Rezultati projekta so omogočili pripravo novih navodil za pridelovalce in bistveno prispevali k nadgradnji strategije preprečevanja okužb hmelja s CBCVd. Prav tako so rezultati pomembni za preprečevanje viroidnih okužb na ostalih kulturnih rastlinah.

5 VIRI IN LITERATURA UPORABLJENA PRI PRIJAVI PROJEKTA

- Adams, A. N., Barbara, D. J., Clark, M. F., Manwell, W. F., in Thresh, J. M. 1978. Virus diseases of hop. Rep. East Malling Res. Stn. 1977:102-103.
- Adams, A. N., Barbara, D. J., Clark, M. F., Flegg, C. L., in Thresh, J. M. 1977. Virus diseases of hop. Rep. East Malling Res. Stn. 1976:147.
- Astruc N, Marcos JF, Macquaire G, Candresse T. in Pallás V, 1996. Studies on the diagnosis of [Hop stunt viroid](#) in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. [European Journal of Plant Pathology](#). 102: 837-846.
- Barbara D.J, Morton, A., Adams A.N. in Green, C.P. 1990. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the UK. *Annals of Applied Biology*. 117: 359-366.
- Barbosa C.J., Pina J.A., Perez-Panades J., Bernard L., Serra P., Navarrio L., Duran Vila N. 2005. Mechanical Transmission of cotrus viroids. *Plant Disease*. 89: 749-754.
- Bar-Joseph M. 2003. Natural history of viroids - horticultural aspects. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS, eds. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 246-251.
- Bollen G.J. Volker D., 1996. Phylogenetic aspects of composting. In de Bertoldi M., Sequai P., Lemmes B., Papi T., eds. *The Science of composting*. Glasgow, UK: Blackie Academic & Professional.
- Bonham, N., González Pérez, L., Mendez, M.S., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. in Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of virological methods*. 116: 139-146.
- Boubourakas, I.N., Fukuta, S. in Kyriakopoulou, P.E. 2009. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of virological methods*. 160: 63-68.
- Christensen K.K., Kron E., Carlbaek M., 2001. Development of a Nordic System for Evaluating the Sanitary Quality of Compost. Copenhagen: Nordic Council of Ministers.
- Coutts B.A., Kehoe M.A. in Jones R.A.C. 2013. Zucchini yellow mosaic virus: Contact Transmission, stability on surfaces, and inactivation with disinfectants. *Plant Disease*. 97: 766-771.
- Desjardins PR. 1987. Avocado Sunblotch. 299-313. In: Diener (ed) *The viroids*. Plenum Press, NY.

- Diener T.O, 1987. The viroids. Plenum Press: New York.
- Diener T.O. 1995. Origin and evolution of viroids and viroid like satellite RNAs. *Virus Genes*. 11: 119-131.
- Eastwell, K.C. in Nelson, M.E. 2007. Occurrence of viroids in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) production areas of Washington State. *Plant Management Network*, 7 pp. <https://sharepoint.cahnrs.wsu.edu/hops/Shared%20Documents/Scientific%20Articles/Hop%20Stunt/hop.pdf>.
- Elbeaino T, Abou Kubaa R, Choueiri E, Digiario M. in Navarro B. 2012. Occurrence of Hop stunt viroid in mulberry (*Morus alba*) in Lebanon and Italy. *Journal of Phytopathology*. 160(1): 48-51.
- Flores R., Randles J.W., Bar-Joseph M. in Diener T.O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology*. 143: 623-629.
- Flores, R., Hernandez, C., Martinez de Alba, A. E., Daros, J. A., in Di Serio, F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43:117-139.
- Guo L., Liu S., Wu Z., Mu L., Xiang B. in Li S. 2008. Hop stunt viroid (HSVd) newly reported from hop in Xinjiang, China. *Plant Pathology*. 57(4): 764.
- Hadidi A., Flores R., Randles J.W. in Semacik J.S. 2003. Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 370pp.
- Hutton, R. J., Braodbent, P. in Bevington, K. B. 2000. Viroid dwarfing for high density citrus plantings. *Hort. Rev.* 24:277-317.
- Ito T., Kanematsu S., Kogenezawa H., Tsuchizaki T. in Yoshida K. 1993. Detection of a viroid associated with apple fruit crinkle disease. *Ann. Phytopathol. Soc Jpn.* 59: 520-527.
- Lee J.Y., Puchta H., Ramm K. in Sanger H.L. 1988. Nucleotide sequence of the Korean strain of hop stunt viroid (HSVd). *Nucleic Acids Research*. 16: 8708.
- Lenarčič, R., Morisset, D., Mehle, N. in Ravnikar M. 2013. Fast real-time detection of Potato spindle tuber viroid by RT-LAMP. *Plant Pathology*. 62: 1147-1156.
- Lewandowski D., Hayes A. in Adkins S. 2010. Surprising results from a search for effective disinfectants for tobacco mosaic virus-contaminated tools. *Plant Disease*. 94: 542-550.
- Lin, L., Li, R., Bateman, M., Mock, R. in Kinard, G. 2013. Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. *Eur J Plant Pathol*. 137: 797-804.
- Lu, W., Zhang, Z., Xu, P., Liu, S., Wang, H., Jing, D. in Li, S. 2012. Simultaneous Detection of Three Viroid Species Infecting Hops in China by Multiplex RT-PCR. *Journal of phytopathology*. 6: 308-310.
- Matoušek J., Orctova L., Steger G. in Riesner D. 2004. Biolistics inoculation of plants with viroid nucleic acids. *Journal of Virological Methods*. 122:153-164.
- Matoušek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P. in Ludviková, I. 2003. Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop production. *Plant soil environment*. 40: 168-175.
- Matsushita, Y., Aoki, K. in Sumimoto, K. 2012. Selection and inheritance of resistance to Chrysanthemum stunt viroid. *Crop Protection*, 35: 1-4.
- Matsuura S., Matsushita Y., Usugi T. in Tsuda A. 2010. Disinfection of tomato chlorotic dwarf viroid by chemical and biological agents. *Crop Protection*. 29: 1157-1161.
- Matoušek J., Orctova L., Ptaček J., Patzak J., Dedič P., Steger G. in Riesner D. 2007. Experimental Transmission of *Pospiviroid* Populations to Weed Species Characteristic of Potato and Hop Fields. *Journal of Virology*. 81(21): 11891-11899.
- Nagamine, K., Hase, T. in Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*. 16: 223-229.
- Noble R. in Roberts S.J. 2004. Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: a review. *Plant Pathology*. 53: 548-568.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. in Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28: e63.
- Pallás V., Gómez G. in Duran-Vila N. 2003. Viroids in Europe in: Viroids Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semacik JS, eds. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 268-275.
- Papayiannis, L.C. 2014. Diagnostic real-time RT-PCR for the simultaneous detection of Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid. *Journal of virological methods*. 196: 93-99.
- Park, J., Jung, Y., Kil, E.-J., Kim, J., Tran, D.T., Choi, S.-K., Yoon, J.-Y., Cho, W.K. in Lee, S. 2013. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd). *Journal of virological methods*. 193: 232-237.
- Pethybridge S.J., Hay F.S., Barbara D.J., Eastwell K.C. in Wilson C.R. 2008. Viruses and Viroids Infecting Hop: Significance, Epidemiology, and Management. *Plant Disease*. 92 (3): 324-334.
- Puchta H., Ramm K., Luckinger R., Hadas R., Bar-Joseph M. in Sanger H. 1991. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Research*. 19: 23.

- Puchta H., Ramm K. in Sanger H. 1988. The molecular structure of hop latent viroid (HLVd), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* 16: 4197-4216.
- Radisek S., Majer A., Jakse J., Javornik B. in Matoušek J. 2012. First report of Hop stunt viroid infecting hop in Slovenia. *Plant Disease.* 96(4): 592.
- Randles J. W. 2003. Economic impact of viroid diseases. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS, eds. *Viroids.* CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 3-11.
- Rizza, S., Nobile, G., Tessitori, M., Catara, A. in Conte, E. 2009. Real time RT-PCR assay for quantitative detection of *Citrus viroid III* in plant tissues. *Plant pathology.* 58: 181-185.
- Sano T. 2003. Hop stunt viroid. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS, eds. *Viroids.* CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 207-212.
- Sano T., Yoshida H., Goshono M., Monma T., Kawasaki H. in Ishizaki K. 2004. Characterisation of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species. *Journal of General Plant Pathology.* 70: 181-187.
- Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E., Ohno, T. in Okada, Y. 1984. Nucleotide sequence of cucumber pale fruit viroid: homology to hop stunt viroid. *Nucleic Acids Research.* 12: 3427-3434.
- Sasaki M. in Shikata E. 1977. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proceedings of the Japan Academy. Series B.* 53:109-112.
- Sasaki M., Fumikazu K., Yamamoto T., Ozawa M., Kurokawa M., Kagami Y. 1989. Epidemiology and control of hop stunt disease. 165-178; In: *Proceedings of Int. Workshop on Hop Virus Diseases.* Eppler A (ed). Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft: Ulmer, Germany.
- Semancik J.S. in Vidalakis G. 2005. The question of Citrus viroid IV as a Cocadviroid. *Arch. Virol.* 150: 1059-1067.
- Shamloul, A.M., Faggioli, F., Keith, J.M. in Hadidi, A. 2002. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid*, and *Pospiviroid*. *Journal of virological methods.* 105: 115-121.
- Shikata E. 1990. New viroids from Japan. *Seminars in Virology.* 1: 107-115.
- Sing R.P. in Slack S.A. 1984. Reactions of tuber-bearing *Solanum* species to infection with potato spindle tuber viroid. *Plant Disease.* 68: 784-787.
- Singh, R. P., Ready, K. F. M., in Nie, S. 2003. Viroids of solanaceous species. Pages 125-136 in: *Viroids.* A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, and J. S. Semancik, eds. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Tharanajoo, S.S., Kong, L.L., Kadir, J., Lau, W.H. in Vadamalai, G. 2014. Detection of Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd) in oil palm by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of virological methods.* 202: 19-23.
- Tsutsumi, N., Yanagisawa, H., Fujiwara, Y. in Ohara, T. 2010. Detection of Potato spindle tuber viroid by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan.* 46: 61-67.
- Verhoeven JThJ & Roenhorst JW. 2000. Herbaceous test plants for the detection of quarantine viruses of potato. *EPPO Bulletin.* 30: 463-467.
- Verniere C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botela L., Chabrier C., Bove J.M., Duran Vila N. 2006. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of Clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology.* 96: 356-368.
- Walia Y., Dhir S., Ram R., Zaidi A. in Hallan V. 2013. Identification of the herbaceous host range of apple scar skin viroid and analysis of its progeny variants. *Plant Pathology.* doi: 10.1111/ppa.12118.
- Yaguchi S. in Takahashi T. 1984. Survival of Hop Stunt Viroid in the Hop Garden. *Journal of Phytopathology.* 109: 32-44.
- Yamamoto H., Kagami Y., Kurukawa M., Nishimura S. in Kubo S. 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd. 16: 49-62.
- Zhang B., Liu G.Y., Liu C., Wu Z., Jiang D. in Li S. 2009. Characterisation of Hop stunt viroid (HSVd) isolates from jujube trees (*Ziziphus jujuba*). *European Journal of Plant Pathology.* 125: 665-669.
- Zhang, Z., Peng, S., Jing, D., Pan, S. Wang, H. in Li, S. 2012. Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants. *Eur J Plant Pathol.* 132: 9-16.