

ZAKLJUČNO POROČILO

O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

2. Šifra projekta:

V4-0523

3. Naslov projekta:

Karakterizacija novih bakterijskih in fitoplazemskih bolezni, ki ogrožajo sadno drevje; razvoj metod za detekcijo povzročiteljev in iskanje naravne odpornosti gostiteljev

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Karakterizacija novih bakterijskih in fitoplazemskih bolezni, ki ogrožajo sadno drevje; razvoj metod za detekcijo povzročiteljev in iskanje naravne odpornosti gostiteljev

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Characterization of new bacterial and phytoplasma diseases of fruit trees; the development of methods for the pathogen detection and searching for the natural host resistance

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

sadno drevje, fitoplazme iz skupine AP, metličavost jablan, propadanje hrušk, klorotično zvijanje listov koščičarjev, bakterija *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, pegavost orehov, rod *Pseudomonas*

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

fruit trees, AP phytoplasmas, apple proliferation, pear decline, European stone fruit yellows, bacterium *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, genus *Pseudomonas*

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Nacionalni inštitut za biologijo

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

6. Sofinancer/sofinancerji:

MKGP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

05229

Maja Ravnikar

Datum: 14. 9. 2010

Podpis vodje projekta:


Prof. dr. Maja Ravnikar

Podpis in žig izvajalca:


Prof. dr. Tamara Lah Turnšek



II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

1. FITOPLAZEMSKÉ BOLEZNI SADNEGA DREVJA

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo je s strani Fitosanitarne uprave Republike Slovenije pooblaščen za izvajanje diagnostike fitoplazem gospodarsko pomembnih rastlin, vključno s pečkarji in koščičarji. Ker fitoplazem, kot patogenih bakterij, ki povzročajo veliko gospodarsko škodo na številnih gospodarsko pomembnih rastlinah, še ne znamo gojiti v razmerah *in vitro*, je njihova detekcija mogoča le z različnimi molekulskimi pristopi. Ti so praviloma dragi, težavni, in zelo zamudni. Glavni cilj predlaganega projekta je bil v segmentu fitoplazemskih bolezni sadnega drevja razviti ustrezno molekulske metodo na osnovi PCR v realnem času, ki bi po zanesljivosti, natančnosti in hitrosti nadomestila obstoječe detekcijske metode v diagnostičnem laboratoriju Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo.

V začetni fazi projekta smo izvedli obširno bioinformatično analizo fitoplazem na sadnem drevju, na osnovi katere smo izbrali primerne gene za vključitev v detekcijo fitoplazem iz taksonomske skupine 16Sr-X ali AP. Ta med drugim vključuje glavne fitoplazemske povzročitelje bolezni pečkarjev in koščičarjev: '*Candidatus* Phytoplasma mali', ki povzroča metličavost jablan (AP), '*Ca. P. prunorum*', povzročiteljico zvijanje listov koščičarjev (ESFY) in '*Ca. P. pyri*', ki povzroča propadanje hrušk (PD). Kot primeren gen za oblikovanje začetnikov za kvantitativni PCR v realnem času smo izbrali 16S in medgensko regijo 16S/23S. V končnem oblikovanju protokola za določanje vseh treh fitoplazem smo sestavili skupino testov, ki je temeljila na sondah TaqMan MGB. Testi vključujejo isti komplet začetnikov, a specifične sonde za vrstno specifično pomnoževanje znotraj medgenske regije 16S/23S rRNA, komplet začetnikov in sond za pomnoževanje ribosomske 16S DNA za splošno fitoplazemsko detekcijo in dodatni komplet začetnikov in sond za 18S rRNA, ki predstavlja endogeno kontrolo za kakovost ekstrahirane DNA. Lastnosti delovanja vseh testov smo ovrednotili in prednosti novih testov prikazali v primerjalni raziskavi s klasičnim PCR in objavljenimi testi. Pokazalo se je, da je občutljivost novega testa večja, povezana pa je s trikrat krajšim časom testiranja od do sedaj uporabljene metode. Nove teste smo preizkusili na vzorcih DNA fitoplazem '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. prunorum*', '*Ca. P. pyri*', drugih fitoplazem in drugih bakterij izoliranih iz rastlinskega materiala. Teste smo preizkusili tudi na 198 simptomatičnih in nesimptomatičnih vzorcih sadnega drevja, nabranih na terenu v različnih rastnih sezonah. Rezultati raziskave potrjujejo, da je nov komplet testov primeren tako za rutinsko diagnostiko kot tudi za monitoring v programih certificiranja.

Rezultate raziskave smo prikazali na več znanstvenih in strokovnih srečanjih ter v znanstvenem članku.

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

2. BOLEZNI OREHOV, KI JIH POVZROČA BAKTERIJA *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

Bakterijska pegavost orehov, ki jo povzroča bakterija *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* je ena najpomembnejših bolezni oreha. Bolezen je prisotna v vseh pridelovalnih območjih oreha in napada vse zelene dele rastline, tudi plodove, kar posledično zmanjša pridelek, prizadeto pa je tudi splošno zdravstveno stanje dreves. V Sloveniji so v preteklosti v selekcijskih in proizvodnih nasadih že opazili značilna bolezenska znamenja bakterijske pegavosti orehov, povzročitelja bolezni pa smo v okviru tega projekta prvič laboratorijsko identificirali in potrdili, kar je bil eden glavnih ciljev v okviru tega projekta. Poleg tega smo raziskali povezavo med odpornostjo posameznih sort orehov in vsebnostjo fenolnih snovi.

Za laboratorijsko potrditev bakterije *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* smo uporabili metode izolacije na splošnih in selektivnih gojiščih, izbrane biokemijske teste, molekularno biološke teste pomnoževanja DNA v repetitivnem PCR (BOX-PCR), analizo talilne krivulje PCR produktov gena *gyrB* in potrjevanje patogenosti s testom hipersenzitivnostne reakcije na tobaku in okuževanjem plodov orehov. Na ta način smo potrdili prisotnost bakterije *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* v vseh opazovanih sortah orehov v izbranem selekcijskem nasadu (Seifersdorfski, Šampion, Cisco, Erjavec, Fernette in Zdole) v različnem rastlinskem materialu (plodovih, listih in poganjkih). Uvedene metode so primerne za laboratorijsko določanje bakterije *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* v različnih materialih.

Ob sami karakterizaciji izolatov smo opazili raznolikost predvsem v sposobnosti pektinolitičnosti, lastnosti, ki lahko izolat omogoča razgradnjo pektina rastlinskih celic in s tem prednost pri širjenju po rastlinskem tkivu. Manjšo raznolikost izolatov smo opazili tudi z uporabo BOX-PCR, ki pa ni pokazal soodvisnosti med opaženim profilom PCR produktom in izvorom izolata (sorta oreha, tip rastlinskega tkiva). S fenotipsko karakterizacijo Biolog Gen III MicroPlate, ki vključuje standardizirane mikroteste skupaj 71 testov uporabe ogljikovih hidratov in 23 testov občutljivosti na različne snovi, smo lahko izolate razvrstili v štiri skupine, ki so se razlikovale v produkciji pektina, razgradnji saharoze, natrijevega butirata in D-maltoze, sposobnost rasti v 4% NaCl ter v občutljivosti na nekatere druge snovi (natrijev bromat, nalikdiksično kislino in astreonam).

Z opazovanji pojava bolezenskih znamenj v selekcijskih in proizvodnih nasadih smo potrdili opažanja drugih raziskovalcev, da se sorte orehov razlikujejo v občutljivosti. Pri šestih izbranih sortah orehov, ki smo jih izbrali na podlagi predhodnih opazovanj ter pomembnosti sort za Slovenijo, smo primerjali občutljivost dreves v nasadih z občutljivostjo plodov istih sort ob umetnem okuževanju plodov v nadzorovanih pogojih. Podobno kot pri drugih boleznih, tudi pri bakterijski pegavosti orehov v splošnem velja, da je mlajše tkivo bolj občutljivo od starejšega, kar kaže na vlogo sekundarnih metabolitov, tudi fenolov, zato smo v plodovih orehov, tako zdravih kot okuženih, v nasadu in v laboratoriju, spremljali razvoj fenolnih snovi.

Plodove orehov sort Seifersdorfski, Šampion, Cisco, Erjavec, Fernette in Zdole smo nabrali v nasadu v fenofazi Gf+30 do Gf+45, smo umetno okužili z bakterijo *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* z vbadanjem bakterije v mezokarp plodov. Plodove smo inkubirali v pogojih, ugodnih za razvoj bolezni ter ocenili stopnjo razvitih bolezenskih znamenj z oceno nekroz. Metodo umetnega okuževanja plodov orehov, razvito v okviru

projekta COST873, smo tehnično izpopolnili in nadgradili z analizo slik odtisov prečno in vzdolžno prerezanih orehov na hranilnem gojišču. Po umetni inokulaciji plodov z bakterijo *X. a. pv. juglandis* so se znamenja bolezni, značilna za orehov ožig, razvila pri vseh šestih testiranih sortah. Znamenja bolezni so se izražala predvsem v notranjosti oreha, mezokarpu in jedrcu, izredno redko pa na površini zelene lupine. Pri umetnem okuževanju sta se za najbolj občutljivi sorti izkazali sorti Cisco in Šampion, srednje občutljive so bile sorte Zdole, Fernette in Seifersdorfski, najmanj občutljiva pa je bila sorta Erjavec.

Ekstrakcijo fenolov iz plodičev oreha, tako okuženih kot tudi zdravih, smo izvedli po metodi Escarpa in Gonzalez. Vsebnost posameznih fenolov smo analizirali na tekočinskem kromatografu visoke ločljivosti (HPLC, Thermo Finningan Surveyor) s PDA detektorjem, kjer smo uporabili kolono Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm, Phenomenex). HPLC je računalniško povezan s kromatografsko postajo ChromQuest™ 4.0. Spekter je bil sneman v območju valovne dolžine od 200 do 500 nm. Absorbanca za flavan-3-ole, kinone, hidroksicimetne kisline ter hidroksibenzojske kisline je bila merjena pri 280 nm, absorbanca za flavonole pa pri 350 nm. Fenolne spojine v vzorcih oreha smo določili kvalitativno s pomočjo standardnih raztopin (po retencijskem času, absorpcijskem maksimumu v UV spektru in dodatku standardne raztopine vzorcu) in kvantitativno na osnovi primerjave površine vrhov na kromatogramu glede na standardne raztopine. Pri vseh sortah smo v zdravih in s *X. arboricola pv. juglandis* napadenimi plodovi določili 18 fenolov (elagna, ferulna, galna, kavina, klorogenska, vanilna, p-kumarna, protokatehulna, siringinska in sinapinska kislina; juglon; aldehyd siringinske kisline, rutin, katehin, kvercetin-3-ramnozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-galaktozid in floroglucinol).

V razmerah umetne okužbe med s *X. arboricola pv. juglandis* okuženimi in slepo okuženimi plodovi posameznih sort ni bilo statistično značilnih razlik v skupnih fenolih, razlikovala pa se je zastopanost posameznih fenolov. Pri vseh sortah je bila v okuženih plodovih v primerjavi s slepo okuženimi plodovi statistično značilno večja vsebnost katehina, klorogenske in p-kumarne kisline. Pri vseh sortah je prišlo v okuženih plodovih v primerjavi s slepo okuženimi in zdravimi fenoli do statistično značilnega povečanja vsebnosti vsaj enega fenola, vendar ni bilo opaziti odvisnosti med odpornostjo plodov na okužbo v laboratorijskih pogojih in zastopanostjo fenolov.

Ob spremljanju občutljivosti orehovitih dreves v nasadu smo opazili medsebojno odvisnost občutljivosti plodičev na umetno okužbo in pojav nekroze poganjkov in plodov pozno poleti.

Rezultati projekta so potrdili prisotnost in razširjenost bakterije *X. arboricola pv. juglandis* v izbranem selekcijskem in proizvodnem nasadu oreha, kar kaže na nujnost fitosanitarnih ukrepov za omejitev širjenja bolezni. Vzpostavljeni laboratorijski testi za določanje bakterije omogočajo hitro in zanesljivo preverjanje njene prisotnosti. Optimiziran postopek umetnega okuževanja plodov orehov zagotavlja hitrejše in enostavnejše ocenjevanje občutljivosti različnih sort na bakterijsko pegavost oreha in omogoča izbor odpornejših sort. Raziskava je potrdila različne odzive posameznih sort oreha na okužbo z bakterijo *X. arboricola pv. juglandis* s statistično značilnim povečanjem vsebnosti nekaterih fenolov v okuženih orehih.

Rezultate raziskave smo prikazali na več znanstvenih in strokovnih srečanjih ter v

znanstvenem članku.

3. IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA IZOLATOV RODU *Pseudomonas* spp.

Bakterije iz rodu *Pseudomonas* so na sadnem drevju pogosti, manj škodljivi patogeni organizmi, ki s povzročanjem madežev zmanjšajo kvaliteto sadja, v določenih klimatskih pogojih, posebno v povezavi z intenzivnejšo tehnološko prakso in gojenjem občutljivejših sort. Občasno so bolezenska znamenja, predvsem pri jablanah, zelo izrazita in vključujejo sušenje in propadanje celotnih poganjkov in mladih dreves, kar je sicer bolj značilno za bakterijski hrušev ožig, nadzorovano bolezen, ki jo povzroča bakterija *Erwinia amylovora*.

Poglavitni cilj projekta je bila karakterizacija izolatov iz rodu *Pseudomonas*, izoliranih iz različnih gostiteljskih rastlin, z različno izraženimi bolezenskimi znamenji in iz različnih geografskih področij v Sloveniji. Za identifikacijo in karakterizacijo izolatov smo uporabili kombinacijo klasičnih mikrobioloških metod, molekularno-bioloških metod, teste produkcije toksinov in različne teste patogenosti. Uporabili smo metode: LOPAT teste, tvorbo fluorescentnih pigmentov na gojišču King B, imunofluorescenčni test s protitelesi za določanje bakterij *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, analizo profila maščobnih kislin, test toksinov z indikatorsko glivo *Rhodotorula pilimanae* molekularno metodo BOX-PCR in 16S RFLP z encimoma RsaI in MnlI, test patogenosti na stročjem fižolu ter test patogenosti na plodovih in listih hrušk sorte Conference. Z uporabo programa Bionumerics smo pridobljene rezultate analizirali in raziskali povezave med njimi. Preverjali smo tudi vpliv izolatov na rast bakterije *E. amylovora* ter njihovo odpornost na baker.

Največ (68.1 %) naših izolatov smo izolirali iz jablan z različnimi bolezenskimi znamenji, predvsem nekrozami cvetnih šopov in nekrozami poganjkov. Preostale izolate smo izolirali iz hrušk, kutin in nekaterih drugih rastlin z izraženimi nekrozami (panešplja, ognjeni trn, japonska kutina, glog, jerebika, skorš ipd.), vključili pa smo tudi izbrane izolate iz drugih gostiteljskih rastlin (vrtnica, radič, žito, krizantema ipd.).

Iz večine vzorcev smo izolirali *Pseudomonas* spp., ki so bili sposobni povzročiti hipersenzitivnostno reakcijo na tobaku in so torej sposobni povzročati bolezenska znamenja. Na osnovi testov LOPAT smo večino le-teh uvrstili v vrsto *Pseudomonas syringae*. Poleg izolatov, ki na gojišču razvijejo levana (n=86), ki je eden pomembnejših virulenčnih dejavnikov bakterij iz rodu *Pseudomonas*, so bili presenetljivo, predvsem pri jablanah, pogosti izolati, ki levana ne proizvajajo (n=44). Produkcija levana je bila pri nekaterih izolatih variabilna, ravno tako pa smo opazili variabilnost v sposobnosti encimske razgradnje pektina. Precej redko smo izolirali *Pseudomonas* spp. tudi drugih LOPAT skupin (n=4). Poleg pričakovanih bakterij *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, ki veljajo za najpogostejše bakterije rodu *Pseudomonas* na sadnem drevju, smo tako že v začetnih testih z uporabo enostavnih, klasičnih testov pokazali veliko raznolikost teh bakterij. Z uporabo nekaterih biokemijskih testov in upoštevanjem izvornih gostiteljskih rastlin, smo poleg prisotnosti razširjenega *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* potrdili prisotnost nekaterih drugih bakterij: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in pv. *marsprunorum*, *Pseudomonas viridiflava*, poleg teh pa so se, sicer redko, pojavljali izolati z netipičnimi profili LOPAT. Morebitna vključenost predvsem *Pseudomonas viridiflava* v razvoj bolezenskih znamenj pri jablanah še ni raziskana.

Poleg karakterizacije izolatov z metodami, ki omogočajo razlikovanje med posameznimi

izolati, smo za njihovo karakterizacijo uporabili tudi teste, ki imajo neposreden pomen za prakso. V testu inhibicije bakterije *Erwinia amylovora*, povzročiteljice bakterijskega hruševega ožiga, na umetnih gojiščih, smo preverjali morebiten negativen vpliv *Pseudomonas* spp. na rast in možnost določanja te bakterije. Od testiranih *Pseudomonas* spp. smo negativen vpliv na rast *E. amylovora* opazili le pri štirih nepatogenih izolatih *Pseudomonas* spp. Razširjenost nepatogenih *Pseudomonas* spp. v normalni flori rastlin, ki lahko zavirajo rast nadzorovan bakterije *E. amylovora*, veča pomen pravilne priprave vzorca za laboratorijsko določanje *E. amylovora*, predvsem pravilne površinske sterilizacije. Izolati *Pseudomonas* spp. z inhibitorskim učinkom so potencialno uporabni kot biokontrolni agensi. Dodatno smo pri izoliranih *Pseudomonas* spp. preverjali njihovo odpornost na baker, ki je eno redkih sredstev za njihovo omejevanje. Večina izolatov je bila občutljiva že na nižje koncentracije bakra, iz jablanovih nasadov pa smo izolirali tudi nekaj sevov, ki so bili odporni na najvišjo testirano koncentracijo (2,2 mM). Glede na to, da se odpornost na baker znotraj *Pseudomonas* spp. pogosto širi preko izmenjave plazmidov, večji pojav odpornih sevov v nasadih z večjo uporabo bakra, ni presenetljiv.

Izmed ostalih uporabljenih testov nekateri niso bili primeri za uporabo na večjem številu izolatov in/ali so kazali premajhno resolucijo za zanesljivo razlikovanje izolatov rodu *Pseudomonas*. Pričakovano smo v seroloških testih označevanja bakterij s protitelesi razvitimi proti *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, opazili navzkrižno reaktivnost protiteles, razlike v njihovem titru pa so bile premalo zanesljive za uporabo tega testa za razvrščanje izolatov. Podobno so se izolati premalo razlikovali v testu tvorjenja fluorescentnega pigmenta v gojišču KingB in sicer pogosto uporabljeni metodi za identifikacijo bakterij, analizi profila maščobnih kislin. Ravno tako smo nizko raznovrstnost med izolati ugotovili s testom polimorfizma dolžine restrikcijskih fragmentov (RFLP) 16S RFLP. Z uporabo restrikcijskih encimov RsaI in MnlI smo lahko vse izolate, tako nepatogene kot tudi patogene, razvrstili v vsega 5 skupin pri čemer smo opazili soodvisnost RFLP profila in sposobnostjo povzročitve hipersenzitivnostne reakcije na tobaku.

Daleč največjo raznolikost izolatov smo ugotovili z uporabo molekularno biološkega testa, repetitivnega PCR z uporabo oligonukleotidnega začetnika BOX1A (BOX-PCR). Test, katerega rezultat so prstni odtisi različno velikih produktov PCR reakcije, se je ob standardizaciji postopka izkazal za zelo ponovljivega in zanesljivega. Z analizo denziometričnih krivulj prstnih odtisov smo lahko razlikovali med večino referenčnimi bakterijami različnih patovarjev, znotraj skupine naših patogenih izolatov *Pseudomonas* spp. pa smo ugotovili kar 22 različnih skupin (70 % podobnost). Nekatere od teh skupin so bile zastopane z večjim številom izolatov. V večini BOX-PCR skupin so bili prisotni izolati z različnimi profili LOPAT, izjema so levan negativni izolati iz jablan, ki so se v večini uvrstili v svojsko skupino BOX-PCR prstnih odtisov ne glede na njihov geografski izvor.

V preverjanju patogenosti na strokih fižola, pa tudi na nezrelih plodovih hrušk in listih hrušk sorte Conference, ti izolati niso povzročali bolezenskih znamenj in jih skoraj polovica ni proizvajala toksinov. To bi lahko nakazovalo delno specializiranost izolatov na jablane, verjetneje pa odraža njihovo specifičnost za določeno tkivo. Izolati so bili namreč večinoma izolirani iz nekrotičnih poganjkov in razjed na zelenih in olesenelih poganjkih. Ločena razvrstitev teh izolatov v BOX-PCR bi lahko nakazovala njihovo ločenost od

ostalnih *Pseudomonas* spp. ali, verjetneje, nedavni klonski razvoj, ki še ni omogočil običajno pogoste izmenjave genskega materiala med različnimi *Pseudomonas* spp. Ločena razvrstitev hkrati nakazuje možnost izolacije specifičnega dela dednega materiala in razvoj za skupino levan negativnih *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* specifičnega molekularnega testa, ki bi omogočil obširnejšo analizo prisotnosti in pomena teh bakterij pri razvoju bolezenskih znamenj jablan.

Z uporabo tako klasičnih, kot tudi novejših, molekularno-bioloških metod razvrščanja bakterij, smo potrdili veliko raznolikost *Pseudomonas* spp. pri nas. V primeru jablan, na katerih v zadnjih letih opazamo izrazitejša znamenja bolezni, smo poleg pričakovanih bakterij *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, pogosto izolirali levan negativne izolate *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Z uporabo metode BOX-PCR smo pokazali veliko medsebojno podobnost izolatov in različnost od ostalih izolatov, kar med drugim omogoča izbor izolatov za potrjevanje njihove vključenosti v razvoj nekroz ter morebitni razvoj zanje specifične metode detekcije.

Rezultate raziskave smo prikazali na več znanstvenih in strokovnih srečanjih.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;

² Označite lahko več odgovorov.

- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Rezultati projekta so neposredno povezani z:

1. zastavljenimi ukrepi Sektorja Evropske komisije za sadje in zelenjavo, s katerimi bi v EU pospešili pridelavo sadja in posledično povečali uživanje sadja med potrošniki, med katerimi so tudi mikrobiološke raziskave in analize na pridelkih, ki vključujejo preverjanje skladnosti s standardi ter pravila glede varstva rastlin
2. ukrepi za preprečevanje širjenja nevarnih škodljivih organizmov rastlin po Direktivi Sveta 2000/29/ES.

Z razvitimi diagnostičnimi pristopi bomo lažje, hitreje, ceneje, bolj natančno in zanesljivo sledili poteku bolezni sadnega drevja, ker so metode zelo občutljive pa so uporabne tudi za zelo zgodnjo diagnostiko. Rezultati raziskav fitoplazem sadnega drevja so že uvedeni v diagnostične postopke v laboratoriju Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo NIB za potrebe Fitosanitarne uprave Republike Slovenije in inšpekcijskih služb. Razviti testi so trenutno vključeni tudi v evropsko medlaboratorijsko preizkušanje (ring test) najboljše metode za detekcijo fitoplazem na sadnem drevju v okviru evropskega projekta EUPHRESKO.

Rezultati raziskav na orehih bodo pomembno prispevali k izbiri sajenja vrst, odpornih proti bakteriji *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

Rezultati raziskav bakterij iz rodu *Pseudomonas* nam je pokazala katere bakterije iz tega rodu so v Sloveniji prisotne in kakšna je njihova raznolikost. Ustvarjena knjižnica podatkov na bo v prihodnje služila za lažjo in hitrejšo karakterizacijo in identifikacijo bakterij iz tega rodu .

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Rezultati projekta so z mednarodnimi objavami pomemben prispevek k temeljnemu poznavanju fitoplazem na splošno in na sadnem drevju specifično. To bo pomagalo pri nadaljnjem spremljanju teh malo poznanih rastlinskih patogenov, saj se število bolezni, ki jih fitoplazme povzročajo povečuje, tako zaradi vnosa povzročiteljev bolezni od drugod, zaradi vedno bolj razširjenega integriranega načina pridelave rastlin, pri katerem različnih vrst prenašalcev ne zatiramo v zadostni meri, kot tudi izvora okužb v divjerodnih rastlinah.

S poznavanjem odpornostnih odgovorov orehov, bomo lahko pomagali pri vzgoji odpornih sort.

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

- | | |
|---|--------------------------------------|
| X | a) v domačih znanstvenih krogih; |
| X | b) v mednarodnih znanstvenih krogih; |
| X | c) pri domačih uporabnikih; |
| X | d) pri mednarodnih uporabnikih. |

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

Sistem testov za detekcijo fitoplazem sadnega drevja je že vključen v evropsko medlaboratorijsko testiranje v okviru evropskega projekta EUPHRESKO, ki bo potekalo jeseni 2010. Z laboratorijem s Palacký Univerzity v Olomoucu, Republika Češka smo že podpisali sporazum o uporabi razvitih testov, na ARRS pa je v teku tudi prijava za bilateralno sodelovanje z istim laboratorijem na raziskavah fitoplazem sadnega drevja.

3.7. Število diplomantov, magistrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

Fitoplazme: 1 diploma, doktorat, ki bo zaključen spomladi 2011
Pseudomonas: 1 doktorat

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

Na področju raziskav rastlinskih patogenov trenutno potekajo formalne oblike sodelovanja:

1. bilateralni projekti s Poljsko, Hrvaško, Francijo
2. sodelujemo v potekajočih evropskih projektih Q-DETECT, Q-BOL, EUPHRESKO
3. sodelovanje v osmih projektih COST
4. na osnovi medsebojnega sporazuma sodelujemo s Palacký Univerzity v Olomoucu, Republika Češka
5. neposredno raziskovalno sodelujemo z Agroscope Changins-Wädenswil v Švici, FERA v Veliki Britaniji, School of Biosciences Univerze v Nottinghamu v Veliki Britaniji, Univerzo v Udinah, Centro per la Ricerca in Viticoltura v Coneglianu v Italiji, Plant Pathology Department Floridske univerze v ZDA.

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

S tujimi partnerji sodelujemo kot soavtorji pri znanstvenih člankih in skupaj nastopamo pri prijavljanju mednarodnih projektov.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.