

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/37

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	L4-9442
<b>Naslov projekta</b>	Razvoj metode PCR v realnem času za detekcijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja
<b>Vodja projekta</b>	15489 Irena Mavrič Pleško
<b>Tip projekta</b>	L Aplikativni projekt
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	3.150
<b>Cenovni razred</b>	C
<b>Trajanje projekta</b>	01.2007 - 12.2009
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	401 Kmetijski inštitut Slovenije
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	416 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije 1775 OMEGA svetovanje, inženiring, razvoj in raziskovanje d.o.o.
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	08. Kmetijstvo

#### 2. Sofinancerji<sup>1</sup>

1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
	Naslov	Dunajska 58, Ljubljana
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta<sup>2</sup>

Viroidi so pomembni škodljivi organizmi gojenih rastlin. So kovalentno zaprte krožne molekule RNA velikosti od 246 do 399 baznih parov. Ne kodirajo peptidov oz. beljakovin, zato morajo za pomnoževanje, procesiranje in transport uporabljati beljakovine gostitelja. Glede na način pomnoževanja jih delimo v dve družini, Pospiviroidae in Avsunviroidae. Za Slovenijo pomembni viroidi, ki okužujejo trajnice, so *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Hop latent viroid* (HLVd), *Apple scar skin viroid* (ASSVd), *Apple dimple fruit viroid* (ADFVd), *Australian*

*grapevine viroid* (AGVd), *Grapevine yellow speckle 1 viroid* (GYSVd-1), *Grapevine yellow speckle 2 viroid* (GYSVd-2) in *Pear blister canker viroid* (PBCVd) iz družine Pospiviroidae in *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) iz družine Avsunviroidae. Nekateri viroidi sami povzročajo veliko gospodarsko škodo, medtem ko so drugi lahko škodljivi v kombinaciji z drugimi viroidi ali virusi.

Glede na obstoječa poročila, viroidi vinske trte sami ne povzročajo ekonomsko pomembnih izgub. Mešana okužba z GYSVd-1 in GYSVd-2 na nekaterih rastlinah povzroča bolezenska znamenja, na drugih pa ne. Mešana okužba z GYSVd in HSVd spremeni pH grozdnega soka in zmanjša vegetativno rast. Mešana okužba z GYSVd in virusom pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) povzroča t.i. bolezen »vein banding«. Zaradi možnih interakcij viroidov z mnogimi virusi in fitoplazmami, katerih gostitelj je vinska trta, naj viroidi ne bi bili navzoči v elitnih rastlinah vinske trte. Epidemiologija viroidov vinske trte ni dobro raziskana, vendar nekatere raziskave kažejo na prenos GYSVd-1 in HSVd s semenom. Prenos s semenom vpliva na uporabo tehnik žlahtnjenja in je lahko vzrok preživetja viroidov v sejančkih.

Hop stunt viroid okužuje številne rastline. O okužbah hmelja so doslej poročali le z Japonske. Okužene rastline hmelja so fizično manjše od zdravih za okrog 40%, teža trte in listov se zmanjša za okrog 30%, teža storžkov pa za okrog 50%. Prav tako se zniža vsebnost alfa kislin v storžkih medtem ko vsebnost beta kislin ostaja nespremenjena.

HSVd in PLMVd sta do sedaj edina znana viroida, ki okužujeta koščišaste sadne vrste. Pri breskvah in nektarinah znižujeta kakovost plodov. PLMVd povzroča tudi prezgodnje ali prepozno zorenje. Okužbe z viroidi lahko povzročijo tudi prezgodnji propad rastlin in zmanjšujejo njihovo odpornost na mraz in različne bolezni.

Nekateri izmed viroidov ne povzročajo velikih gospodarskih škod, zato se zdijo le-ti manj pomembni, vendar pa mutacije in mešane okužbe z drugimi škodljivimi organizmi lahko povzročijo večjo škodo. Prav zato je potrebno zagotavljati z viroidi neokužen sadilni material vseh gojenih rastlin.

Navzočnost viroidov v Sloveniji je slabo proučena. Večina raziskav je bila izvedena na trajnih rastlinah z uporabo klasičnih tehnik detekcije kot so hibridizacija točkovnega odtisa, povratna poliakrilamidna gelska elektroforeza (R-PAGE) in RT-PCR. Prisotnost PLMVd in HSVd je bila potrjena v koščičastih sadnih vrstah, prisotnost HLVd pa v hmelju.

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) je nova in zelo zmogljiva metoda za detekcijo in identifikacijo rastlinskih in drugih škodljivih organizmov.

Pri klasični PCR metodi ugotavljamo količino namnoženega produkta PCR na koncu reakcije, medtem ko lahko v qPCR spremljamo namnoževanje produkta PCR med samo reakcijo. To nam omogočajo uporaba fluorescentnih barvil, katerih fluorescenco detektiramo v vsakem ciklu pomnoževanja. V ta namen so v uporabi različne kemije, ki jih v grobem delimo na specifične in nespecifične. Pri nespecifičnih metodah uporabljamo barvila (npr. SYBR Green I), ki se vežejo v dvovertično molekulo DNA. Te ob osvetljevanju s svetlobo ustrezne valovne dolžine fluorescirajo. Vežejo se tako na specifične produkte, kot tudi na nespecifične produkte in na dimere začetnih oligonukleotidov. Za uspešno kvantifikacijo specifičnega produkta mora biti reakcija popolnoma optimizirana, tako da v njej ne nastajajo dimeri začetnih oligonukleotidov ali nespecifični produkti.

Pri specifičnih metodah so na začetne oligonukleotide ali sonde vezane fluorescentne molekule. Ena izmed kemij, ki se uporabljajo za specifične metode je TaqMan kemija, kjer je detekcija zagotovljena z uporabo dveh začetnih oligonukleotidov in hidrolizirajoče sonde. Sonda je označena z dvema različnima molekulama. V nedotaknjeni sondi se emitirana energija reporterske molekule, ki je vezana na 5'-terminalnem koncu, prenaša na t.i. dušilec ('quencher') na 3'-terminalnem koncu preko FRET (prenos energije s fluorescentno resonanco). Reakcija poteka tako, da se sonda in začetna oligonukleotida vežejo na tarčno DNA. Encim DNA polimeraza prične sintetizirati komplementarno verigo DNA. Zaradi endonukleazne aktivnosti encima le-ta razgradi sondo, vezano na tarčno DNA, in posledično se reportersko barvilo in dušilec sprostita v raztopino. Dušilec ne duši več fluorescence reporterskega barvila zato to razliko zazna detektor kot porast fluorescence. Dušilec na 3'-terminalnem koncu je lahko fluorescenten (TAMRA) ali nefluorescenten (NFQ). Sonde z dušilcem NFQ še imajo lahko dodatno molekulo, ki stabilizira vezavo na DNA in jih zato imenujemo MGB sonde.

Za ugotavljanje uspešnosti pomnoževanja in kvantifikacijo tarčne DNA uporabljamo enoto, ki se imenuje Ct ali 'cycle threshold' cikel. To je cikel, pri katerem emitirana fluorescenca reporterskega barvila preseže fluorescenco ozadja. Porast fluorescence merimo v vsakem ciklu, to pa nam omogoča tudi kvantifikacijo tarčne molekule.

V primerjavi s klasičnim PCR je qPCR občutljivejši in zanesljivejši, poleg tega pa nam omogoča tudi kvalitetnejšo kvantifikacijo tarčne molekule. Za kvantifikacijo primerjamo Ct vzorca s podatki serijsko redčenega standarda, ki nam služijo za izdelavo standardne krivulje. Za kvantifikacijo namreč uporabljamo podatke iz linearne faze pomnoževanja, kjer so pogoji za reakcijo qPCR optimalni. Pri klasičnem PCR pa tudi za kvantifikacijo uporabljamo končne podatke, na katere lahko, poleg količine tarčne molekule, vplivajo številni drugi dejavniki (inhibitorji, stranski produkti, ki lahko delujejo kot inhibitorji, pomanjkanje reagentov potrebnih za uspešen PCR ...). Uporaba podatkov iz linearne faze pomnoževanja omogoča kvantifikacijo v širšem območju. V primerjavi s klasičnim PCR pa je pri qPCR tudi manjša variabilnost znotraj in med posameznimi testi.

Pri qPCR po končani reakciji ni potrebna uporaba agaroznega gela, kot pri klasični reakciji PCR, saj se fluorescenca meri v vsakem ciklu. Rezultate dobimo takoj, ko se zaključi reakcija qPCR. Na ta način se izognemo uporabi nevarnih kemikalij za detekcijo produktov PCR in obenem skrajšamo čas analize. Z uporabo univerzalni pogojev pri reakciji qPCR tekom namnoževanja lahko istočasno izvajamo različne reakcije – npr. detekcijo različnih škodljivih organizmov.

qPCR se že uporablja za detekcijo, identifikacijo in kvantifikacijo številnih patogenov, med njimi tudi za človeške in rastlinske viruse ter viroide. Doslej so bili razviti testi qPCR za detekcijo več rastlinskih virusov, med njimi za *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Plum pox virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus*, dva virusa, ki okužujeta orhideje in dva potivirusa, ki okužujeta čebulnice in nekatere viruse vinske trte. Kljub pogostejši uporabi metode za detekcijo virusov, pa je bila metoda doslej razvita le za detekcijo enega viroida, to je *Potato spindle tuber viroid*, v zadnjem letu pa še za nekatere pospiviroide, ki okužujejo vrtnine in okrasne rastline (v okviru Euphresco projekta 'Detection and epidemiology of pospiviroids', v katerem smo sodelovali tudi sodelavci Kmetijskega inštituta Slovenije).

Indeksiranje z uporabo molekularnih metod bi bila najhitrejša in najcenejša tehnika za detekcijo viroidov. Posebno pozornost moramo nameniti detekciji viroidov, ki se v naravi lahko širijo, ker predstavljajo stalno grožnjo kmetijski pridelavi.

V okviru predhodnih raziskav smo ugotovili, da je hmelj močno okužen s *Hop latent viroidom* (HLVd), pri nekaterih sadnih rastlinah pa smo ugotovili okužbo s *Peach latent mosaic* in *Hop stunt viroidom* posamično oziroma v mešani okužbi. Ta material smo uporabili za preizkus reagentov qPCR. Pred izvedbo tega projekta stanje v zvezi z viroidi vinske trte v Sloveniji še ni bilo znano, vendar smo že opazili bolezenska znamenja, ki kažejo na možnost okužbe z viroidi, in mešane okužbe GYSVd in GFLV, zato smo za preizkus reagentov uporabili prav take vzorce.

V bazi GenBank smo najprej poiskali nukleotidna zaporedja posameznih viroidov, jih med seboj poravnali in za vsak viroid ugotovili, kje so najbolj konzervirana mesta, primerna za postavitve začetnih oligonukleotidov in sond. Z uporabo Primer Express programske opreme ali z uporabo usluge, ki jo ponuja proizvajalec reagentov smo pripravili začetne oligonukleotide in sonde primerne za izvajanje reakcije pri univerzalnih pogojih. Reakcije za detekcijo posameznih viroidov smo optimizirali, nato pa opravili analize različnih vzorcev in preverili navzkrižno reaktivnost z drugimi viroidi.

Skupno smo v času projekta na terenu nabrali skupno 244 vzorcev, od tega 47 vzorcev sadnega drevja (predvsem breskev), 129 vzorcev vinske trte in 61 vzorcev hmelja. Iz vsakega vzorca smo s komercialnim kitom RNeasy Plant mini kit (Qiagen) izolirali celokupno RNA (totRNA) z uporabo pufra z in brez  $\beta$ -merkaptetanola. V primeru hmelja smo totRNA izolirali še s klasično metodo CTAB. Izolirano totRNA smo prepisali v komplementarno DNA (cDNA) in nato izvedli qPCR pri univerzalnih pogojih. Skupno smo tako naredili 535 izolacij totRNA in vse prepisali v cDNA.

Pri analizah sadnega drevja na PLMVd in HSVd smo ugotovili, da je večina analiziranih vzorcev okužena s PLMVd, praktično noben pa s HSVd. Pri več kot polovici vzorcev smo dobili močne reakcije, ki kažejo na visoko koncentracijo viroida v okuženih rastlinah, pri nekaterih rastlinah so bile reakcije šibkejšje, kar kaže na nizko koncentracijo viroida. Le za dva vzorca lahko trdimo, da s PLMVd nista bila okužena. Za primerjavo smo tri vzorce, dva z visoko koncentracijo in enega z

nizko koncentracijo viroida, testirali še s klasičnim RT-PCR. Pozitiven rezultat smo dobili za prva dva, medtem ko prisotnosti viroida nismo dokazali v vzorcu z nizko koncentracijo. Za dva vzorca in oba načina izolacije totRNA smo preizkusili še metodo enostopenjske RT-PCR v realnem času. Rezultati analiziranih vzorcev so pokazali, da sta obe metodi med seboj primerljivi.

Pri detekciji HLVd smo analizirali 61 vzorcev, iz katerih je bila totRNA izolirana na tri načine. Primerjali smo enostopenjsko in dvostopenjsko reakcijo in ugotovili, da je pri enostopenjski reakciji pri večini vzorcev Ct vrednost za par ciklov nižja, kot pri dvostopenjski. Ker pa so bile vrednosti visoke, ta razlika na rezultat analize prisotnosti viroida, ne vpliva. Pri vseh vzorcih pa smo ugotovili, da so Ct vrednosti pri klasični izolaciji občutno nižje kot pri izolaciji totRNA s kitom. Pri klasični izolaciji poleg RNA izoliramo tudi večje količine DNA. Možno je, da je v tem primeru prišlo do navzkrižne reakcije z genomsko DNA ali pa je količina izolirane totRNA res toliko višja, kot nam kažejo rezultati qPCR.

Pri viroidih vinske trte smo pripravili reagente za detekcijo GYSVd-1 in -2, poleg tega pa smo vzorce analizirali tudi na prisotnost HSVd. V nobenem od naših vzorcev nismo dokazali prisotnosti GYSVd-2, oba ostala viroida pa sta v našem materialu pogosto prisotna, HSVd bolj kot GYSVd-1. Največkrat sta oba viroida prisotna v mešanih okužbah.

Navzkrižnih reakcij z drugimi viroidi pri nobenem od razvitih testov nismo ugotovili, za testiranje pa smo uporabili tako vzorce z visoko, kot tudi vzorce z nizko koncentracijo viroidov. Izračunali smo tudi parametre za posamezne reakcije. Pri testih na PLMVd, HSVd in HLVd je učinkovitost reakcije med 102 in 110%, kar je značilno za dobre qPCR reakcije, medtem, ko je učinkovitost testa za GYSVd-1 nižja, 82%. Korelacijski koeficienti so v vseh primerih zelo dobri.

Rezultate projekta smo že predstavili na dveh pomembnih konferencah s področja qPCR, leta 2008 na kongresu '*RNAi Europe and advances in qPCR, Stockholm, Švedska*', kjer smo predstavili naše rezultate testiranja reagentov za HLVd, ter leta 2009 na kongresu '*RNAi Europe and advances in qPCR, Epigenetics World Congress and Peptides Europe, Berlin, Nemčija*', kjer smo predstavili rezultate testiranja reagentov za GYSVd-1 in HSVd na vinski trti. V teku je priprava dveh znanstvenih člankov o rezultatih projekta.

V okviru predlaganega projekta smo razvili metode qPCR detekcije za različne viroide, ki okužujejo trajnice, z uporabo TaqMan kemije. Znano je, da je qPCR v primerjavi s klasičnimi metodami mnogo občutljivejši in hitrejši. Z uporabo univerzalnih pogojev pri izvedbi reakcije lahko izvajanje analiz močno optimiziramo – v isti reakciji lahko analiziramo vzorce, okužene z različnimi patogeni, kar močno zniža stroške izvedbe analiz. Uporaba qPCR nam omogoča tudi kvantifikacijo izvorne nukleinske kisline. Rezultati projekta so zelo pomembni tudi za druge raziskovalce in diagnostike v Sloveniji in v svetu, saj do sedaj metode na osnovi qPCR za detekcijo in identifikacijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja še niso bile razvite. V okviru projekta razvite metode bodo na voljo tudi za rutinsko uporabo v okviru programov zdravstvene selekcije in certifikacije sadnih rastlin, vinske trte in hmelja.

#### 4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

Namen raziskovalnega projekta je bil razvoj metod za detekcijo in identifikacijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja. V okviru projekta smo razvili metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) za 5 viroidov. Razvite metode smo preizkusili na realnih vzorcih nabranih v Sloveniji. Na ta način smo dobili nove podatke o prisotnosti viroidov na našem področju in tudi o njihovi razširjenosti. Novo razvite metode smo v nekaterih primerih primerjali tudi z metodami, ki smo jih doslej uporabljali za namene diagnostike viroidov in ugotovili, da so nove metode občutljivejše od prej uporabljenih metod. Ker vse razvite metode potekajo pod tako imenovanimi 'univerzalnimi pogoji', jih lahko, v primeru manjšega števila vzorcev izvedemo istočasno, kar še dodatno skrajša čas, potreben za postavitev diagnoze in zmanjša stroške analize. Menimo, da so bili zastavljeni raziskovalni cilji doseženi.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta<sup>4</sup>

Bistvenih sprememb in odstopanj od programa ni bilo.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>5</sup>

Znanstveni rezultat		
1.	Naslov	<i>SLO</i> Prve brezviroidne rastline hmelja ( <i>Humulus lupulus</i> L.) v Sloveniji
		<i>ANG</i> First viroid-free hop plants ( <i>Humulus lupulus</i> L.) in Slovenia
	Opis	<i>SLO</i> Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije smo z namenom zagotovitve kakovostnega in neokuženega sadilnega materiala začeli z eliminacijo hmeljevega latentnega viroida (HLVd) in vzgojo prvih brezviroidnih rastlin. Iz mladih poganjkov matičnih rastlin smo izolirali meristeme in jih in vitro kultivirali na primernih gojiščih. Uspešnost regeneracije meristemov se je gibala med 18 in 60%, odvisno od sorte. S testiranjem potrjene neokužene rastline smo prenesli v in vivo pogoje in jih vključili, kot brezviroidne rastline, v proizvodnjo certificiranega sadilnega materiala hmelja.
		<i>ANG</i> The Slovenian Institute for Hop Research and Brewing has started the elimination of Hop latent viroid (HLVd) and obtained first viroid-free mother plants. Healthy planting material is a prerequisite to get high and quality yield. Meristems were excised from newly emerged sprouts of mother plants and growing them on appropriate growing media. In vitro regeneration varied between 18 and 60%, depending on variety. Viroid-free tested plants were transferred to in vivo conditions and are used as mother plants for further propagation of certified hop planting material.
	Objavljeno v	MAČEK, Jože (ur.). Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Nova Gorica, 4.-5. marec 2009. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2009, str. 453-456
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
	COBISS.SI-ID	715895
2.	Naslov	<i>SLO</i> Biološka, serološka in molekulska karakterizacija RBDV iz vinske trte in detekcija virusa v nematodah vrste <i>Longidorus juvenilis</i>
		<i>ANG</i> Biological, serological and molecular characterisation of RBDV from grapevine and its detection in the nematode <i>Longidorus juvenilis</i>
	Opis	<i>SLO</i> Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) je bil do nedavno opisan le na vrstah iz rodu <i>Rubus</i> . Leta 2003 smo ga prvi na svetu našli tudi na vinski trti, kot prvem gostitelju izven rodu <i>Rubus</i> . V članku smo opisali nadaljnjo biološko, serološko in molekulska karakterizacijo izolatov RBDV iz vinske trte. Izolati iz vinske trte se razlikujejo od izolata iz maline. Virus smo detektirali tudi v nematodah <i>Longidorus juvenilis</i> . Rezultati kažejo večjo raznolikost RBDV, kot smo doslej mislili, najdba virusa v nematodah pa kaže na možnost novega načina prenosa virusa - s pomočjo nematod.
		<i>ANG</i> RBDV was until recently, found only on <i>Rubus</i> species. In 2003 we reported a first finding of RBDV on grapevine as non- <i>Rubus</i> natural host. In this paper we report about further biological, serological and molecular characterisation of grapevine isolates. They differ from Slovenian isolate of RBDV from raspberry. RBDV was detected also in the nematode <i>Longidorus juvenilis</i> . The results show a bigger diversity inside RBDV than previously thought. Finding of RBDV in <i>L. juvenilis</i> shows a possibility of virus transmission by nematodes which was not known before for this virus.
	Objavljeno v	Eur. j. plant pathol., 2009, vol. 123, nr. 3, str. 261-268, doi: 10.1007/s10658-008-9362-6
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	2739304
3.	Naslov	<i>SLO</i> RADIŠEK, Sebastjan. Verticillium Wilt
		<i>ANG</i> RADIŠEK, Sebastjan. Verticillium Wilt
	Opis	<i>SLO</i> V poglavju je obdelana problematika hmeljeve uvelosti, ki jo povzročajo glive iz rodu <i>Verticillium</i> .
		<i>ANG</i> The problems and knowledge of Verticillium wilt caused by Verticillium spp. is covered.
	Objavljeno v	MAHAFFEE, Walter F. (ur.), PETHYBRIDGE, Sarah J. (ur.), GENT, David H. (ur.). Compendium of hop diseases and pests. St. Paul (Minnesota): The American Phytopathological Society, cop. 2009, 2009, str. 33-36, ilustr.

	Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
	COBISS.SI-ID	651127
4.	Naslov	SLO RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, JAVORNIK, Branka, DE GRUYTER, J. Prva najdba <i>Phoma exigua</i> kot patogena na hmelju v Sloveniji
		ANG RADIŠEK, Sebastjan, JAKŠE, Jernej, JAVORNIK, Branka, DE GRUYTER, J. First report of <i>Phoma exigua</i> as a pathogen of hop in Slovenia
	Opis	SLO Avgusta 2005 smo na hmelju sort 'bobek', 'magnum' in 'merkur' na Koroškem in v Podravju opazili nekrotične lezije na storžkih in listih. Mikroskopski pregled je pokazal prisotnost piknidijev. Z gojenjem na primernih gojiščih smo patogena identificirali kot <i>Phoma exigua</i> Desm. Identifikacijo smo potrdili s sekvenciranjem ITS regije. Opravili smo tudi test patogenost. Prvi simptomi so se pojavili na listih in storžkih obeh sort šest dni po inokulaciji. Glivo smo reisolirali iz lezij na listih in storžkih. Po naših informacijah je to prva najdba <i>P. exigua</i> , ki povzroča občutno škodo na hmelju.
		ANG In August 2005, necrotic lesions on cones and leaves were observed on hop in Slovenia. Microscopic examination revealed the presence of irregularly scattered globose pycnidia. The pathogen was identified as <i>Phoma exigua</i> Desm. The identification was confirmed by sequencing the ITS region. Pathogenicity tests were performed and the fungus was re-isolated from the lesions. To our knowledge, this is the first report of <i>P. exigua</i> causing severe damage to hop.
	Objavljeno v	Plant Pathol., 2008, vol. 57, no. 2, str. 381
	Tipologija	1.03 Kratki znanstveni prispevek
COBISS.SI-ID	5000057	
5.	Naslov	SLO VIRŠČEK MARN, Mojca, MAVRIČ, Irena, ZINDOVIČ, Jelena. Odkritje in karakterizacija izolatov virusa šarke v Črni Gori
		ANG VIRŠČEK MARN, Mojca, MAVRIČ, Irena, ZINDOVIČ, Jelena. Discovery and characterisation of Plum pox virus isolates in Montenegro
	Opis	SLO V letu 2006 smo pregledali 20 slivovih nasadov v Črni Gori na prisotnost virusa šarke (PPV). Simptome smo opazili v 15 nasadih. Odvzeli smo 19 vzorcev v 17 smo z DAS-ELISA testom potrdili okužbo s PPV. Od teh smo 16 vzorcev izbrali za molekularno karakterizacijo. Rezultati RT-PCR analiz so pokazali, da so štiri izolati iz skupine PPV-D. Ti izolati niso reagirali v TAS-ELISA z monoklonskimi protitelesi proti PPV-M, medtem ko ostalih 12 je. Od teh smo sedem izolatov potrdili kot PPV-REC. Te smo z nadaljnjimi analizami potrdili kot PPV-REC. To je prva potrditev okužba s PPV v Črni Gori.
		ANG In 2006 20 plum orchards in Montenegro were screened for the presence of Plum pox virus (PPV). Symptoms were found in 15 orchards. 19 samples were collected and 17 proved to be positive by DAS-ELISA. Of these 16 were selected for molecular identification. The results showed the presence of PPV-D type isolates in 4 samples. The remaining 12 samples were PPV-M positive by TAS-ELISA. Of these, seven proved to be of PPV-REC. Other five isolates were further analyzed and identified as the PPV-REC type. To our knowledge this was the first confirmation of PPV infection in Montenegro.
	Objavljeno v	Plant Pathol., 2008, vol. 393, issue 2, str. 393
	Tipologija	1.03 Kratki znanstveni prispevek
COBISS.SI-ID	2555752	

## 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

	Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat	
1.	Naslov	SLO MAVRIČ, Irena, RADIŠEK, Sebastjan, VIRŠČEK MARN, Mojca, TOPLAK, Nataša. Razvoj metode PCR v realnem času za detekcijo latentnega viroida hmelja (HLVd)
		ANG MAVRIČ, Irena, RADIŠEK, Sebastjan, VIRŠČEK MARN, Mojca, TOPLAK, Nataša. Development of real time PCR assay for detection of hop latent viroid (HLVd)
		Razvili smo metodo RT-PCR v realnem času za detekcijo latentnega viroida hmelja (HLVd). Reagente smo preizkusili na vzorcih hmelja, okuženih s

Opis	SLO	HLVd. Pripravili smo standardno krivuljo in določili parametre reakcije. Navzkrižnih reakcij z drugimi viroidi nismo opazili.
	ANG	The RT real-time PCR reaction was developed for the detection of Hop latent viroid (HLVd). The method was used for testing of hop samples known to be infected with the viroid. Standard curve was established and reaction parameters were set. No nonspecific reactions with other viroids were observed.
Šifra	F.21 Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
Objavljeno v	RNAi Europe and advances in qPCR, 16-18 September 2008, Stockholm, Sweden : [conference and exhibition] : event materials : [book of abstracts]. Stockholm: [s. n.], 2008, [1 str.], Poster 1033	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
COBISS.SI-ID	2804584	
2. Naslov	SLO	MAVRIC, Irena, VIRŠČEK MARN, Mojca, TOPLAK, Nataša. Razvoj metode PCR v realnem času za detekcijo dveh viroidov vinske trte
	ANG	MAVRIC, Irena, VIRŠČEK MARN, Mojca, TOPLAK, Nataša. Development of real-time RT-PCR assay for the detection of two viroids in grapevine
Opis	SLO	Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1) in Hop stunt viroid (HSVd) sta najpogostejša viroida najdena v vinski trti. Razvili smo metodo RT-PCR v realnem času za detekcijo obeh viroidov v vinski trti. Metodo smo uporabili za testiranje vzorcev vinske trte nabranih v slovenskih vinogradih. Okužbe vinske trte smo bile pogosto najdene, precej je bilo tudi mešanih okužb z obema viroidoma. Z enim od pozitivnih vzorcev smo pripravili tudi standardno krivuljo in določili parametre reakcije. Navzkrižnih reakcij med obema viroidoma in z drugimi viroidi nismo opazili.
	ANG	Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1) and Hop stunt viroid (HSVd) are most widespread viroids in grapevine. The RT real-time PCR was developed for the detection of both viroids in grapevine. Samples collected in different slovenian vineyards were tested for the presence of both viroids. Many infected samples were detected and mixed infections were frequently found. Standard curve using one of the positive samples was established and reaction parameters were set. No cross reactions with other viroids were observed.
Šifra	F.21 Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
Objavljeno v	RNAi Europe and advances in qPCR, Epigenetics World Congress and Peptides Europe, 17-18 September 2009, Berlin, Germany : [conference and exhibition] : event materials : [book of abstracts]. Berlin: [s. n.], 2009, [1 str.], Poster 217	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
COBISS.SI-ID	3107688	
3. Naslov	SLO	Članica programskega odbora konference
	ANG	Member of program committee
Opis	SLO	V avgustu 2008 je v Ljubljani potekal mednarodni kongres delovne skupine za viruse vrtnin in stročnic. Na njem so sodelovali najpomembnejši raziskovalci s tega področja dela. Kot članica programskega odbora sem sodelovala pri pripravi programa kongresa in pri izbiri prispevkov za referate. Poleg tega sem organizirala enodnevno strokovno ekskurzijo, na kateri smo udeležencem predstavili slovensko proizvodnjo vrtnin in težave, s katerimi se pri tem ukvarjamo.
	ANG	The congress of International working group of legume and vegetable viruses was held in Ljubljana in August 2008. The most important researchers from the field participated on it. As a member of program committee I was involved in preparation of congress programme and selection of oral presentations. I also organized a field trip to show the participants the vegetable production in Slovenia and virus diseases we deal with.
Šifra	B.06 Drugo	
Objavljeno v	VERHOEVEN, J. T. (ur.), VETTEN, Josef H. (ur.), KRAJAČIČ, Mladen (ur.), MAVRIČ, Irena (ur.), RAVNIKAR, Maja (ur.), POMPE NOVAK, Maruša (ur.). The 3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV), August 20th - 23rd, 2008, Ljubljana, Slovenia : book of abstracts. Ljubljana: National Institute of Biology, 2008. 90 str.	

	Tipologija	2.30 Zbornik strokovnih ali nerecenziranih znanstvenih prispevkov na konferenci
	COBISS.SI-ID	2803304
4.	Naslov	SLO nova sorta hmelja
		ANG new hop variety
	Opis	SLO V sortno listo Republike Slovenije se vpiše sorta <i>Humulus lupulus</i> L., z odobrenim imenom 279D112
		ANG New hop variety was registered in slovenian variety list named 279D112
	Šifra	B.06 Drugo
	Objavljeno v	V sortno listo Republike Slovenije se vpiše sorta <i>Humulus lupulus</i> L., z odobrenim imenom 279D112 : registrska številka sorte HUL021 : odločba RS Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Fitosanitarna uprava RS, 321-21-03-118/2004/7, z dne 16.05.2007. Ljubljana, 2007. 2 str.
	Tipologija	2.22 Nova sorta
COBISS.SI-ID	569719	
5.	Naslov	SLO TOPLAK, Nataša, KOVAČ, Minka. Hitra detekcija in diagnostika bioagensov v pitni vodi in hrani z molekularnimi metodami
		ANG TOPLAK, Nataša, KOVAČ, Minka. Molecular methods for fast detection and diagnosis of bioagents in drinking water and food
	Opis	SLO V diagnostičnih laboratorijih so molekularne biološke metode postale ene izmed ključnih metod za diagnosticiranje. V prispevku smo opisali trenutno najbolj uporabljane za molekularno diagnostiko v laboratorijih. Prednosti teh metod so predvsem občutljivost in hitra izvedba. V današnjem času najpogosteje uporabljene tehnike so metoda RFLP, pulzna elektroforeza, hibridizacijske metode, analiza nukleotidnega zaporedja, verižna reakcija s polimerazo (PCR) in novejša različica PCR v realnem času.
		ANG Molecular techniques can improve diagnosis in clinical laboratories. This review focuses on currently used molecular diagnostic methods. They improve sensitivity and decrease time needed for pathogen identification, they are used for determination of drug sensitivity. Currently most used techniques are restriction fragment length polymorphism, pulse-field gel electrophoresis, blot methods (Northern blot, Southern blot, Western blot and Dot blot), sequencing, polymerase chain reaction and variation like real time polymerase chain reaction (real-time PCR).
	Šifra	B.06 Drugo
	Objavljeno v	BERDEN ZRIMEC, Maja (ur.). Metode za detekcijo nevarnih bioloških agensov v vodi in hrani. 1. izd. Grosuplje: Inštitut za fizikalno biologijo, 2009, str. 29-39.
	Tipologija	1.17 Samostojni strokovni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
COBISS.SI-ID	25464025	

## 8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>7</sup>

Projektna skupina je bila v času trajanja projekta zelo aktivna tudi na drugih področjih. Skupno smo objavili 13 znanstvenih člankov, 1 pregledni znanstveni članek 6 kratkih znanstvenih prispevkov. Objavili smo številne strokovne prispevke in s prispevki sodelovali na domačih in mednarodnih znanstvenih in strokovnih konferencah. Iz rezultatov projekta pripravljamo vsaj dva prispevka, ki ju bomo objavili v mednarodno priznani znanstveni reviji.

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>8</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

SLO

Pri pregledu literature lahko zasledimo le prispevke o detekciji viroida vretenatosti gomoljev krompirja (Potato spindle tuber viroid - PSTVd) z metodo qPCR. V okviru Euphresco projekta 'Detection and epidemiology of pospiviroids', ki se je zaključil konec leta 2009 in v katerem smo sodelovali tudi sodelavci Kmetijskega inštituta Slovenije, smo razvili metode RT-qPCR za detekcijo in identifikacijo še nekaterih pospiviroidov na vrtninah in okrasnih rastlinah. Z



razvitimi metodami v okviru zaključenega projekta smo pomembno prispevali k razvoju znanosti, saj so to prve metode qPCR, razvite za detekcijo in identifikacijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja (Hop stunt viroid (HSVd), Hop latent viroid (HLVd), Grapevine yellow speckle 1 viroid (GYSVd-1), Grapevine yellow speckle 2 viroid (GYSVd-2) in Peach latent mosaic viroid (PLMVd)). Nekatere rezultate smo že predstavili na dveh mednarodnih kongresih v tujini. Po objavi v ustrezni znanstveni literaturi bodo te metode na voljo širši raziskovalni in strokovni javnosti. Razvite metode bomo lahko uporabljali za zanesljivejšo in cenejšo detekcijo in kvantifikacijo teh relativno manj znanih patogenov. Izkušnje, ki smo jih pridobili med razvojem metod RT-qPCR bodo pripomogle k lažjemu in hitrejšemu razvoju podobnih metod za detekcijo, identifikacijo in kvantifikacijo številnih drugih patogenov.

ANG

The available information about viroid detection using RT-qPCR is limited only to detection of Potato spindle tuber viroid - PSTVd. Further RT-qPCR methods for detection of pospiviroids in vegetables and ornamentals were developed in frame of Euphresco project 'Detection and epidemiology of pospiviroids', where Agricultural Institute of Slovenia was involved as a partner. The project ended at the end of 2009. During our project the RT-qPCR methods were developed for detection and identification of Hop stunt viroid (HSVd), Hop latent viroid (HLVd), Grapevine yellow speckle 1 viroid (GYSVd-1), Grapevine yellow speckle 2 viroid (GYSVd-2) and Peach latent mosaic viroid (PLMVd). To our knowledge these are the first RT-qPCR methods for detection of these viroids. The developed methods were already presented at two conferences and the results will be available to researchers and experts after publication in international journals. The experience obtained during the project will be valuable in future when the same techniques will be developed for detection, identification and quantification of other plant pathogens.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Metode, razvite v okviru projekta, in možnost za razvoj podobnih metod za druge pomembne škodljive organizme so zelo pomembne za uporabnike. Njihova uporaba v diagnostiki rastlinskih škodljivcev, zdravstveni selekciji in certifikacijskih programih bo močno izboljšala učinkovitost diagnostike, saj je metoda qPCR zelo občutljiva in hitra tehnika, ki obenem, ob uporabi univerzalnih pogojev reakcije, omogoča tudi izvedbo testiranja prisotnosti različnih patogenov istočasno. Z njeno uporabo bomo lahko zmanjšali stroške in zmanjšali odzivni čas detekcije in identifikacije škodljivih organizmov. Razvoj novih metod na tem področju bo prispeval tako k razširitvi znanja na področju identifikacije viroidov z metodami na osnovi qPCR, ki je še zelo nerazvito, kot tudi k časovni in ekonomski racionalizaciji detekcije in identifikacije omenjenih organizmov. Razvite metode so nadgradnja klasičnih RT-PCR metod za detekcijo viroidov PLMVd in HSVd v koščičarjih in HLVd v hmelju, ki smo jih doslej uporabljali v diagnostiki. Ker nove metode omogočajo hkratno obdelavo večjega števila vzorcev, jih bomo lahko uporabljali tudi za sistematične raziskave in nadzor navzočnosti viroidov. Na ta način bomo lahko izboljšali zdravstveno stanje našega in tujega razmnoževalnega materiala in s tem omogočili varnejše pridelovanje sadja, grozdja in hmelja.

ANG

The RT-qPCR methods for detection of viroids, developed in frame of the project and future developments of similar detection methods are of great importance for all their users. They will enable higher sensitivity and reproducibility of results and simultaneous detection of different pathogens due to the universal assay parameters used. The methods will be used in diagnostics of plant pathogens, certification and breeding programmes. The costs of pathogen diagnosis will be lower and the results will be available in shorter time. The development of new methods for detection of plant pathogens will contribute to broader knowledge about viroids and to faster and economical viroid detection. They were shown to be more sensitive and could replace the RT-PCR methods for detection of HLVd in hop and HSVd and PLMVd in stone fruits which are used at present. More samples can be analysed using the new methods and they could be used for monitoring and survey of viroids. This will help us to improve the health status of domestic and foreign plant propagation material and higher quality of fruit, grapevine and hop production.

## 10. Samo za aplikativne projekte!

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

Cilj	
------	--

<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	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"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.34</b>	<b>Svetovalna dejavnost</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.35</b>	<b>Drugo</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

**Komentar**

V okviru projekta razvite nove metode za detekcijo in identifikacijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja so nove metode, ki za omenjene namene doslej še niso bile razvite. Osebe, udeležene pri razvoju so dobile nova praktična znanja tako za laboratorijsko delo, kot tudi za delo na terenu. Pridobili smo nove informacije o okuženosti omenjenih rastlin z obravnavanimi viroidi. Razvite metode bomo na Kmetijskem inštitutu Slovenije ponudili zainteresiranim uporabnikom kot novo diagnostično metodo, ki je predvsem hitrejša, zanesljivejša in občutljivejša od doslej uporabljenih metod.

**11. Samo za aplikativne projekte!**

**Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv

<b>G.01</b>	<b>Razvoj visoko-šolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
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 checked="" type="radio"/>	<input 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 type="radio"/>	<input checked="" 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 checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input 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"/>	
<b>G.03</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.04</b>	<b>Družbeni razvoj</b>					
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 checked="" type="radio"/>	<input 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 checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.05.</b>	<b>Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete</b>					
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>					
<b>G.07</b>	<b>Razvoj družbene infrastrukture</b>					
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"/>	

<b>G.08.</b>	<b>Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva</b>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

**Komentar**

Z razvojem metod za detekcijo in identifikacijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja smo razširili ponudbo diagnostičnih postopkov, ki jih ponujamo vsem zainteresiranim. Razvita metoda za detekcijo produktov ne uporablja nevarnih kemikalij, kot prej uporabljane metode, kar pozitivno vpliva na zdravje zaposlenih, ki diagnostične metode uporabljajo, hkrati pa je tudi manjše onesnaževanje okolja. Metoda je hitrejša od doslej uporabljanih, zato je torej poraba časa in energije nižja, kar pozitivno vpliva tako na okolje, kot tudi na produktivnost. Zaradi manjše porabe časa in tudi nekaterih materialov (npr. agaroze in etidijevega bromida) so naše analize hitreje zaključene, cene diagnostičnih storitev so nižje, zato smo lahko konkurenčnejši v primerjavi z drugimi izvajalci podobnih storitev, hkrati pa je storitev dostopnejša tudi širšemu upporabnikom.

**12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki<sup>11</sup>**

1.	<b>Sofinancer</b>	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>	33.852,00	<b>EUR</b>	
	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>	24,00	<b>%</b>	
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>			<b>Šifra</b>
		1.	razvoj RT-qPCR metodo za detekcijo HLVD	F.21
		2.	razvoj RT-qPCR metodo za detekcijo PLMVd	F.21
		3.	razvoj RT-qPCR metodo za detekcijo HSVd	F.21
	4.	razvoj RT-qPCR metodo za detekcijo GYSVd-1	F.21	
	5.	razvoj RT-qPCR metodo za detekcijo GYSVd-2	F.21	
	<b>Komentar</b>	V okviru projekta smo razvili pet novih metod za detekcijo petih viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja. Gre za nove metode za detekcijo teh viroidov, edine take doslej razvite metode so RT-qPCR za detekcijo PSTVd in pospiviroide vrtnin in okrasnih rastlin, ki so bile, razen prve, razvite v zadnjem letu. Z razvitimi metodami smo dobili prve podatke o prisotnosti viroidov na vinski trti v Sloveniji, potrdili pa smo okužbe sadnega drevja in hmelja. Z razvitimi metodami smo povečali zanesljivost in občutljivost detekcije viroidov, ki je bila s prejšnjimi metodami slabša. Metode nam omogočajo tudi kvantifikacijo viroidov, krajši je čas, potreben za detekcijo in identifikacijo okužbe. Poleg tega pa se izognemo uporabi nevarnih kemikalij v diagnostičnem laboratoriju, v našem primeru uporabi etidijevega bromida, kar pomeni večjo varnost za vse zaposlene v diagnostičnih laboratorijih.		
	<b>Ocena</b>	Rezultati projekta, v okviru katerega so bile razvite nove qPCR metode detekcije za različne viroide, s skladni z načrtovanimi cilji. qPCR metode so v primerjavi s klasičnimi metodami mnogo občutljivejše in tudi veliko hitrejše jih je ob univerzalnih pogojih izvajanja reakcije mogoče optimizirati (hkratno analiziranje različnih patogenov), kar močno zniža stroške izvedbe analiz. Uporaba qPCR nam omogoča tudi kvantifikacijo izvorne nukleinske kisline. Rezultati projekta so z vidika uporabnosti zelo pomembni, saj poleg uvedbe racionalnejših in hitrejših načinov detekcije (metodološko) tudi podaja dejansko stanje okuženosti proučevanih rastlin. Rezultati pa so pomembni		

		tudi za druge raziskovalce in diagnostike v Sloveniji in v svetu, saj do sedaj metode na osnovi PCR v realnem času za detekcijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja še niso bile razvite. V okviru projekta razvite metode se bodo uvedle v rutinsko uporabo za oceno zdravstvene ustreznosti v nacionalne programe (strokovne naloge) selekcije in certificiranja sadnih rastlin, vinske trte in hmelja.	
2.	<b>Sofinancer</b>		
		<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>	<b>EUR</b>
		<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>	<b>%</b>
		<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>	<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	<b>Komentar</b>		
	<b>Ocena</b>		
3.	<b>Sofinancer</b>		
		<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>	<b>EUR</b>
		<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>	<b>%</b>
		<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>	<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	<b>Komentar</b>		
	<b>Ocena</b>		

### 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, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter 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

## Podpisi:

Irena Mavrič Pleško	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

19.4.2010

## Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/37

<sup>1</sup> Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> Samo v primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote. Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

**PRIMER** (v slovenskem jeziku):

**Naslov:** Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

**Opis:** Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

**Objavljeno v:** OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates  $\beta 2$  - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

**Tipologija:** 1.01 - Izvirni znanstveni članek

**COBISS.SI-ID:** 1920113 [Nazaj](#)

<sup>6</sup> Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>8</sup> 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](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2010 v1.00a

67-C1-3A-8B-7A-16-54-7B-59-9D-16-56-0F-47-2B-FA-6F-4C-30-BC