

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP)
»ZAGOTOVIMO.SI HRANO ZA JUTRI« v letu 2020
Poročilo velja za obdobje od 1.11.2020 do 15.9.2023

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

1. Prehranska varnost Slovenije

2. Šifra projekta:

V4-2003

3. Naslov projekta

Q-ENTRY - Vpeljava hitrih testov za identifikacijo karantenskih škodljivih organizmov, povzročiteljev bolezni in poškodb na rastlinah

4. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Nacionalni inštitut za biologijo

4.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Kmetijski inštitut Slovenije
Gozdarski inštitut Slovenije
Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

5. Sofinancer/sofinancerji:

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
ARRS - Javna agencija RS za raziskovalno dejavnost

6. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

23611

Tanja Dreo

Datum: 23.11.2023



¹ NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY
Ljubljana, Slovenija

Podpis vodje projekta:

Žig

Podpis izvajalca:

Digitally
signed by
TANJA DREO

dr. Tanja Dreo

MAJA
RAVNIKAR

Digitalno podpisal MAJA
RAVNIKAR
Datum: 2023.11.23 16:19:40
+01'00'

dr. Maja Ravnikar



II. Vsebinska struktura poročila

1. Opisno poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Delovni sklop 1: Koordinacija

V okviru koordinacije projekta smo usklajevali delo partnerjev, poročali financerju ARRS (zdaj ARIS; na poziv) in so-financerjem (MKGP; ob predvidenih rokih)) ter organizirali več projektnih sestankov z vsebinsko spremljevalko projekta in financerji na katerih smo usklajevali natančnejše načrte dela. Večji del projekta se je izvajal v času COVID epidemije, kar je vplivala na časovni potek in obliko izvajanja npr. zamik nekaterih aktivnosti ter organizacijo sestankov preko telekonferenc.

Oblikovali smo logotip projekta ter postavili spletne strani projekta (<https://projects.nib.si/qentrysi/>).

Projekt QEntry je imel za cilj “Vpeljava hitrih testov za identifikacijo karantenskih škodljivih organizmov, povzročiteljev bolezni in poškodb na rastlinah”.

Hitra in zanesljiva identifikacija, npr. morfološko zelo podobnih žuželk oziroma določitev nekaterih bakterij ali virusov, ki sodijo med karantenske škodljivih organizmov (KŠO) in ki odražajo podobne vizualne znake na rastlini ima velik pomen pri izvajanju ukrepov proti njihovemu širjenju. V primeru odreditve inšpekcijskih ukrepov (zavrnitev ali uničenje pošiljk) ali v primeru najdbe KŠO v kmetijski pridelavi ali v naravi v okviru izvajanja preiskav na navzočnost KŠO (npr. izkoreninjenje, obvladovanje sta učinkovitost sprejetih ukrepov stroški njihove izvedbe lahko povezana tudi s hitro identifikacijo KŠO na podlagi zanesljivih hitrih testov. V zadnjem desetletju se v prakso uvajajo hitri testi oz. testi, ki omogočajo identifikacijo tudi v omenjenih kritičnih primerih in temeljijo na uporabi testo LAMP in/ali določanju DNA črtnih kod. V okviru projekta bomo v prakso uvedli in ob tem validirali izbrane hitre teste glede na prisotnost gostiteljskih rastlin in nevarnosti širjenja v rastlinski pridelavi ali v naravi na ozemlju Slovenije ali pri uvozu rastlin, rastlinskih proizvodov in drugih predmetov v Slovenijo ter tehnične danosti (obstoj testov in kakovost sekvenčnih podatkov za izbrane organizme).

Posamezni cilji projekta so bili:

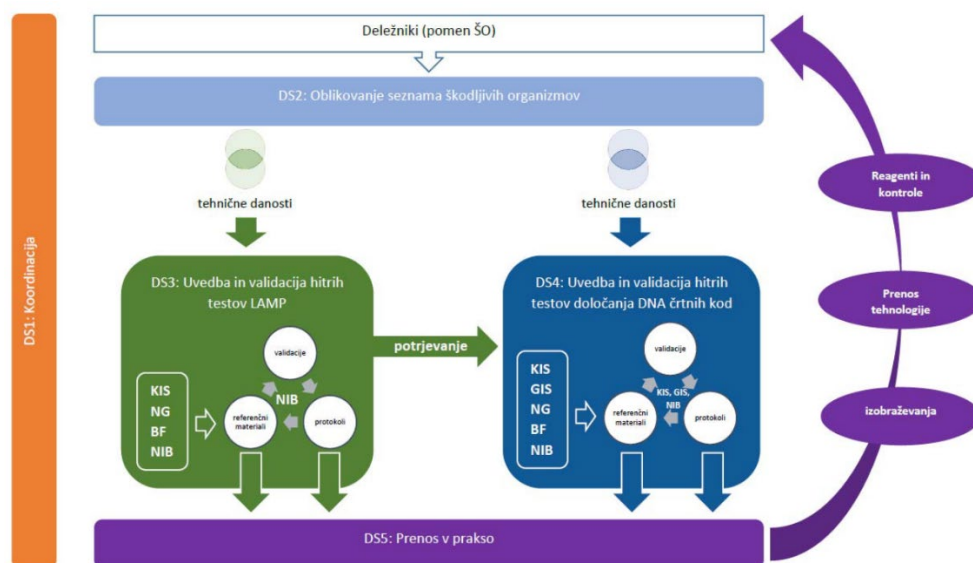
- (i) določiti KŠO ali skupine KŠO, za katere je smiselna uvedba in uporaba hitrih testov za identifikacijo ob uvozu pošiljk rastlin v Slovenijo (EU) in na mestih rastlinske pridelave v Sloveniji,
- (ii) razviti in validirati hitre in zanesljive teste, predvsem na osnovi tehnologije LAMP in/ali določanja DNA črtnih kod, za določen KŠO ali skupino KŠO,
- (iii) preizkusiti in vpeljati hitre teste v prakso za potrebe inšpekcijskih nadzorov in programov preiskav na navzočnost KŠO).

V projektu so sodelovali partnerji, ki združujejo znanja o povzročiteljih bolezni z dolgoletnimi izkušnjami s področja laboratorijskih testov in aktivnosti na področju varstva rastlin, Nacionalni inštitut za biologijo (NIB; vodja projekta, vodja delovnih paketov 1, 2, 4 in 5), Kmetijski inštitut Slovenije

¹ Popis in opis opravljenega raziskovalnega dela vključno z doseženimi delnimi rezultati projekta v skladu s programom. V primeru interdisciplinarno in interinštitucionalno sestavljenih projektnih skupin posebej navedite uspešnost oz. neuspešnost tega sodelovanja. Opis naj bo stvaren, sklicujoč se na zastavljene naloge in vlogo v projektni skupini glede na medsebojni dogovor o sodelovanju na projektu.



(KIS; vodja delovnega paketa 3), Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica (KGZ-NG) in Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (BF). Vsebinsko delo na projektu je bilo organizirano v več delovnih sklopov (Slika 1), vsebina katerih je opisana v nadaljevanju.



Slika 1: Shematični prikaz povezanosti delovnih sklopov projekta.

Tekom projekta sta se partnerja NIB in KGZ-NG vključila v sinergistični projekt mreže Euphresco, Fast detection methods for quarantine Tephritidae (TEPHRIFADE, <https://pureportal.ilvo.be/en/projects/snelle-detectiemethoden-voor-quarantaine-tephritidae>) in redno sodelovala na sestankih projekta z izmenjavo znanj in izkušenj.

Delovni sklop 2: Oblikovanje seznama škodljivih organizmov

Cilj delovnega sklopa 2 je bil ugotoviti za katere KŠO oz. skupine KŠO je smiselna uvedba hitrih testov (glede na prisotnost gostiteljskih rastlin in nevarnosti širjenja v rastlinski pridelavi ali v naravi na ozemlju Slovenije ali pri uvozu rastlin, rastlinskih proizvodov in drugih predmetov v Slovenijo, glede na že uvedene metode ter glede na zahtevnost identifikacije z uporabo standardnih metod).

Seznam predlogov KŠO/skupin KŠO in tipov vzorcev za uvedbo hitrih testov (delovni sklop 2, rezultat 1, predviden za december 2020) je bil pripravljen v sodelovanju partnerjev projekta, vsebinske spremljevalke in izbranih deležnikov.

Osnovna seznama KŠO/skupin KŠO, ki sta bila pripravljena z namenom lažjega in sistematičnega pregleda s strani deležnikov, sta bila pripravljena z združitvijo različnih seznamov. Upoštevali smo sezname iz relevantnih zakonodajnih seznamov, seznamov za EU najpomembnejših KŠO, seznamov v okviru organizacije EPPO, informacije o KŠO v informativnih kartah organizacije EFSA in mednarodnih diagnostičnih protokolih (Slika 1). Seznam namenjen pregledu s strani partnerjev projekta (verzija 1) je vseboval skupno 712 vnosov KŠO/skupin KŠO od katerih se pričakovano nekateri vnosi posameznih KŠO in skupin KŠO delno prekrivajo. V seznamu so bile najbolj zastopane žuželke (Insecta, 54 %), medtem ko so druge skupine enako pomembne, a zastopane v manjši meri npr. glive (Fungi, 12 %), virusi in viroidi (11 %) in bakterije (Bacteria, 9 %).

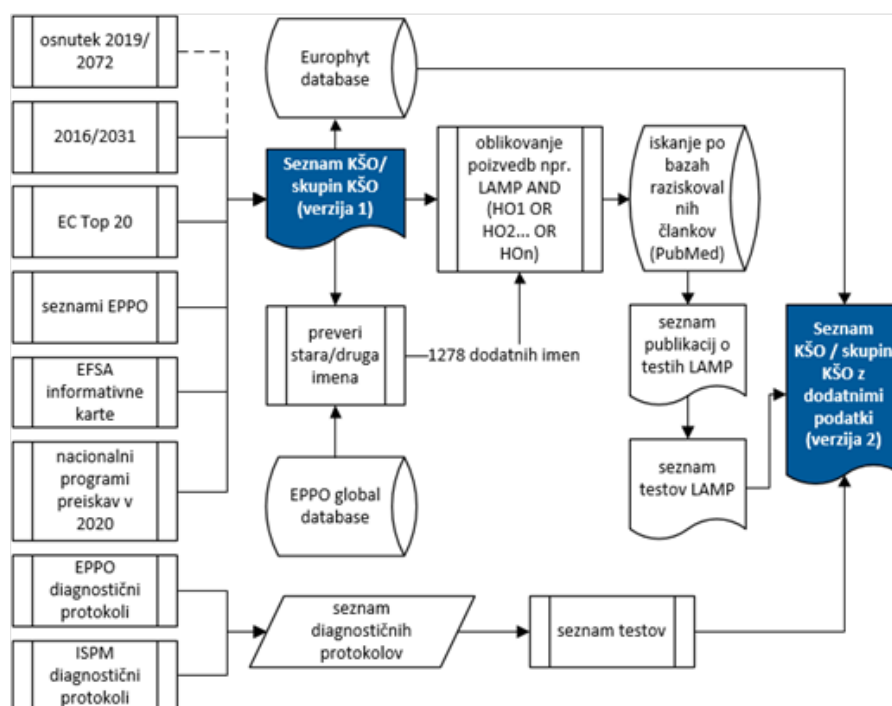
Seznam je bil v nadaljevanju dopolnjen z informacijami pojavljanja v različnih seznamih in drugimi



relevantnimi informacijami npr. pogostosti prestržb in najdb KŠO v EU (vir informacij UVHVVR). Priprava seznama je potekala vzporedno z delom v drugih delovnih sklopih npr. inventarizacijo testov LAMP v delovnem sklopu 3. Kolikor je bilo mogoče, glede na še potekajoč pregled znanstvenih objav, so bile informacije o razpoložljivosti testov LAMP za posamezne KŠO/skupine KŠO vključene v seznam (verzija 2).

V izbor KŠO/skupin KŠO smo prek serije posvetovanj vključili deležnike, (i) partnerje projekta, ki so tudi koordinatorji in/ali izvajalci nekaterih nacionalnih programov preiskav, (ii) predstavnike Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin in (iii) izvajalce inšpektorskega nadzora na področju varstva rastlin.

Pregled podatkov in seznamov škodljivih organizmov v sodelovanju z deležniki je identificiral več KŠO/skupin KŠO za katere bi bila uvedba hitrih testov, bodisi LAMP, bodisi določanje DNA črtnih kod, zaželjena. Kot posebej pomembne so deležniki, ki upravljajo s tveganjem, identificirali naslednje skupine in sisteme kot prioritete (rezultat R01; Priloga 1): (i) plodove muhe, posebej muhe iz družine Tephritidae in tudi muhe iz družine Drosophilidae, (ii) različne vrste metuljev, katerih gosenice so škodljive v rastlinjakih na širšem območju Kopra in različne vrste listnih zavrtalk (*Liriomyza* spp.), katerih žerke so škodljive v rastlinjakih na širšem območju Kopra, (iii) listni zavijač *Thaumatotibia leucotreta* in (iv) kompleks vrst *Ralstonia solanacearum* (v simptomatičnih gomoljih krompirja). V širšem izboru so izpostavili tudi škodljivega resarja Thrips palmi in glivo *Guignardia citricarpa*.



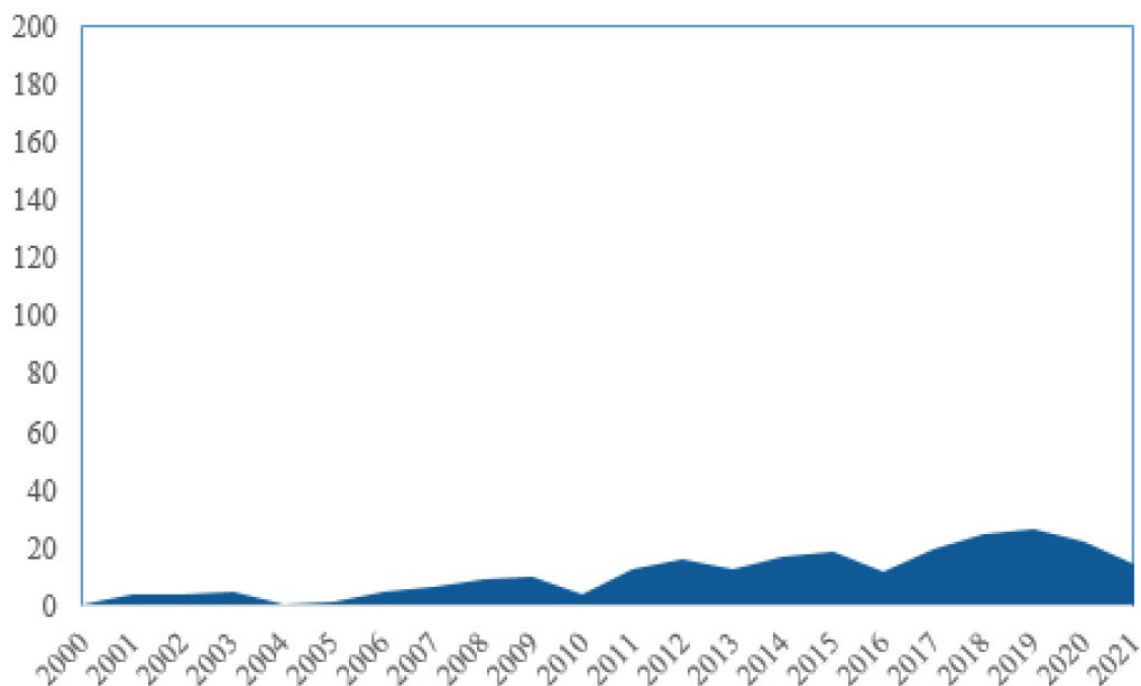
Slika 2: Shematični prikaz priprave seznama KŠO/skupin KŠO za pregled s strani deležnikov.

Delovni sklop 3: Uvedba in validacija hitrih testov LAMP

Namen DS3 je bilo razviti in validirati hitre in zanesljive teste na osnovi tehnologije LAMP ter preizkusiti in vpeljati hitre teste v prakso za potrebe inšpekcijskih nadzorov in programov preiskav na navzočnost karantenskih škodljivih organizmov (KŠO).



V Delovnem sklopu 3 smo na osnovi seznama prednostnih škodljivih organizmov oblikovanega v Delovnem sklopu 2, opravili strokovni pregled posameznih organizmov v katerem smo ugotavljali za katere od njih imajo laboratoriji pri nas že uvedene ustrezne druge teste. Hkrati smo vzporedno, z obsežnejšim pregledom literature ugotavljali, za katere od prednostnih škodljivih organizmov s seznama, so testi LAMP že opisani in je torej njihova uvedba mogoča. Za pregled literature smo za skupine škodljivih organizmov in posamezne organizme s seznama oblikovanega v DS2 s pomočjo EPPO Global Database zbrali veljavna imena ter tudi druga imena pod katerimi bi lahko bili objavljeni testi in ta imena v sintaksi [(LAMP) AND (harmful organisms as phrases)] uporabili v bazi PubMed. Osnovno iskanje s 130 različnimi imeni skupin organizmov/organizmov je dalo 255 rezultatov. Nekateri od teh so se nanašali na obdobje pred opisom metodologije izotermalnega pomnoževanja LAMP in so najverjetneje posledica osnovnega pomena izraza »lamp«, ki v angleškem jeziku pomeni tudi svetilko. Z omejitvijo rezultatov na obdobje po letu 2000, ko je bil opisana metoda LAMP, smo dobili skupno 233 rezultatov. V rezultatih smo najprej s pomočjo digitalnega identifikatorja objektov (doi) preverili morebitne podvojene zadetke, ki jih ni bilo. Rezultati so pričakovano naraščali po letih (Slika 3).



Slika 3: Število publikacij v bazi PubMed, ki omenjajo tako skupine organizmov/organizme iz razširjenega seznama organizmov (Priloga 1) in ključne besede "LAMP". Publikacije so prikazane po letih objave. Skala je poenotena s skalo Slike 2, ki prikazuje število.

Za 233 rezultatov (publikacij) smo v nadaljevanju pregledali povzetke iz katerih smo zaključili ali gre za realno referenco, ki opisuje test LAMP ali lažno negativni zadetek zaradi izraza »lamp« in na kateri organizem se ta referenca nanaša. Z navzkrižno primerjavo dobljenega seznama s seznamom R01 (Priloga 1), smo ugotovili za katere organizme je LAMP že opisan.

Na ta način smo zbrali teste LAMP, ki bi jih bilo mogoče uvesti in ustrezno preveriti v okviru tega projekta (mejniki M06; Priloga 2). Ugotovili smo, da so v literaturi opisani testi LAMP za naslednje organizme s seznama: *Bactrocera tryoni*, *Ceratitidis capitata*, *Dacus ciliatus*, *Thrips palmi* ter bakterije kompleksa vrst *Ralstonia solanacearum* in glivo *Phylosticta citricarpa*. Uvedba testa LAMP je mogoča tudi za nekatere teste LAMP, ki so jih z nami delili švicarski raziskovalci za



organizme: *Liriomyza huidobrensis*, *Liriomyza sativae*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera latifrons* in *Thrips palmi*. Seveda sam obstoj testa LAMP ne pomeni nujno, da je le-ta zanimiv za uvedbo v Sloveniji; pri nadaljnjem izboru bom o tako upoštevali pomen organizmov za Slovenijo, pojavljanje v Evropi ter tudi že obstoječo ekspertizo. Zato se nam po strokovnem pregledu zdi smiselna tudi uvedba testa LAMP za bakterijo *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, pomebna karantenska bakterija, ki jo v zadnjih letih pri nas ponovljivo zaznavamo. Ta test bi uvajali če bo obseg projekta, glede na prej omenjene prednostne organizme, to dovoljeval.

Pomanjkanje obstoječih testov LAMP za organizme, ki so za Slovenijo v tem hipu najbolj zanimivi, je bilo pričakovano, saj se test na področju entomologije še ni povsem uveljavil. Tekom letošnjega leta imamo namen razširiti iskanje tudi druge baze podatkov. Na ta način bomo zajeli tudi novo opisane teste na tem hitro se razvijajočem področju in teste LAMP, ki so bili opisani v publikacijah, ki niso indeksirane v bazi PubMed.

Tekom projekta smo pripravili in/ali zbrali nekatere sintetične in druge referenčnih in/ali kontrolne materiale, kar je sicer ena od ključnih omejitev uvajanja testov za določanje KŠO:

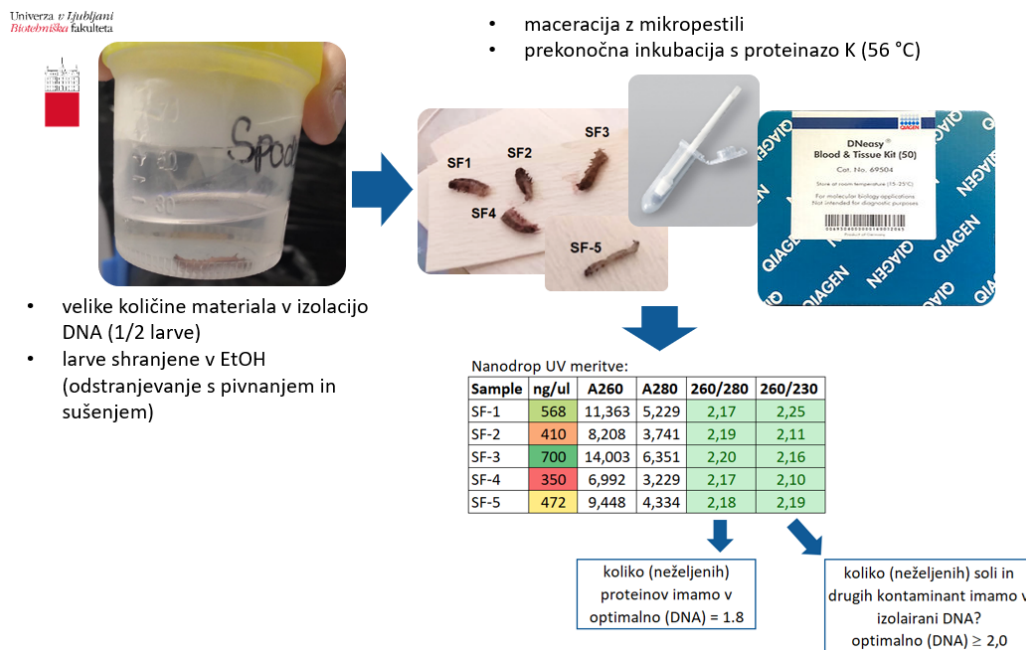
- a) Partner Nacionalni inštitut za biologijo je v sodelovanju s švicarskim inštitutom Agroscope pridobil sintetične kontrolne materiale za teste LAMP za določanje *Liriomyza sativae* (gBlock_LisaH1) in kontrolni material za določanje skupine *Bactrocera dorsalis* (LAMP za določanje skupine *B. dorsalis* in *Bactrocera latifrons/cucurbitae*; gBlock_BadoH1). Za dodatne tri sintetične materiale izbrani ponudnik za sintezo le-te ni mogel izvesti zato iščemo drugega ponudnika. V teku je oblikovanje drugih sintetičnih kontrol.
- b) Partner Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica je v obdobju julij-september na terenu zbiral referenčne materiale: na območju Primorske smo nabirali vzorce plodovih muh iz družine Tephritidae in Drosophilidae ter gosenice škodljivih metuljev. Kljub dolgoletnemu nadzoru karantenskih vrst iz rodov *Bactrocera* (*Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera zonata*), *Rhagoletis* (*Rhagoletis fausta*, *Rhagoletis pomonella*), *Ceratitis* (*Ceratitis* (*Pterandrus*) *rosa*) in *Anastrepha* (*Anastrepha ludens*) našete karantenske vrste zaenkrat v Sloveniji še niso bile najdene. Zato smo vzorčili domorodne in vnesene vrste iz rodov *Rhagoletis*, *Bactrocera* in *Ceratitis*, ki bodo uporabljene za preverjanje analitične specifičnosti testov LAMP (zaznavanje potencialnih navzkrižnih reakcij z domorodnimi in/ali že razširjenimi žuželkami). Nabrali smo vzorce orehove muhe (*Rhagoletis completa*), oljčne muhe (*Bactrocera olea*) in breskove muhe (*Ceratitis capitata*) ter nekaj gosenic škodljivih metuljev (*Helicoverpa armigera*). KGZ NG je tekom projekta navezal stike s tujimi raziskovalci; z dr. Eugénia De Andrade Silva vodjo Nacionalnega kmetijskega in veterinarskega laboratorja iz Lizbone ter prof. dr. David João Horta Lopes iz Azorov, za katere smo pričakovali, da nam bodo lahko pomagali pomagala pri pridobivanju referenčnega materiala za LAMP teste, predvsem karantenske plodove muhe. KGZ NG je tekom svojih aktivnosti med drugim zbral vzorce naslednjih organizmov: *Rhagoletis completa*, *Bactrocera olea*, *Ceratitis capitata*, *Thaumetobia leucotreta* in *Helicoverpa armigera*. Kot negativni testni material je KGZ NG zbral ličinke zavijačev (jabolčni, češpljev, breskov), ličinke vinskih mušic (*Drosophilidae*) ter ličinke in odrasle osebkke figove muhe (*Silba adipata*).
- c) Partner Biotehniška fakulteta je zbiral referenčne materiale: V obdobju julij-avgust smo na različnih območjih Slovenije nabirali škodljive žuželke, ki bi bile ustrezne



za uvedbo hitrih testov. Nabrali smo več vzorcev listne zavrtnalke *Liriomyza bryoniae*, cvetličnega resarja (*Frankliniella occidentalis*) in tobakovega resarja (*Thrips tabaci*), ki sta poleg neposredne škodljivosti pomembna prenašalca karantenskega TSWV, in gosenice kapusovega belina (*Pieris brassicae*) ter paradižnikove sovke (*Chrysodeixis chalcites*). Slednja spada med novejšje vrste v Sloveniji in postaja zlasti v primorskih rastlinjakih v zadnjih letih prevladujoča vrsta listnih sov. Ravno tako je partner Biotehniška fakulteta je prispeval vzorce karantenskih organizmov. Poleg gosenic *Spodoptera frugiperda* (tarčni organizem) je prispeval še vzorce gosenic *Spodoptera littoralis* in *Spodoptera exigua*. Vzorce so pridobili z Univerze v Neuchatel-u (Švica). Na Kitajskem (Univerza v Yangzhou) smo vzpostavili stik s strokovnjaki za listne zavrtnalke, ki so nam obljubili posredovanje vzorcev tarčnih organizmov *Liriomyza trifolii*, *Liriomyza sativae*, in *Liriomyza huidobrensis*.

Aktivnosti pridobivanja referenčnih materialov so se izvajale tudi v okviru sodelovanja v projektu Euphresco (2021-A-373) vendar tudi v tem projektu material za karantenske Tephritidae ni bil na voljo.

Za namene eksperimentalnih preverjanj smo vpeljali in preverili postopek izolacije večjih količin DNK iz *Spodoptera frugiperda* (Slika 4). Njeno primernost za pomnoževanje smo preverili v delovnem sklopu 4, z določanjem črtnih kod DNA



Slika 4: Shematični prikaz izolacije večjih količin DNA iz *Spodoptera frugiperda* (referenčni material je prispeval partner projekta, Biotehnična fakulteta).

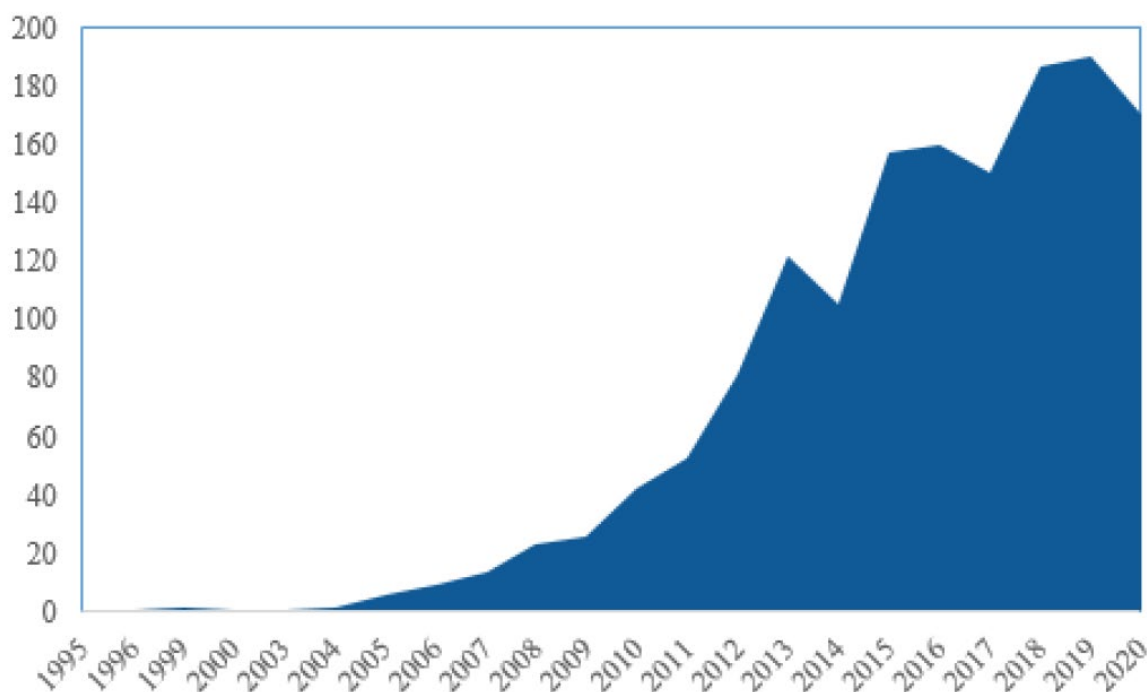
Glede na manjšo razpoložljivost referenčnih materialov ter testov LAMP, ki bi bili zanimivi za uvedbo, smo v nadaljevanju projekta eksperimentalni del testov LAMP omejili. Nekatere analize podatkov so zaradi časovnih zamikov še v teku in bomo o njih poročali zaključnem poročilu projekta za ARRS. Večino preostalih aktivnosti smo v nadaljevanju iz delovnega sklopa 2 preusmerili v delovni sklop 3, t.j. v aktivnost določanja črtnih kod DNA.



Delovni sklop 4: Uvedba in validacija določanja DNA črtnih kod

Določanje DNA črtnih kod je ena osrednjih metod, ki se uveljavlja kot dopolnitev morfometričnim metodam določanja žuželk in drugih škodljivih organizmov. V delovnem sklopu 4 smo pregledali celoten seznam ŠO in seznam prednostnih ŠO, ki je bil rezultat dela v Delovnem sklopu 2. Na osnovi predlogov in strokovne presoje vseh partnerjev projekta (zahtevnost morfološke identifikacije, zanesljivost identifikacije z že uvedenimi testi v laboratorijih...) smo izbrali organizme, za katere bi bilo v tem trenutku najbolj smiselno uvajati metode na osnovi DNA črtnih kod.

Partner NIB je izvedel inventarizacijo uporabe določanja DNA črtnih kod za skupine organizmov/organizme s seznama (Priloga 1). Pričakovano je pregled dal veliko večje število zadetkov kot za metodo LAMP (Slika 5; N = 1589), vendar se mnogi od njih nanašajo na splošne opise pristopov določanja DNA črtnih kod ali so pregledne narave.



Slika 5: Število publikacij v bazi PubMed, ki omenjajo tako skupine organizmov/organizme iz razširjenega seznama organizmov (Priloga 1) in ključno frazo "DNA barcoding". Publikacije so prikazane po letih objave.

Pregled povzetkov je potrdil, da je pristop določanja DNA črtnih kod za žuželke bolj razvit kot določanje s testom LAMP. Generični pristopi, ki jih omogoča določanje DNA črtnih kod imajo veliko prednosti pred specifičnimi testi, še posebej kadar želimo pokriti večje skupine organizmov. V literaturi so tako opisani pristopi za določanje rodov in razlikovanje vsaj nekaterih vrst znotraj njih za rodove *Liriomyza*, *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus* in *Rhagoletis* ter drugih posameznih vrst (Priloga 2).

Medtem ko smo osnovni, hiter pregled opisov določanja DNA črtnih kod za organizme s seznama opravili, bo za zanesljivejše rezultate potreben dodaten, natančnejši pregled celotnih publikacij. Predvsem gre za primere ko je pristop opis za celotno družino ali red določenega organizma, ni pa iz povzetka razvidno ali zares dovoljuje razlikovanje vrst s seznama. Ravno tako smo ob pregledu opazili, da za določanje kompleksa vrst *R. solanacearum* določanje DNA črtnih kod ni objavljeno, zato ga s pregledom baze PubMed nismo našli. Vemo pa, da je pristop del EPPO protokola za določanje DNA črtnih kod. Podobno lahko velja za druge organizme, kar bomo dodatno preverili.



ter, podobno kot za test LAMP, pregled razširili tudi na druge baze podatkov. Publikacije bomo pregledali skupaj s strokovnjaki in pred dokončno izbiro posameznih testov ocenili kakovost razvitih pristopov in javno dostopnih baz podatkov.

S strokovnim pregledom seznama R01 (Priloga 1) in pregledom literature, smo izbrali teste določanja DNA črtnih kod, ki bi jih bilo mogoče uvesti in ustrezno preveriti v okviru tega projekta (mejniki M07; Priloga 2).

Poleg referenčnih materialov zbranih v okviru delovnega sklopa 2, smo pripravljali/zbirali referenčne in druge kontrolne materiale:

- a) Kmetijski inštitut Slovenije je pričel z delom na pršici šiškarici *Phyllocoptes fructiphilus*. Nabrali smo dodatne vzorce pršic šiškaric za njihovo nadaljnjo identifikacijo z metodo DNA črtnih kod, hkrati pa poiskali tudi vzorce pršic iz preteklih let, ki jih bomo v študiji uporabili. Čeprav je osnovna identifikacija, da gre za pršice šiškarice relativno enostavna, pa je njihova nadaljnja morfološka identifikacija izjemno zahtevna. V izjemno pomoč pri njihovi identifikaciji je metoda DNA črtnih kod, pri tem pa se pri pršicah šiškaricah kot izbrane regije uporabljajo zelo različne genomske regije. Tako smo že identificirali dve objavljeni metodi, ki ju bomo uvedli in primerjali, ena od njiju omogoča tudi sočasno analizo prisotnosti virusa na istem vzorcu.
- b) Partner Gozdarski inštitut Slovenije je za izbrani karantenski škodljivi organizem – glivo *Geosmithia morbida* – pridobil smo referenčni material iz zbirke CBS (2 izolata glive *G. morbida*) ter iz interne zbirke laboratorija izbral izolate gliv oziroma ekstrakte DNA, ki smo jih pridobili v letih 2019–2022 v okviru izvajanja drugih nalog s področja zdravja rastlin iz gostiteljskih rastlin, tj. *Juglans* spp oziroma iz potencialnih vektorjev.
- c) Partnerja Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica in Biotehniška fakulteta sta zbirala vzorce na terenu.

V smislu uvedbe in preverjanja uporabnosti metode črtnih kod DNA so partnerji izvajali naslednje aktivnosti:

- (i) Partner Gozdarski inštitut Slovenije je za izbrani karantenski škodljivi organizem – glivo *Geosmithia morbida* ki skupaj s svojim vektorjem (vrsta *Pityophthorus juglandis* in druge vrste) povzroča bolezen orehov (bolezen tisočerih rakov) nadaljeval z razvijanjem metode določanja DNA črtnih kod. Prva izbrana regija za DNA črtne kode (ITS rDNA) je bila s strani že objavljenih študij (npr. Kolařík *in sod.*, 2017) prepoznana kot dovolj informativna za identifikacijo *G. morbida*. V laboratoriju smo optimizirali postopek za pomnoževanje omenjene regije, opravili smo verifikacijo (občutljivost, specifičnost, ponovljivost) po priporočilih standarda EPPO za regijo ITS-rDNA. Dodatno smo verificirali še dodatna regija (b-tubulin). V primeru direktne izolacije iz okuženega materiala je bila razvita metoda s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (Moore *in sod.*, 2019), ki pomnožujejo odsek b-tubulina, ki smo jo uspešno implementirali v rutinsko diagnostiko. Tekom verifikacije smo na enem ne-tarčnem izolatu zaznali nespecifično pomnoževanje. V okviru projekta Q-Entry smo zato na osnovi nukleotidnih zaporedij odseka, ki ga



pomnožita specifična začetna oligonukleotida, ugotavljali občutljivost, specifičnost in ponovljivost uporabe te regije za potrditev suma na prisotnost *G. morbida* v vzorcih lesa in vektorjev ter skonstruirali sintetično kontrolo za omenjeni postopek.

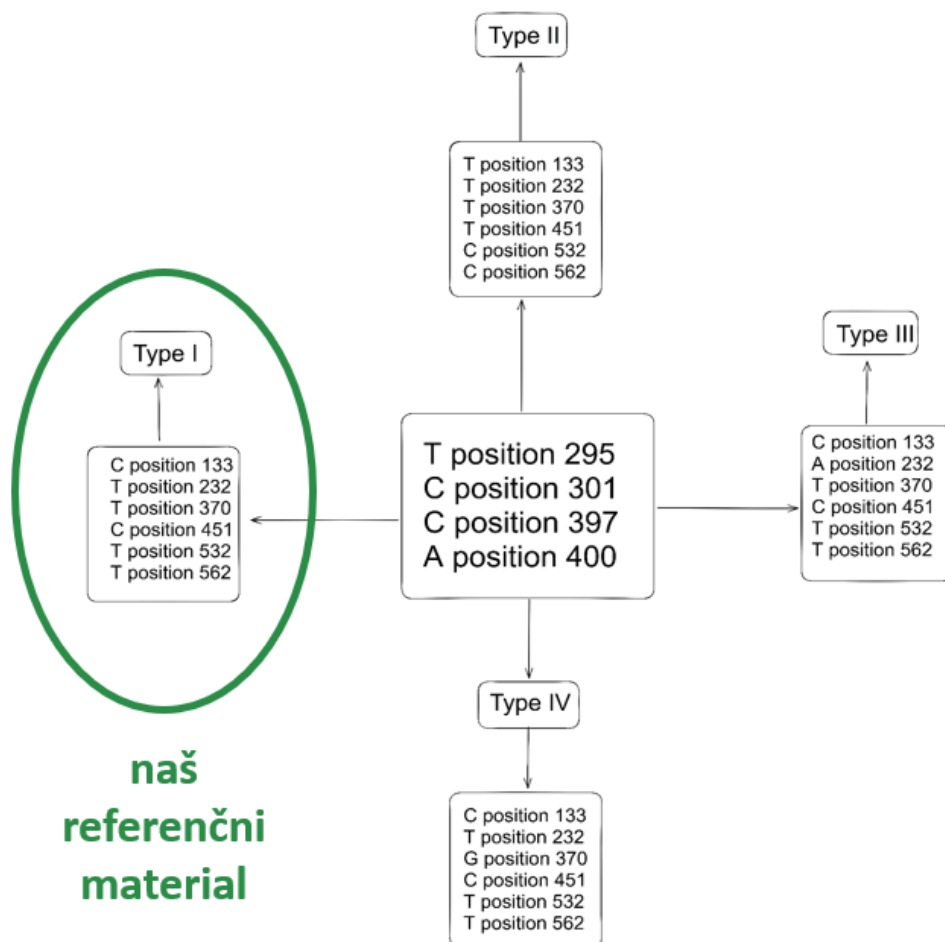
- (ii) Kmetijski inštitut Slovenije je z uvajanjem metode pričel na primeru pršice šiškarice *Phyllocoptes fructiphilus*. V nadaljevanju je v dogovoru z vsebinsko spremljevalko projekta, dr. Alenko Zupančič, UVHVVR, prilagodi program nadaljnjih aktivnosti tega delovnega sklopa. Delo na identifikaciji pršic šiškaric v okviru tega projekta se ni nadaljevalo, izkušnje so se prenesle na delo z žuželkami. Direktna izvedba metode določanja črtnih kod brez predhodne izolacije DNA se je namreč pri identifikaciji pršic šiškaric izkazala kot zelo učinkovita, podobne pozitivne izkušnje pa imamo s uporabo te metode tudi pri nematodah (naloge je bila izvedena v okviru Programa strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin). S to metodo se namreč izognemo izolaciji DNA, kar za nas pomeni tako časovni, kot tudi finančni prihranek. Poleg tega metoda za vzorec ni destruktivna, kar pomeni, da eksoskelet, ki po izvedbi molekularne analize ostane nepoškodovan, lahko uporabimo tudi za morebitno nadaljnjo morfološko identifikacijo. To je predvsem pomembno v primerih, ko so referenčne baze nukleotidnih zaporedij, ki jih uporabljamo za molekularno identifikacijo organizmov, pomanjkljive. V praksi je to namreč zelo pogost pojav. Ker je za prenos metode na druge organizme in primerjavo z drugimi uveljavljenimi metodami potrebno kar nekaj materiala, smo se omejili na domorodne vrste in preizkusili možnost direktne metode na različnem materialu – svežem, zamrznjenem, materialu, ki je shranjen v etanolu in po možnosti tudi na materialu, ki ni bil shranjen v optimalnih razmerah. V delovnem sklopu 4 smo na KISu na primeru plodove vinske mušice preverili uporabnost direktnega PCR za identifikacijo žuželk v primerjavi s klasično izolacijo DNA. Primerjavo smo izvedli na živih in mrtvih celotnih osebkih, preverili pa smo tudi, kako različne metode shranjevanja žuželk vplivajo na uspešnost reakcije PCR. V ta namen smo žuželke teden dni hranili zamrznjene na -80°C in -20°C , v hladilniku ter v 70% etanolu na sobni temperaturi. Ugotovili smo, da pri obravnavanjih, pri katerih je propad tkiv najmanjši (takojšnja analiza živih organizmov ali njihova hramba na -80°C), direktni PCR daje najslabše rezultate, medtem ko so bili rezultati pri mrtvih osebkih pri vseh obravnavanjih enaki, in smo pri vseh uspešno pomnožili želeni fragment. Poskus smo ponovili v enakem obsegu in dobili podobne rezultate. Iz KGZ NG smo dobili tudi vzorce oljčne muhe, na katerih smo preskusili primernost direktnega PCR za identifikacijo te muhe. Ker gre za večje organizme, smo primerjavo direktnega PCR in klasičnega postopka z izolacijo DNA izvedli na nogah mrtvih osebkov. Tudi pri oljčni muhi je bila uspešnost pomnoževanja zelenega produkta manjša pri direktnem PCR (4/5) kot pri klasičnem protokolu (5/5). Ker gre pri slabši uspešnosti direktnega PCR lahko za več dejavnikov, ki na to lahko vplivajo in bi bila optimizacija tega postopka tudi časovno zelo zahtevna, bomo v nadaljevanju projekta preizkusili alternativno metodo kuhanja materiala, ki je tudi hitrejša in cenovno ugodnejša kot izolacija DNA.
- (iii) NIB se je v prvem delu svojih aktivnosti v delovnem sklopu 4 smo se na NIBu v tem poročevalskem obdobju osredotočili na analizo sekvenčnih podatkov in optimiziranje pristopov izgradnje internih referenčnih baz podatkov. Za samo analizo kromatogramov smo primerjali programska orodja (CLC, BioNumerics, Geneious, Peak Scanner in Chromas) ter interno določili korake v analizi ter pogoje za kakovost, ki nam omogočajo zanesljivo interpretacijo rezultatov. Pri oceni kakovosti posameznih kromatogramov tako npr. upoštevamo kakovost kromatografskih vrhov (ni prekrivanja, enakomerna razdalja,



dobri signali posameznih nukleotidov), pričakovano nižjo kakovost na začetku (20-40 nukleotidov) in proti koncu kromatograma (nepričakovani zaporedni vrhovi posameznih nukleotidov, upad fluorescence), pričakovane vrhove barvila okoli pozicije 80, pričakovan končni vrh A (Slika 1), Phred vrednosti posameznih nukleotidov in druga merila. Izdelali smo osnutek meril za sestavljanje kromatogramov, rezanje sekvenc ter na primerih z drugih področij primerjali različne pristope k analizi, predvsem (a) analizo s filogenetskimi drevesi ter (b) analizo informativnih nukleotidov. Za eksperimentalni del validacij smo nadaljevali z zbiranjem referenčnih materialov ter v sodelovanju s Katherine Lester, SASA, UK, oblikovali osnutek protokola izolacije DNA iz žuželk, ki v veliki meri ohranja morfološke značilnosti in tako omogoča kasnejšo morfološko identifikacijo žuželk. Kot najbolj perspektivne vire oblikovanja internih referenčnih baz podatkov smo identificirali (i) bazo Q-Bank, ki je kurirana, vendar vsebuje manjše število sekvenc, bazo BOLD in bazo PubMed. Zadnja vsebuje večje število sekvenc vendar so predvsem taksonomski podatki organizmov iz katere sekvence izhajajo, manj zanesljive, zato jo je smiselno uporabljati predvsem v kombinaciji s preverjenimi znanstvenimi publikacijami. Že sama baza Q-Bank v tej fazi za identifikacijo nekaterih žuželk zahteva poleg COI sekveniranje dodatnih genov (<https://qbank.eppo.int/arthropods/>).

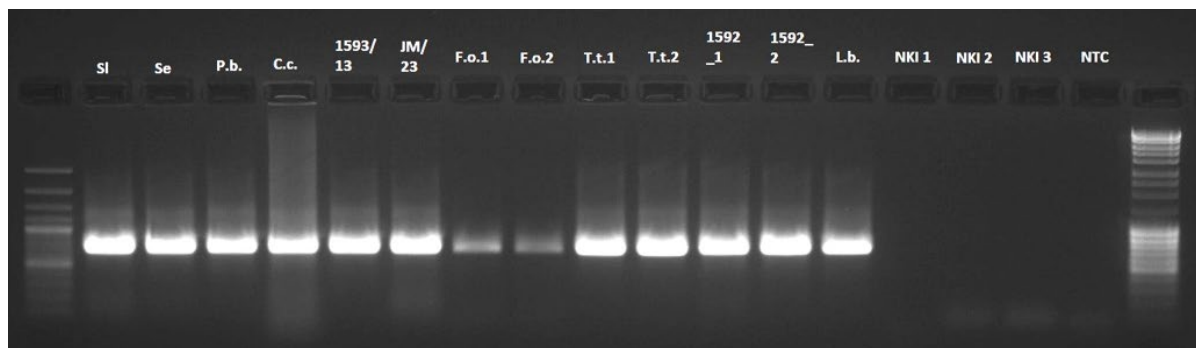
V nadaljevanju smo se osredotočili na preverjanje pristopov k analizi sekvenčnih podatkov in optimiziranja pristopov izgradnje internih referenčnih baz podatkov na primeru določitve DNA črtno kode COI za karantenski organizem *Spodoptera frugiperda*. Po destruktivni izolaciji DNA s kompletom Blood & Tissue Kit (Qiagen) in preverjanju kakovosti izolirane DNA smo s PCR, prilagojenem po mednarodnih standardih (EPPO PM 7/129(2)), pomnožili črtno kod COI. Uspešno smo pomnožili pričakovan fragment in ga poslali v določanje sekvence akreditiranemu ponudniku. Pridobljene odčitke smo analizirali po internem, v prejšnjih poročevalskih obdobjih razvitem postopku ter tako pridobili črtno kodo DNA našega referenčnega materiala. Črtno kodo smo primerjali z referenčno knjižnico Q-Bank pri čemer smo se osredotočili na možnosti njenega razlikovanja od drugih organizmov rodu *Spodoptera* (*S. exigua*, *S. littoralis*, *S. litura* in *S. eridania*). S primerjavo smo potrdili, da gre za *S. frugiperda*. Podrobnejša analiza dobljenih črtnih kod DNA je pokazala, da so referenčni vnosi *S. frugiperda* v referenčni knjižnici Q-bank štirih tipov, ki jih lahko sekvenčno razlikujemo na podlagi desetih (10) informativnih nukleotidov (Slika 6). Glede na določeno črtno kodo DNA COI je naš referenčni material, ki ga je prispeval partner Biotehnična fakulteta, identičen primerku 6786 iz baze EPPO Q-Bank ([Spodoptera frugiperda](https://qbank.eppo.int/arthropods/) GEBK00344 0101) in spada v tip I; morebitni biološki pomen različnih tipov še ni znan.

Z analizo smo potrdili tako ustreznost referenčnega materiala kot tudi oblikovanega pristopa za določanje in analizo rezultatov določanja črtnih kod DNA za rod *Spodoptera*.



Slika 6: Prikaz identifikacije referenčnega materiala *S. frugiperda* s pristopom določanja črtnih kod DNA in identifikacijo informativnih nukleotidov.

V nadaljevanju aktivnosti v okviru sklopa 4 smo na NIB pridobljene izkušnje postopkov priprave vzorcev žuželk v različnih stadijih, izolacije DNA; PCR pomnoževanja izbrane črtne kode DNA, čiščenje produktov pomnoževanja in analize podatkov po sekvenciranju prenesli na izbran nabor referenčnih in kontrolnih materialov. V optimiziranem pristopu iz vzorcev odstranimo etanol, izberemo material (optimalna količina cca. 35 mg) ter DNA izoliramo na destruktiven način, s prilagojenim protokolom in kompletom DNA Blood & Tissue Kit (Qiagen). Pomnoževanje COI izvedemo po prilagojenem protokolu glede na EPPO standard pri čemer uporabljamo zanesljivejšo in kakovostnejšo polimerazo. S tem pristopom smo uspešno identificirali znane referenčne materiale kot tudi nekatere druge kontrolne (neznane) žuželke že na osnovi baze NCBI (Slika 7, Tabela 1). Izjema je rod *Liriomyza* kjer smo za zanesljivo identifikacijo pravilne vrste morali uporabiti bazo EPPO Q-Bank. Ob tem smo opazili pomembno razhajanje med priporočili EPPO in standardom BOLD, ki za identifikacijo žuželk uporabljata različne oligonukleotidne začetnike, kar dodatno otežuje izmenljivost referenčnih knjižnic.



Slika 7: Ločevanje pomnožkov COI iz izbranih referenčnih materialov žuželk (NIB). Tudi identifikacija vzorcev *Frankliniella occidentalis*, pri katerih smo dobili nekoliko šibkejše lise, je bila po sekvenciraju uspešna.

Tabela 1: Identifikacija izbranih referenčnih materialov s pristopom določanja črtnih kod DNA uvedenih na NIB. V stolpcu COI je navedena maksimalna dolžina konsenzusne sekvence dobljena z uporabo najstrožjih pogojev kakovosti. Pri vrsti *Liriomyza bryoniae* smo za 100 % identifikacijo morali uporabiti referenčno bazo sekvenc EPPO Q-Bank.

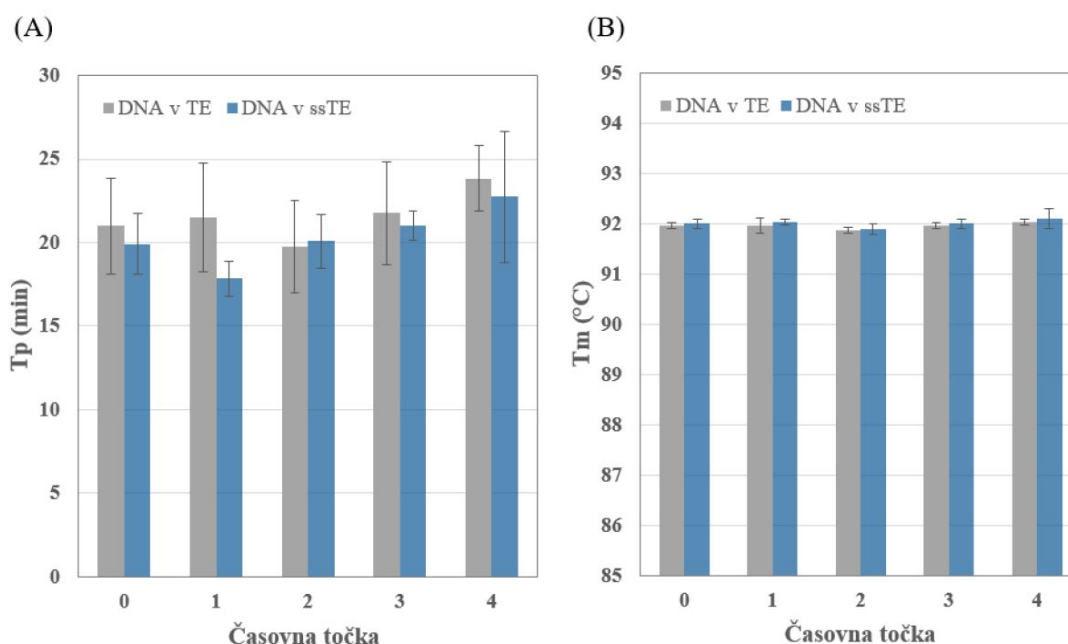
Vzorec	Ime organizma	Osebk (število)	COI (bp)	Identifikacija (NCBI)
Sl	<i>Spodoptera littoralis</i>	larva (3)	632	<i>Spodoptera littoralis</i>
C.c.	<i>Chrysodeixis calcites</i>	glava (1)	633	<i>Chrysodeixis calcites</i>
F.o. 1	<i>Frankliniella occidentalis</i>	odrasli osebek (5)	629	<i>Frankliniella occidentalis</i>
F.o. 2	<i>Frankliniella occidentalis</i>	odrasli osebek (5)	622	<i>Frankliniella occidentalis</i>
L.b.	<i>Liriomyza bryoniae</i>	odrasli osebek (6)	640	<i>Liriomyza bryoniae</i> ; <i>Liriomyza trifolii</i>
P.b.	<i>Pieris brassicae</i>	glava (1)	638	<i>Pieris brassicae</i>
Se	<i>Spodoptera exigua</i>	larva (3)	630	<i>Spodoptera exigua</i>
T.t. 2	<i>Thrips tabbaci</i>	odrasli osebek (11)	639	<i>Thrips tabbaci</i>
T.t. 1	<i>Thrips tabbaci</i>	odrasli osebek (11)	612	<i>Thrips tabbaci</i>
1593/13	Unknown	larva (1)	643	<i>Ostrinia nubilalis</i>
JM/23	Unknown	larva (1)	640	<i>Agrochola macilenta</i>
1592_1	Unknown	odrasli osebek (5)	647	<i>Rhopalosiphum maidis</i>
1592_2	Unknown	odrasli osebek (5)	645	<i>Rhopalosiphum maidis</i>

Delovni sklop 5: Prenos v prakso

Za prenos v prakso je bil že v stopnji oblikovanja seznama škodljivih organizmov izražen interes za hitri testi za detekcijo bakterije *Ralstonia solanacearum* (koleks vrst). Za omenjeni škodljivi organizem že razvit, objavljen in preizkušen LAMP test (Lenarčič et al., PLOS ONE 2014, doi.org/10.1371/journal.pone.0096027). Omenjeni test je odličen kandidat za prenos v prakso, saj zanj obstajajo validacijski podatki in je vključen v EPPO diagnostični protokol za določanje bakterije *Ralstonia solanacearum* (PM7/021). Za monografijo iz serije Springer Protocols, Methods in Molecular Biology book, pripravili opis izvedbe testa LAMP za določanje bakterije *Ralstonia solanacearum* (kompleks vrst; Pirc in sod., 2021). Poleg same objave, ki je v angleškem jeziku, smo pripravili tudi slovenski prevod, ki bo služil kot osnova za protokol za prenos tehnologije LAMP v prakso različnih deležnikov. V omenjenem prevodu poglavja je natančno opisana metodologija, uporaba in interpretacija rezultatov LAMP testa za detekcijo *Ralstonia solanacearum* (Lenarčič et al., 2014). Poglavje je odlična osnova in pripomoček za izobraževanje novih uporabnikov testa, saj vsebuje strukturiran in metodološko popoln opis izvedbe ter vključuje praktične nasvete, ki so za nove uporabnike neprecenljivi.



Drugi del aktivnosti prenosa v prakso testa LAMP za določanje bakterije *Ralstonia solanacearum* (Lenarčič *et al.*, 2014) je vezan na testiranje stabilnosti reagentov potrebnih za izvedbo testa. Pripravili in pričeli smo z eksperimentalnim, dolgoročnim preverjanjem (do 24 mesecev) stabilnosti vnaprej pripravljenih reagentov. Tekom preverjanja smo v enakomernih časovnih intervalih (vsake 3 mesece) testirali morebitne spremembe v delovanju reagentov. V vseh časovnih točkah je bilo testiranje izvedeno na instrumentu GenieII (Optigene, Velika Britanija), ki je prilagojen tudi za izvajanje testiranja LAMP na terenu. Stabilnostno študijo smo izvajali pri -20°C , skladno s priporočili proizvajalca za shranjevanje reagentov zajetih v študijo. Eksperimenti so pokazali veliko stabilnost pred-pripravljenih reagentov.



Slika 8: Rezultat testiranja stabilnosti reagentov in DNA po času glede na rezultat časa pozitivnosti reakcije (T_p ; A) in talilno temperaturo produktov reakcije (T_m ; B). Na sliki so prikazana povprečja in standardne deviacije vseh tehničnih ponovitev ($n=3$) posameznega vzorca za posamezno časovno točko. Razmak med posameznima časovnima točkama je 3 mesece, kar pomeni da x os prikazuje rezultate stabilnosti preko enega leta.

V letu 2023 (5. oktober 2023) smo izvedli izobraževanje za izvedbo testa LAMP za dva sodelavca partnerja KGZ-NG.

2. Ocena o stopnji realizacije programa in zastavljenih ciljev (samoevalvacija)²:

V okviru projekta smo z upoštevanjem prilagoditev programa tekom projekta dosegli vse ključne cilje:

- I. določili smo KŠO in skupine KŠO, za katere je smiselna uvedba in uporaba hitrih testov za identifikacijo ob uvozu pošilk rastlin v Slovenijo (EU) in na mestih rastlinske pridelave v Sloveniji,
- II. v treh partnerskih laboratorijih projekta (NIB, KIS, GIS) smo na osnovi izkušenj iz

² Realizacija programa z utemeljitvijo večjih odstopanj od stopnje realizacije glede na vsebinski in terminski plan projekta



projekta Q-Entry in drugih aktivnosti uvedli in verificirali izbrane pristope hitrih testov ter jih uvedli v redno delo. S postavljenimi osnovami je omogočena lažje veplejava nadaljnjih testov glede na potrebe uradne diagnostike.

- III. preizkusili in vpeljali smo izbrane hitre teste v prakso za potrebe inšpekcijskih nadzorov in programov preiskav na navzočnost KŠO).

Za teste LAMP se je tekom izvedbe projekta izkazalo, da je njihov uporaba za identifikacijo žuželk, tudi KŠO, v prezgodnji fazi za učinkovito uporabo. Za večino KŠO teh testov ni razvitih in/ali ni zadostnih referenčnih sekvenčnih podatkov. Posledično smo aktivnosti v projektu usmerili v metodo določanja DNA črtnih kod. V pričakovanju razvoja novih testov smo pripravili podlage za prenos v prakso drugih laboratorijih, kar je vključevalo pripravo natančnih protokolov za izbrane teste, eksperimentalno preverjanje dolgotrajne stabilnosti predpripravljenih reagentov in kontrolnih materialov, ter izvedbo praktičnega izobraževanja.

Specifični pogoji tekom izvajanja projekta npr. epidemija COVID so otežili sodelovanje v začetnih fazah projekta, tako znotraj projekta, kot tudi navzven, z drugimi projekti. Kljub temu smo tekom projekta v nadaljevanju uspešno izmenjali znanja s sodelavci v okviru dveh projektov Euphresco, 2020-F-341 Biology and epidemiology of *Xylella fastidiosa* and its insect vectors (NIB) ter 2021-A-373, Fast detection methods for quarantine Tephritidae (TEPHRIFADE) (NIB, KGZ-NG).

Pričakovano se je kot dodaten izziv izkazala (ne)dostopnost referenčnih materialov. Partnerja KGZ-G in BF sta prispevala nabor izredno koristnih materialov preko svojih vzpostavljenih domačih in mednarodnih povezav. Za ostale materiale, za katere se je pokazal potreba ali možnost pridobitve tekom projekta, številne aktivnosti partnerjev niso obrodile sadov. Pomanjkanje referenčnih materialov, tudi omejitve pri sintezi sintetičnih referenčnih materialov, tako ostajajo pomembna ovira, ki jo prepoznavajo tudi EPPO, EU referenčni laboratoriji in drugi.

Zradi zgornjih omejitev in prilagoditev dela podatki o izvedenih testih niso bili deponirani v baze validacijskih podatkov, kot je bilo sprva predvideno.

Glede na izkušnje ocenjujemo, da je bil projekt Q-Entry izveden uspešno. Glede na zgodnje faze razvoja in zrelost obeh tehnologij, LAMP in določanja črtnih kod, smo kot skupina zdaj v dobri poziciji, da z uporabo in razvojem teh pristopov nadaljujemo in se aktivno vključimo v mednarodne napore zapolnitve manjkajočih točk, vključno s pridobivanjem sekvenčnih podatkov za karantenske in nekarantenske tarčne in kontrolne organizme.

3. Morebitne spremembe programa in njihova utemeljitev ³:

V dogovoru z naročnikom (vsebinska spremljevalka dr. Alenka Zupančič, MKGP) in ciljnim deležniki (Alenka Pivk, Inšpekcija za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Sektor za nadzor varstva rastlin) smo ugotovili, da prenos testa LAMP do deležnikov znotraj fitosanitarne inšpekcije zaenkrat ni več aktualen. Posledično ni bil in ne bo izveden mejnik M14 (DS5), Praktična predstavitev hitrih testov LAMP in/ali izobraževanje izvajalcev na mestih vstopnih točk (mesec 18, april 2022, nosilec NIB). Aktivnost smo v dogovoru z naročnikom nadomestili z NIB

³ Samo v primeru večjih sprememb oziroma odstopanj od sprejetega programa.



izobraževanjem za test LAMP med partnerji projekta (KGZ-NG).

Ravno tako smo v dogovoru z naročnikom aktivnosti na pršicah v delovnem sklopu 4 preusmerili na druge organizme kot je opisano v DS4.

Zaradi pomanjkanja ustreznih testov LAMP in referenčnih sekvenc za identifikacijo večine karantenskih žuželk smo v drugem delu projekta večino aktivnosti iz delovnega sklopa 3 preusmerili na delovni sklop 4, v določanje črtnih kod DNA.

4. Bibliografski in drugi doseženi rezultati projektne skupine ⁴:

Za monografijo iz serije Springer Protocols, Methods in Molecular Biology book, smo pripravili opis izvedbe testa LAMP za določanje bakterije *Ralstonia solanacearum* (kompleks vrst; Pirc et al., 2021).

Za mednarodno konferenco Entomology 2021, ki jo organizira Entomological Society of America, smo v obliki plakata pripravili predstavitev pregleda (inventarizacije) testov LAMP in projekta (Alič in Dreó, 2021).

Pirc M., Alič Š., Dreó T. (2021) Rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of the Ralstonia solanacearum Species Complex Bacteria in Symptomatic Potato Tubers and Plants. In: Dobnik D., Gruden K., Ramšak Ž., Coll A. (eds) Solanum tuberosum. Methods in Molecular Biology, vol 2354. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1609-3_20.

Alič Š., Dreó T. (2021) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for identification and detections of insects. In: Annual Conference of the Entomological Society of America, Entomology 2021.

V obdobju projekta smo se partnerji projekta udeležili 15. Posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, ki je potekalo 1. in 2. marca 2022 v Portorožu. Na posvetovanju smo predstavljali tudi projekt Q-Entry in nekatere rezultate pridobljene v okviru projekta.

DREO, Tanja, MAVRIČ PLEŠKO, Irena, PIŠKUR, Barbara, ROT, Mojca, BOHINC, Tanja, ALIČ, Špela, TRDAN, Stanislav. Ciljni raziskovalni projekt QEntry - Vpeljava hitrih testov za identifikacijo karantenskih škodljivih organizmov, povzročiteljev bolezni in poškodb na rastlinah = Targeted research project Q-ENTRY - Introduction of rapid tests to identify quarantine pests and pathogens harmful to plants. V: TRDAN, Stanislav (ur.). 15. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo : izvlečki referatov = 15th Slovenian conference on plant protection with international participation : abstract volume : 1.-2. marec 2022, Portorož, Slovenija. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia. 2022, str. 151-152. [COBISS.SI-ID 99668227].

KAVČIČ, Andreja, CVELBAR, Tašja, DEVETAK, Zina, OGRIS, Nikica, PIŠKUR, Barbara. Sušenje orehov : iskanje vzrokov in verifikacija molekularne metode za določanje Geosmithia morbida v različnih tipih vzorcev = Dieback of walnuts : searching of its causes and the verification of a molecular method for the detection of Geosmithia morbida in different types of samples. V: TRDAN, Stanislav (ur.). 15. slovensko

⁴ Navedite vse morebitne objave vezane na izvajanje projekta in ostale podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatih, vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za sofinancerje projekta.



posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo : izvlečki referatov = 15th Slovenian conference on plant protection with international participation : abstract volume : 1.-2. marec 2022, Portorož, Slovenija. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia. 2022, str. 92-93. [COBISS.SI-ID 99522307].

O rezultatih projekta smo poročali tudi v okviru EURL delavnice.

DEVETAK, Zina, CVELBAR, Tašja, KAVČIČ, Andreja, PIŠKUR, Barbara. Validation and implementation of the end point PCR for detection of Geosmithia morbida directly from wood (Juglans spp.): presented at the Third EURL on fungi and oomycetes workshop, 4th May 2022 – Malzéville (Nancy), France. [COBISS.SI-ID 109241603].

Poleg zgornjih rezultatov smo izkušnje pridobljene tekom izvajanja projekta Q-Entry laboratoriji uvedli v svojo stalno prakso in pripravili ustrezne dokumente znotraj internih sistemov kakovosti.



Priloga 1: Seznam prioritetnih škodljivih organizmov

Seznam prioritetnih organizmov smo oblikovali na podlagi seznama, ki smo ga v sodelovanju z deležniki oblikovali v delovnem sklopu 2 (rezultat R01). Seznam smo dopolnili z vrstami, ki so bile v času analize posebej omenjene v različnih uradnih seznamih (zakonodajni dokumenti EU, seznam dvajsetih prioritetnih škodljivih organizmov v EU, seznam EPPO ipd.). Razširitev seznama z imeni posameznih vrst je olajšala pregled literature z namenom inventarizacije testov LAMP.

Tabela 1: Seznam prioritetnih organizmov za razvoj hitrih testov. Organizmi, ki so na seznamu 20 prioritetnih organizmov za EU, so označeni rdeče.

Kraljestvo	Deblo	Družina	Rod	Škodljivi organizem
Animalia	Arthropoda	Agromyzidae	Liriomyza	<i>Liriomyza</i>
				<i>Liriomyza huidobrensis</i>
				<i>Liriomyza sativae</i>
				<i>Liriomyza trifolii</i>
		Drosophilidae	Drosophila	<i>Drosophila suzukii</i>
				<i>Acidiella kagoshimensis</i>
		Tephritidae	Acidiella	<i>Acidoxantha bombacis</i>
			Acidoxantha	<i>Acroceratitis distincta</i>
			Acroceratitis	<i>Adrama</i>
			Adrama	<i>Anastrepha</i>
			Anastrepha	<i>Anastrepha fraterculus</i>
				<i>Anastrepha ludens</i>
				<i>Anastrepha obliqua</i>
				<i>Anastrepha spp.</i>
				<i>Anastrepha suspensa</i>
			Asimoneura	<i>Asimoneura pantomelas</i>
			Austrotephritis	<i>Austrotephritis protrusa</i>
			Bactrocera	<i>Bactrocera</i>
				<i>Bactrocera caryeae</i>
				<i>Bactrocera dorsalis</i>
				<i>Bactrocera kandiensis</i>
				<i>Bactrocera latifrons</i>
				<i>Bactrocera minax</i>
				<i>Bactrocera occipitalis</i>
				<i>Bactrocera pyrifoliae</i>
				<i>Bactrocera tryoni</i>
				<i>Bactrocera tsuneonis</i>
				<i>Bactrocera zonata</i>
			Bistrispinaria	<i>Bistrispinaria fortis</i>
				<i>Bistrispinaria magniceps</i>
			Callistomyia	<i>Callistomyia flavilabris</i>
			Campiglossa	<i>Campiglossa albiceps</i>



Campiglossa californica



Kraljestvo	Deblo	Družina	Rod	Škodljivi organizem
				<i>Campiglossa duplex</i>
				<i>Campiglossa reticulata</i>
				<i>Campiglossa snowi</i>
			Carpomya	<i>Carpomya incompleta</i>
				<i>Carpomya pardalina</i>
			Ceratitis	<i>Ceratitis</i>
				<i>Ceratitis capitata</i>
				<i>Ceratitis cosyra</i>
				<i>Ceratitis quilicii</i>
				<i>Ceratitis rosa</i>
			Craspedoxantha	<i>Craspedoxantha marginalis</i>
			Dacus	<i>Dacus</i>
				<i>Dacus ciliatus</i>
			Dioxyna	<i>Dioxyna chilensis</i>
			Dirioxa	<i>Dirioxa pornia</i>
			Euleia	<i>Euleia separata</i>
			Euphranta	<i>Euphranta camelliae</i>
				<i>Euphranta canadensis</i>
				<i>Euphranta cassia</i>
				<i>Euphranta japonica</i>
				<i>Euphranta oshimensis</i>
			Eurosta	<i>Eurosta solidaginis</i>
			Eutreta	<i>Eutreta</i>
			Gastrozona	<i>Gastrozona nigrifemur</i>
			Gymnocarena	<i>Gymnocarena</i>
			Insizwa	<i>Insizwa oblita</i>
			Marriottella	<i>Marriottella exquisita</i>
			Monacrostichus	<i>Monacrostichus citricola</i>
			NA	<i>Tephritidae</i>
			Neaspilota	<i>Neaspilota alba</i>
				<i>Neaspilota reticulata</i>
			Parastenopa	<i>Parastenopa limata</i>
			Paratephritis	<i>Paratephritis fukaii</i>
				<i>Paratephritis takeuchii</i>
			Paraterellia	<i>Paraterellia varipennis</i>
			Philophylla	<i>Philophylla fossata</i>
			Procecidochares	<i>Procecidochares</i>
			Ptilona	<i>Ptilona confinis</i>
				<i>Ptilona persimilis</i>
			Rhagoletis	<i>Rhagoletis</i>
				<i>Rhagoletis cingulata</i>
				<i>Rhagoletis completa</i>
				<i>Rhagoletis fausta</i>
				<i>Rhagoletis indifferens</i>



Kraljestvo	Deblo	Družina	Rod	Škodljivi organizem
				<i>Rhagoletis mendax</i>
				<i>Rhagoletis pomonella</i>
			Sphaeniscus	<i>Sphaeniscus binoculatus</i>
			Sphenella	<i>Sphenella nigricornis</i>
			Strauzia	<i>Strauzia</i>
			Taomyia	<i>Taomyia marshalli</i>
			Tephritis	<i>Tephritis leavittensis</i>
				<i>Tephritis luteipes</i>
				<i>Tephritis ovatipennis</i>
				<i>Tephritis pura</i>
			Toxotrypana	<i>Toxotrypana curvicauda</i>
				<i>Toxotrypana recurcauda</i>
			Trupanea	<i>Trupanea bisetosa</i>
				<i>Trupanea femoralis</i>
				<i>Trupanea wheeleri</i>
			Trypanocentra	<i>Trypanocentra nigrithorax</i>
			Trypeta	<i>Trypeta flaveola</i>
			Urophora	<i>Urophora christophi</i>
			Xanthaciura	<i>Xanthaciura insecta</i>
			Zacerata	<i>Zacerata asparagi</i>
			Zeugodacus	<i>Zeugodacus</i>
				<i>Zeugodacus cucumis</i>
				<i>Zeugodacus cucurbitae</i>
			Zonosemata	<i>Zonosemata electa</i>
			Goedenia	<i>Goedenia stenoparia</i>
			Paracantha	<i>Paracantha trinotata</i>
			Rioxoptilona	<i>Rioxoptilona dunlopi</i>
		Thripidae	Thrips	<i>Thrips palmi</i>
		Tortricidae	Thaumatotibia	<i>Thaumatotibia leucotreta</i>
Bacteria	Proteobacteria	Burkholderiaceae	Ralstonia	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Fungi	Ascomycota	Phyllostictaceae	Phyllosticta	<i>Phyllosticta citricarpa</i>



Priloga 2: Izbor KŠO/skupin KŠO in tipov podvzorcev za uvedbo hitrih testov LAMP (mejniki M06) in uvedbo testov določanja DNA črtnih kod (mejniki M07)

Teste LAMP in pristope določanja DNA črtnih kod, ki so opisani v literaturi in jih je mogoče uvesti za organizme iz seznama (Priloga 1), smo identificirali s sistematičnim pregledom baze PubMed. Podrobnosti in povzetek rezultatov pregleda so opisani v Delovnem sklopu 2 (za LAMP) in v Delovnem sklopu 3 (za določane DNA črtnih kod). Dokončni izbor specifičnih testov bomo naredili po dodatnem pregledu kvalitete validacijskih podatkov.

Poleg v tabeli navedenih organizmov so za uvedbo testa LAMP in/ali testa določanja DNA črtnih kod predvidena tudi organizma izbrana s strani strokovnih inštitucij, *Phyllocoptes fructiphilus* (Kmetijski inštitut Slovenije) in *Geosmithia morbida* (Gozdarski inštitut Slovenije). Dodatno je Nacionalni inštitut za biologijo kot potencialno zanimiv test identificiral test LAMP za določanje bakterije *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* v simptomatičnih listih koruze. Ti organizmi so navedeni posebej, v spodnjem razdelku tabele.

Debilo	Družina	Rod	Škodljivi organizem	LAMP	Določanje DNA črtnih kod ³
Arthropoda	Agromyzidae	Liriomyza	<i>Liriomyza</i>	ne	da
			<i>Liriomyza huidobrensis</i>	da ¹	da
			<i>Liriomyza sativae</i>	da ¹	da
			<i>Liriomyza trifolii</i>	ne	da
	Drosophilidae	Drosophila	<i>Drosophila suzukii</i>	ne	?
	Tephritidae	Acidiella	<i>Acidiella kagoshimensis</i>	ne	ne
		Acidoxantha	<i>Acidoxantha bombacis</i>	ne	ne
		Acroceratitis	<i>Acroceratitis distincta</i>	ne	ne
		Adrama	<i>Adrama</i>	ne	ne
		Anastrepha	<i>Anastrepha</i>	ne	da
			<i>Anastrepha fraterculus</i>	ne	?
			<i>Anastrepha ludens</i>	ne	da



			<i>Anastrepha obliqua</i>	ne	?
			<i>Anastrepha spp.</i>	ne	?
			<i>Anastrepha suspensa</i>	ne	?
		Asimoneura	<i>Asimoneura pantomelas</i>	ne	?
Deblo	Družina	Rod	<i>Škodljivi organizem</i>	LA MP	Določanje DNA črtnih kod3
		Austrotephritis	<i>Austrotephritis protrusa</i>	ne	?
		Bactrocera	<i>Bactrocera</i>	ne	da
			<i>Bactrocera caryeae</i>	ne	ne
			<i>Bactrocera dorsalis</i>	da 1	?
			<i>Bactrocera kandiensis</i>	ne	ne
			<i>Bactrocera latifrons</i>	da 1	ne
			<i>Bactrocera minax</i>	ne	da
			<i>Bactrocera occipitalis</i>	ne	ne
			<i>Bactrocera pyrifoliae</i>	ne	ne
			<i>Bactrocera tryoni</i>	da	da
			<i>Bactrocera tsuneonis</i>	ne	da
			<i>Bactrocera zonata</i>	ne	da
		Bistrispinaria	<i>Bistrispinaria fortis</i>	ne	ne
			<i>Bistrispinaria magniceps</i>	ne	ne
		Callistomyia	<i>Callistomyia flavilabris</i>	ne	ne
		Campiglossa	<i>Campiglossa albiceps</i>	ne	ne
			<i>Campiglossa californica</i>	ne	ne
			<i>Campiglossa duplex</i>	ne	ne
			<i>Campiglossa reticulata</i>	ne	ne
			<i>Campiglossa snowi</i>	ne	ne



		Carpomya	<i>Carpomya incompleta</i>	ne	?
			<i>Carpomya pardalina</i>	ne	?
		Ceratitis	<i>Ceratitis</i>	ne	da
			<i>Ceratitis capitata</i>	da	?
			<i>Ceratitis cosyra</i>	ne	?
			<i>Ceratitis quilicii</i>	ne	da
			<i>Ceratitis rosa</i>	ne	da
		Craspedoxantha	<i>Craspedoxantha marginalis</i>	ne	ne
		Dacus	<i>Dacus</i>	ne	da
			<i>Dacus ciliatus</i>	da	?
		Dioxyna	<i>Dioxyna chilensis</i>	ne	?
		Dirioxa	<i>Dirioxa pornia</i>	ne	da
		Euleia	<i>Euleia separata</i>	ne	ne
		Euphranta	<i>Euphranta camelliae</i>	ne	ne
			<i>Euphranta canadensis</i>	ne	ne
			<i>Euphranta cassia</i>	ne	ne
			<i>Euphranta japonica</i>	ne	ne
			<i>Euphranta oshimensis</i>	ne	ne
		Eurosta	<i>Eurosta solidaginis</i>	ne	ne
		Eutreta	<i>Eutreta</i>	ne	ne
		Gastrozona	<i>Gastrozona nigrifemur</i>	ne	ne
		Gymnocarena	<i>Gymnocarena</i>	ne	ne
		Insizwa	<i>Insizwa oblita</i>	ne	ne
		Marriottella	<i>Marriottella exquisita</i>	ne	ne
		Monacrostichus	<i>Monacrostichus citricola</i>	ne	ne



	NA		<i>Tephritidae</i>	ne	?
	Neaspilota		<i>Neaspilota alba</i>	ne	ne
			<i>Neaspilota reticulata</i>	ne	ne
	Parastenopa		<i>Parastenopa limata</i>	ne	ne
	Paratephritis		<i>Paratephritis fukaii</i>	ne	ne
			<i>Paratephritis takeuchii</i>	ne	ne
	Paraterellia		<i>Paraterellia varipennis</i>	ne	ne
	Philophylla		<i>Philophylla fossata</i>	ne	ne
	Procecidochares		<i>Procecidochares</i>	ne	ne
	Ptilona		<i>Ptilona confinis</i>	ne	ne
			<i>Ptilona persimilis</i>	ne	ne
	Rhagoletis		<i>Rhagoletis</i>	ne	da
			<i>Rhagoletis cingulata</i>	ne	?
			<i>Rhagoletis completa</i>	ne	?
			<i>Rhagoletis fausta</i>	ne	?
			<i>Rhagoletis indifferens</i>	ne	?
			<i>Rhagoletis mendax</i>	ne	?
			<i>Rhagoletis pomonella</i>	ne	?
	Sphaeniscus		<i>Sphaeniscus binoculatus</i>	ne	ne
	Sphenella		<i>Sphenella nigricornis</i>	ne	ne
	Strauzia		<i>Strauzia</i>	ne	ne
	Taomyia		<i>Taomyia marshalli</i>	ne	ne
	Tephritis		<i>Tephritis leavittensis</i>	ne	ne
			<i>Tephritis luteipes</i>	ne	ne



			<i>Tephritis ovatipennis</i>	ne	ne
			<i>Tephritis pura</i>	ne	ne
	Toxotrypana		<i>Toxotrypana curvicauda</i>	ne	ne
			<i>Toxotrypana recurcauda</i>	ne	ne
	Trupanea		<i>Trupanea bisetosa</i>	ne	ne
			<i>Trupanea femoralis</i>	ne	ne
			<i>Trupanea wheeleri</i>	ne	ne
	Trypanocentra		<i>Trypanocentra nigrithorax</i>	ne	ne
	Trypeta		<i>Trypeta flaveola</i>	ne	ne
		Urophora	<i>Urophora christophi</i>	ne	?
		Xanthaciura	<i>Xanthaciura insecta</i>	ne	ne
		Zacerata	<i>Zacerata asparagi</i>	ne	ne
		Zeugodacus	<i>Zeugodacus</i>	ne	?
			<i>Zeugodacus cucumis</i>	ne	ne
			<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	ne	ne
		Zonosemata	<i>Zonosemata electa</i>	ne	ne
		Goedenia	<i>Goedenia stenoparia</i>	ne	ne
		Paracantha	<i>Paracantha trinotata</i>	ne	ne
		Rioxoptilona	<i>Rioxoptilona dunlopi</i>	ne	ne
	Thripidae	Thrips	<i>Thrips palmi</i>	da 1	da
	Tortricidae	Thaumatotibia	<i>Thaumatotibia leucotreta</i>	da	ne
Proteobacteria	Burkholderiaceae	Ralstonia	<i>Ralstonia solanacearum</i>	da 2	ne4



Ascomycota	Phyllostictaceae	Phyllosticta	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	ne	ne
Animalia	Eriophyidae	Phyllocoptes	<i>Phyllocoptes fructiphilus</i>	ne	ne
Fungi	Bionectriaceae	Geosmithia	<i>Geosmithia morbida</i>	ne	da
Proteobacteria	Erwiniaceae	Pantoea	<i>Pantoea stewartii subsp. Stewartii</i>	da	ne

- 1 test LAMP ni objavljen, vendar imamo do njega dostop za potrebe tega projekta, v okviru sodelovanja med NIB in Agroscope.
- 2 za določanje kompleksa vrst *R. solanacearum* je objavljenih veliko testov LAMP. Za prenos v prakso smo izbrali test, ki so ga opisali Lenarčič *et al.* (2014) s katerim imamo največ izkušenj in je tudi vključen v EPPO diagnostični protokol.
- 3 kjer iz povzetka publikacije ni razvidno, da je mogoče razlikovati tudi med specifičnimi vrstami, opisan pa je generičen pristop določanja DNA črtnih kod na nivoju rodu ali za druge vrste znotraj rodu, je to označeno z »?«.
- 4 Za določanje kompleksa vrst *R. solanacearum* določanje DNA črtnih kod ni objavljeno, zato ga s pregledom baze PubMed nismo našli. Vemo, da je pristop del EPPO protokola za določanje DNA črtnih kod. Podobno lahko velja za druge organizme, kar bomo dodatno preverili v prihodnosti.
- 5 Organizmi izbrani za uvedbo testov po strokovni presoji partnerjev projekta.