

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2014/72



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	L4-3642
Naslov projekta	Razvoj enostavne in hitre metode za določanje rastlinskih povzročiteljev bolezni na terenu
Vodja projekta	27827 Jon Gutierrez Aguirre
Tip projekta	L Aplikativni projekt
Obseg raziskovalnih ur	7471
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	05.2010 - 04.2013
Nosilna raziskovalna organizacija	105 Nacionalni inštitut za biologijo
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	1775 OMEGA svetovanje, inženiring, razvoj in raziskovanje d.o.o.
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.06 Biotehnologija
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.01 Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2.Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Zaradi vpliva podnebnih sprememb in širitve trgovinskih mrež, lahko v prihodnosti pričakujemo znatno povečanje števila povzročiteljev bolezni na rastlinah. Ker se povzročitelji bolezni prilagajajo na kontrolne ukrepe in iščejo nove rezervoarje ter gostiteljske rastline, je za učinkovit nadzor potrebno nove gostiteljske rastline identificirati pravočasno. Določanje povzročiteljev bolezni na rastlinah je pogosto najprej vizualno, sledi potrjevanje v laboratoriju in pregled stanja. Pred razvojem bolezenskih znamenj je povzročitelje bolezni možno odkriti le z ustreznimi

laboratorijskimi metodami. Zanašanje na včasih dolgotrajna laboratorijska testiranja lahko povzroči velike zamude pri izvedbi ustreznih preventivnih ukrepov. Trenutno je na razpolago malo detekcijskih metod, ki bi bile uporabne na terenu, pa še te so pogosto premalo občutljive, preveč zahtevne in predrage. Z namenom reševanja teh problemov, smo v okviru tega projekta razvijali nove molekularne metode, primerne za uporabo na terenu, ki temeljijo na detekciji tarčnih zaporedij nukleinskih kislin, in sicer metode za detekcijo posameznega tarčnega zaporedja in metode za sočasno detekcijo več tarčnih zaporedij. Sočasna detekcija omogoča hitro iskanje ali določitev širšega spektra rastlinskih povzročiteljev bolezni. Znotraj projekta smo razvili detekcijsko metodo NAIMA, ki omogoča sočasno detekcijo več tarčnih sekvenc, neodvisno od tipa nukleinske kisline (DNA ali RNA). Prednost metode NAIMA je, da je izotermna in zato za izvedbo ne potrebujemo dragih aparatov, zaradi česar je primerna tudi za določanje rastlinskih povzročiteljev bolezni neposredno na terenu. Dodatno smo razvili metode za hitro detekcijo posameznih tarčnih sekvenc v kombinaciji s primernim prenosnim sistemom, ki temelji na izotermalnem pomnoževanju posredovanem z zanko (LAMP). V projektu smo se osredotočili na določanje tistih rastlinskih povzročiteljev bolezni, ki predstavljajo grožnjo za rastline, ki so ekonomsko pomembne za Slovenijo in Evropsko unijo, kot sta rjava gniloba in obročkasta gniloba krompirja (povzročitelj *Ralstonia solanacearum*) ali viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd). Poleg obeh omenjenih metod za pomnoževanje in detekcijo, smo preizkusili tudi nov sistem določanja nukleotidnega zaporedja (SOLiD), kot alternativno orodje za potrditev. Pokazali smo, da lahko preko pridobljenih nukleotidnih zaporedij natančno določimo prisotnost virusa v okuženem vzorcu. Verjamemo, da bodo novo razvite tehnike pripomogle k boljšem nadzoru povzročiteljev bolezni na rastlinah, hkrati pa so tehnike prenosljive in uporabne tudi na drugih področjih, kot na primer zdravje ljudi, veterina, epidemiologija človeških bolezni in kontrola hrane.

ANG

An emergent number of new plant pathogens (or existing ones but from different geographical locations) is expected in the near future, due to the impact of climate change and expansion of trade networks. Because they evolve in response to control methods, plant pathogens find new reservoirs and host plants that must be identified for efficient plant disease control. Plant pathogen detection is often done visually, followed by laboratory confirmation and subsequent monitoring. Before symptom development, detection tools are the only available solutions. Reliance on sometimes lengthy laboratory testing can cause significant delays in preventive actions. A small number of detection tools are currently available for field use, many of which have serious shortcomings in terms of sensitivity, complexity or cost. To solve these issues, we have, within this project, developed new molecular methods, suitable for field use, and based on detection of target sequences of nucleic acids, enabling detection of individual target or more targets at the same time (multiplexing). Multiplex methods enable fast detection and identification of wider range of plant pathogens. In the course of the project, we have developed a NAIMA procedure that enables simultaneous detection of multiple target sequences independent of nucleic acid type (DNA or RNA). The advantage of the NAIMA method is that it is isothermal and therefore no expensive apparatus is needed for work, which makes it also suitable for the determination of plant pathogens directly in the field. In addition, we have developed a method for rapid detection of specific target sequences in combination with a suitable portable system, which is based on loop mediated isothermal amplification (LAMP). In this project, we focused on detection of those plant pathogens that pose a threat to plants of economic importance for Slovenia and the European Union, such as brown rot and ring rot of potato (caused by *Ralstonia solanacearum*) and Potato spindle tuber viroid (PSTVd). Together with these methods for amplification and detection, we also tested a next generation

sequencing (NGS) platform (SOLiD) as an alternative tool to confirm the presence of pathogens. We have shown that with the use of NGS, we can detect the presence of the pathogen in the infected sample. We believe that the newly developed techniques will contribute to better control of pathogens on plants and at the same time these techniques are transferable and useful also in other areas, such as human health, veterinary medicine, epidemiology, human disease and food control.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Poročilo o realizaciji

V projektu smo si kot glavni cilj zadali razvoj novih molekularnih metod za določanje RNA in DNA ciljnih karantenskih rastlinskih povzročiteljev bolezni. Želeli smo razviti enostavno metodologijo, ki bo omogočala hitro določanje neposredno na terenu. Kot primarne uporabnike teh tehnik vidimo inšpekcijske službe in nacionalne organizacije za varstvo rastlin za hitro detekcijo na terenu, epidemiologe za raziskave na terenu, in tiste uporabnike, ki niso usposobljeni za uporabo zahtevnejših molekularnih metod. Ob začetku projekta smo predvidevali le razvoj NAIMA metode, vendar smo se tekom projekta, na podlagi razvoja novih metod, odločili tudi za razvoj LAMP testov, ki so prav tako izotermalni in omogočajo delo na terenu. Novo razvite metode smo objavili v znanstvenih člankih, med katerimi je bil članek o metodi NAIMA objavljen v znanstveni reviji, ki je na prvem mestu na svojem področju.

Delo je bilo razdeljeno na štiri večje sklope, in sicer 1) razvoj RNA/DNA amplikonov za eno ali večtarčno pomnoževanje izbranih rastlinskih povzročiteljev bolezni, 2) izbira, razvoj in testiranje enostavne in hitre metode za izolacijo, pomnoževanje in določanje DNK / RNA na terenu, 3) prilagoditev razvite metode za diagnostiko na terenu in 4) uporaba sistema za določanje zaporedja nove generacije (SOLiD) kot alternativno orodje za določanje prisotnih patogenov ali za potrditev rezultata.

Načrtovanje amplikonov za RNA in DNA tarče

Pri razvoju novih metod za določanje DNA ali RNA tarč v vzorcu, je zaradi zagotovitve dobre učinkovitosti in specifičnosti, izredno pomembno dobro načrtovanje amplikonov. Za RNA tarče so bili na specifičnih ohranjenih regijah zaporedja viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd) načrtovani štirje amlikoni. Za DNA tarče je bilo na specifičnih ohranjenih regijah zaporedja *Ralstonia solanacearum* dizajniranih pet amplikonov. Začetni oligonukleotidi in amplikoni so bili *in silico* preverjeni za možne primere prisotnosti sekundarnih struktur z uporabo DINAMelt Web Server. Odsotnost navzkrižne homologije začetnih oligonukleotidov in amplikonov je bila potrjena s preverbo na strani NCBI nucleotideBLAST. Vsi amplikoni, ki so prestali *in silico* analizo so bili nato še eksperimentalno preverjeni in le eden je bil izbran za nadaljnje poskuse.

Razvoj in testiranje novih metod izolacije, pomnoževanja in določanja ter prilagoditev metod za določanje na terenu

Izolacija nukleinskih kislin

Izolacija nukleinskih kislin je pomemben izziv v vseh rutinskih diagnostičnih preiskav, ki temeljijo na postopkih molekularne biologije. Pogosto so vsi nadaljnji koraki odvisni od izolacije nukleinskih kislin, predvsem od koncentracije nukleinskih kislin in morebitnih inhibitorjev, ki ostanejo prisotni po izolaciji. Običajno ta korak zahteva veliko dela, ki za delo na terenu ni primerno. Želeli smo izbrati najbolj obetaven protokol za izolacijo DNA in RNA, ki bi ustrezal zastavljenim merilom (minimalno ravnanje z vzorcem, minimalna uporaba strupenih spojin). Kot referenčno metodo smo uporabili klasične komercialne komplete. Testirali smo več različnih metod izolacije, med katerimi je večina vključevala postopek homogenizacije materiala, nadaljnji postopki čiščenja pa o bili minimalizirani ali

povsem opuščeni. Potrebna čistost izolirane nukleinske kisline je v veliki meri odvisna nadaljnjih postopkov. Za namen novo razvite metode NAIMA smo za izolacijo RNA uporabili klasičen komercialni komplet, ki se je izkazal kot najbolj primeren, kot DNA vzorec pa smo lahko uporabili suspenzijo bakterij, ki smo jo kratek čas denaturirali pri visoki temperaturi, tako da uporaba kompletov za izolacijo ni bila več potrebna. Za namen novo razvite metode LAMP, smo uspeli postopek izolacij skrajšati na minimum, saj smo pokazali, da metoda deluje, če uporabimo prevrete bakterija, v pufru zredčen homogenat vzorca ali neposredno sok iz rastlinskega materiala, kar lahko pridobimo že s preprostim mletjem vzorca skupaj s pufrom. Tak način je izredno primeren za delo na terenu, saj zanj ne potrebujemo posebnih aparatov in kemikalij.

NAIMA

Znotraj projekta smo razvili nov postopek NAIMA, ki omogoča hkratno pomnoževanje DNA in RNA tarč. To smo dosegli z izboljšanjem različnih eksperimentalnih korakov in uporabljenih kemikalij. Med optimizacijo smo testirali različne začetne oligonukleotide, tako specifične za prvi korak, kot univerzalne za drugi korak. Izbrali smo sistem pomnoževanja z največjo učinkovitostjo, kar smo sproti preverjali s PCR v realnem času. DNA amplikon je v našem primeru predstavljala bakterija *Ralstonia solanacearum*, medtem ko smo kot RNA tarčo uporabili viroid PSTVd. Specifičnost pomnoževanja smo določili na vzorcih večjega števila različnih izolatov viroidov in različnih bakterijskih vrstah ter sevih. Pokazali smo, da je občutljivost pomnoževanja primerljiva z metodami, ki so trenutno v uporabi v diagnostičnih laboratorijih.

Da bi omogočili zaznavanje produktov po pomnoževanju v NAIMA postopku, smo pregledali trenutno dostopne tehnologije. Naš cilj je bil izbor takšnega sistema, ki bi skupaj s pomnoževanjem omogočal določanje patogenov na mestu vzorčenja. V sodelovanju s partnerjem FERA iz Velike Britanije, smo se odločili za sistem določanja in identifikacije različnih NAIMA produktov na prenosnih sistemih mikromrež, ArrayTube (sistem mreža-epruveta od Alere Technologies GmbH, Jena, Nemčija). V ta namen smo na podlagi NAIMA amplikonov, izbranih za pomnoževanje, načrtovali več različnih sond. V sodelovanju s partnerjem FERA smo razvili protokol hibridizacije produktov pomnoževanja na mikromreže. Skeniranje mikromrež poteka v izredno majhnem namiznem aparatu, ki se ga lahko preko USB priključka priključi v računalnik. Z izvedbo celotnega NAIMA postopka smo nato preverili občutljivost in specifičnost določanja na mikromrežah. Pokazali smo, da je postopek NAIMA za hkratno pomnoževanje PSTVd in *R. solanacearum* za odtenek bolj specifičen kot individualna metoda za določanje s PCR v realnem času. Prav tako je bila z reakcijo s PCR v realnem času primerljiva občutljivost za PSTVd, medtem ko je bila občutljivost za *R. solanacearum* nekoliko nižja, še vedno pa smo uspeli določiti tisti nivo omenjene bakterije, ki je običajen za simptomatične vzorce.

Z vsemi testi smo pokazali, da je nova metoda NAIMA primerna za izotermalno pomnoževanje RNA in DNA tarč hkrati ter da je metoda zaradi potrebne opreme uporabna tudi za določanje na terenu. Obenem pa je metoda razširljiva v smislu večtarnosti, kot je tudi prenosljiva na druga področja.

LAMP

Z vključitvijo LAMP testov smo sledili pojavu alternativnih izotermalnih in enostavnih testov za odkrivanje povzročiteljev bolezni, ki so uporabni na terenu in dajo rezultat v zelo kratkem času. Tudi za te teste smo kot ciljna organizma izbrali PSTVd in *R. solanacearum*.

Za določanje PSTVd smo razvili metodo, kjer reakcijo spremljamo v realnem času v eni epruvetki in temelji na reverzni transkripciji povezani z zanko posredovanim izotermalnim pomnoževanjem (RT-LAMP). Z razvitim testom smo lahko uspešno določili PSTVd, ki je eden od karantenskih patogenov krompirja v Evropi in Severni Ameriki. Potrdili smo tako dobro specifičnost kot tudi občutljivost testa. Specifičnost lahko dodatno podkrepimo z analizo talilne krivulje produkta. Metoda se je pokazala za 10-krat bolj občutljivo kot običajna reverzna transkripcija sklopljena z verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR).

Prednosti nove metode so, ne le hitrost reakcije (15-25 minut do rezultata) in stroškovna učinkovitost (ki izhaja iz prihranjenega časa in cenejšega potrošnega materiala), temveč tudi sposobnost, da se uporablja na terenu s pomočjo prenosnega instrumenta.

Za določanje *R. solanacearum* z metodo z zanko posredovanega izotermalnega pomnoževanja (LAMP) smo preverili uspešnost pomnoževanja, če so ciljne tarče različni geni (16S rRNA, *fliC* in *EGL*). Poleg primerjanja uspešnosti pomnoževanja smo metodo ocenili v smislu uporabnosti na terenu. Kot najbolj učinkovita tarča se je izkazal gen *EGL*, saj smo z uporabo te tarče dosegli visoko analitično občutljivost za različne seve *R. solanacearum* (tudi neevropske in seve biovara 2). V postopek uporabe te metode lahko vključimo tudi analizo talilne krivulje produkta, kar omogoča dodatno potrditev specifičnosti rezultatov. Po obsežnih testiranjih smo pokazali, da lahko test *EGL* LAMP uporabimo z minimalnim naporom priprave vzorca (inkubacija nekaj minut na 100°C) za določanje iz čistih bakterijskih kultur ali izločka simptomatskih vzorcev. Metoda zaradi svoje hitrosti omogoča tudi visoko zmogljivo delo tudi v laboratoriju. Z razvojem te metode smo doprinesli k občutljivemu in zanesljivemu odkrivanju sevov *R. solanacearum* iz različnih filotipov. Ta metoda tako predstavlja dobro orodje za preprečevanje ekonomskih izgub, ki nastanejo zaradi bakterijskih bolezni, v primerih, kjer kontrola temelji na odstranitvi okuženega materiala iz proizvodnje.

Uporaba sistema za določanje zaporedja nove generacije (SOLiD) kot alternativno orodje za določanje prisotnih patogenov ali za potrditev rezultata

Določanje prisotnosti patogenov v rastlinskih vzorcih lahko izvedemo tudi na način, ki ne vključuje klasičnih metod pomnoževanja in detekcije. Nedavno so bile razvite nove generacije sistemov za določanje nukleotidnega zaporedja. Znotraj projekta smo želeli uporabiti te nove sisteme (npr. SOLiD), za ugotavljanje tujih nukleinskih kislin (DNK ali RNK) v danem organizmu. V ta namen, smo s sofinancerjem, podjetjem Omega d.o.o., vzorce različnih zdravih kultivarjev krompirja in enakih kultivarjev okuženih z vrusom Y krompirja poslali na sekvenciranje po novi metodi določanja nukleotidnega zaporedja SOLiD.

Področje določanja zaporedja nove generacije (NGS) je v preteklih nekaj letih dramatično napredovalo, s tem pa so se pojavile tudi nove možnosti za bolj učinkovito analizo podatkov. Izkazalo se je, da tehnika računalniškega odštevanja gostiteljskega genoma ne predstavlja učinkovitega pristopa k analizi podatkov pri zaznavanju rastlinskih patogenov iz rezultatov NGS. Za iskanje virusnih zaporedij v veliki količini podatkov smo zato uporabili uporabni dva načina, ki se glede na študije kažeta kot najbolj učinkovita. (1) Analizirali smo rezultate sekvenciranja totalne RNA izolirane iz okužene rastline in (2) rezultate sekvenciranja malih RNA izoliranih iz okužene rastline. Pokazali smo, da oba pristopa omogočata učinkovito detekcijo virusnih zaporedij v okuženih vzorcih, pri čemer se je sestavljanje virusnega genoma iz malih RNA izkazalo za učinkovitejše. Rezultate smo predstavili v obliki prispevka na konferenci. Rezultati analiz bodo pripomogli k nadaljnjemu razvoju učinkovitih metod za odkrivanje znanih in neznanih rastlinskih povzročiteljev bolezni.

Organizacija dela in sodelovanje s tujino:

Projekt, predvsem optimizacija izolacije nukleinskih kislin in razvoj metod NAIMA in LAMP, se je v glavnem izvajal na NIB. V projektu so sodelovali slovenski raziskovalci, specialisti rastlinske virologije in bakteriologije, molekularne biologije in diagnostične mikrobiologije, kar je omogočalo učinkovit interdisciplinarni pristop. Naš sofinancer Omega d.o.o. sledi hitro razvijajočim se metodam molekularne diagnostike (SOLiD). Na področju rastlinskih povzročiteljev bolezni in rastlinske molekularne biologije smo razširili naše sodelovanje s pomembnimi evropskimi inštitucijami kot je FERA (Dr. Neil Boonham) v Veliki Britaniji. Naše dolgoletne izkušnje na področju določanja GSO in dobro sodelovanje z inštitucijami, ki imajo izkušnje z diagnostičnimi sistemi, kot je FERA (Array-Tubes), so zagotovile dragoceno izmenjavo informacij. Sodelujoči v projektu smo okrepili

stike, kar predstavlja dobro podlago za sodelovanje tudi v prihodnjih projektih.

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

Projekt je potekal po predvidenem planu. Glavni cilj, ki smo si ga zadali je bil dosežen, saj nam je uspelo razviti nove protokole, ki omogočajo odkrivanje ciljnih rastlinskih patogenov, neodvisno od tipa genoma (DNA ali RNA). To smo dosegli z razvojem novih metod LAMP in NAIMA za določanje bakterije *Ralstonia solanacearum* in viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd). Novo razvita metoda NAIMA omogoča hkratno izotermalno pomnoževanje RNA in DNA tarč ter njihovo hkratno detekcijo, medtem ko je prednost metode LAMP v njeni hitrosti, saj v povprečju traja 20 minut. Novo razvite metode so se pokazale kot hitre, zanesljive in občutljive, prav tako pa lahko vse uporabljamo tudi na terenu, s čimer smo dosegli cilj, da bi metode lahko uporabljali tudi inšpektorji na sami lokaciji vzorčenja. V sodelovanju s sofinancerjem Omega d.o.o. smo dosegli zastavljeni cilj in uspeli pokazati, da lahko določanje nukleotidnega zaporedja po novih metodah, služi kot orodje za potrditev prisotnosti patogena v rastlinskem tkivu. Organiziranost projekta se je izkazala kot odlična, saj je komunikacija med partnerji in sofinancerjem, podjetjem Omega d.o.o., potekala nemoteno. Vsi rezultati projekta so bili, ali pa bodo v kratkem objavljeni v znanstvenih revijah in/ali konferencah ter v pripadajočih knjigah povzetkov.

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

V prijavi projekta smo omenili, da bi se v primeru slabih rezultatov z metodo NAIMA obrnili na druge metode, kot je na primer z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje (LAMP). Metoda NAIMA je pokazala dobre rezultate, ker pa je razvoj na področju LAMP izjemno hitro napredoval, metoda pa je po principu komplementarna metodi NAIMA, smo se odločili, da tudi metodo LAMP vključimo v projekt. LAMP pomnoževanje je izotermalno, zaznavanje produktov pa je lahko vizualno ali preko fluorescentnih barvil. V našem primeru smo uporabljali prenosno aparaturu Genie II, ki omogoča pomnoževanje in zaznavanje na edinstven, prenosen in uporabniku prijazen način. Metodo LAMP smo uspešno uporabili za določanje karantenskih rastlinskih patogenov, ki imajo genom v RNA ali DNA obliki. Metodo LAMP za določanje PSTVd smo že objavili v znanstveni reviji, članek o metodi LAMP za *R. Solanacearum* pa je tudi že sprejet in je v fazi oddajanja popravkov.

V zadnjem letu izvajanja projekta je zaradi zamenjave zaposlitve prišlo do zamenjave na mestu vodje projekta, in sicer je mesto dr. Dany Morisseta prevzel dr. Jon Gutierrez Aguirre. Delo je kljub zamenjavi potekalo nemoteno in po predvidenem planu.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	3071055	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Simultano zaznavanje RNA in DNA tarč preko hkratnega izotermnega pomnoževanja
		ANG	Simultaneous detection of RNA and DNA targets based on multiplex isothermal amplification
			Odkrivanje patogenih mikroorganizmov, prisotnih v hrani, krmi, rastlinah in drugih vzorcih je pomembno za zagotavljanje varne hrane, kot tudi za preprečevanje širjenja mikrobov. S ciljem hkratnega določanja patogenov z

	Opis		SLO	genomom v obliki RNA ali DNA, smo razvili nov postopek NAIMA, ki je primeren za istočasno večtarčno pomnoževanje RNA in DNA tarč, skupaj z zaznavanjem na mikromrežah v obliki ArrayTubes. Pokazali smo, da je metoda zelo občutljiva in specifična za odkrivanje dveh gospodarsko pomembnih karanteni rastlinskih patogenov krompirja, viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (RNA tarča) in bakterije <i>Ralstonia solanacearum</i> (DNA tarča). Zaradi izotermnega pomnoževanja in enostavne opreme, ki je potrebna, je metoda uporabna tudi na terenu. NAIMA se lahko uporablja na vseh področjih, kjer je potrebno določanje DNA in RNA tarč hkrati.
			ANG	In this article we describe the development of an isothermal nucleic acid sequence based amplification [NASBA] implemented microarray analysis (NAIMA) procedure, suitable for the simultaneous multiplex amplification of RNA and DNA targets, coupled with the detection on ArrayTubes. The method is demonstrated to be very sensitive and specific for the detection of two economically important quarantine plant pathogens of potato, the potato spindle tuber viroid (RNA target) and <i>Ralstonia solanacearum</i> (DNA target). Because of its isothermal amplification and simple detection equipment, the method is also applicable for on-site analyses. NAIMA can be used in any domain where there is the need to detect RNA and DNA targets simultaneously.
	Objavljeno v			American Chemical Society, Books and Journals Division; Journal of agricultural and food chemistry; 2014; Vol. , no.; 30 str., [in press]; Impact Factor: 2.906; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.832; A'': 1; A': 1; WoS: AH, DW, JY; Avtorji / Authors: Dobnik David, Morisset Dany, Lenarčič Rok, Ravnikar Maja
	Tipologija			1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID		2683727	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Hitro določanje viroida vretenatosti krompirja z RT-LAMP metodo v realnem času	
		ANG	Fast real-time detection of Potato spindle tuber viroid by RT-LAMP	
	Opis	SLO	Članek opisuje razvoj testa za določanje viroida vretenatosti krompirja (PSTVd), ki je karantenski patogen krompirja v Evropi in Severni Ameriki, z uporabo reverzne transkripcije in z zanko posredovanega izotermnega pomnoževanja (RT-LAMP) v realnem času in v eni epruvetki. Metoda omogoča določanje širokega spektra PSTVd izolatov in je približno 10-krat bolj občutljiva kot običajna z reverzno transkripcijo povezana verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR). Prednosti metode pa niso samo v hitrosti (15-25 minut do rezultata) in cenovni učinkovitosti (prihranek na času in cenejšega potrošnega materiala), ampak tudi v možnosti uporabe metode na terenu z uporabo prenosnega instrumenta.	
		ANG	This work describes the development of a single tube, real-time, reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detecting Potato spindle tuber viroid (PSTVd), one of the quarantine pathogens of potato in Europe and North America. The method enables detection of a broad range of PSTVd isolates, and is about 10 times more sensitive than the conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Its benefits are not only its speed (15–25 min to obtain results) and cost effectiveness (resulting from time saved as well as cheaper consumables), but also its demonstrated ability to be performed in the field, using portable instruments.	
	Objavljeno v		Her Majesty's Stationery Office; Plant Pathology; 2013; Vol. 62, issue 5; str. 1147-1156; Impact Factor: 2.729; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.239; A'': 1; WoS: AM, DE; Avtorji / Authors: Lenarčič Rok, Morisset Dany, Mehle Nataša, Ravnikar Maja	
	Tipologija		1.01	

		Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	Se ni v Cobissu	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Z zanko posredovano izotermno pomnoževanje specifičnega zaporedja endoglukanaznega gena za določanje bakterije <i>Ralstonia solanacearum</i>
		ANG	Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen <i>Ralstonia solanacearum</i>
	Opis	SLO	Za preprečevanje ekonomskih izgub v povezavi z bakterijskimi boleznimi, kjer je njihova zajezeitev odvisna od izločitve okuženega materiala iz proizvodnje, so potrebni hitri, enostavni in cenovno učinkoviti testi. V tem članku smo primerjali in ocenili uporabo metode z zanko posredovanega izotermnega pomnoževanja (LAMP), ki ciljajo gene 16S rRNA, fliC in egl. Pokazali smo, da je imela najboljše pomnoževanje metoda, ki cilja gen egl, ki je pokazal visoko analitično specifičnost za različne seve bakterije <i>Ralstonia solanacearum</i> . Glede na našo obširno eksperimentalno oceno, test egl LAMP zahteva minimalno pripravo vzorca (nekaj minut vretja) za identifikacijo iz čiste kulture ali bakterijskega izločka iz simptomatskega materiala. Metoda je obenem tudi za visoko zmogljiva. S to metodo smo omogočili občutljivo in zanesljivo določanje različnih sevov in različnih filotipov bakterije <i>R. solanacearum</i> .
		ANG	To prevent the economic losses related to bacterial plant diseases where their management relies on removal of the infected material from production, simple, easy-to-perform, rapid and cost-effective tests are needed. In this article, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays that target 16S rRNA, fliC and egl genes were compared and evaluated as on-site applications. The assay with the best performance was that targeted to the egl gene, which shows high analytical specificity for diverse strains of the betaproteobacterium <i>Ralstonia solanacearum</i> . According to our extensive assessment, the egl LAMP assay requires minimum sample preparation (a few minutes of boiling) for the identification of pure cultures and ooze from symptomatic material, and it can also be used in a high-throughput format in the laboratory. This provides sensitive and reliable detection of <i>R. solanacearum</i> strains of different phylotypes.
	Objavljeno v	Accepted in press in, PLOS-ONE. R. Lenarčič, D. Morisset, M Pirc, P. Llop, M. Ravnikar and T. Dreo. 2014.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	2522447	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	PCR v realnem času, metoda uporabna za določanje in kvantifikacijo bakterije <i>Erwinia amylovora</i>
		ANG	Real-time PCR, a method fit for detection and quantification of <i>Erwinia amylovora</i>
	Opis	SLO	Hrušev ožig, uničujoča bolezen dreves pečkatega sadja, še vedno predstavlja grožnjo kmetijski proizvodnji. Določanje povzročitelja, bakterije <i>Erwinia amylovora</i> , je v simptomatičnih vzorcih precej neposredno. V nekaterih primerih pa so za določanje <i>E. amylovora</i> potrebne metode z večjo občutljivostjo. Testi s PCR v realnem času so pokazali, da so zadostno občutljivi in zanesljivi. V članku smo povzeli naše rezultate v povezavi z določanjem hruševega ožiga s PCR v realnem času, obenem pa smo predstavili nove, hitre in občutljive teste za PCR v realnem času
		ANG	Fire blight, a devastating disease of pome fruit trees continues to pose threat to agricultural production. Detection of its causative agent, bacterium <i>Erwinia amylovora</i> , is usually straightforward in symptomatic samples. Methods with increased sensitivity however, are sometimes needed for detection of <i>E. amylovora</i> and realtime PCR assays have been

		shown to have required sensitivity and reliability. Here we summarize our previous results on realtime PCR detection of fire blight and present new, fast and sensitive realtime PCR assay.
	Objavljeno v	Springer International; Springer; Trees; 2012; Vol. 26, no. 1; str. 165-178; Impact Factor: 1.925; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.114; A': 1; WoS: KA; Avtorji / Authors: Dreo Tanja, Pirc Manca, Ravnikar Maja
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	2345551 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> MPIC: Analitična metoda visoke zmogljivosti za sočasno detekcijo DNK tarč <i>ANG</i> MPIC: A High-Throughput Analytical Method for Multiple DNA Targets
	Opis	<i>SLO</i> Opisujemo razvoj novega kombiniranega pristopa visoke zmogljivosti za hkratne analize DNA tarč, ki sloni na sočasnem mikrokapljičnem PCR z uporabo kapilarne gelske elektroforeze (MPIC), kar predstavlja dvostopenjsko strategijo PCR pomnoževanja. Ob uporabi genetsko modificiranih organizmov kot modela je bila ugotovljena zmožnost sočasne detekcije 24 DNA tarč z relativno mejo detekcije 0,1% (w/w) in absolutno mejo detekcije 39 DNA tarč. Opisani sistem predstavlja obetavno alternativo za visoko zmogljive analize več hkratnih DNA tarč. <i>ANG</i> We describe the development of a novel combined approach for high-throughput analysis of multiple DNA targets based on multiplex Microdroplet PCR Implemented Capillary gel electrophoresis (MPIC), a two-step PCR amplification strategy. Using genetically modified organism (GMO) analysis as a model, 24 DNA targets can be simultaneously detected with a relative limit of detection of 0.1% (w/w) and absolute limit of detection of 39 target DNA copies. The described system provides a promising alternative for high-throughput analysis of multiple DNA targets.
	Objavljeno v	American Chemical Society; Analytical chemistry; 2011; Vol. 83, issue 5; str. 1579-1586; Impact Factor: 5.856; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.215; A': 1; WoS: EA; Avtorji / Authors: Guo Jinchao, Yang Litao, Chen Lili, Morisset Dany, Li Xiang, Pan Liangwen, Zhang Dabing
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	2891855 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Razvoj hitrih in enostavnih diagnostičnih testov za določanje povzročiteljev rastlinskih bolezní na terenu <i>ANG</i> Development of fast and simple diagnostic tests for field detection of plant pathogens.
	Opis	<i>SLO</i> Prepoznavanje bolezní in njihovih povzročiteljev na terenu poteka predvsem z vizualnim pregledom. Za potrditev suma pa je največkrat potrebna še dodatna laboratorijska diagnostika. Še posebno je to pomembno v primeru mikrobnih povzročiteljev bolezní kjer je potrebno za njihovo potrditev uporabiti serološke, molekularne in druge laboratorijske tehnike. Da bi skrajšali čas prvega prepoznavanja prisotnosti patogenih mikroorganizmov so se že pred leti na terenu pričeli uporabljati hitri diagnostični testi, sprva serološki v zadnjem času pa tudi molekularni. Velik korak k učinkoviti diagnostiki na terenu pa je prispeval razvoj hitre molekularne metode LAMP, ki poteka pod pogoji konstantne temperature in

			se zato za njeno izvedbo uporablja enostaven fluorimeter. Metoda LAMP je manj občutljiva na inhibitorje prisotne v vzorcih, zato je priprava vzorca za analizo enostavnejša. Teste razvijamo v okviru dveh evropskih projektov Vitisens in Q-detect. Razvite teste bo mogoče prilagoditi za enostavno uporabo tako v laboratoriju kakor tudi pri pridelovalcih, v skladiščih, letališčih, pristanišču in na mejnih prehodih.
		ANG	Discovery of diseases and their causes in the field is performed with visual inspection. To confirm the presence, the laboratory diagnostics is often required. This is specially unavoidable in the case of plant pathogens, where use of serological, molecular or other laboratory methods is needed. To shorten the time of first plant pest recognition, fast, serological and later molecular on-site detection methods were developed. The major progress was reached with the development of fast, molecular method LAMP, which can be performed under constant temperature, therefore simple fluorimeter is used for detection of LAMP product. The method is less prone to inhibitors; therefore the sample preparation could be faster and simple. The tests are developed in the frame of two European projects Vitisens and Qdetect. Developed test could be adapted for easy use in the laboratory, at the production site, warehouses, airports, ports and country borders.
		Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
		Objavljeno v	Društvo za varstvo rastlin Slovenije = Plant Protection Society of Slovenia; Zbornik predavanj in referatov 11. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo (in Okrogle mize o zmanjšanju tveganja zaradi rabe FFS v okviru projekta CropSustaIn), Bled, 5.-6. marec 2013; 2013; Str. 429-433; Avtorji / Authors: Lenarčič Rok, Kogovšek Polona, Ravnikar Maja
		Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
2.	COBISS ID	30821081	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Določanje zaporedja nove generacije za odkrivanje rastlinskih patogenih virusov
		ANG	Next generation sequencing (NGS) for the discovery of plant pathogenic viruses
	Opis	SLO	Na področju rastlinske virologije je bilo izvedenih več študij z uporabo NGS tehnologij za odkrivanje novih povzročiteljev bolezni. Eden od najbolj pomembnih trenutnih fokusov tega področja je navezava s pripravo vzorca. Obogatitev virusnih nukleinskih kislin med pripravo vzorca lahko močno olajša analitični korak in zmanjša stroške celotnega procesa. V ta namen se lahko uporabijo različni pristopi, kot so: subtraktivna hibridizacija, obogatitev za dvoverižno RNA, sekvenciranje majhnih RNA in čiščenje virusnih delcev. A primerjava teh metod še vedno ni bila izvedena. Tako smo testirali uporabnost celokupne RNA in sekvenciranje majhnih RNA s SOLiD platformo za odkrivanje krompirjevega virusa Y (PVY) v rastlinah krompirja. Oba pristopa sta prinesla zadostno količino podatkov za zanesljivo odkrivanje PVY. Rezultati so bili predstavljeni na konferenci slovenskega biokemijskega društva.
		ANG	In plant virology several studies have been carried out using NGS technologies for the detection of new pathogens. One of the most important current focuses in the field is the one dealing with sample preparation. The enrichment for viral nucleic acids during sample preparation could greatly facilitate the analytical step and reduce the cost of the entire process. Different approaches can be adopted, such as: subtractive hybridization, enrichment for double stranded RNA, small RNA sequencing and purification of viral particles. However, their evaluation and comparison are still missing. We tested the utility of total RNA and small RNA deep sequencing on the SOLiD sequencing platform for the detection of Potato virus Y (PVY) in potato plants. Both approaches yielded sufficient amount of information

		for reliable PVY detection. Results were disseminated in the Slovenian biochemical society conference.
	Šifra	F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
	Objavljeno v	Slovenian Biochemical Society; Book of abstracts; 2013; Str. 120; Avtorji / Authors: Kutnjak Denis, Dobnik David, Morisset Dany, Kovač Minka, Petek Marko, Rupar Matevž, Gutierrez-Aguirre Ion, Gruden Kristina, Ravnikar Maja
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
3.	COBISS ID	29518809 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Razvoj novih diagnostičnih tehnik za patogene organizme in sodelovanje v projektu Qdetect (7. okvirni program EU)
		ANG Development of new diagnostic techniques for plant pathogens and participation to the 7th framework project Qdetect
	Opis	SLO V okviru Oddelka vodi Maja Ravnikar diagnostični laboratorij za uradno diagnostiko karantenskih in drugih rastlinskih patogenih mikroorganizmov, ki se izvajajo za potrebe državne uprave (FURS in inšpekcije) in podjetij. Poleg izobraževanja tujcev v laboratoriju pripravljamo strokovna mnenja in analize za mednarodne organizacije s področja rastlinske patologije. Skrbimo za strokovno podporo državni upravi, izobraževanje inšpektorjev in stike z mediji ob epidemijah – hrušev ožig. V letu 2010 sta Dany Morisset in Maja Ravnikar začela sodelovati v novem projektu Qdetect (7. okvirni program EU).
		ANG In the frame of the Department of Biotechnology and Systems Biology, Maja Ravnikar is leading the laboratory for official detection of quarantine and other plant pathogens. The laboratory performs diagnostics and scientific support for Phytosanitary Administration of the Republic of Slovenia, Phytosanitary Inspection Service and commercially. The laboratory takes part in expert support to state administration, education of inspectors and public relations in the case of epidemics. In 2010, Dany Morisset and Maja Ravnikar started their activities within the new 7th framework project Qdetect.
	Šifra	D.08 Upravljanje in razvoj raziskovalnega dela
	Objavljeno v	EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization = OEPP - Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes; EPPO/Q-DETECT Workshop for phytosanitary inspectors, 2011-11-16/18, Padova; 2011; Str. 8; Avtorji / Authors: Lenarčič Rok, Morisset Dany, Dreo Tanja, Ravnikar Maja
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
4.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO Razširitev obsega akreditacije na področje mikrobiologija (molekularne metode).
		ANG Extending the scope of accreditation to the field of microbiology (molecular methods).
	Opis	SLO Laboratorij je od leta 2003 akreditiran pri Slovenski akreditaciji (reg. št. LP028) za področje določanja gensko spremenjenih organizmov. V letu 2012 je laboratoriju uspelo razširiti akreditacijo tudi na področje določanja mikroorganizmov. Za obe področji je obseg akreditacije delno fleksibilen, kar omogoča, da laboratorij po potrebi uvede nove metode in jih uvrsti na seznam akreditiranih metod. Podeljena akreditacija še dodatno povečuje tako prepoznavnost laboratorija v svetu kot možnosti sodelovanja na mednarodnem nivoju.
		The laboratory is accredited since 2003 by Slovenian Accreditation (Reg. no. LP028) for the domain of genetically modified organisms. In 2012,

		ANG	the laboratory accreditation also managed to expand the domain of accreditation to microorganisms. For both areas, the scope of accreditation is partially flexible, allowing the laboratory to introduce, if necessary, new methods and add them to the list of accredited methods. Granted accreditation further enhances the visibility of the laboratory in the world and the possibilities of cooperation at the international level.
	Šifra		D.05 Akreditacija laboratorija
	Objavljeno v		Slovenska akreditacija http://www.sloakreditacija.si/lp000/media/lp028.pdf
	Tipologija		2.15 Izvedensko mnenje, arbitražna odločba
5.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Organizacija večih mednarodnih delavnic na temo uporabe najnovejših molekularnih metod v diagnostiki rastlinskih povzročiteljev bolezni
		ANG	Organization of numerous international workshops dealing with the use of state of the art molecular methods in plant pathogen diagnostics
	Opis	SLO	Zadnja je potekala V Ljubljani od 3. - 6. decembra 2013. V mednarodni delavnici za visoko tehnološke raziskave in molekularno diagnostiko rastlinskih povzročiteljev bolezni z uporabo metode PCR v realnem času, so naši strokovnjaki svoje znanje in izkušnje delili z raziskovalci iz mnogih evropskih držav (Avstrija, Velika Britanija, Francija, Poljska, Finska, Litva, Latvija, Črna gora in Slovenija). Delavnica je potekala v soorganizaciji Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) in podjetja BioSistemika d.o.o v sodelovanju z evropskim projektom Bicopoll. qPCR delavnice združujejo odlično tehnično znanje z bogatimi praktičnimi izkušnjami v oblikovanju, validaciji in uporabi metode PCR v realnem času na področju diagnostike in raziskav v rastlinski patologiji. Delavnica vključuje osnove in najnovejša znanja. Poseben del je namenjen svetovanju udeležencem pri reševanju težav, ki jih opažajo v svojih poskusih.
		ANG	The last international workshop on high technology research and the molecular diagnostics of pathogens using real-time PCR was held in Ljubljana from 3rd to 6th December 2013. This international workshop was co-organized by the Slovenian National Institute of Biology (NIB) and BioSistemika d.o.o., in collaboration with the European project Bicopoll (http://www.coreorganic2.org/). qPCR Workshops integrate excellent technical knowledge with vast practical experience in design, validation and use of real-time PCR in official diagnostics and research in plant pathology. Up to date news from the field are part of the course as well as a special section of troubleshooting tailored to participants. Also this time researchers and diagnosticians from many European countries attended the workshop and benefited from the exchange of knowledge and holiday spirit in the capital of Slovenia: Austria, Great Britain, France, Poland, Finland, Lithuania, Latvia, Montenegro and Slovenia.
	Šifra		B.01 Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v		http://www.nib.si/aktualno/novice/704-delavnica-qpcr-na-podrocju-rastlinske-patologije-2013
	Tipologija		2.05 Drugo učno gradivo

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Poglobili smo tudi znanje o prenosu virusov na rastlinah, njihovih mehanizmih za zaščito pred rastlinsko obrambo, kot tudi o rastlinskem odgovoru na okužbo. Rezultati teh študij so bili objavljeni v izvirnih znanstvenih člankih.

Poleg tega smo ugotovili prisotnost škodljivega mikroorganizma za rastline (ŠO) (Xanthomas

axonopodis pv. Poinsettiicola), ki doslej ni bil prisoten na ozemlju Republike Slovenije. Rezultati tega odkritja so bili objavljeni v kratkem znanstvenem prispevku.

Sodelovali smo v center odličnosti CO BIK. Naše znanje o rastlinski mikrobiologiji, virologiji rastlin in molekularni biologiji v okviru tega sodelovanja uporabljamo za razvoj novih metod za zaščito rastlin proti bakterijskim napadom in za proizvodnjo rekombinantnih proteinov v rastlinah, z uporabo genskih elementov rastlinskih virusov.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Rezultati projekta bodo pomembno vplivali za znanstvena področja diagnostike rastlinskih patogenov in epidemiologije, hkrati pa bodo doprinesli tudi k znanstvenim dognanjem na drugih področjih diagnostike, kjer bi bila uporaba izotermalne detekcije na terenu koristna. V molekularni diagnostiki, kot tudi na drugih sorodnih področjih, so trenutni trendi in zahteve osredotočene predvsem na zmanjšanje velikosti, enostavnost uporabe in visoko zmogljivost. Rezultat projekta predstavljajo nove metode določanja rastlinskih povzročiteljev bolezni (PSTVd in *Ralstonia solanacearum*): 1) metoda NAIMA, ki omogoča hkratno pomnoževanje DNA in RNA tarč in njihovo hkratno zaznavanje; 2) metoda LAMP, ki omogoča preprosto in hitro določanje prisotnosti patogena; 3) določanje prisotnosti patogena na podlagi podatkov pridobljenih z visoko zmogljivim določanjem nukleotidnih zaporedij nove generacije.

Metode NAIMA in LAMP bodo epidemiologom omogočile, da s pomočjo terenskih izotermalnih molekularnih metod proučujejo obnašanje povzročiteljev bolezni (kot na primer, bakterijske združbe na polju) ter omogočile detekcijo in odkrivanje novih rezervoarjev povzročiteljev bolezni in gostiteljskih rastlin. Hkratno večtarčno pomnoževanje RNA in DNA tarč po metodi NAIMA, predstavlja dodatno prednost, saj je za določanje prisotnosti različnih tarč potrebna le ena reakcija. Razvita metoda je prva, ki se loti pomnoževanja RNA in DNA v enem koraku pri izotermalnih pogojih in bo tudi predvidoma visoko citirana. Metode LAMP in NAIMA so obenem zelo preproste in ne zahtevajo zapletene opreme, zato jo bodo lahko na terenu uporabljale tudi osebe brez posebnega tehničnega znanja. Te metode zaradi hitrosti in preprostosti omogočajo tudi precejšnjo cenovno učinkovitost, kar bo posledično vplivalo tudi na razvoj novih metodologij.

Prikazana uporabnost visoko zmogljivih metod za določanje nukleotidnega zaporedja bo zagotovila novo alternativno orodje za detekcijsko nukleinskih kislin in lahko postane mejnik na področju diagnostike rastlinskih patogenov, saj naj bi visoko zmogljivo določanje nukleotidnega zaporedja v bližnji prihodnosti postalo bolj dostopno.

Poleg zgoraj navedenih področij raziskav, bo rezultat predlaganega projekta prispeval tudi k razvoju drugih področij, kjer bi bila potrebna metoda hkratnega pomnoževanja DNA in RNA ter kjer so zaželjene uvedbe preprostih terenskih molekularnih metod. Takšna raziskovalna področja so okoljska virologija in bakteriologija, diagnostika GSO, diagnostika človeških in živalskih bolezni, študije epidemiologije na ljudeh/živalih in druge. Vsi rezultati bodo tako uporabni za širok spekter raziskovalnih področij.

ANG

The results of the project will have a relevant impact to the scientific fields of the plant pathogen diagnostics and epidemiology, and they will also add scientific advances to other diagnostics fields, where the application of on-site isothermal detection would be beneficial. In the molecular diagnostics as well as in other related fields, current trends and demands are focusing mainly on the reduction in size, simplicity of use, and high throughput.

The results of the project are represented by new methods for detection of plant pathogens (PSTVd and *Ralstonia solanacearum*): 1) NAIMA method, enabling simultaneous multiplex amplification and detection of RNA and DNA targets; 2) LAMP method, enabling fast and simple pathogen detection; 3) detection of pathogens based on data gathered by high-throughput next generation sequencing.

NAIMA and LAMP methods will equip epidemiologists with on-site, isothermal molecular methods that will assist them to study pathogens behaviour as well as, for example, bacterial communities in the field, detection and discovery of new pathogens' reservoirs and host plants. Simultaneous multiplex amplification of RNA and DNA targets with NAIMA method represents an

additional advantage, because only one reaction is needed for detection of both types of targets. The NAIMA method is the first method enabling isothermal amplification of RNA and DNA targets, thus it is expected to be highly cited. All LAMP and NAIMA methods are at the same time very simple and don't require complex equipment, therefore they could be used on-site by staff with no special technical skill. Due to the simplicity and short time needed for analysis, these new methods are cost-effective, what will have an impact on the development of further methods.

The shown usefulness of next generation sequencing approach makes it a new alternative tool for detection of nucleic acids that can become a landmark in the field of plant pathogen diagnostics as high-throughput sequencing is expected to become more and more affordable in the near future.

In addition to the above fields of research, the outcome of the project will contribute to the development of other fields where there is a need for simultaneous multiplex DNA and RNA amplification and where simple, on-site molecular methods would represent a benefit. Such research fields include environmental virology and bacteriology, food safety diagnostics (GMO, food pathogens...), human and animal disease diagnostics, human/animal epidemiology studies and others, therefore, the project results will be applicable to a wide spectrum of research.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Rezultati projekta bodo imeli neposreden vpliv na gospodarstvo in družbo Republike Slovenije, saj smo dosegli namen izboljšanja zgodnjega odkrivanja (in torej izkoreninjenje) karantenskih škodljivih organizmov, ki predstavljajo resnično gospodarsko in ekološko grožnjo za slovensko kmetijstvo, kot tudi v Evropski uniji in po svetu.

Rezultat projekta so nove diagnostične metode, ki so zanesljive in hitre, hkrati pa tudi enostavne in cenovno ugodne. S pomočjo teh metod bo zgodnje odkrivanje in potrjevanje rastlinskih povzročiteljev bolezni zelo pomagalo pri oblikovanju pravočasnih in učinkovitih ukrepov za varstvo rastlin, kar zmanjšuje socialno-ekonomski učinek zaradi grožnje rastlinskih patogenov. Koristi od rezultatov projekta bodo imele naslednje interesne skupine:

- inšpekcijske službe in združenje za varstvo rastlin (z zmanjšanjem stroškov in časa analiz)
- pridelovalci in gojitelji rastlinskega materiala (boljše in hitrejše odkrivanje prepreči širjenje povzročiteljev bolezni)
- izvozniki / uvozniki (manj zamud za trgovino)
- družba (preprečevanje bolezni, ki uničujejo rastline in okolje).

Poleg tega, bodo rezultati tega projekta koristni za rastlinske epidemiologe, saj smo razvili nova in cenejša orodja za odkrivanje novih rezervoarjev povzročiteljev bolezni, ter za študij interakcij rastlina - patogen. S tem bodo le-ta v pomoč epidemiologom pri zaščiti slovenske naravne rastlinske raznolikosti. Zaradi dolgoletnega sodelovanja z različnimi slovenskimi interesnimi skupinami, bo Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo promoviral v projektu razvita orodja, ter spodbujal njihovo uporabo v različnih interesnih skupinah za varstvo rastlin in na področju rastlinske epidemiologije v Republiki Sloveniji in v tujini, saj rastlinski patogeni predstavljajo globalno grožnjo za kmetijstvo in trgovino z rastlinami.

Poleg tega je vključitev podjetja OMEGA d.o.o. kot partnerja v projektu, dodaten primer pomena tesnega sodelovanja in izmenjave znanja med slovenskimi biotehnološkimi podjetji in raziskovalnimi organizacijami. To je strategija, ki se na NIBu smatra kot bistveno pomembna za optimalen nacionalen R & R razvoj. Dobljeni rezultati lahko, z razširitvijo uporabe na druga področja v slovenskem omrežju raziskav in razvoja, privabijo nove uporabnike tehnologije. To bo prispevalo k nadaljnjemu razvoju dejavnosti podjetja OMEGA d.o.o. v Republiki Sloveniji. Ne nazadnje, aplikacije in koristi rezultatov projekta niso omejene samo na področje varstva in epidemiologije rastlin, saj so hitre in cenovno ugodne metode odkrivanja potrebne na številnih področjih družbeno-ekonomskega pomena, kot je diagnostika in epidemiologija v veterini in zdravstvu, varnost hrane, bio-varnost.

Združitev moči in spretnosti raziskovalcev, tako iz skupine diagnostikov GSO in iz skupine diagnostikov rastlinskih povzročiteljev bolezni, z zelo dragocnim strokovnim znanjem naših mednarodnih sodelavcev ter z visoko tehnologijo, ki jo zagotavlja OMEGA d.o.o., je pripomogla k rezultatu zelo visoke kakovosti, ki zagotavlja ugled slovenske znanosti kot ene od vodilnih v terenski diagnostiki in uporabni biotehnologiji. Preko znanstvenih publikacij in aplikacij se bodo slovenska znanost in visoko tehnološka podjetja promovirala v svetu. Poleg tega, se bodo lahko razvita cenovno ugodna in enostavna diagnostična orodja, razširila in uporabljala v državah v

razvoju, kjer sedanja visoka tehnologija ni dostopna. V tem smislu bo imel projekt tudi bolj dolgoročen pozitiven učinek na promocijo slovenske znanosti.

ANG

The results of the project will have a direct impact for the economy and society of the Republic of Slovenia, as we have reached the aim of improving the early detection (and therefore eradication) of quarantine pests that constitute a real economic and ecological threat to the Slovenian agriculture as well as in the European Union and worldwide.

The results of the project are newly available diagnostic methods that will be robust and fast but also focusing on simplicity and cost-effectiveness. With the help of these results the early front line detection and confirmation of plant pathogens will greatly assist in designing timely and efficient plant protection measures thus decreasing the socio-economical impacts of plant pathogen threat. The following stakeholder groups will benefit from the outcomes of the project:

- inspection services and plant protection associations (by decreasing cost and time of analysis)
- growers and breeders of plant material (better and faster detection avoiding the spread of pathogens)
- exporters/importers (less delay for trade)
- society (prevention of diseases that damage plants and the environment).

Furthermore, the results of this project will benefit to the plant epidemiologists, providing new and cheaper tools for the discovery of new pathogens reservoirs and, for the study of plant-pathogens interactions, therefore helping the epidemiologists in protecting the Slovenian natural plant diversity. Thanks to its long-standing collaboration with different Slovenian stakeholders, the Department of Biotechnology and Systems Biology has already and will continue advertising the tools developed in the project and will promote their use to the different stakeholders of the plant protection and plant epidemiology fields in the Republic of Slovenia and abroad, as plant pathogens are a global threat to agriculture and plant trade, as well as plant diversity.

Moreover, the inclusion of the company OMEGA d.o.o. as a partner in the project is an additional example of the importance of close collaboration and knowledge exchange between Slovenian biotech companies and research organizations, strategy, which at NIB is considered essential for an optimal national R&D development. The use of generated results can be extended to other applications in Slovenian network of research and development, thus inviting new users of the technology. This will therefore contribute to a further development of OMEGA d.o.o activities in the republic of Slovenia.

Finally, the applications and benefits of the project results are not limited to the fields of plant protection and plant epidemiology, as fast and cost effective detection methods are needed in numerous fields of socio-economical importance such as veterinarian and human health diagnostics and epidemiology, food safety, bio-security.

Combining the strength and skills of researchers from both GMO diagnostics and plant pathogens diagnostics units, with the highly valuable expertise from our international collaborators and the high technology provided by OMEGA d.o.o. facilitated an outcome of very high quality, ensuring the reputation of Slovenian research as one of the leaders in on-site diagnostics and applied biotechnology. In this way, Slovenian science and high technology companies will be promoted through the rest of the world via scientific publications and applications. Moreover, providing cost-effective and easy-to-use diagnostics tools may help their diffusion and use in developing countries where the current high technology tools are not affordable. In that sense, the project will also have a long-term positive effect for the promotion of Slovenian research.

10. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

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

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen

	Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti

F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

Z naprednimi molekularnimi pristopi smo razvili metode, ki lahko sekvencirajo in pomnožujejo DNA in RNA gene različnih karantenskih povzročiteljev bolezni (bakterij in virusov). V projektu smo razvili metode NAIMA, LAMP in NGS s fokusom hitre in čim enostavnejše (LAMP) diagnostike z možnostjo dela na terenu z minimalnim usposabljanjem. Rezultati projekta so bili že vključeni v diagnostične procedure različnih projektov na NIB in prikazane na Upravi za varno hrano, veterinarstvo in zdravje rastlin.

11. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☒	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☒	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☒	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☒	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☒	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☒	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☒	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☒	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☒	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☒	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☒	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☒	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☒	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☒	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☒	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☒	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☒	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☒	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☒	☐	☐	☐	

G.04.06.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete		☐	☐	☒	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj		☐	☐	☒	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture						
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura		☒	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura		☒	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura		☒	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva		☐	☐	☐	☒	
G.09.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	

Komentar

Možnost uporabe občutljivih diagnostičnih metod bo zmanjšal čas analize na karantenske povzročitelje bolezni pri pretoku blaga preko mej in bo koristna pri zavarovanju kmetijsko pomembnih rastlin, okolja in družbe. TE metode se lahko uporabljajo tudi v medicini in veterini kot izboljšava diagnostičnih aktivnosti. V projektu so sodelovali učitelji, ki sodelujejo na do in podiplomskih šolah ter znanje prenašajo na študente.

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

	Sofinancer		
1.	Naziv	Omega d.o.o.	
	Naslov	Dolinškova 8, 1000 Ljubljana	
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		95.933,40 EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		25 %
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
		1. Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin v okviru NGS	F.01
		2. Razvoj nove storitve za NGS (Ion Torrent tehnologija) v Republiki Sloveniji	F.11
		3. Razširitev ponudbe novih storitev na trgu v relaciji s NGS	F.35
		4.	
		5.	
	Komentar	Tekom projekta so bili opravljeni poskusi na napravi Solid (NGS) v Szeged-u na Madžarskem. Dobljeni rezultati so bili analizirani z več programskimi orodji in določen je bil virus PVY v vzorcu okuženega krompirja iz katerega je bila izolirana totalna RNA. Virus PVY je bil določen tudi s sekvenciranjem malih RNA molekul, ki so bile izolirane iz istega vzorca. Rezultati služijo kot podlaga za pripravo aplikacij za določitev nukleotidnega zaporedja novim mikroorganizmov z Ion Torrent tehnologijo, katere aplikacijo razvija in trži podjetje Omega d. o. o.	
		Tekom projekta smo spoznali prednosti in uporabnost nove tehnologije	

	Ocena	NGS. Soočili smo se postopki priprave vzorcev, samim potekom sekveniranja naslednje generacije in z analizo dobljenih podatkov. Omega d.o.o. je s tem projektom pridobila dodatno znanje na področju NGS, ki nam predstavlja prednost in omogoča boljšo podporo drugim uporabnikom NGS v Sloveniji.
--	-------	---

13. Izjemni dosežek v letu 2013¹²

13.1. Izjemni znanstveni dosežek

Nove metode za večtarčno pomnoževanje in določanje RNA in DNA tarč.

S ciljem hkratnega določanja patogenov z genomom v obliki RNA ali DNA, smo razvili nov postopek NAIMA, ki je primeren za istočasno večtarčno pomnoževanje RNA in DNA tarč, skupaj z zaznavanjem na mikromrežah v obliki ArrayTubes. Pokazali smo, da je metoda zelo občutljiva in specifična za odkrivanje dveh gospodarsko pomembnih karanteni rastlinskih patogenov krompirja, PSTVd viroida (RNA tarča) in bakterije *R. solanacearum* (DNA tarča). Zaradi izotermnega pomnoževanja in enostavne opreme, ki je potrebna, je metoda uporabna tudi na terenu.

Za določanje omenjenih patogenov smo razvili tudi metodi z zanko posredovanega izotermnega pomnoževanja (LAMP), ki čas analiz skrajšata praktično na minimum, saj izolacija nukleinskih kislin ni potrebna, pomnoževanje pa traja povprečno le 20 minut.

Omenjene metode so bile objavljene v znanstvenih revijah, NAIMA celo v vodilni reviji na področju (agriculture, multidisciplinary).

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

V organizaciji Evropske Organizacije za varstvo rastlin (EPPO) in Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) je potekala predstavitev rezultatov evropskega projekta Q-DETECT v obliki delavnice od 19.2.-21.2.2013 v M Hotelu v Ljubljani.

70 udeležencev, raziskovalcev, diagnostikov in inšpektorjev so prišli iz 20 evropskih držav, Kitajske in Peruja. Mednarodna projektna skupina raziskovalcev med katerimi tudi raziskovalci z Nacionalnega inštituta za biologijo so prikazali uporabo povsem novih metod za določanje povzročiteljev bolezni na terenu.

Projekt Q-detect je močno povezan s Q-Finder ARRS projektom. Z namenom razvoja novih, primernejših diagnostičnih metod so se nekateri najboljši evropski raziskovalni laboratoriji in visokotehnoška podjetja združili v evropskem projektu Q-DETECT. Cilj projekta je oblikovati metode, ki bi se jih lahko uporabilo na terenu in bi omogočale občutljivo zaznavanje prisotnosti povzročiteljev bolezni rastlin.

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 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:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Nacionalni inštitut za biologijo

Jon Gutierrez Aguirre

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	14.4.2014
-----------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2014/72

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Rubrike izpolnite / prepisite 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](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2013 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analyze/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2014 v1.03
25-5D-A8-5E-71-1C-E5-1F-FA-E0-48-80-71-95-64-39-B1-5B-6B-87

Priloga 1

NARAVOSLOVJE

1.03.04 Rastlinska fiziologija

Projekt ARRS Q-Finder je neposredno povezan s FP7 evropskim projektom Q-Detect

Vir: <http://www.nib.si/aktualno/novice/626-v-organizaciji-eppo-in-nib-poteka-predstavitev-rezultatov-evropskega-projekta-q-detect-v-obliki-delavnice-od-torka-do-etrka-192-212-v-m-hotelu-v-ljubljani>



Z namenom razvoja novih, primernejših diagnostičnih metod so se nekateri najboljši evropski raziskovalni laboratoriji in visokotehnološka podjetja združili v evropskem projektu Q-DETECT. Cilj projekta je oblikovati metode, ki bi se jih lahko uporabilo na terenu in bi omogočale občutljivo zaznavanje prisotnosti povzročiteljev bolezni rastlin.

V organizaciji Evropske Organizacije za varstvo rastlin (EPPO) in Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) je potekala predstavitev rezultatov evropskega projekta Q-DETECT v obliki delavnice od 19.2.-21.2.2013 v M Hotelu v Ljubljani.

70 udeležencev, raziskovalcev, diagnostikov in inšpektorjev je prišlo iz 20 evropskih držav, Kitajske in Peruja. Mednarodna projektna skupina raziskovalcev med katerimi so bili tudi raziskovalci iz Nacionalnega inštituta za biologijo so prikazali uporabo povsem novih metod za določanje povzročiteljev bolezni na terenu.

Priloga 2

NARAVOSLOVJE

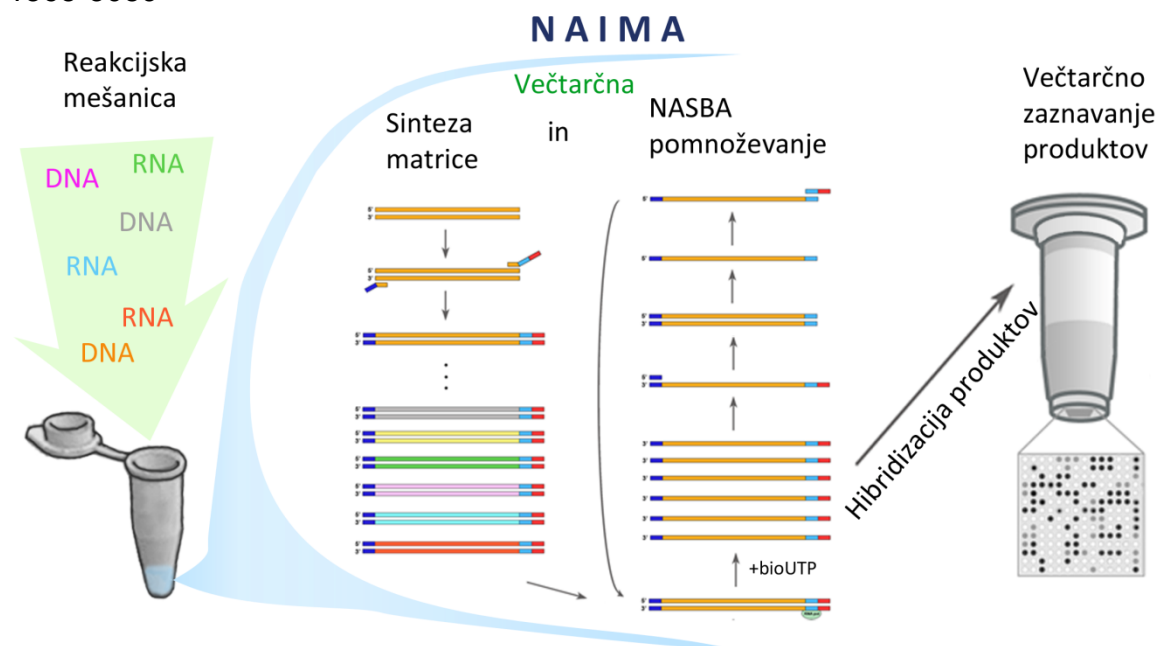
1.03.04 Rastlinska fiziologija

Nove metode za večtarčno pomnoževanje in določanje RNA in DNA tarč

Vir:

D. Dobnik, D. Morisset, R. Lenarčič, M. Ravnikar. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62 (13), 2989-2996

R. Lenarčič, D. Morisset, N. Mehle, R. Ravnikar. Plant Pathology, 2012, 62 (5), 1365-3059



Odkrivanje patogenih mikroorganizmov, prisotnih v hrani, krmi, rastlinah in drugih vzorcih je pomembno za zagotavljanje varne hrane, kot tudi za preprečevanje širjenja mikrobov.

S ciljem hkratnega določanja patogenov z genomom v obliki RNA ali DNA, smo razvili nov postopek NAIMA, ki je primeren za istočasno večtarčno pomnoževanje RNA in DNA tarč, skupaj z zaznavanjem na mikromrežah v obliki ArrayTubes.

Pokazali smo, da je metoda zelo občutljiva in specifična za odkrivanje dveh gospodarsko pomembnih karanteni rastlinskih patogenov krompirja, viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (RNA tarča) in bakterije *Ralstonia solanacearum* (DNA tarča). Zaradi izotermnega pomnoževanja in enostavne opreme, ki je potrebna, je metoda uporabna tudi na terenu. NAIMA se lahko uporablja na vseh področjih, kjer je potrebno določanje DNA in RNA tarč hkrati.

Za določanje omenjenih patogenov smo razvili tudi metodi z zanko posredovanega izotermnega pomnoževanja (LAMP), ki čas analiz skrajšata praktično na minimum, saj izolacija nukleinskih kislin ni potrebna, pomnoževanje pa traja povprečno le 20 minut.

Omenjene metode so bile objavljene v znanstvenih revijah, NAIMA celo v vodilni reviji na področju (agriculture, multidisciplinary).