

## PREIZKUŠANJE RAZLIČNIH METOD OKUŽEVANJA RASTLIN S CBCVd

Tanja GUČEK<sup>1</sup>, Jernej JAKŠE<sup>2</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>3</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific paper

Received / prispelo: 23. 10. 2019

Accepted / sprejeto: 5. 12. 2019

### Izvleček

Z namenom določitve najboljšega načina okuževanja hmelja s CBCVd smo primerjali različne načine vnosa inokuluma na različnih testnih rastlinah in hmelju. Na dveh sortah paradižnika in kumar, jajčevcu in hmelju smo rastline okužili z razmazom in injiciranjem. Kot najbolj uspešen način okužbe hmelja s CBCVd smo določili injiciranje celokupnih nukleinskih kislin v steblo. Med testnimi rastlinami je bila stopnja okužbe najvišja pri paradižniku sorte Heinz 1370. Preizkušali smo tudi različne pufre, ki se uporabljajo za stabilizacijo rastlinskega ekstrakta, vendar se je uporaba le-teh izkazala za neuspešno. Z analizo porazdelitve CBCVd po rastlini smo zaznali viroide v listih, steblo, koreninah in plodu, razen v starejšem tkivu in tanjših koreninicah ne. Vzpostavljena metoda za umetno okuževanje rastlin z viroidi omogoča testiranje gostiteljske specifičnosti, odpornosti sort, epidemiološke študije in analizo interakcij med rastlinami in patogeni.

**Ključne besede:** viroidi, patogeni testi, gostiteljska specifičnost

## TESTING OF DIFFERENT METHODS FOR MECHANICAL INOCULATION OF PLANTS WITH CBCVd

### Abstract

In order to determine the best way to infect hops with CBCVd, we compared different means of inoculation on different test plants and hop. On two varieties of tomatoes and cucumbers, eggplant and hop, the plants were infected by smearing and injection. Injection of whole nucleic acids into the stem has been identified as the most successful way of hop infection with CBCVd. Among test plants, the infection rate was the highest in tomato variety Heinz 1370. At the same time, the effect of different buffers, which are used for stabilization of the plant extract, was tested, but their use proved as unsuccessful. By analyzing the distribution of

---

<sup>1</sup> Univ. dipl. biokem., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

<sup>2</sup> Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

CBCVd in plant, viroids were detected in leaves, stem, roots and fruits, except in older tissue and thinner roots. The described method for artificial infection of plants with viroids enables biological indexing of host plants, resistance screening, epidemiological studies and analysis of plant-pathogen interactions.

**Key words:** viroids, biological indexing, host specificity

## 1 UVOD

CBCVd spada v skupino osmih viroidov, ki so bili do sedaj odkriti na agrumih (Wang in sod., 2018), okužbe pa so bile potrjene tudi v nasadih hmelja (Jakše in sod., 2015) in pistacije (Al Rwahnih in sod., 2018). Poleg omenjenih rastlin je bilo z umetnimi okužbami potrjeno, da lahko okužuje tudi paradižnik, kumare in nekatere okrasne rastlin (Semancik in Vidalakis, 2005). CBCVd je bil odkrit leta 1988 v Kaliforniji pri raziskavi določanja povzročiteljev bolezni eksokortis agrumov (Duran-Vila in sod., 1988). Najpogosteje se pojavlja v obliki mešanih okužb z drugimi viroidi, pri čemur na večini sort agrumov in pistaciji ne povzroča vidnih bolezenskih znamenj, zato spada med manj proučene viroide (Semancik in Vidalakis, 2005; Wang in sod., 2018; Al Rwahnih in sod., 2018).

Z odkritjem CBCVd v hmelju v Sloveniji (Jakše in sod., 2015) in povzročanjem agresivnih bolezenskih znamenj se je uvrstil med pomembne patogene s statusom karantenskega organizma na hmelju v skladu z Odločbo o nujnih ukrepih za preprečevanje vnosa in širjenja viroidnih zakrnelosti hmelja (Uradni list RS, št. 21/15). Hkrati je CBCVd v Evropi prepoznan kot škodljiv organizem, ki lahko močno prizadene celotno evropsko hmeljarstvo in je kot tak uvrščen na opozorilno listo Evropske organizacije za varstvo rastlin (EPPO). CBCVd je v letih 2007-2018 v Sloveniji prizadel več kot 150 ha hmeljišč, v letu 2019 pa so bile okužbe zaznane tudi v nasadih hmelja v Nemčiji (EPPO, 2019).

Umetne okužbe (biološki testi) rastlin z viroidi se uporabljajo za identifikacijo bolezni in njihovih povzročiteljev v gostiteljih z vidnimi bolezenskimi znamenji ter določanje gostiteljske specifičnosti. Osnova je uporaba testnih rastlin, ki omogočajo vizualizacijo biološke aktivnosti, potrditev infektivnosti in analizo agresivnosti viroidov (Singh in Ready, 2003). Omogočajo tudi študije vpliva posameznih viroidov, kjer z uporabo specifičnih gostiteljskih rastlin, ki jih lahko okuži samo posamezen viroid, dobimo inokulum za nadaljnje umetno okuževanje. Omenjeni postopki lahko vzamejo veliko časa in vključujejo večje število gostiteljskih rastlin (Singh in Ready, 2003). Za okuževanje rastlin s posameznimi viroidi se zato pogosteje uporabljajo cDNA konstrukti monomerov in dimerov viroidov (Cress in sod., 1983; Verhoeven in sod., 2009; Adkar-Purushothama in sod., 2015; Guček in sod., 2017). Testne rastline se največkrat okuži mehansko, ker se tudi v naravi viroidi najpogosteje širijo z mehanskim kontaktom. Za mehanski

prenos viroidov v rastline se najpogosteje uporablja inokulum na osnovi rastlinskega soka, celokupnih nukleinskih kislin, očiščene RNA, prepisov viroidne cDNA ali RNA (Cress in sod., 1983; Vernière in sod., 2006; Verhoeven, 2010; Verhoeven in sod., 2010; Adkar-Purushothama in sod., 2015). Metode za vnos viroida v rastlino so lahko različne, od cepljenja, rezanja, injiciranja, razmaza inokuluma, agroinokulacije do biolistike (Matoušek in sod., 2004; Barbosa in sod., 2005; Verhoeven in sod., 2010; Pallas in sod., 2012). Na potek okužbe vplivajo številni faktorji, kot so stabilnost, koncentracija in različica viroida, občutljivost testne rastline (kultivar, starost rastline), metoda vnosa inokuluma, sočasne okužbe z več viroidi in virusi, okolje (temperatura, svetilnost, dolžina dneva, količina hranil v zemlji) in čas da pride do razvoja bolezenskih znamenj (Singh in Ready, 2003). Viroidi preferirajo visoke temperature in veliko svetlobe, do okužbe pa pogosteje pride ob uporabi rezanja in injiciranja inokuluma, kot v primeru razmaza na listno površino (Singh in Ready, 2003; Nie in Singh, 2017).

Zaradi velike variabilnosti viroidov in pogostih sočasnih okužb z več viroidi lahko pride do sprememb v izražanju bolezenskih znamenj (Reanwarakorn in Semancik, 1999; Kovalskaya in Hammond, 2014). Po drugi strani pa lahko različni viroidi na istem gostitelju izražajo podobna bolezenska znamenja (Malfitano in sod., 2005). Uporaba umetnih okužb spada med dolgotrajnejše metode, predvsem zaradi večtedenske dobe, ki je potrebna za namnožitev viroidov do meje detekcije ali pa do pojava bolezenskih znamenj, ki lahko traja tudi več mesecev (Nie in Singh, 2017). V preteklosti so se biološki testi uporabljali za določanje viroidov v rastlinah, danes se večinoma uporabljajo kot podpora epidemiološkim in interakcijskim študijam (Singh in Ready, 2003).

## **2 MATERIAL IN METODE**

V okviru preizkušanja različnih metod za umetno okuževanje rastlin z viroidi smo želeli izbrati zanesljiv način umetnega okuževanja s CBCVd na hmelju in hkrati določiti najboljšo testno rastlino za CBCVd. V prvem poskusu smo tako preizkušali različne načine okuževanja testnih rastlin na različnih sortah iste rastlinske vrste. Testirali smo različne načine okuževanja in kot inokulum uporabili rastlinske ekstrakte in nukleinske kisline. V okviru prvega poskusa smo analizirali tudi kolonizacijo viroidov v posameznih delih rastlin. V drugem poskusu smo preizkušali različne pufre, ki omogočajo stabilizacijo rastlinskega ekstrakta in preprečijo delovanje inhibitorjev. V tretjem poskusu pa smo preizkušali različne načine okuževanja za hmelj.

### **2.1 Rastlinski material**

Hmelj in testne rastline smo vzgajali v rastni komori pri temperaturi 25°C v času osvetljevanja in 18°C v času teme. Rastline smo redno gnojili in zalivali z

vodovodno vodo. Testne rastline smo vzgojili iz semen, hmelj pa iz sadik A certifikata (IHPS). Vpliv posameznih načinov okuževanja smo analizirali na hmelju sorte Celeia. Vir inokulov za okuževanje so predstavljale naravno okužene rastline hmelja iz hmeljišča, ki so bile glede na RT-PCR pozitivne na HLVd in CBCVd. Zaradi možnih razlik v občutljivosti rastlin smo okužili 10 rastlin posamezne rastlinske vrste glede na obravnavanje. Rastline smo okužili v fenološki fazi 4-6 pravih listov. Inokulirane rastline smo po okuževanju vzdrževali v rastni komori, opazovali pojavljanje bolezenskih znamenj ter jih po 8-16 tednih analizirali. Vzorčili smo mlajše liste (3-4), ki so se po možnosti razvili po inokulaciji. Vzorce smo izolirali z uporabo CTAB metode in testirali na CBCVd z RT-PCR. V testiranje smo vključili tudi kontrolne rastline, ki smo jih okužili z destilirano vodo in so služile kot osnova za določanje bolezenskih znamenj.

### 2.1.1 Testne rastline

Z namenom izbora najbolj uspešne umetne okužbe rastlin s CBCVd smo analizirali naslednje testne rastline (10 rastlin/obravnavanje):

- a) kumara (*Cucumis sativus*), sorta Pariški kornišon
- b) kumara (*Cucumis sativus*), sorta Levine F<sub>1</sub>
- c) paradižnik (*Solanum lycopersicum*), sorta Heniz 1370
- d) paradižnik (*Solanum lycopersicum*), sorta Marmande
- e) jajčevac (*Solanum melongena*), sorta Halflange Violette

### 2.2 Prvi poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja testnih rastlin

Na testnih rastlinah smo analizirali infektivnost 4 različnih inokulov v okviru naslednjih obravnavanj:

1. razmaz surovega rastlinskega soka,
2. razmaz rastlinskega soka v fosfatnem pufri,
3. injiciranje ekstrakta celokupnih nukleinskih kislin (TNA),
4. injiciranje ekstrakta celokupne RNA.

V primeru inokulov na osnovi rastlinskega materiala (1 in 2) smo rastline okužili z razmazom inokula preko listov, v primeru inokulov na osnovi nukleinskih kislin (3 in 4) pa z injiciranjem inokuluma v steblo rastlin. Omenjena obravnavanja smo izbrali glede na v literaturi najpogosteje uporabljene metode umetnega okuževanja, s poudarkom na posnemanju naravnega poteka širjenja viroidov. V primeru razmaza smo liste posipali s karborundom (SiC z granulacijo 180) in s tem povzročili mikropoškodbe, ki viroidom olajšajo vstop v rastlinske celice. Na prve tri prave liste tretirane s karborundumom smo s kapalko nanесли 3-4 kapljice inokuluma in jih s prstom razmazali tako, da je bil s sokom prepojen cel list. Po 15 minutah smo liste nežno sprali z destilirano vodo in rastline za dva dni pokrili s prozorno vrečko, da smo povišali vlago. V primeru injiciranja smo TNA oziroma

RNA v indikatorske rastline vnesli tako, da smo v steblo na 2-4 mestih po sredini navpično zarezali s skalpelom in v posamezno zarezo s pipeto vnesli 15  $\mu$ L TNA/RNA. V posamezno indikatorsko rastlino smo vnesli  $\sim$ 80  $\mu$ g TNA/RNA. Vstopna mesta smo zavili s parafilmom, da je inokulum ostal v stebelu in da se rana ni izsušila.

Z namenom, da bi analizirali kolonizacijo viroida CBCVd smo pri paradižniku določili prisotnost viroida v posameznih delih rastline. Po okuževanju smo zato rastline paradižnika sorta Heniz 1370 testirali na prisotnost viroida CBCVd tako v zelenih, mlajših listih, kot tudi starejših, rumenih. V primeru, da je bil po RT-PCR analizi v rastlini viroid CBCVd prisoten, smo vzorčili še preostali del rastline, od stebela, listov, plodov do korenin. Po vzorčenju smo izvedli izolacijo celokupnih nukleinskih kislin z uporabo CTAB metode (Kump in Javornik, 1996) in vzorce analizirali z RT-PCR na prisotnost CBCVd.

### **2.2.1 Okuževanje z razmazom surovega rastlinskega soka**

Tkivo donorske okužene rastline hmelja smo zmleli z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto (Meku, Nemčija) v vodi brez RNaz v razmerju 1:5. Rastlinski sok smo precedili skozi gazo in tako pridobili homogen inokulum, ki smo ga v rastline vnesli z razmazom.

### **2.2.2 Okuževanje z razmazom rastlinskega soka v fosfatnem pufru**

Fosfatni pufer smo pripravili po protokolu Verhoeven in Roenhorst (2000) (0.02 M fosfatni pufer, pH 7.4, 2% (w/v) polivinilpirolidon (PVP; MW 10000)). Tkivo donorske okužene rastline hmelja smo zmleli z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto v fosfatnem pufru v razmerju 1:5. Rastlinski sok v fosfatnem pufru smo precedili skozi gazo in tako pridobili homogen inokulum, ki smo ga v rastline vnesli z razmazom.

### **2.2.3 Okuževanje z injiciranjem ekstrakta celokupnih nukleinskih kislin**

Inokulum na osnovi celokupnih nukleinskih kislin (TNA) smo iz donorskih okuženih rastlin hmelja izolirali z uporabo CTAB metode (Kump in Javornik, 1996). Za posamezno izolacijo smo uporabili 100 mg listov in pelet raztopili v 50  $\mu$ l vode brez RNaz (Sigma-Aldrich, ZDA). TNA smo v rastline vnesli z injiciranjem.

### **2.2.4 Okuževanje z injiciranjem ekstrakta celokupne RNA**

Inokulum na osnovi RNA ekstrakta (RNA) smo iz okuženih rastlin hmelja izolirali z uporabo kompleta Spectrum<sup>®</sup> Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich,

ZDA). Za posamezno izolacijo smo uporabili 100 mg listov in pelet raztopili v 50  $\mu$ l vode brez RNaz. Inokulum na osnovi RNA smo v rastline vnesli z injiciranjem.

### **2.3 Drugi poskus: Preizkušanje okuževanja z rastlinskim sokom v različnih pufrih**

Z namenom izbora najbolj infektivnega inokuluma rastlinskega soka v pufru smo primerjali tri različne pufre, ki se uporabljajo za mehansko okuževanje rastlin z viroidi. Pufri se uporabljajo za stabilizacijo in uravnavanje pH rastlinskega soka in tako preprečijo negativen vpliv inhibitorjev.

Primerjali smo naslednje pufre:

- a) fosfatni pufer (0,02 M fosfatni pufer, pH 7,4, 2% (w/v) polivinilpirolidon (PVP; MW 10000)) (Verhoeven in Roenhorst, 2000),
- b) TKM pufer (10 mM Tris, 10 mM KCl, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>) (Škorić, 2015),
- c) kalijev pufer (0,01 M kalijev fosfatni pufer, 0,01 M  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,2 % Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O) (Bogaert in sod., 2015).

Tkivo donorske okužene rastline hmelja smo zmelili z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto v posameznem pufru v razmerju 1:5. Rastlinski sok v pufru smo precedili skozi gazo in tako pridobili homogen inokulum. Kot testne rastline smo uporabili paradižnik sorte Heinz 1370, ki smo ga pred okuževanjem zalili in ranili s karborundumom. Okužili smo 10 rastlin na posamezen pufer. Na prve tri prave liste tretirane s karborundumom smo s kapalko nanesti 3-4 kapljice rastlinskega soka in jih s prstom razmazali tako, da je bil s sokom prepojen cel list. Inokulum smo v rastlino vnesli tudi preko stebela, tako da smo steblo na 2 mestih po sredini navpično zarezali s skalpelom in v posamezno zarezo s pipeto vnesli 50  $\mu$ L inokuluma. Vstopna mesta smo zavili s parafilmom, da je inokulum ostal v stebelu in da se rana ni izsušila. Po 15 minutah smo liste nežno sprali z destilirano vodo in rastline za dva dni pokrili s prozorno vrečko, da smo povišali vlago.

### **2.4 Tretji poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja za hmelj**

Z namenom izbora optimalnega načina okuževanja hmelja s CBCVd, smo analizirali vpliv načina vnosa inokuluma.

V ta namen smo uporabili 4 različne vrste inokuluma (poglavje 2.2):

- surov rastlinski sok,
- rastlinski sok v fosfatnem pufru,
- ekstrakt celokupnih nukleinskih kislin (TNA),
- ekstrakt celokupne RNA.

Inokulum smo v rastline vnesli na dva načina:

a) z injiciranjem

V primeru injiciranja smo rastlinski sok oziroma nukleinske kisline v steblo vnesli tako, da smo steblo na 4 mestih po sredini navpično zarezali s skalpelom in v posamezno zarezo s pipeto vnesli 15  $\mu$ L inokuluma. Rastlini smo odrezali vrh in iglo s sokom zapičili v steblo ter v njegovo notranjost spustili 15  $\mu$ L inokuluma. Vstopna mesta smo zavili s parafilmom, da je inokulum ostal v steblu (slika 1).



**Slika 1:** Injiciranje inokuluma v steblo hmelja. Levo: prerez stebela s skalpelom. Sredina: Vnos inokuluma v steblo s pipeto. Desno: vnos inokuluma v steblo z iglo.

b) z razmazom

V primeru razmaza smo rastline predhodno po listih posipali s karborundum. Na prve tri prave liste tretirane s karborundumom smo s pipeto nanесли inokulum (100  $\mu$ L soka/ 15  $\mu$ L nukleinskih kislin) in jih s prstom razmazali tako, da je bil z inokulum prepojen cel list. Po 15 minutah smo liste nežno sprali z destilirano vodo in rastline za dva dni pokrili s prozorno vrečko, da smo povišali vlago.

## 2.5 RT-PCR in agarozna gelska elektroforeza

Obratno prepisovanje in PCR smo izvajali v enem koraku (RT-PCR) s kompletom One Step RT-PCR (Qiagen, Nemčija) v inštrumentu Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Nemčija). Z RT-PCR smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi analizirali prisotnost CBCVd v rastlinah (preglednica 1) (Guček in sod., 2019). Namnožene produkte smo analizirali z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu v 1x TBE pufru obarvanem z etidijevim bromidom (0,5  $\mu$ g/ml) pod UV lučjo (Syngene, ZDA). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 160 V in 180 mA.

**Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje CBCVd iz hmelja z RT-PCR**

Viroid	Začetni oligonukleotid	Zaporedje 5' - 3'	Velikost produkta [bp]	Vir
<i>Viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd)</i>	CVd-IV-F1_1	GGGGAAATCTCTTCAGAC TC	284	spremenjeno glede na (Bernad in Duran-Vila, 2006)
	CVd-IV-R1	GGGGATCCCTCTTCAGGT		

**3 REZULTATI Z RAZPRAVO****3.1 Prvi poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja testnih rastlin**

V okviru prvega poskusa smo primerjali v literaturi najbolj pogosto uporabljene metode mehanske inokulacije in inokulum na osnovi surovega rastlinskega soka in celokupnih nukleinskih kislin (Hadidi in sod., 2003). Testne rastline smo izbrali glede na rezultate predhodnih testiranj gostiteljske specifičnosti CBCVd (Duran-Vila in Semancik, 2003; Semancik in Vidalakis, 2005). Glede na rezultate okuževanja (preglednica 2) lahko sklepamo, da je za CBCVd najboljša indikatorska rastlina paradižnik Heinz 1370 in zanj najboljša metoda okuževanja injiciranje z uporabo RNA ekstrakta.

**Preglednica 2: Primerjava metod za umetno okuževanje s CBCVd na kumarah, paradižniku in jajčevcu.**

Obravnavanje	Število uspešno okuženih rastlin/ število vseh okuženih rastlin					
	Kumare Pariški kornišon	Kumare Levine F <sub>1</sub>	Paradižnik Heinz 1370	Paradižnik Marmande	Jajčevcec Halflange Violette	Št. uspešno okuženih rastlin/ št. vseh okuženih rastlin
Razmaz surovega rastlinskega soka	2/10	1/10	2/10	1/10	1/10	7/50
Razmaz rastlinskega soka v fosfatnem pufu	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/50
Injiciranje celokupnih nukleinskih kislin (TNA)	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	3/50
Injiciranje ekstrakta celokupne RNA	0/10	0/10	3/10	2/10	0/10	5/50
<b>Število vseh uspešno okuženih rastlin/ število vseh okuženih rastlin</b>	<b>2/40</b>	<b>1/40</b>	<b>7/40</b>	<b>4/40</b>	<b>1/40</b>	<b>15/200</b>



Skupno je bila za testne rastline najboljša metoda okuževanja z razmazom surovega rastlinskega soka, kjer smo uspešno okužili kumare, paradižnik in jajčevce. Pri paradižniku se je kot enako uspešna izkazala metoda okuževanja z uporabo TNA in kot neprimerna uporaba soka v fosfatnem pufru. Skupno smo od okuženih 200 rastlin uspešno okužili 15 rastlin, od tega 2 kumari sorta Pariški kornišon, 1 kumaro sorta Levine F<sub>1</sub>, 7 paradižnikov sorta Heinz 1370, 4 paradižnike sorta Marmande in 1 jajčevac sorta Halflange Violette. V primeru rastlinskega soka v fosfatnem pufru nismo bili uspešni, vzrok je bil mogoče neustrezen pH. Za nadaljnjo okuževanje s CBCVd je tako primerna uporaba tako razmaza kot injiciranja, medtem ko se za indikatorsko rastlino lahko uporablja paradižnik sorte Heinz 1370. Vse kontrolne rastline so bile vzorčene in na CBCVd testirane kot negativne.

Rastline smo spremljali 16 tednov po okužbi in v tem času nismo zaznali vidnih bolezenskih znamenj, tako da so bile vse rastline glede na skalo ocenjene z 0. Pri kumarah smo na plodovih opazili nenavadno zbitost, zgubanost in zvijanje, vendar so bili omenjena bolezenska znamenja prisotna tudi pri na CBCVd negativnih rastlinah, tako da znamenja pripisujemo fiziološkemu stresu v rastlinjaku. Pri paradižniku sorta Heinz 1370 prav tako nismo zaznali vidnih bolezenskih znamenj, kar v primeru indikatorskih rastlin ni optimalno, vendar ne glede na to uporaba paradižnika glede na hmelj zaradi možnosti gojenja čez celo leto in hitrejše rasti omogoča lažje izvajanje raziskav.

Po okužbi paradižnika Heinz sorta 1370, smo pozitivne rastline vzorčili po delih: liste, stebela, plodove in korenine. V posameznih rastlinah pozitivnih na CBCVd smo zaznali razliko med mladimi zelenimi listi, ki so imeli nedvoumne pozitivne signale pomnoženih fragmentov in starejšimi, rumenimi listi, ki so bili na CBCVd negativni. Zaradi omenjenih razlik smo naknadno pri pozitivnih rastlinah vzorčili še preostale dele, tako da smo analizirali celo rastlino (preglednica 3, slika 2). Ugotovili smo, da je viroid prisoten po celi rastlini v vseh zelenih in mladih delih, medtem ko ga v rumenih (starejših) listih ne zaznamo, prav tako pa ga nismo zaznali v stranskih nediferenciranih koreninicah. Viroid je bil prisoten tudi v zelenem plodu. Iz omenjenih rezultatov lahko sklepamo, da so viroidi homogeno razporejeni po celotnem zelenem delu rastline in da jih v starejših tkivih ne moremo več zaznati, ker RNA razpade oziroma se dušik vsebujoče molekule s sokom prenesejo v druge dele rastline (Hadidi in sod., 2003). To je lahko posledica fiziološkega stanja rastline, ki je vse hranilne snovi usmerila v rast listov in razvoj plodov, kjer smo lahko tudi zaznali viroide. V primeru ko se rastline, kot je hmelj, pripravljajo na dormanco, se sokovi vrnejo v korenine in zato lahko takrat najverjetneje viroide zaznamo po celem koreninskem sistemu. Problem detekcije pa lahko predstavlja tudi samo koreninsko tkivo, ki vsebuje veliko inhibitorjev, ki lahko motijo RT-PCR analize.

**Preglednica 3:** Prisotnost viroida CBCVd v posameznem delu rastlin paradižnika sorta Heinz 1370. (+) viroid je prisoten v delu rastline; (-) viroid v delu rastline ni prisoten

Del rastline	CBCVd
steblo	+
1. list (od spodaj navzgor) - rumen	-
2. list- zelen	+
3. list - zelen	+
4. list - zelen	+
5. list - zelen	+
6. list - zelen	+
7. list – vrh, mlado tkivo	+
zelen plod	+
glavna korenina	+
stranske nediferencirane korenine	-

### 3.2 Drugi poskus: Preizkušanje okuževanja z rastlinskim sokom v različnih pufrih

Zaradi prisotnosti inhibitorjev v rastlinskih ekstraktih se za stabilizacijo viroidnega inokuluma uporabljajo različni pufri in ustrezen pH (Verhoeven in Roenhorst, 2000). Rastlinski sok smo v našem primeru stabilizirali z uporabo fosfatnega, TKM in kalijevega pufra (poglavje 2.3). Okužili smo paradižnik sorta Heinz 1370 z razmazom in injiciranjem rastlinskega soka v posameznem pufri. Kljub temu, da smo posamezno rastlino okužili z več kot 100  $\mu$ L inokuluma, v nobenem primeru ni prišlo do okužbe. Svež rastlinski sok je z dodanim pufrom najverjetneje pridobil neustrezen pH.



**Slika 2:** Posamezni deli rastlin paradižnika sorta Heinz 1370 okuženi s CBCVd: listi, zelen plod in korenine

### 3.3 Tretji poskus: Preizkušanje različnih načinov okuževanja za hmelj

V okviru tretjega poskusa smo okužbo z različnimi vrstami inokuluma testirali na hmelju z uporabo injiciranja in razmaza (preglednica 4).

**Preglednica 4:** Rezultati okuževanja hmelja s CBCVd z injiciranjem in razmazem

Inokulum	Št. uspešno okuženih rastlin/ št. vseh okuženih rastlin			
	60 dpi*		120 dpi	
	Injiciranje	Razmaz	Injiciranje	Razmaz
Surov rastlinski sok	1/10	0/10	1/10	0/10
Rastlinski sok v fosfatnem puftru	0/10	0/10	0/10	0/10
Celokupne nukleinske kisline (TNA)	6/10	1/10	10/10	1/10
Ekstrakt celokupne RNA	3/10	0/10	10/10	0/10
<b>Št. vseh uspešno okuženih rastlin/ št. vseh okuženih rastlin</b>	10/40	1/40	21/40	1/40

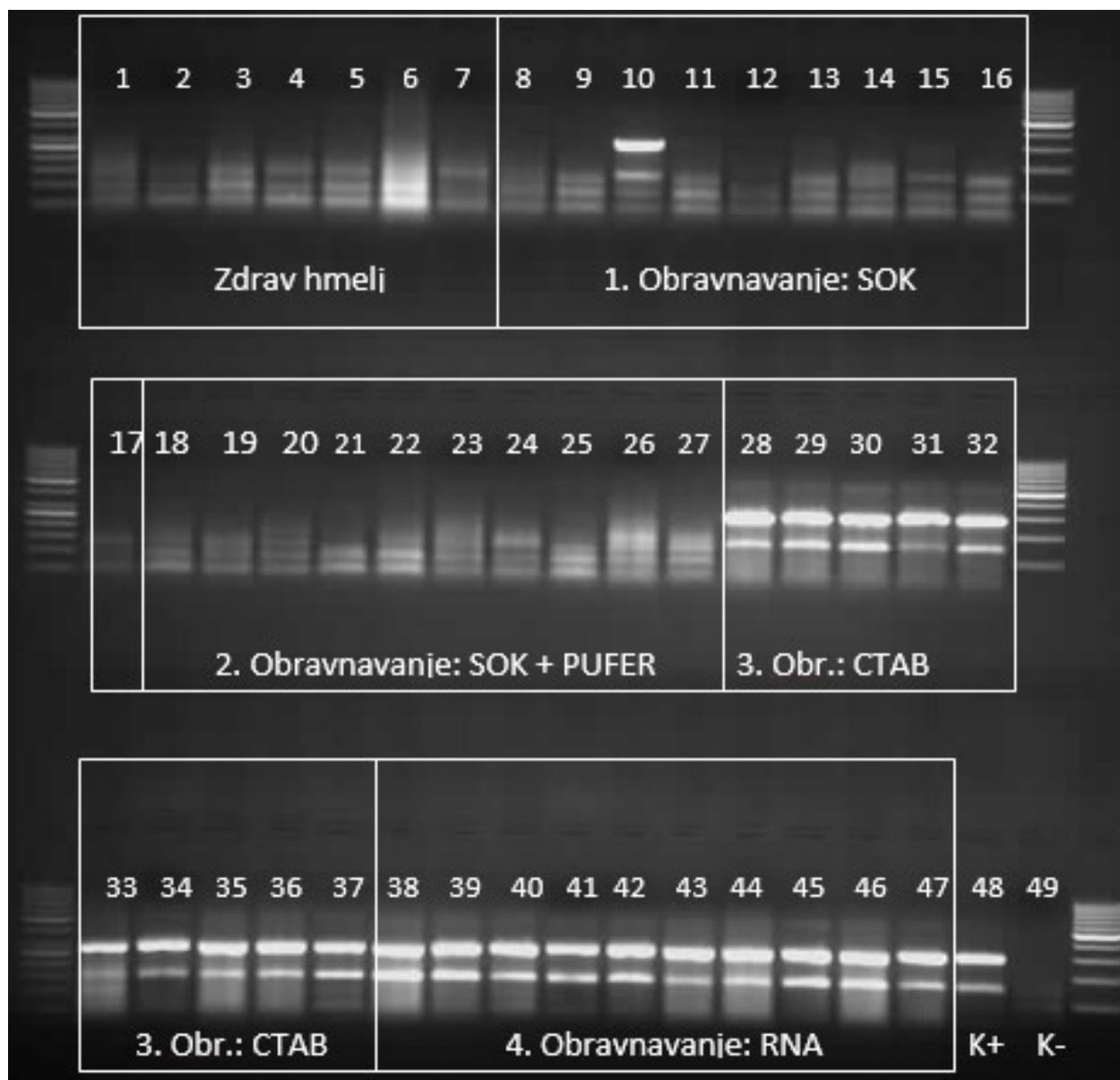
\*dpi, število dni po okužbi (ang. days post infection)

Omenjene rastline so bile dvakrat vzorčene, prvič 2 meseca (60 dpi) in drugič 4 mesece (120 dpi) po okužbi. Po 2 mesecih je bilo s TNA okuženih 6/10 in z RNA 3/10 rastlin. V primeru injiciranja smo z uporabo rastlinskega soka uspešno okužili 1/10 rastlin, v primeru uporabe rastlinskega soka v fosfatnem puftru nam okužba ni uspela. V primeru TNA in celokupne RNA pa je bila po 4 mesecih okužba 100 % (slika 3), kar pomeni, da je za uspešno potrditev okužbe rastline potrebno vzorčiti 4 mesece po okužbi. V primeru razmaza je bila okužba s CBCVd uspešna samo s TNA pri 1/10 (preglednica 4). Iz rezultatov lahko sklepamo, da je za hmelj primernejša uporaba injiciranja kot razmaza in inokuluma na osnovi nukleinskih kislin (TNA oziroma RNA). Pridobljeni rezultati se ujemajo s predhodnimi raziskavami, ki pri hmelju preferirajo uporabo injiciranja (Adams in sod., 1996).

## 4 ZAKLJUČEK

Bolezen huda viroidna zakrnelost hmelja predstavlja za pridelovalce hmelja veliko težavo, ker negativno vpliva na količino pridelka in s hitro dinamiko širjenja pomeni odmiranje velikega števila rastlin in posledično krčenje pridelovalnih površin hmeljišč. V letu 2019 se je bolezen zelo razširila in bila prvič potrjena tudi izven meja Slovenije, v Nemčiji (EPPO, 2019). Da bomo lahko bolezen omejili in preprečili njeno nadaljnje širjenje moramo poznati biologijo viroida CBCVd, pri čemer je še posebej pomembno poznavanje njegove infektivnosti. V ta namen smo razvili metodo za umetno okuževanje hmelja s CBCVd, da bomo lahko izvajali epidemiološke študije, študije odpornosti sort, testirali gostiteljsko specifičnost in

interakcije med rastlinami in viroidi. Določili smo tudi testno rastlino, ki je paradižnik sorta Heinz 1370 in hkrati analizirali tudi razporeditev viroidov po rastlini, kar je ključnega pomena za pravilno izvajanje vzorčenj.



**Slika 3:** Analiza RT-PCR rezultatov na 2 % agaroznem gelu za hmelj okužen s CBCVd z injiciranjem viroidnega inokuluma 120 dpi. Pozitiven signal je pomnožen fragment viroida CBCVd velikosti 284 bp. Ostali fragmenti so nespecifični pomnožki. Od 1-7: zdrav hmelj. Od 8-17: hmelj okužen z injiciranjem rastlinskega soka (1 okužena rastlina). Od 18-27: hmelj okužen z injiciranjem rastlinskega soka v fosfatnem pufri (brez okužbe). Od 28-37: hmelj okužen z injiciranjem TNA izoliranih po CTAB metodi (100 % okužba). Od 38-47: hmelj okužen z injiciranjem celokupne RNA (100 % okužba). Oznaka 48: pozitivna kontrola reakcije. Oznaka 49: negativna kontrola reakcije.

S preizkušanjem različnih metod okuževanja smo določili zanesljiv način okuževanja hmelja s CBCVd in določili testno rastlino, ki nam bo olajšala nadaljnje raziskave. Za prihodnost hmeljarstva bo zelo pomembno poznavanje sort, ki so na viroid CBCVd odporne, kot tudi rastlin, ki so lahko njegovi gostitelji in pomenijo nevarnost za nenadzorovano širjenje. Uporaba omenjenih metod umetnega okuževanja bo zato za nadaljnje raziskave ključnega pomena.

**Zahvala.** Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (MR štipendija št. 36371 in raziskovalni program P4-0077). Hkrati se avtorji za nasvete pri izvajanju okužb zahvaljujemo dr. Jaroslavu Matoušek (Institute of Plant Molecular Biology, Česke Budějovice, Češka), dr. Darji Škorić (University of Zagreb, Zagreb, Hrvaška) in dr. Noémi Van Bogaert (Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, Melle, Belgija).

## 5 LITERATURA

- Adams A.N., Barbara D.J., Morton A., Darby P. The experimental transmission of hop latent viroid and its elimination by low temperature treatment and meristem culture. *Ann. Appl. Biol.* 1996. 128: 37-44.
- Adkar-Purushothama C. R., Zhang Z., Li S., Sano T. Analysis and application of viroid-specific small RNAs generated by viroid-inducing RNA silencing. *Methods Mol Biol.* 2015; 1236:135-70.
- Barbosa C.J., Pina J.A., Perez-Panades J., Bernad L., Serra P., Navarro L., Duran-Vila N. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease.* 2005.89 (7):749-754.
- Bernad L. in Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol Cell Probes.* 2006; 20 (2):105-13.
- Bogaert N. Van, Smagghe G., De Jonghe K. The role of weeds in the epidemiology of pospiviroids. *Weed Research.* 2015. 55 (6):631-638.
- Cress D. E., Kiefer M. C., Owens R. A. Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA clones. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11 (19):6821-35.
- Duran-Vila N., Pina J.A., Ballester J. F., Juarez J., Roistacher C. N., Rivera-Bustamante R., Semancik J. S. The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists.* 1988.
- Duran-Vila N., in Semancik J.S. Citrus viroids. V *Viroids*, recenzenti A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles in J.S. Semancik, Collingwood Australia: CSIRO Publishing. 2003. 178-194.
- EPPO. First report of Citrus bark cracking viroid in Germany. *EPPO Reporting Service* 2019 no. 8- Diseases. 2019. 2019/165.
- Guček T., Jakše J., Javornik B., Radišek S. Razvoj metode umetnega okuževanja hmelja z monomerom in dimerom CBCVd= Development of a method for artificial inoculation of hops with monomeric and dimeric CBCVd. *Hmeljarski bilten/ Hop Bulletin.* 2017. 24:5-16.
- Guček T., Jakše J., Matoušek J., Radišek S. One-Step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viroids from hop (*Humulus lupulus* L.). *European Journal of Plant Pathology* 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01654-2>.

- Hadidi A., Flores R., Randles J., Semancik J. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 2003.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*. 2015; 64 (4):831-842.
- Kovalskaya N. in Hammond R. W. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci*. 2014. 228:48-60.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114:149-158.
- Malfitano M., Barone M., Duran-Vila N., Alioto D. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 2005. 87 (2):115-121.
- Matoušek J., Orctová L., Steger G., Riesner D. Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *J Virol Methods*. 2004; 122 (2):153-64.
- Nie X. in Singh R.P. Detection and Identification by Bioassay. V *Viroids and Satellites*, recenzenti A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, Palukaitis P. Academic press. 2017. 347-356.
- Pallas V., Martinez G., Gomez G. The interaction between plant viroid-induced symptoms and RNA silencing. *Methods Mol Biol*. 2012. 894:323-43.
- Reanwarakorn K. in Semancik J.S. Discrimination of cachexia disease agents among citrus variants of hop stunt viroid. *Annals of Applied Biology*. 1999.135 (2):481-487.
- Semancik J. S. in Vidalakis G. The question of Citrus viroid IV as a cocadviroid. *Arch Virol*. 2005. 150 (6):1059-67.
- Singh R. P., Ready K.F.M. Biological indexing. V *Viroids*, recenzenti A. Hadidi, Flores, R., Randles, J., in Semancik, J.S. CSIRO Publishing. Cllingwood, Australia. 2003. 89-94.
- Škorić D. Osebna komunikacija. International Conference on Viroids and Viroid-Like RNAs, Češke Budejovice, Češka Republika. 2015.
- Verhoeven J. Th. J. Identification and epidemiology of pospiviroids. Wageningen University. 2010.
- Verhoeven J.Th.J. in Roenhorst J.W. Herbaceous test plants for the detection of quarantine viruses of potato. *EPPO Bulletin*. 2000; 30: 463-467.
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C., Roenhorst J.W., Flores R., de la Pena M. Pepper chat fruit viroid: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research*. 2009; 144 (1-2):209-214.
- Verhoeven J.Th.J., Hüner L., Virscek Marn M., Mavric Plesko I., Roenhorst J.W. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides* and potatoes and tomatoes. *Eur J Plant Pathol*. 2010.128: 417- 421.
- Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella, L. Chabrier C., Bové J. M., Duran Vila N. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology*. 2006; 96 (4):356-68.
- Wang Y., Atta S., Wang X., Yang F., Zhou C., Cao M. Transcriptome sequencing reveals novel Citrus bark cracking viroid (CBCVd) variants from citrus and their molecular characterization. *PLoS One*. 2018. 13 (6):e0198022.