

## KVANTIFIKACIJA IN DOLOČANJE GLIVE *Verticillium albo-atrum* V HMELJU (*Humulus lupulus*) Z UPORABO PCR V REALNEM ČASU

Tanja GUČEK<sup>8</sup>, Nataša ŠTAJNER<sup>9</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>10</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 15. oktober 2015

Sprejeto / accepted: 13. november 2015

### Izvleček

Verticilijska uvelost hmelja, ki jo povzročata glivi *Verticillium albo-atrum* in *V. dahliae* spada med najnevarnejše bolezni hmelja. V Sloveniji se na hmelju pojavlja predvsem okužba z glivo *V. albo-atrum*, ki je lahko blaga (patotip PG1) ali pa letalna (patotip PG2). Za določanje gliv rodu *Verticillium* se še vedno pogosto uporabljajo metode, ki temeljijo na morfoloških lastnostih in patogenih testih, ter PCR molekularne tehnike z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov. Molekularne metode, ki omogočajo kvantifikacijo glive v tkivu ter višjo stopnjo občutljivosti so pri hmelju v rutinskih laboratorijih slabo razvite. V ta namen je bila razvita metoda PCR v realnem času na osnovi Sybr Green kemije, ki omogoča kvantifikacijo in določanje glive *V. albo-atrum* v rastlinskih vzorcih. Na osnovi predhodnih analiz markerjev AFLP in SCAR so bili načrtovani začetni oligonukleotidi, ki omogočajo specifično določanje posameznih vrst rodu *Verticillium* in ločevanje med patotipoma PG1 in PG2. Zaporedje genov DRH1 in CAC je bilo uporabljeno kot notranja kontrola pomnoževanja, med optimizacijo pa je bila metoda tudi validirana. Metoda PCR v realnem času na osnovi Sybr Green kemije je zelo občutljiva in poleg kvantifikacije omogoča tudi ločevanje med hmeljnima patotipoma PG1 in PG2 glive *V. albo-atrum*, ki sta prisotna v Sloveniji.

**Ključne besede:** hmelj / *Verticillium* / patotip / PCR v realnem času / Sybr Green

## QUANTIFICATION AND DETECTION OF *Verticillium albo-atrum* IN HOP (*Humulus lupulus*) WITH REAL-TIME PCR

### Abstract

Hop *Verticillium* wilt caused by the fungus *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* is one of the most dangerous diseases on hops. In Slovenia, hop is mainly infected by the fungus *V. albo-atrum*, which may occur as mild (PG1 pathotype) or lethal (PG2 pathotype) infection. For the determination of the fungi of the genus *Verticillium* methods based on morphological properties and pathogenic assays are still widely used, as well as molecular PCR techniques using specific primers. Molecular methods that allow quantification of fungi in tissue and a higher level of sensitivity are in routine laboratories for hops still underdeveloped. In the presented project, quantitative PCR based on Sybr Green chemistry, that enables the quantification and identification of *V. albo-atrum* in the plant samples, has been developed. Based on preliminary analyzes of AFLP and SCAR markers, primers that allow specific determination of individual species of the genus *Verticillium* and differentiation between PG1 and PG2 pathotypes, were designed. Sequences of genes DRH1 and CAC were used as an internal control of

<sup>8</sup> Univ. dipl. biokem., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

<sup>9</sup> Doc. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: natasa.stajner@bf.uni-lj.si

<sup>10</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

amplification, and during optimization, the method was also validated. Quantitative PCR based on Sybr Green chemistry is a very sensitive method that enables differentiation between PG1 and PG2 pathotypes present in Slovenia and also their quantification.

**Key words:** hop / *Verticillium* / pathotype / Real-time PCR / Sybr Green

## 1 UVOD

Fitopatogene glive rodu *Verticillium* povzročajo uvelost rastlin, ki prizadene njihovo prevajalno tkivo in pri številnih gostiteljih privede do velikih izgub pridelka (Pegg in Brady, 2002). Do nedavnega je rod *Verticillium* vključeval 5 fitopatogenih vrst, med katerimi po agresivnosti in patogenosti s širokim naborom gostiteljskih rastlin, vključno s hmeljem, izstopata glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* (Barbara in Clewes, 2003; Gams in sod., 2005). Zadnja taksonomska revizija osnovana na obsežni filogenetski analizi in morfoloških lastnostih opisuje 10 vrst, saj so se nekatere vrste razdelile, potrjenih pa je tudi pet novih vrst (Inderbitzin in sod., 2011). Vrsta *V. albo-atrum* v katero so do sedaj bili uvrščeni izolati, ki parazitirajo hmelj, se je razdelila na 3 vrste: *V. albo-atrum*, *V. alfalfe* in *V. nonalfalfe*, medtem ko je vrsta *V. dahliae* ostala nerazdeljena. Tako se hmeljni izolati glede na novo taksonomijo razvrščajo v vrsti *V. nonalfalfe* in *V. dahliae* (Inderbitzin in sod., 2011). Ker nova taksonomska klasifikacija za vrsto *V. nonalfalfe* še ni sprejeta v fitosanitarnih aktih, v tem članku uporabljamo do sedaj uveljavljeno ime *V. albo-atrum*.

Hmelj spada med gospodarsko pomembnejše gostitelje gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, na katerem povzročata karantensko bolezen verticiljsko uvelost hmelja (EPPO, 2015). Pojav bolezenskih znamenj pri hmelju je odvisen od virulence glive, odpornosti sorte in abiotičnih dejavnikov. Gliva *V. albo-atrum* je za hmelj lahko letalna, kar pomeni, da rastlina po okužbi odmre, ali pa blaga, ko si rastlina po okužbi opomore, medtem ko *V. dahliae* povzroča samo blago obliko (Radišek in sod. 2004; 2006). Bolezenska znamenja, ki se pojavljajo pri obeh oblikah, so rumenenje, venenje in nekroze listov, katerih robovi so obrnjeni navzgor in hitro odpadejo, ter porjavelo tkivo v spodnjem delu rastline (Down in sod., 2007; Radišek, 2009). Bolezenska znamenja so posledica vdora gliv skozi koreninski sistem v prevajalno tkivo rastline, kjer prisotnost micelija zmoti preskrbo celic z vodo in povzroči odmiranje tkiva. Glive v prevodni sistem sproščajo hidrolitične encime in toksične glikolipide, s katerimi delno razgradijo celično steno in membrano, in tako pridejo do hranil potrebnih za svojo rast. V odmrlem tkivu glive tvorijo trajne organe, ki se s propadom rastline sprostijo v tla (Fradin in Thomma, 2006). Na ta način infekcijski potencial v tleh hitro raste, bolezen pa se z obdelavo širi znotraj nasadov in izven njih ter s tem povzroča večleten izpad pridelka. Iz omenjenega je verticiljsko uvelost hmelja mogoče uspešno preprečevati le s sanacijo tal (premene z negostiteljskimi rastlinami, biofumigacija, razkuževanje tal), s sajenjem odpornih sort, zdravim sadilnim materialom, izvajanjem fitosanitarnih ukrepov in hitrim odkrivanjem žarišč, ki jih omogočajo sistematični nadzori nasadov (Down in sod., 2007; Radišek, 2009).

Pri preprečevanju bolezni in odločanju o obsegu ukrepov ima velik pomen zanesljiva in hitra diagnostika. Klasična diagnostika temelji na določanju morfoloških lastnosti in uporabi patogenih testov. Pri tem se uporabljajo selektivna gojišča, ki posameznim vrstam gliv različno ustrezajo in močno vplivajo na razvoj posameznih morfoloških lastnosti, v primeru patogenih testov pa se izvajajo umetne okužbe rastlin. Glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae* se

ločita predvsem na osnovi trajnih organov, trajnega melaniziranega micelija pri *V. albo-atrum* in tvorbe mikrosklerocijev pri glivi *V. dahliae*. Uporaba klasičnih metod je za namene diagnostičnih analiz pri glivah iz rodu *Verticillium* dolgotrajna in delovno zahtevna, ob enem pa ima nanje velik vpliv okolje, kar lahko vodi do napačne identifikacije (Inderbitzin in sod., 2011; Maurer in sod., 2013). Za identifikacijo gliv je primernejša uporaba različnih molekularnih metod, med katerimi za določevanje vrst prevladuje analiza razlik v ITS (ang. Internal Transcribed Spacer) regijah jedrne rDNA (Gao in Zhang, 2013). Za karakterizacijo gliv rodu *Verticillium* so v uporabi tudi različni začetni oligonukleotidi, ki v verižni reakciji s polimerazo (PCR) namnožijo specifične regije za vrsto ali celo patotip (Nazar in sod., 1991; Robb in sod., 1993; Inderbitzin in sod., 2013).

Za identifikacijo *V. albo-atrum* pri hmelju so bili razviti markerji AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism) in markerji SCAR (ang. Sequence-Characterized Amplified Region), ki omogočajo razlikovanje med manj virulentnim patotipom PG1 in virulentnim PG2, ki v Sloveniji povzroča letalno bolezensko obliko (Radišek in sod., 2003; 2004; 2006). Uporaba molekularnih metod, kot je PCR, omogoča hitrejšo, bolj občutljivo in specifično določanje gliv. Hkrati omogoča tudi določanje mikroorganizmov, ki se jih ne da gojiti na selektivnih gojiščih. Šibka točka uporabe PCR so lažno negativni rezultati, do katerih pride zaradi inhibitorjev, ki jih skupaj z DNA izoliramo iz rastlinskih tkiv in tal, in motijo potek PCR reakcije. Z razvojem novih metod izolacij in tehnike PCR v realnem času (ang. Real-Time PCR, quantitative PCR, qPCR) se te težave odpravljajo, hkrati pa nove tehnike omogočajo tudi kvantifikacijo posameznih gliv v analiziranih substratih. V ta namen smo za hmeljne izolate glive *V. albo-atrum* razvili qPCR na osnovi Sybr Green kemije, ki poleg identifikacije patotipov omogoča tudi neposredno kvantifikacijo v rastlinah.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Rastlinski material

Vzorci hmelja okuženi z glivo *V. albo-atrum* so bili vzorčeni v nasadih hmelja v Savinjski dolini, med letoma 2013 in 2014. Vzorčeno je bilo steblo do višine enega metra nad tlemi. Rastlinski material je bil izbran na podlagi vizualnih bolezenskih znamenj in že potrjenih okužb v hmeljišču in do analize hranjen pri -20°C. Za negativno kontrolo so bili leta 2015 vzorčeni listi brez-virusnih in brez-viroidnih rastlin hmelja, sorte Celeia, gojenega v rastlinjaku Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS). Vzorci zdravih rastlin so bili do analize hranjeni pri 4°C.

### 2.2 Izolati glive *Verticillium albo-atrum*

Kulture izolatov glive *V. albo-atrum* in *V. dahliae* so bile pridobljene iz zbirke škodljivih organizmov Laboratorija za varstvo rastlin na IHPS. Izolati v zbirki so bili okarakterizirani z morfološkimi deskriptorji in molekularnimi analizami do ravni posameznih patotipov. Za namene analize so bili izolati kot duplikati precepljeni na PDA (ang. Potato Dextrose Agar) trdna gojišča in vsaj 1 teden inkubirani v temi pri sobni temperaturi. Pred DNA izolacijo so bili s svetlobnim mikroskopom morfološko pregledani za potrditev prisotnosti trosonoscev tipičnih za rod *Verticillium*.

### 2.3 Izolacija DNA iz rastlinskega materiala in gliv

Celokupna genomska DNA iz okuženih in zdravih rastlin hmelja je bila izolirana z uporabo CTAB metode (Kump in Javornik, 1996). Iz okuženih rastlin je bila DNA izolirana iz sredice stebela, ki je bila zmleta v terilnici v CTAB ekstrakcijskem puftru. Na enak način je bila izolirana tudi DNA iz zdravih rastlin hmelja, vendar so bili v tem primeru namesto stebela uporabljeni listi.

V primeru izolatov gliv je bila DNA izolirana iz čiste kulture, micelija, ki je bil s sterilnim skalpelom postrgan z gojišča. Micelij je bil v terilnici zmlet skupaj z nekaj zrnci kremenčevega peska in CTAB pufrom. DNA iz gliv je bila izolirana po enaki metodi kot DNA iz rastlinskega materiala (Kump in Javornik, 1996). Pri vsaki izolaciji je bil za kontrolo izolacije uporabljen dodaten zdrav vzorec hmelja, med samo PCR reakcijo pa je bila uspešnost izolacije DNA potrjena tudi z uporabo začetnih oligonukleotidov za notranjo kontrolo pomnoževanja (poglavje 2.5).

### 2.4 Merjenje koncentracije izolirane DNA

Koncentracija izolirane DNA iz rastlinskega materiala in gliv je bila izmerjena z uporabo fluorometra Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies), kvaliteta izolacije pa je bila izmerjena z uporabo spektrofotometra BioPhotometer D30 (Eppendorf) glede na razmerje absorbance pri 260 nm in 280 nm ( $A_{260/280}$ ).

### 2.5 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotidi so bili načrtovani na podlagi rezultatov analize markerjev AFLP in SCAR (Radišek in sod., 2003; 2004) z uporabo programa Primer Express 3.0.0 Applied Biosystems software. Zaporedja posameznih fragmentov AFLP, ki so bili osnova za načrtovanje, se nahajajo v bazi GenBank, ki jo ureja NCBI (The National Center for Biotechnology Information) pod pristopnimi številkami: AY518585, AY534125, AY534126, AY534127, AY534128, AY534129, AY534130, AY534131, AY534132, AY534133, AY534134, AY534135, AY534136, AY534137, AY534138 in AY534139 (Radišek in sod., 2004). Glivna DNA je bila namnožena z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov za glivo *V. albo-atrum* in začetnih oligonukleotidov specifičnih za hmeljna patotipa PG1 in PG2 (preglednica 1). Začetni oligonukleotidi za gena DRH1 (ang. DEAD box RNA helicase) in CAC (ang. Clathrin adaptor complexes medium subunit), ki sta služila kot notranja kontrola pomnoževanja, so bili uporabljeni kot predhodno opisano v Štajner in sod. (2013) ter Cregeen in sod. (2014).

### 2.6 PCR v realnem času

PCR v realnem času je bil izveden z uporabo Fast SYBR Green kemije na detekcijskem sistemu LightCycler 96 (ROCHE). Vse reakcije qPCR smo izvedli z uporabo kita FastStart Essential DNA Green Master (ROCHE). Reakcijska mešanica (10  $\mu$ L) je vsebovala: 5  $\mu$ L FastStart Essential DNA Green Master komponente, 50 ng DNA in 500 nM vsakega začetnega oligonukleotida. Amplifikacija je bila izvedena s temperaturnim profilom: 95°C 10 min, 45 ciklov na 95°C 30s, 60°C 30s in 72°C 30s, na koncu je bilo izvedeno še taljenje: 95°C

10s, 65°C 60s in 97°C 1s. Vsi vzorci so bili namnoženi v treh tehničnih ponovitvah istega DNA vzorca. Za vsak par začetnih oligonukleotidov smo dodali po dve negativni kontroli (namesto DNA je bila uporabljena sterilna voda), kot prvi in zadnji vzorec pri pipetiranju. Raven pomnoževanja posameznega produkta je bila določena kot Cq vrednost, ki predstavlja število ciklov potrebnih, da se doseže prag fluorescence (fluorescenca produkta je večja od fluorescenca ozadja) v eksponenti fazi PCR reakcije.

**Preglednica 1:** Zaporedja posameznih začetnih oligonukleotidov, uporabljena za določanje patotipa PG1 in PG2 glive *V. albo-atrum* in za pomnoževanje notranje kontrole (DRH1 in CAC)

**Table 1:** Primer sequences for detection of PG1 and PG2 pathotype of *V. albo-atrum* and amplification of the internal control (DRH1 and CAC)

| Patotip           | Začetni oligonukleotid | Zaporedje 5'-3'             |
|-------------------|------------------------|-----------------------------|
| PG1 + PG2         | ITS1-ITS2-F1           | GCAGCGAAACGCGATATGT         |
|                   | ITS1-ITS2-R1           | GCATGCCTCCCAGGATACTG        |
| PG1 + PG2         | ITS1-ITS2-F2           | CTCATAACCCTTTGTGAACCATATTG  |
|                   | ITS1-ITS2-R2           | GTTCGCTAAGAACACTCAGAAGTATCG |
| PG1 + PG2         | 4bgs-F1                | AGAACAGACACCAGAGGTGCAA      |
|                   | 4bgs-R1                | GAAGGAGAGGTGGCGACAAC        |
| PG1 + PG2         | 4cgs-F1                | TGAAGAGGGAAGAGATGGCTTT      |
|                   | 4cgs-R1                | ACCCACCGCACCTTCCA           |
| PG1 + PG2         | 9-1gs-F1               | GGTAACGTCATCGAACGACATC      |
|                   | 9-1gs-R1               | CACACGCTACATATCAAACAGCATAT  |
| PG2               | 5-1gs-F1               | GAGCGGGTCGATACGATTCA        |
|                   | 5-1gs-R1               | GGTGATGTCCAGCACAGTGATAC     |
| PG1               | 10-1gs-F1              | AGCCCCGTGCGCTGTAAT          |
|                   | 10-1gs-R1              | GTTCCCTACATGGCAGCTTCA       |
| Notranja kontrola | Začetni oligonukleotid | Zaporedje 5'-3'             |
| DRH1              | DRH1-F                 | CCAACCTACTGGGCTTCGAC        |
|                   | DRH1-R                 | CAGAATGGGTATGATCGGGC        |
| CAC               | CAC-F1                 | CTGGCCATGTGAGAATTTTCCTT     |
|                   | CAC-R1                 | CTCGCAATTTTGTCACTACAACA     |

PCR v realnem času je bil preverjen glede na vpliv oziroma inhibicijo rastlinske DNA na pomnoževanje glivne DNA. V ta namen je bila vzorcu glivne DNA (100 ng, 10 ng, 1ng) dodana DNA izolirana iz zdravega hmelja (1 µg in 500 ng). Iz rezultatov je bilo razvidno, da prisotnost rastlinske DNA ne vpliva na pomnoževanje glivne DNA, kajti Cq vrednosti so ostale nespremenjene.

Učinkovitost pomnoževanja je bila izračunana za vsako namnoženo tarčno zaporedje z uporabo programa LightCycler96 SW 1.1 (ROCHE), na osnovi naklona standardne krivulje. Za standardno krivuljo je bila uporabljena DNA izolirana iz čiste kulture s serijo redčitev:

100, 10, 1, 0.1, 0.01 in 0.001 ng. Prisotnost namnoženega produkta z ustrežno velikostjo je bila potrjena z nanosom na 2 % agarozni gel. Na osnovi analize talilnih krivulj je bila potrjena specifičnost pomnoževanja za posamezen par začetnih oligonukleotidov. Normalizacija je bila narejena na osnovi notranje kontrole DRH1 in CAC z uporabo  $\Delta\Delta$  Cq metode, kot predhodno opisano v Štajner in sod. (2013). V zdravih vzorcih hmelja se z uporabo PCR v realnem času gliva *V. albo-atrum* ni namnožila.

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Namen laboratorijskega dela je bil razviti hitro in občutljivo metodo za kvantifikacijo in določanje patotipov glive *V. albo-atrum* v trtah hmelja. V ta namen je bil razvit PCR v realnem času na osnovi Sybr Green kemije, ki omogoča pomnoževanje tarčnih regij pri DNA vzorcih glive (izoliranih z uporabo CTAB metode).

#### 3.1 Izolacija in koncentracija DNA

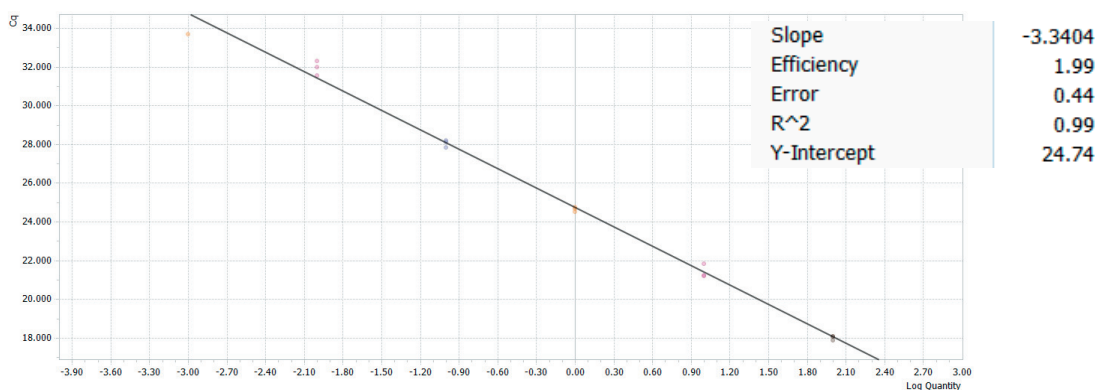
Uporaba CTAB metode za izolacijo DNA iz rastlinskega tkiva, se je izkazala kot zelo učinkovita, koncentracije izmerjene s fluorometrom so bile med 200 in 700 ng/ $\mu$ L, razmerje  $A_{260/280}$  vzorcev pa je bilo  $\sim 1,9$ . Pri izolaciji gliv iz čiste kulture so bili rezultati nekoliko slabši, kajti koncentracije izmerjene s fluorometrom so bile med 50 in 100 ng/ $\mu$ L, razmerje  $A_{260/280}$  pa je bilo  $\sim 1,7$ , pri čemer so bile vrednosti nižje zaradi prisotnost gojišča, ki je bilo skupaj z glivo postrgano pri izolaciji.

#### 3.2 Učinkovitost pomnoževanja in specifičnost začetnih oligonukleotidov

Za vsak posamezen par začetnih oligonukleotidov navedenih v preglednici 1 je bila z uporabo standardne krivulje določena učinkovitost pomnoževanja reakcije. Standardna krivulja predstavlja odvisnost logaritma znane koncentracije redčene DNA od Cq vrednosti. Učinkovitost pomnoževanja s posameznimi pari začetnih oligonukleotidov je znašala od 97 % do 116 %. Kot par začetnih oligonukleotidov z najbolj optimalno učinkovitostjo za pomnoževanje *V. albo-atrum* se je izkazal 9-1gs-F1/R1 z učinkovitostjo 99 % (slika 1).

Z namenom določitve specifičnosti PCR reakcije v realnem času, so bili pari začetnih oligonukleotidov testirani na različnih izolatih gliv *V. albo-atrum* in reprezentativnem izolatu *V. dahliae* (preglednica 2). Začetni oligonukleotidi ITS1-ITS2-F1/R1, ITS1-ITS2-F2/R2, 4bgs-F1/R1 in 4cgs-F1/R1 so specifični tako za PG1 kot tudi PG2 patotip *V. albo-atrum*. Oba patotipa pomnoži tudi par začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1, ki pa je hkrati specifičen tudi za glivo *V. dahliae*. Par začetnih oligonukleotidov 5-1gs-F1/R1 je specifičen za PG2 patotip in ne pomnožuje PG1 izolatov in glive *V. dahliae*. Par začetnih oligonukleotidov 10-1gs-F1/R1, naj bi glede na rezultate analiz markerjev SCAR (Radišek in sod., 2004), pomnoževal samo patotip PG1, čeprav pomnoži tudi izolata PG2 (Ciglarica 4, Ciglarca 3, Betonka), pri katerih pa so Cq vrednosti glede na ostale pozitivne vzorce visoke (Cq=  $\sim 33$ , drugače Cq= 22- 27). Par začetnih oligonukleotidov 10-1gs-F1/R1 poleg patotipa PG2 pomnoži tudi izolat Rec (patotip PG1), prav tako pa pomnoži tudi glivo *V. dahliae*.





**Slika 1:** Učinkovitost reakcije qPCR za par začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1 specifičnih za patotipa PG1 in PG2 glive *V. albo-atrum*. Naklon je -3,3404,  $R^2$  je 0,99, učinkovitost se izračuna po enačbi  $E = ((10-1/\text{naklon}) - 1) * 100 = 99 \%$ .

**Figure 1:** Efficiency of qPCR reaction for 9-1gs-F1/R1 primer pair specific for pathotype PG1 and PG2 *V. albo-atrum*. Slope is -3.3404,  $R^2$  is 0.99, efficiency is calculated by the equation  $E = ((10-1/\text{slope}) - 1) * 100 = 99 \%$ .

**Preglednica 2:** Testirani izolati gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae* iz hmelja in specifičnost posameznih začetnih oligonukleotidov

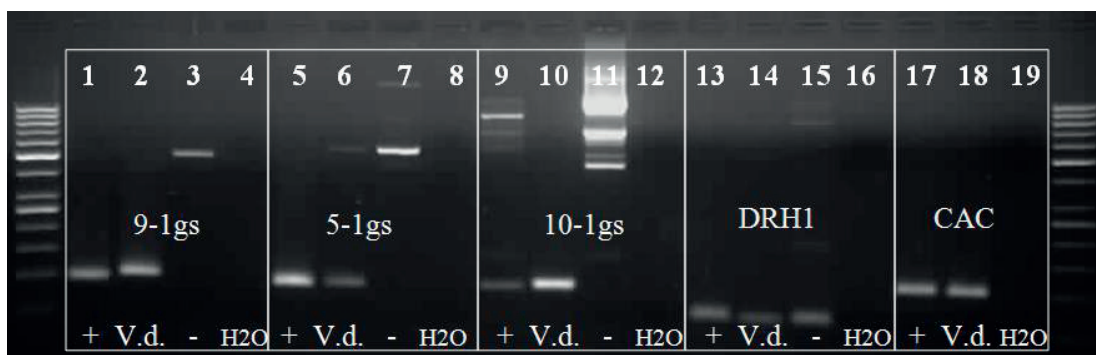
**Table 2:** Tested isolates of fungi *V. albo-atrum* and *V. dahliae* from hop and specificity of each primer

| Rod                  | Izolat      | Patotip * | Začetni oligonukleotid |           |      |      |       |       |        |
|----------------------|-------------|-----------|------------------------|-----------|------|------|-------|-------|--------|
|                      |             |           | ITS-F1/R1              | ITS-F2/R2 | 4bgs | 4cgs | 5-1gs | 9-1gs | 10-1gs |
| <i>V. albo-atrum</i> | Ciglarica 4 | PG2       | +                      | +         | +    | +    | +     | +     |        |
| <i>V. albo-atrum</i> | Ciglarca 3  | PG2       | /*                     | /         | /    | /    | +     | +     | +      |
| <i>V. albo-atrum</i> | Betonka     | PG2       | /                      | /         | /    | /    | +     | +     | +      |
| <i>V. albo-atrum</i> | T2          | PG2       | +                      | +         | +    | +    | +     | +     | -      |
| <i>V. albo-atrum</i> | Uršič       | PG2       | /                      | /         | /    | /    | +     | +     | /      |
| <i>V. albo-atrum</i> | Rec         | PG1       | /                      | /         | /    | /    | -     | +     | +      |
| <i>V. albo-atrum</i> | Zup         | PG1       | +                      | +         | +    | +    | -     | +     | +      |
| <i>V. dahliae</i>    | Ormož       | -         | /                      | /         | /    | /    | -     | +     | +      |

\*PG2= letalna oblika, PG1= blaga oblika, /= ni bilo testirano

Rezultati PCR v realnem času so si z omenjeno analizo markerjev SCAR (Radišek in sod., 2004) nekoliko nasprotujoči, pri slednji naj bi namreč par začetnih oligonukleotidov 9-1gs specifično namnožil samo PG2 patotip, par 10-1gs pa samo PG1 patotip. Razlog za razlike je lahko v samem načrtovanju začetnih oligonukleotidov (začetni oligonukleotidi za PCR reakcijo v realnem času so bili na novo načrtovani na osnovi zaporedij markerjev SCAR (Radišek in sod., 2004)), saj so za pomnoževanje v realnem času bolj primerni krajši produkti. Pri pristopu SCAR pomnoževanja se je pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov upoštevalo restriksijsko mesto AFLP markerja, ki je bilo prisotno oziroma odsotno pri patotipih in na ta način se je med drugim dosegla specifičnost pomnoževanja. Zaradi velike podobnosti med zaporedji gliv patotipa PG1 in PG2 pa lahko pride do spremembe v specifičnosti pomnoževanja omenjenih začetnih oligonukleotidov.

Ob rezultatih, ko določena C<sub>q</sub> vrednost za posamezen vzorec zelo izstopa, kar je lahko rezultat nespecifičnega pomnoževanja, je potrebno za isti vzorec uporabiti več parov začetnih oligonukleotidov z različno specifičnostjo pomnoževanja, prav tako pa je poleg analize talilnih krivulj, smiselno velikost namnoženih produktov preveriti tudi na agaroznem gelu. Slika 2 prikazuje nanos vzorcev PCR reakcije v realnem času na 2 % agarozni gel, na katerem so prikazani različni produkti 9-1gs, 5-1gs, 10-1gs, DRH1 in CAC začetnih oligonukleotidov. Iz gela je razvidno, da se na primer v vzorcu zdravega hmelja (-) lahko namnožijo produkti drugačnih velikosti (~700 bp) kot pričakovano (~100 bp), kar pomeni, da je lahko prišlo do nespecifičnega pomnoževanja. Tako obstaja možnost, da lahko na podlagi gela ovržemo lažno pozitivne rezultate. Gena DRH1 in CAC se namnožita v vseh vzorcih (slika 2) in tako služita kot referenca in hkrati notranja kontrola pomnoževanja.



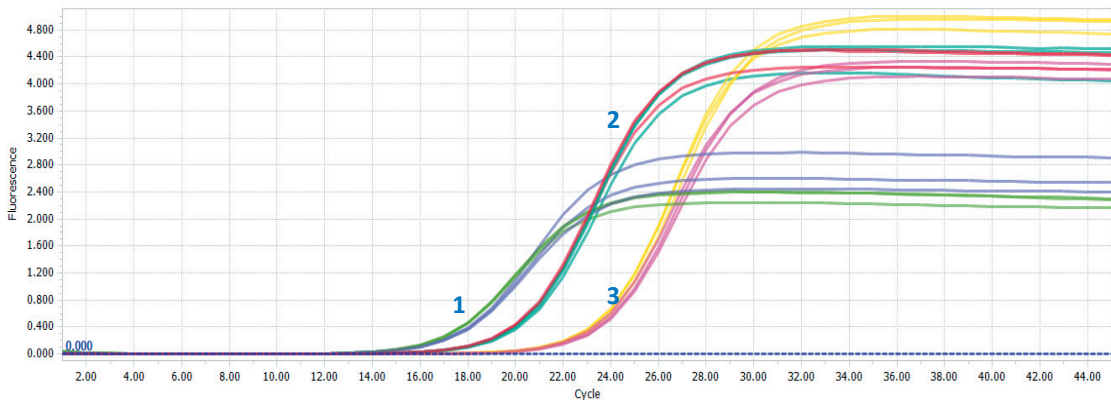
**Slika 2:** Nanos produktov reakcije PCR v realnem času na 2 % agarozni gel. Vzorci od 1-4: produkt začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1, od 5-8: 5-1gs-F1/R1, od 9-12: 10-1gs-F1/R1, od 13-16: DRH1-F/R in od 17-19: CAC-F1/R1. Na gelu so vidni pozitivni signali (velikost= ~100 bp) vzorcev glive *V. albo-atrum* (+) (PG2), glive *V.dahliae* (V.d.), vzorcev zdravega hmelja (-) in negativne kontrole (H<sub>2</sub>O). Z uporabo začetnih oligonukleotidov za notranjo kontrolo (DRH1 in CAC) se namnožijo tako pozitivni, kot tudi negativni vzorci (velikost za DRH1= ~50 bp, za CAC= ~100 bp).

**Figure 2:** Products of the Real-time PCR reaction on a 2% agarose gel. Samples from 1-4: product of primers 9-1gs-F1/R1, from 5-8: 5-1gs-F1/R1, from 9-12: 10-1gs-F1/R1, from 13-16: DRH1- F/R and from 17 to 19: CAC-F1/R1. In the gel there are positive signals (size= ~100 bp) from samples of *V. albo-atrum* (+) (PG2), fungi *V.dahliae* (Vd), samples of healthy hops (-) and negative control (H<sub>2</sub>O). With the use of primers for amplification of the internal control (DRH1 and CAC) positive as well as negative samples are amplified (size for DRH1= ~50 bp, for CAC= ~100 bp).

### 3.3 Analiza reakcije qPCR

V okviru razvoja reakcije qPCR za kvantifikacijo glive *V. albo-atrum* je bilo analiziranih sedem različnih izolatov glive *V. albo-atrum* in en izolat glive *V. dahliae* (preglednica 2). Vzorci gliv izoliranih iz čiste kulture so bili v reakciji qPCR testirani v različnih koncentracijah: 100 ng, 10 ng, 1 ng (slika 3) in 0.1 ng, 0.01 ng in 0.001 ng (slika 4). Na sliki 3 so prikazane krivulje pomnoževanja za *V. albo-atrum* namnoženega z uporabo začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1. Na sliki so prikazani trije različno redčeni vzorci s C<sub>q</sub> vrednostmi 16 (100 ng), 19 (10 ng) in 22 (1 ng) pri prazni vrednosti 0,2.





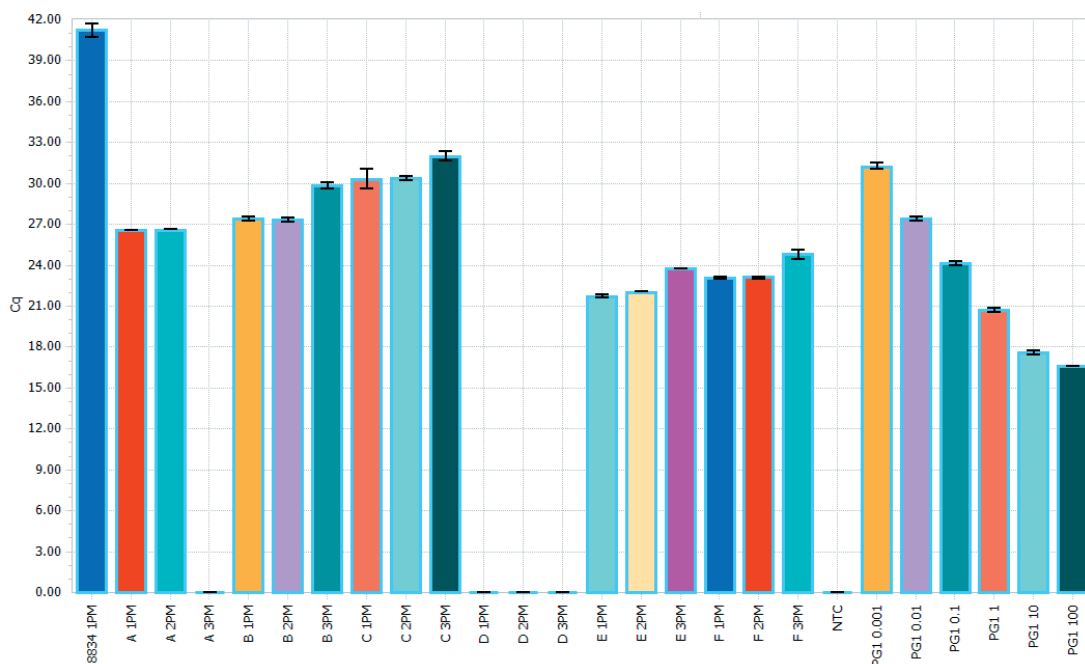
**Slika 3:** Krivulje pomnoževanja za *V. albo-atrum* s parom začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1. Prikazani vzorci predstavljajo serijo redčitev, pri čemer ima vzorec označen z 1 z najvišjo koncentracijo (100 ng) najnižjo Cq vrednost (16), vzorec 2 s koncentracijo 10 ng ima Cq= 19, in vzorec 3 z najnižjo koncentracijo (1 ng) ima najvišjo Cq vrednost (22).

**Figure 3:** Curves of amplification for *V. albo-atrum* with primer pair 9-1gs-F1/R1. Displayed samples representing a series of dilutions, whereby sample 1 has the lowest Cq value (16) and the highest concentration (100 ng), sample 2 has Cq = 19 and a concentration of 10 ng, sample 3 has the highest Cq value (22) and the lowest concentration (1 ng).

Na vzorcih gliv izoliranih iz okuženega hmelja je bila narejena serija redčitev:  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ , vzorcev označenih s črkami od A do F pri čemer vzorci A ( $10^0$ ), B ( $10^1$ ) in C ( $10^2$ ) predstavljajo patotip PG1, vzorci D ( $10^0$ ), E ( $10^1$ ) in F ( $10^2$ ) pa patotip PG2 (slika 4). V primeru neredčenega vzorca D (slika 4) je najverjetneje prišlo do inhibicije reakcije qPCR, zato sta za analizo primernejši redčitvi  $10^1$  oziroma  $10^2$ , med katerima ni bilo večjih razlik v Cq vrednostih. Najvišjo Cq vrednost (41) je imel vzorec 8834, zdrav hmelj, ki je negativen, torej ni bil okužen z glivo, kar pomeni, da je verjetno prišlo do nespecifičnega pomoževanja (slika 4). Hkrati z redčitvami so bile pri posameznih vzorcih testirane tudi različne koncentracije začetnih oligonukleotidov (1PM= 500 nM, 2PM= 300 nM, 3PM= 100 nM; slika 4).

Z namenom razvoja reakcije qPCR za specifično določanje glive *V. albo-atrum* je bilo testiranih sedem parov začetnih oligonukleotidov in dva gena, ki sta služila kot notranja kontrola pomnoževanja (preglednica 1). Za nadaljnjo uporabo so bili izbrani trije pari začetnih oligonukleotidov (9-1gs, 10-1gs, 5-1gs), ki ob skupni uporabi omogočajo ločevanje med posameznima patotipoma. Par 9-1gs je bil izbran zaradi zelo visoke učinkovitosti pomnoževanja in dosedanjih rezultatov analize markerjev SCAR (Radišek in sod., 2004), ne glede na to, da je pomnožil tudi glivo *V. dahliae*. Za določitev letalnega patotipa je bil izbran par 5-1gs, medtem ko je bil par 10-1gs izbran kot primeren za določevanje nekaterih PG1 izolatov (preglednica 2). Izbrani začetni oligonukleotidi so bili v reakciji qPCR testirani v treh različnih koncentracijah: 100 nM, 300 nM in 500 nM (slika 4). Najnižje Cq vrednosti so imeli vzorci s 500 nM koncentracijo 9-1gs, vendar glede na 300 nM koncentracijo skoraj ni bilo opaziti razlike. Za pomnoževanje je primernejša nižja koncentracija (300 nM), saj se tako izognemo nastanku dimerov. Uporaba 100 nM koncentracije začetnih oligonukleotidov pa

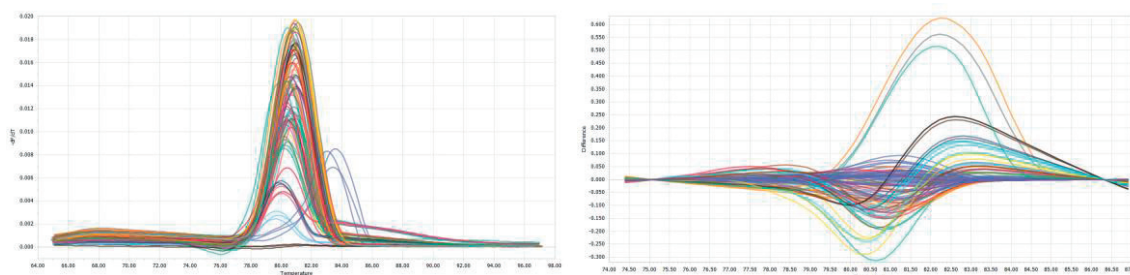
glede na naše rezultate ni priporočljiva zaradi možnosti lažno negativnih rezultatov (vzorec A 3PM, slika 4).



**Slika 4:** Cq vrednosti različno redčenih vzorcev pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1. Vzorec 8834 je zdrav hmelj. Vzorca glive *V. albo-atrum* A in D sta neredčena, B in E sta 10x redčena, C in F pa 100x redčena. Oznaka 1PM= 500 nM, 2PM= 300 nM, 3PM= 100 nM. Na sliki so prikazane tudi Cq vrednosti za standardno krivuljo za patotip PGI s koncentracijami od 0,001 ng do 100 ng. NTC= negativna kontrola.

**Figure 4:** Cq values of different diluted samples with different concentrations of primers 9-1gs-F1/R1. Sample 8834 is a healthy hops. Samples of *V. albo-atrum* A and D are not dilluted, B and E are 10x diluted, C and F are 100x diluted. Lable 1PM= 500 nM, 2PM= 300 nM, 3PM= 100 nM. The figure also shows the Cq values for the standard curve for PGI pathotype with concentrations of 0.001 ng to 100 ng. NTC = negative control.

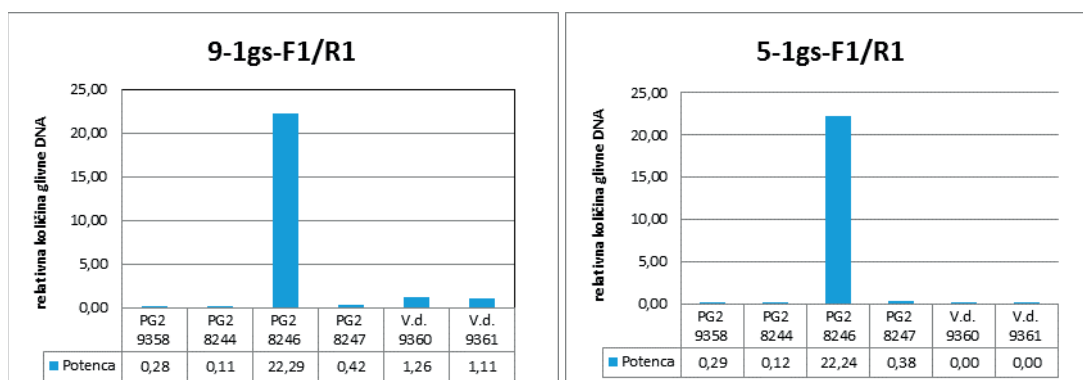
Pri testiranju specifičnosti reakcije qPCR smo analizirali rezultate analize talilnih krivulj, ki na osnovi segregiranja DNA in posledično denaturacije, omogočajo ločevanje med posameznimi namnoženimi produkti. Na sliki 5 (levo) so prikazane talilne krivulje za par 9-1gs-F1/R1, ki lahko namnoži tako PG1 kot PG2 patotip. Iz slike je razvidno, da se vsi vzorci ustrezno namnožijo, odstopajo samo trije, z višjo talilno temperaturo, ki pa so vzorci zdravega hmelja in kot smo dokazali z nanosom PCR produkta na agarozni gel so ti produkti veliko daljši od pričakovanih. Na tak način lahko zelo enostavno ločimo med namnoženimi tarčnimi in nespecifičnimi produkti in tako določimo lažno pozitivne rezultate. Na zelo podoben način, prav tako na osnovi talilnih krivulj, lahko razlike med produkti razberemo tudi iz HRM (ang. high resolution melting) analiz, kar prikazuje slika 5 desno.



**Slika 5:** HRM analize glive *V. albo-atrum*. Levo: Talilne krivulje za vzorce glive *V. albo-atrum* pri uporabi začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1. Talilna temperatura za primerja 9-1gs-F1/R1 je okrog 81°C. Trije vzorci s talilno temperaturo okrog 84°C so vzorci zdravega hmelja. Desno: Slika razlik med namnoženimi produkti pri uporabi začetnih oligonukleotidov 9-1gs-F1/R1. Tri krivulje, ki imajo višjo vrh kot ostale, predstavljajo vzorec zdravega hmelja. **Figure 5:** HRM analysis of *V. albo-atrum*. Left: Melting curves of samples of *V. albo-atrum* using primers 9-1gs-F1/R1. The melting temperature of primers 9-1gs-F1/R1 is about 81°C. Three samples with a melting temperature of about 84°C are samples of healthy hops. Right: Differences plot of the amplified products with the use of primers 9-1gs-F1/R1. The three curves, which have higher top than the other, represent a sample of a healthy hop.

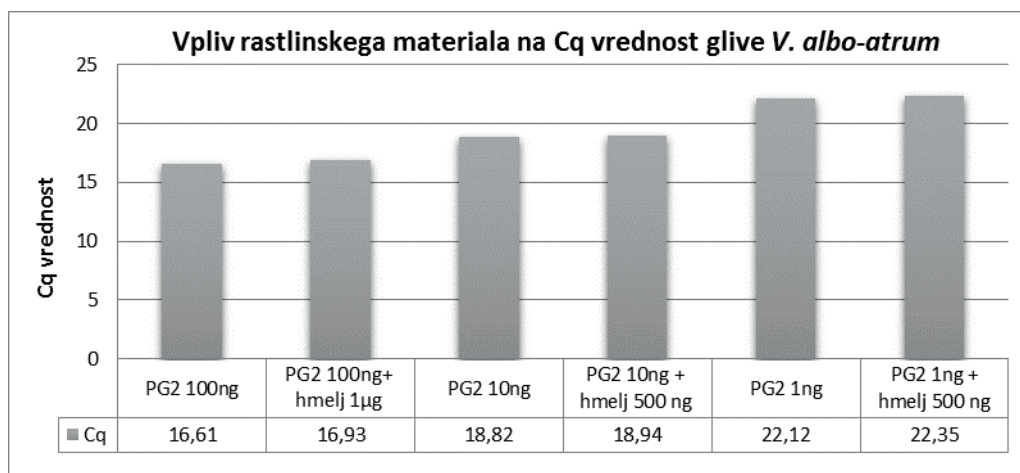
Na osnovi C<sub>q</sub> vrednosti vzorcev gliv in obeh notranjih kontrol pomnoževanja (DRH1 in CAC), je bila določena relativna količina glive v posameznem vzorcu z uporabo metode  $\Delta\Delta$  C<sub>q</sub> (Štajner in sod., 2013) (slika 6). Pri normalizaciji je bila upoštevana tudi učinkovitost pomnoževanja posameznih začetnih oligonukleotidov. Iz rezultatov slike 6 je razvidno, da je par 5-1gs-F1/R1, specifičen za PG2 patotip in ne namnoži glive *V. dahliae*, medtem ko par 9-1gs-F1/R1 poleg patotipa PG2, lahko namnoži tudi glivo *V. dahliae*. Med posameznimi vzorci patotipa PG2 je vidna razlika v količini namnožene glive, ki je pri vzorcu 8246 glede na ostale PG2 vzorce zelo visoka. Pri 9-1gs-F1/R1 se namnoži tudi *V. dahliae*, katere pa je glede na vzorec 8246 skoraj 20 x manj (slika 6).

Test qPCR za določanje in kvantifikacijo glive *V. albo-atrum* je bil validiran na vpliv oziroma inhibicijo rastlinskega materiala na samo pomnoževanje glive. V ta namen je bila vzorcem glive dodana 10x oziroma 50x koncentracija rastlinskega materiala (DNA izolirana iz zdravega hmelja) (slika 7). Ne glede na dodano količino rastlinske DNA (hmelj), so se C<sub>q</sub> vrednosti dobljene v primeru pomnoževanja čiste glivne DNA in glivne DNA mešane s hmeljno DNA minimalno razlikovale (za 0,1 – 0,3 C<sub>q</sub> vrednosti), kar je verjetno posledica tehnične variabilnosti.



**Slika 6:** Graf odvisnosti relativne količine glivne DNA glede na posamezen vzorec glive *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. Levo: Glivna DNA pomnožena s parom začetnih oligonukleotidov 9-1-gs-F1/R1, ki kaže veliko količino glive patotipa PG2 (vzorec 8246). Desno: Glivna DNA pomnožena s parom začetnih oligonukleotidov 5-1gs-F1/R1, ki je specifičen samo na PG2 (velika količina pri vzorcu 8246), glive *V. dahliae* pa ne namnoži.

**Figure 6:** Graph of dependence of the relative amounts of fungal DNA for each sample of *V. albo-atrum* and *V. dahliae*. Left: Fungal DNA amplified with a pair of primers 9-1-gs-F1/R1, which indicates a large amount of fungi PG2 pathotype (sample 8246). Right: Fungal DNA amplified with a pair of primers 5-1gs-F1/R1, which is specific only to PG2 (a large amount in sample 8246), the fungus *V. dahliae* is not amplified.



**Slika 7:** Vpliv rastlinskega materiala na pomnoževanje glive *V. albo-atrum*. Graf prikazuje odvisnost Cq vrednosti od posameznega vzorca. Ne glede na dodano količino rastlinskega materiala (hmelj), se Cq vrednosti glede na samo glivno DNA (PG2) drastično ne razlikujejo.

**Figure 7:** Effect of plant material on the amplification of *V. albo-atrum*. The graph shows the dependence of Cq values from individual samples. Regardless of the added amount of the plant material (hops), the Cq values with respect to fungal DNA alone (PG2) drastically don't differ.

#### 4 ZAKLJUČEK

PCR v realnem času je zelo občutljiva metoda za določanje gliv *V.albo-atrum* in *V. dahliae*, ki je primerna za uporabo v rutinskih testiranjih ter pri epidemioloških študijah. V kombinaciji s CTAB izolacijo je lahko analiza zelo hitra, saj privede do rezultata v enem oziroma dveh dneh, medtem ko je postopek z uporabo selekcijskih gojišč vsaj trikrat daljši. Prav tako se v primerjavi z do sedaj vpeljano PCR metodo izognemo postopku agarozne elektroforeze.

Zaradi zelo zahtevnega načrtovanja začetnih oligonukleotidov je specifična določitev posameznega patotipa glive *V. albo-atrum* z uporabo samo enega para začetnih oligonukleotidov praktično nemogoča. Uporaba več različnih parov začetnih oligonukleotidov, kot so 9-1gs, 5-1gs in 10-1gs, omogoča natančno določitev tako rodu, vrste in patotipa gliv, zato bi bilo v nadaljnje smiselno razviti hkratno reakcijo qPCR (ang. multiplex qPCR). Najprej se z uporabo 9-1gs potrdi prisotnost gliv *V. albo-atrum* in *V. dahliae*, nato se s 5-1gs določi oziroma ovrže PG2 patotip in gliva *V. dahliae*, nato pa še z 10-1gs potrdi oziroma ovrže PG1 patotip. Pri samem določevanju nam lahko pomaga tudi analiza talilne krivulje in HRM analiza ter dodatno, za preverjanje rezultatov še nanos na agarozni gel, na ta način lahko ovržemo lažno negativne oziroma lažno pozitivne rezultate.

PCR v realnem času je primeren tudi za kvantifikacijo gliv v rastlinskem tkivu, ki je mogoča ob uporabi genov za notranjo kontrolo (t.i. referenčnih ali vzdrževalnih genov), ki se nahajajo v hmelju in naj bi bili enako izraženi ne glede na zunanje vplive. Omenjeni geni omogočajo normalizacijo rezultatov, in s tem tudi natančno kvantifikacijo, saj na osnovi teh genov izničimo vso variabilnost, ki je lahko posledica napačne kvantifikacije DNA (Vandesompele in sod., 2002). Zaradi višje občutljivosti detekcije in manjšega vpliva inhibitorjev se lahko v bodoče metoda qPCR vpelje tudi v rutinska testiranja tal, ki so za pridelovalce pomembna pred zasnovo novih nasadov ali pri ocenjevanju učinkovitosti ukrepov nižanja talnega infekcijskega potenciala glive.

#### 5 VIRI

- Barbara, D.J. in Clewes, E. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Mol Plant Pathol.* 2003; 4: 297–305.
- Cregeen, S., Radišek, S., Mandelc, S., Turk, B., Štajner, N., Jakše, J. in Javornik, B. Different gene expressions of resistant and susceptible hop cultivars in response to infection with a highly aggressive strain of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Mol Biol Rep.* 2014; DOI 10.1007/s11105-014-0767-4.
- Down, G., Barbara, D. in Radišek, S. *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. *Bull OEPP.* 2007; 37: 528-535.
- EPPO, 2015, <http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>, citirano 12.10.2015.
- Fradin, E. F. in Thomma, B. P. H. J. Physiology and molecular aspect of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo atrum*. *Molecular Plant Pathology.* 2006; 7 (2): 71-86.
- Gams, W., Zare, R., Summerbell, R.C. Proposal to conserve the generic name *Verticillium* (anamorphic *Ascomycetes*) with a conserved type. *Taxon.* 2005; 54: 179.
- Gao, R., in Zhang, G. Potential of DNA barcoding for detecting quarantine fungi. *Phytopathology.* 2013;103:1103-1107.
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, M., Usami, T., Platt, H.W. in Subbarao, K.V. Phylogenetics and Taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE.* 2011; 6(12): e28341. Doi:10.1371/journal.pone.0028341.



- Inderbiztin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., Subbarao, K.V. Identification and Differentiation of *Verticillium* Species and *V. longisporum* Lineages by Simplex and Multiplex PCR Assay. *PLoS ONE*. 2013; 8, 6: e65990, doi:10.1371/journal.pone.0065990
- Kump, B. in Javornik, B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114: 149-159.
- Maurer, K.A., Radišek, S., Berg, G. in Seefelder, S. Real-time PCR assay to detect *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* in hops: development and comparison with a standard PCR method. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2013; 120(3): 105-114.
- Nazar, R.N., Hu, X., Schmid, T.J., Culham, D., Robb, J. Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and molecular Plant Pathology*. 1991; 39: 1-11.
- Pegg, G. F. in Brady, B. L. *Verticillium* Wilts. Wallingford, *CABI Publishing*. 2002; 552 str.
- Radišek, S. *Verticillium* Wilt. V: Mahaffee, Walter F. (ur.), Pethybridge, Sarah J. (ur.), Gent, David H. (ur.). *Compendium of hop diseases and pests*. St. Paul (Minnesota): The American Phytopathological Society, cop. 2009: 33-36.
- Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A. in Javornik, B. Characterization of *Verticillium albo-atrum* Field Isolates Using Pathogenicity Data and AFLP Analysis. *Plant Disease*. 2003; 87: 633-638.
- Radišek, S., Jakše, J. in Javornik, B. Development of pathotype specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease*. 2004; 88: 1115-1122.
- Radišek S., Jakše, J. in Javornik, B. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*. 2006; 116: 301-314.
- Robb, J., Moukamedov, R., Hu, X., Platt, H., Nazar, R.N. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1993; 43: 423-436.
- Štajner, N., Cregeen, S. in Javornik, B. Evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies in hop (*Humulus lupulus* L.) during infection with vascular pathogen *Verticillium albo-atrum*. *PLoS ONE*. 2013; 8(7): e68228. doi:10.1371/journal.pone.0068228.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; 3.