

RAZVOJ METODE UMETNEGA OKUŽEVANJA HMELJA Z MONOMEROM IN DIMEROM CBCVd

Tanja GUČEK¹, Jernej JAKŠE², Branka JAVORNIK³ in Sebastjan RADIŠEK⁴

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Received / prispelo: 9. 11. 2017

Accepted / sprejeto: 20. 11. 2017

Izveček

Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, sestavljeni samo iz krožne RNA molekule velikosti od 246-401 nukleotidov. Kljub enostavni strukturi lahko povzročajo zelo hude bolezni na večjem številu gostiteljskih rastlin, med katerimi so številne gospodarsko pomembne kmetijske rastline, okrasne rastline in celo nekatere drevesne vrste. Hmelj ni izjema; okužijo ga lahko hmeljev latentni viroid (HLVd), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd), viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in viroid grbavosti jabolok (AFCVd). Viroid CBCVd je na hmelju prisoten samo v Sloveniji; na njem povzroča bolezen hudo viroidno zakrnelost hmelja. Bolezen je zelo agresivna, saj povzroča hiranje in odmiranje rastlin s hitro dinamiko širjenja. V hmelju je CBCVd prisoten vedno v kombinaciji s HLVd, kar otežuje etiološke študije določanja vpliva CBCVd na rastline hmelja. V ta namen je bila razvita metoda umetnega okuževanja s CBCVd, v monomerni in dimerni obliki. Načrtovana monomer in dimer sta bila vstavljena v plazmid, ki je služil kot osnova za prepis v RNA. Viroidna RNA je bila uporabljena za umetno okužbo hmelja, paradiznika in kumar. Vsaka izmed gostiteljskih rastlin je bila okužena tako z monomerom in dimerom CBCVd, kot tudi s celokupnimi nukleinskimi kislinami, izoliranimi iz okuženega hmelja. Pri tem je dimer CBCVd izkazal visoko stopnjo infektivnosti in tako primernost za izvajanje umetnih okužb.

Ključne besede: hmelj, viroid, mehanska inokulacija, CBCVd, dimer

¹ 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

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

³ Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: branka.javornik@bf.uni-lj.si

⁴ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ARTIFICIAL INOCULATION OF HOPS WITH MONOMERIC AND DIMERIC CBCVd

Abstract

Viroids are the smallest plant pathogens, consisting only of a circular RNA molecule, between 246 and 401 nucleotides in size. Despite the simple structure, they can cause very serious diseases on a wide range of hosts, among which there are many economically important agricultural plants, ornamental plants and even some tree species. Not even hops is an exception, which can be infected by hop latent viroid (HLVd), hop stunt viroid (HSVd), citrus bark cracking viroid (CBCVd) and apple fruit crinkle viroid (AFCVd). The CBCVd viroid is currently present on hops only in Slovenia, causing severe hop stunt disease. The disease is very aggressive, because it causes the degradation and dying of plants with a rapid dynamic of spread. CBCVd is always present in hops in combination with HLVd, which makes etiological study of the impact of CBCVd on hop plants difficult. A method of artificial inoculation with CBCVd was therefore developed, in monomer and dimer form. The designed monomer and dimer were inserted into the plasmid, which served as the basis for RNA transcription. Viroid RNA was used for artificial infection of hops, tomatoes and cucumbers. Each of the host plants was infected with both the monomeric and dimeric CBCVd, as well as total nucleic acids isolated from the infected hop. The CBCVd dimer showed a high degree of infectivity and thus suitability for performing artificial infections.

Key words: hop, viroid, artificial inoculation, CBCVd, dimer

1 UVOD

Viroid razpakanosti skorje agrumov (CBCVd) predstavlja krožna RNA molekula, velikosti od 283-286 nukleotidov (nt) (NCBI, GenBank), in je eden izmed številnih viroidov, ki lahko okužijo rastline iz rodu *Citrus*. Na dovzetnih sortah agrumov in trilstnem citronovcu (*Poncirus trifoliata*) povzroča pokanje skorje, medtem ko večje gospodarske škode zaradi njegove prisotnosti v pridelavi agrumov ni zaznati. Spada med manj razširjene viroide in se v večini primerov pojavlja v obliki mešanih okužb z drugimi viroidi iz skupine citrus (Verniere in sod., 2004; 2006). Za razliko od agrumov na hmelju CBCVd povzroča nevarno bolezen, imenovano hudo viroidno zakrnelost hmelja. Bolezenski znaki okužbe s CBCVd se pokažejo že 4 mesece po okužbi in obsegajo zaostajanje v rasti, deformacije storžkov in listov, pokanje trte, trohnenje koreninskega sistema in po 3-5 letih od okužbe propad rastline (Jakše in sod., 2015; Mishra in sod., 2016). V primeru hude viroidne zakrnelosti je v okuženih rastlinah poleg CBCVd vedno prisoten tudi hmeljev latentni viroid (HLVd) (Jakše in sod., 2015), ki je vsesplošno razširjen v

vseh svetovnih območjih pridelovanja hmelja. HLVD na večini sort ne povzroča vidnih bolezenskih znakov, vendar negativno vpliva na velikost storžkov, kvaliteto eteričnih olj in vsebnost alfa-kislin (Puchta in sod., 1988; Barbara in sod., 1990). Podobna bolezenska znamenja kot CBCVD lahko na hmelju povzroči tudi viroid zakrnelosti hmelja (HSVD), katerega prisotnost je bila prav tako potrjena v Sloveniji (Radišek in sod., 2012). Bolezen, ki jo povzroča HSVD ni tako agresivna in hitra, saj se prvi bolezenski znaki pojavijo šele 3-5 let po okužbi, rastline pa preživijo tudi 10 let ali več (Sano, 2003; 2013). Huda viroidna zakrnelost hmelja ni ozdravljiva bolezen, zato je okužene rastline potrebno uničiti, hkrati pa z ustreznimi ukrepi poskrbeti, da se širjenje bolezni čim bolj omeji. Največji del širjenja CBCVD predstavlja mehanski prenos s sokom in ostanki okuženih rastlin hmelja (Jakše in sod., 2015), kar pri pogosti mehanski obdelavi v hmeljiščih povzroča hiter prenos in širjenje bolezni. Najbolj učinkovit ukrep za preprečevanje širjenja je uporaba razkužil in ustrezno ravnanje ob odkritju obolelih rastlin (Radišek in sod., 2017).

Rastline se lahko z viroidi mehansko okuži preko listov, z obrezovanjem ali injiciranjem inokuluma (Hadidi in sod., 2003). Na potek okužbe lahko negativno vplivajo inhibitorji, prisotni v rastlinskem soku, zato se za stabilizacijo inokuluma največkrat uporablja fosfatni pufer in ustrezen pH (Verhoeven in Roenhorst, 2000). Poleg rastlinskih ekstraktov lahko rastline okužujemo z ekstrakti celokupnih nukleinskih kislin, očiščeno viroidno RNA in prepisi viroidne cDNA ali RNA, največkrat z uporabo biolistike (Hadidi in sod., 2003; Matoušek in sod., 2004). Dimerna viroidna cDNA je bolj infektivna kot monomeri viroidov in se lahko uporablja pri umetni inokulaciji specifičnih viroidov, vendar se za okuževanje pogosteje uporabljajo *in vitro* RNA prepisi (Adkar-Purushothama in sod., 2015).

Vpliv CBCVD na hmelj je še vedno neraziskan, kajti v obolelih rastlinah v hmeljiščih je vedno prisoten v kombinaciji s HLVD, pogosto pa so rastline okužene tudi z virusi. Tako smo z namenom razvoja inokula, ki vsebuje samo CBCVD, razvili metodo umetnega okuževanja z uporabo monomerov in dimerov, ki je bila testirana tako na hmelju, kot tudi na paradižniku in kumarah. Na novo razvita tehnika bo omogočila neposredno določanje vpliva CBCVD na hmelju in ostalih gostiteljskih rastlinah in tako pomembno prispevala k proučevanju in razumevanju patogeneze in etiologije viroidnih obolenj.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za umetno okužbo z monomerom in dimerom CBCVD ter celokupnimi nukleinskimi kislinami izoliranimi iz okuženega hmelja, smo uporabili rastline, za katere je bilo že predhodno dokazano, da so uspešni gostitelji viroida CBCVD (Guček in sod., 2015). Okužili smo hmelj sorte Celeia, ki je zelo dovzeten na

okužbo s CBCVd, paradižnik sorte Heinz 1370 in kumare sorte Pariški kornišon. Za okužbo smo potrebovali mlado tkivo, zato smo hmelj okužili v fazi 20-30 listov, paradižnik v fazi 4-5 listov, medtem ko so bile kumare v fazi 2-5 listov. Rastline so bile pred in po okužbi vzdrževane v rastlinjaku Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, pod naravno svetlobo in nihanjem temperature $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Izolacija celokupnih nukleinskih kislin

Celokupne nukleinske kisline smo iz okuženih vzorcev hmelja, paradižnika in kumar izolirali z uporabo CTAB reagenta, kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami. Uporabili smo 100 mg listov, ki smo jih zmelili z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto (Meku).

2.3 Načrtovanje monomera in dimera viroida CBCVd

Monomer in dimere viroida CBCVd smo načrtovali, umetno sintetizirali (SGI-DNA, ZDA) in vnesli v plazmid pBluescript II SK (+) (Stratagene). Za monomer smo uporabili zaporedje viroida CBCVd iz hmelja (GenBank KM211546). Isto zaporedje smo uporabili tudi za dimer, le da smo v tem primeru načrtovali dve različni zaporedji dimera. V prvem primeru smo dvema zaporedjema viroida CBCVd dodali dodatne nukleotide in na ta način pridobili restriksijsko mesto za encim (dimer 2015), v drugem primeru pa smo samo združili dve zaporedji viroida (dimer 2016). Z uporabo programa RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) smo preverili strukturo monomera in dimerov. Načrtovani monomer in dimera so bili nato umetno sintetizirani in vneseni v plazmid pBluescript II SK (+) v območje z več mesti za kloniranje (ang. multiple cloning site, mcs), za T7-promotorjem.

2.4 Transformacija bakterij *Escherichia coli* s plazmidi

Z namenom določitve nukleotidnega zaporedja monomera in dimerov viroida CBCVd smo plazmide z umetno sintetiziranimi zaporedji najprej transformirali v bakterije *E. coli*. Uporabili smo bakterije *E. coli* DH5 α (200 μl), dodali 1 μl plazmida z monomerom/dimerom (1ng/ μl), jih rahlo premešali in inkubirali na ledu 30 minut. Nato smo jih za 1 minuto postavili v vodno kopel na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter jih takoj postavili na led za 5 min. V epice smo nato odpipetirali 900 μl ogretega tekočega medija LB in jih 1 uro inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 120 rpm. Po inkubaciji smo jih v treh različnih volumnih (10, 50 in 100 μl) razmazali na plošče LB/Car/X-Gal/IPTG ter jih inkubirali preko noči pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vse transformirane bakterije, ki so prejele plazmid, so pridobile tudi rezistenco na antibiotik ampicilin. Hkrati je potekla še dodatna selekcija z genom lacZ, kjer bakterije lahko izrabljajo X-Gal, ki se pretvori v modro obarvan produkt. V primeru, da je v plazmidu insert, se gen za lacZ prekine in take kolonije ostanejo bele (modro-bela selekcija). Naslednji dan smo

tako iz plošč izbrali bele kolonije, ki so prejele plazmide z monomerom/dimerom, in jih pripravili za gojenje v tekočem gojišču preko noči. V ta namen smo v tekoče LB gojišče dodali ampicilin (100 mg/ml) in vsaki epruveti dodali ustrezno kolonijo. Epruvete smo inkubirali preko noči pri 37 °C in 120 rpm.

2.5 Izolacija plazmidov iz bakterij *E. coli*

Plazmide smo iz transformiranih bakterij *E. coli* izolirali z uporabo kita High Pure plasmid isolation kit (Roche). Sledili smo navodilom proizvajalca in plazmide na koncu sprali z 100 µl Elution Buffer. Vzorce smo shranili pri -20 °C.

2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja plazmidov

Naš namen je bil določiti nukleotidno zaporedje plazmidom z umetno sintetiziranimi zaporedji monomera in dimerov, zato smo izolirane plazmide namnožili v PCR reakciji z uporabo kita BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Za PCR reakcijo smo vsak plazmid namnožili v dveh reakcijah, v prvi z uporabo začetnega oligonukleotida T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') in v drugi reakciji z uporabo začetnega oligonukleotida M13R (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'). Za PCR reakcijo smo uporabili 1,5 µl izoliranega plazmida, ki smo mu dodali reakcijsko mešanico z 200 nM začetnega oligonukleotida T7 oziroma M13R, 2 µl 5x BigDye Sequencing Buffer, 0,4 µl BigDye Terminator in ustrezen volumen deionizirane H₂O do končnega volumna 10 µl. Program PCR reakcije je bil sledeč: 3 min pri 96 °C, 99 ciklov na 96 °C 10s, 10s pri 50 °C in 4 min pri 60 °C ter zadnji korak 7 min pri 72 °C in hlajenje pri 4 °C. Namnožen PCR produkt smo nato ustrezno očistili in ga poslali na določanje nukleotidnega zaporedja z uporabo avtomatskega sekvenatorja 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Oddelek za zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Določena nukleotidna zaporedja smo analizirali z uporabo programa CodoneCode Aligner in jih z našimi zaporedji poravnali z uporabo programa Clustal Omega (EMBL-EBI). Za nadaljnje delo smo izbrali plazmide s 100 % ujemanjem glede na načrtovana zaporedja monomera in dimerov.

2.7 Merjenje koncentracije DNA in RNA

Zaradi linearizacije plazmidov, številnih korakov čiščenja in transkripcije vzorcev, smo koncentracijo DNA oziroma RNA izmerili večkrat. V ta namen smo za določanje koncentracije DNA uporabili fluorometer Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific), za določanje koncentracije RNA pa BioPhotometer D30 (Eppendorf).

2.8 Linearizacija in čiščenje plazmidov

Da smo lahko izvedli prepis monomera in dimerov CBCVd iz DNA v RNA, smo morali najprej plazmide rezati z ustreznimi restriktivnimi encimi. V ta namen smo

uporabili restriksijska encima *NotI* in *ApaI* (New England BioLabs). Pri dimeru 2015 smo zaradi dodanih nukleotidov zaporedje vnesli pred restriksijsko mesto za encim *NotI*, medtem ko smo za monomer in dimer 2016 zaporedji vnesli pred restriksijsko mesto za encim *ApaI*. V obeh primerih je bilo mesto vnosa in restrikcije izbrano tako, da smo lahko za prepis uporabili T7-polimerazo, torej za T7-promotorjem. Pri linearizaciji plazmidov z restriksijskimi encimi smo sledili navodilom proizvajalca, zaradi večjega končnega izkoristka po poteku čiščenja, pa smo v reakciji povečali končni volumen in posledično priporočeno količino začetne DNA, ki je bila namesto 0,5 -1 µg, v našem primeru 2 µg. Potek linearizacije smo preverili na 0,9 % agaroznem gelu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) pod UV lučjo. Vzorce smo očistili z mešanico kloroform:izoamilakohola (24:1) in precipitacijo na -20 °C preko noči (Kump in Javornik, 1996).

2.9 Prepis DNA v RNA s T7-polimerazo

Za prepis DNA v RNA smo uporabili komplet reagentov MEGAscript T7 Transcription Kit (Ambion, Life technologies) po navodilih proizvajalca. Glede na izmerjeno koncentracijo lineariziranega plazmida smo reakciji transkripcije s T7-polimerazo dodali 8 µl lineariziranega plazmida, tako da smo povečali končno količino plazmida iz predlagane 0,1-1 µg na ~ 2 µg. Kot kontrolo reakcije prepisa DNA v RNA smo uporabili priložen plazmid pTRI-Xef (Ambion, Life technologies). Da smo se prepričali ali je reakcija uspela, smo koncentracijo RNA vzorcev in kontrole izmerili z uporabo BioPhotometra D30 (Eppendorf).

2.10 Meritve koncentracije in kvalitete RNA z inštrumentom Bioanalyzer

Koncentracijo in kvaliteto RNA smo izmerili tudi z uporabo inštrumenta 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). V ta namen smo naredili direktno analizo vzorcev in hkrati tudi analizo 10 krat redčenih vzorcev sintetizirane RNA. Glede na dobljene rezultate smo vzorce ustrezno redčili v RNaze free H₂O (Sigma Aldrich) in za umetno okuževanje uporabili vzorce s končno koncentracijo ~ 300 ng/µl.

2.11 Umetna okužba rastlin

Za umetno okužbo z monomerom in dimeroma CBCVd smo poleg hmelja sorte Celeia, uporabili paradižnik sorte Heinz 1370 in kumare sorte Pariški kornišon. Z injiciranjem v steblo smo okužili po 5 rastlin vsake rastlinske vrste glede na vrsto inokula. Za pozitivno kontrolo okužbe nam je služil vzorec celokupnih nukleinskih kislin, izoliran iz okuženega hmelja, medtem ko smo rastline negativne kontrole inokulirali s sterilno destilirano vodo. Vsako rastlino smo okužili s 40 µl RNA (300 ng/µl), ki smo jo v rastlino injicirali preko stebela, tako da smo s skalpelom v steblo naredili vzdolžno zarezo, v katero smo s pipeto odpipetirali po 10 µl oziroma 20 µl RNA. Na koncu smo vse zareze zavili s parafilnom in rastline postavili v rastlinjak. Inokulirane rastline smo testirali na prisotnost CBCVd 85 dni po okužbi

(dpi, ang. days post infection), v primeru hmelja pa smo testiranje ponovili po dormanci v časovni točki 370 dpi.

2.12 RT-PCR

Vzorci izolirane iz umetno okuženih rastlin hmelja, paradižnika in kumar smo analizirali z metodo RT-PCR za določanje viroida CBCVd v hmelju (Jakše in sod., 2015). V ta namen smo uporabili komercialni komplet One Step RT-PCR (Qiagen) in delno modificirane začetne oligonukleotide CVd-IV-F2 (5'-GGGGAAATCTCTTCAGACTC-3') in CVd-IV-R1 (5'-GGGGATCCCTCTTCAGGT-3') (Bernad in Duran-Vila, 2006). Izolirano RNA (~20 ng) smo skupaj s 4 µl začetnih oligonukleotidov (0,6 µM vsak) denaturirali pri 95 °C 5 min. Po denaturaciji smo mešanico ohladili na ledu in ji dodali 1x OneStep RT-PCR Buffer, 0.4 mM vsakega dNTP, 1x Q-Solution, 2 µl OneStep RT-PCR Enzyme Mix in sterilne vode (Sigma Aldrich), do končnega volumna 12 µl. Program RT-PCR reakcije je bil sledeč: 30 min pri 50 °C, 15 min pri 95 °C, 10 ciklov na 30 s pri 94 °C, 30 s pri 65 °C (-1 °C/cikel) in 1 min pri 72 °C, 35 ciklov na 30 s pri 94 °C, 30 s pri 55 °C in 1 min pri 72 °C, ter zadnji korak 10 min pri 72 °C in hlajenje na 4 °C. Namnožene produkte smo analizirali z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) pod UV lučjo.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Namen laboratorijskega dela je bil razviti umetno okuževanje hmelja z inokulom na osnovi monomera in dimeri CBCVd. Glede na dosedanje raziskave (Cress in sod., 1983; Adkar-Purushothama in sod., 2015; Verhoeven in sod., 2009) okuževanja rastlin s cDNA konstrukti monomerov in dimerov viroidov je bilo ugotovljeno, da so dimeri viroidov bolj infektivni. V našem primeru smo infektivnost primerjali tako med monomerom in dimerom viroida CBCVd, kot tudi med samimi dimeri, s poudarkom na vplivu strukture dimeri. Hkrati smo razliko v infektivnosti testirali tudi na različnih gostiteljih, med katerimi smo poleg hmelja uporabili tudi paradižnik in kumare.

3.1 Načrtovanje monomera in dimeri CBCVd


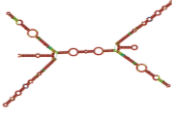
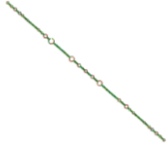
Strukturo monomera in dimerov viroida CBCVd smo določili z uporabo programa RNAfold web server in je bila v primeru monomera 2016 in dimeri 2016 paličasta, v primeru dimeri 2015 pa zelo razvejana, čeprav smo samemu zaporedju dodali samo nekaj nukleotidov (preglednica 1).

3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje plazmidov z monomerom oziroma dimerom smo analizirali z uporabo programa CodoneCode Aligner, poravnave pa izvedli s programom

Clustal Omega (EMBL-EBI). Poravnave analiziranih zaporedij so se 100 % ujemale z načrtovanimi zaporedji monomera in dimerov viroida CBCVd.

Preglednica 1: Zaporedje monomera in dimerov z ustrežno strukturo (RNAfold web server)

Zaporedje monomera/dimera CBCVd	RNAfold web server
<pre>>CBCVd monomer 2016 CCC GGGGAAATCTCTTCAGACTCGTCGAGGGGAGGGGCCCGGGATCACTGGCGTCCAGC ACCGGAACAGGAGCTCGTCTCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTTCT CCTTCGCGACCTGAGAAAAGAACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGG CTTGTTAAATAAAATGGCCCGCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGAC TAAAAACAGCTTGAGGAGGGAACATACCTGAAGAGGGATC</pre>	
<pre>>CBCVd dimer_2015 ATCCCCGGGAAATCTCTTCAGACTCGTCGAGGGGAGGGGCCCGGGATCACTGGCGTCC AGCACCGGAACAGGAGCTCGTCTCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCT TCTTCTTTCGCGACCTGAGAAAAGAACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCC CAGGCTTGTTAAATAAAATGGCCCGCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGAC CAAATAAAACAGCTTGAGGAGGGAACATACCTGAAGAGGGATCGAAATCTCTTCAGACT CTTCGAGGGGAGGGCCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCACCGGAACAGGAGCTCGTCTCC TTCCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTTCTTCTTTCGCGACCTGAGAAAAG ACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGGCTTGTTAAATAAAATGGCCCG CTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGACCAAATAAAACAGCTTGAGGAGGG AACATACCTGAAGAGGGATCCCCGGGAA</pre>	
<pre>>CBCVd dimer 2016 CCC GGGGAAATCTCTTCAGACTCGTCGAGGGGAGGGGCCCGGGATCACTGGCGTCCAGC ACCGGAACAGGAGCTCGTCTCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTTCT CCTTCGCGACCTGAGAAAAGAACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGG CTTGTTAAATAAAATGGCCCGCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGACCAA TAAAAACAGCTTGAGGAGGGAACATACCTGAAGAGGGATCCCCGGGAAATCTCTTCAG ACTCGTCGAGGGGAGGGCCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCACCGGAACAGGAGCTCGTCT CCTTCTTCCATCGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTTCTTCTTTCGCGACCTGAGAAAAG AACTACCCGGTGGATACAACCTTGGGTTGTTCTCCAGGCTTGTTAAATAAAATGGCCCG GCTTTTGAGACCCCTCTGGGGAATTTCTGCGGGACCAAATAAAACAGCTTGAGGAGG GAACATACTGAAGAGGGATC</pre>	

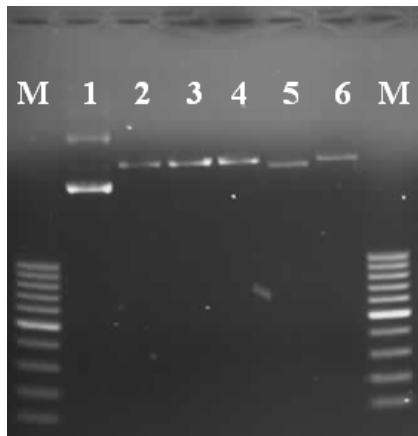
3.3 Linearizacija in čiščenje plazmidov

Uspešnost restrikcije encimov *NotI* in *Apal* smo preverili z vizualizacijo na 0,9 % agaroznem gelu (slika 1). Cel plazmid brez delovanja restrikcijskih encimov namreč zaradi krožne strukture v gelu potuje hitreje in se vizualno loči od lineariziranega plazmida, ki zaradi linearne strukture potuje počasneje. S slike 1 je tako razvidno, da je restrikcija uspešno potekla in da je plazmid primeren za uporabo pri prepisu DNA v RNA.

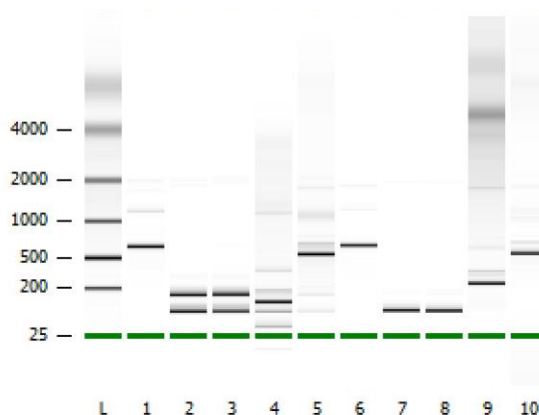
3.4 Prepis DNA v RNA s T7-polimerazo

Glede na mesto vnosa monomera in dimerov viroida CBCVd, usmerjenosti plazmida pBluescript SK II (+) in mesta restrikcije, smo za prepis DNA v RNA uporabili T7-polimerazo. Uspešnost prepisa smo preverili z uporabo kontrolnega plazmida pTRI-Xef, ki smo mu na koncu izmerili koncentracijo in oceno čistosti ($A_{260/280}$). Ker je bila koncentracija in čistost kontrolnega plazmida in analiziranih vzorcev v okviru predvidene, smo vzorcem pred nadaljnjim delom še dodatno

določili koncentracijo in kvaliteto z uporabo inštrumenta 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).



Slika 1: Vizualizacija linearizacije plazmidov z restriksijskimi encimi na 0,9 % agaroznem gelu. Številka 1 predstavlja cel plazmid, številke od 2 do 6 pa linearizirane plazmide, od katerih je številka 5 monomer CBCVd, ostali pa so dimeri CBCVd. Na gelu je marker velikosti 100 bp (M).



Slika 2: Analiza velikosti monomera in dimerov CBCVd z uporabo inštrumenta 2100 BioAnalyzer. Vzorec številka 1 je dimer 2015, številka 4 je monomer 2016 in številka 5 je dimer 2016. Vzorec številka 6 je 10 krat redčen dimer 2015, številka 9 je 10 krat redčen monomer 2016 in številka 10 je 10 krat redčen dimer 2016. Vzorci številka 2, 3, 7 in 8 so dimer CBCVd narejen na Češkem. Marker je označen z L in predstavlja velikosti od 25 do 4000 nukleotidov.

3.5 Meritve koncentracije in kvalitete RNA z inštrumentom Bioanalyzer

Po prepisu DNA v RNA smo vzorcem določili kvaliteto in koncentracijo z uporabo inštrumenta 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Analizirali smo tako neredčene, kot 10 krat redčene vzorce monomera in dimerov viroida CBCVd in jim določili koncentracije (preglednica 2). Poleg kvalitete smo dobili tudi informacijo o velikosti RNA (preglednica 2, slika 2), iz katere lahko sklepamo ali je prišlo do razreza na ustreznem mestu ali ne.

Iz rezultatov pričakovane in videne velikosti RNA (preglednica 2) je razvidno, da je bil razrez uspešen. Hkrati smo analizirali še dva vzorca dimerov CBCVd, ki so jih naredili naši sodelavci na Češkem (slika 2, vzorci 2, 3, 7 in 8), ki smo jih želeli uporabiti za primerjavo, vendar je bilo glede na predvideno velikost, ki bi morala biti okrog 700 nt in ne manj kot 200 nt, razvidno, da do razreza na prišlo na pravem mestu. Vzrok za nepravilen razrez je bil v uporabi drugega plazmida in polimeraze.

Preglednica 2: Meritve koncentracije in velikosti RNA z uporabo inštrumenta 2100 BioAnalyzer

Vzorec	Koncentracija [ng/ μ l]	Pričakovana velikost [nt]	Videna dolžina [nt]
Dimer CBCVd 2015	560	674	657
Monomer CBCVd 2016	303	290	151
Dimer CBCVd 2016	393	574	555
Dimer CBCVd 2015, 10x redčitev	105	674	674
Monomer CBCVd 2016, 10x redčitev	21	290	251
Dimer CBCVd 2016, 10x redčitev	19	574	564

3.6 Rezultati umetnega okuževanja

Z injiciranjem RNA v steblo smo okužili rastline hmelja, paradižnika in kumar. Rastline smo testirali na prisotnost CBCVd na v časovni točki 85 dpi, hmelj pa dodatno še pri 370 dpi. Kot pozitivna kontrola okužbe nam je služil vzorec celokupnih nukleinskih kislin, izoliran iz okuženega hmelja, pri katerem je bila okužba tako paradižnika kot hmelja 100 % (preglednica 3). Kumare so se pokazale kot manj dovzetne za okužbo, kajti tako v primeru okužbe s celokupnimi nukleinskimi kislinami, kot tudi pri ostalih vzorcih, je bila stopnja okužbe nižja kot pri paradižniku in hmelju. V primeru kumar je skoraj četrtnina rastlin propadla še pred prvim vzorčenjem, najverjetneje zaradi prevelikih poškodb med okuževanjem.

Med analiziranimi vzorci monomera in dimerov se je kot najbolj infektiven paradižniku in hmelju pokazal dimer 2016, z enostavno paličasto strukturo, medtem ko na kumarah ni prišlo do okužbe. Tudi vzorec dimera 2015 je bil na hmelju 100 % uspešen, medtem ko je bila v primeru paradižnika in kumar okužbe uspešna samo na eni rastlini. To nakazuje, da bi lahko imela struktura dimera vlogo pri replikaciji CBCVd v različnih gostiteljih. Inokulum na osnovi monomera CBCVd se je izkazal kot najmanj infektiven, saj smo v točki 85 dpi okužbo potrdili le pri 2 rastlinah paradižnika in hmelja, medtem ko se z monomerom ni okužila nobena kumara. Pri hmelju smo v točki 370 dpi pozitiven signal zaznali še pri eni rastlini, vendar je bila glede na ostale vzorce okužba vseeno manj uspešna (preglednica 3). V primeru negativne kontrole so bile vse analizirane rastline brez viroida CBCVd. Pri primerjavi vseh treh gostiteljev rezultati kažejo, uspešno inokulacijo pri hmelju in paradižniku tako z monomerom kot z dimeroma, medtem ko so kumare glede na dobljene rezultate slabši gostitelj.

Preglednica 3: Rezultati RT-PCR po umetni okužbi z monomerom in dimeroma viroida CBCVd; število okuženih rastlin glede na število vseh rastlin za paradižnik, kumare in hmelj (85 dpi in 370 dpi)

Vzorec	Število okuženih rastlin/ število vseh rastlin			
	Paradižnik (Heinz 1370)	Kumare (Pariški kornišon)	Hmelj (Celeia)	Hmelj (Celeia)
	85 DPI*	85 DPI*	85 DPI*	370 DPI*
Dimer CBCVd 2015	1/5	1/3	4/5	5/5
Monomer CBCVd 2016	2/5	0/2	2/5	3/5
Dimer CBCVd 2016	5/5	0/4	4/5	5/5
Celokupne nukleinske kisline	5/5	2/5	5/5	5/5
Negativna kontrola	0/5	0/5	0/5	0/5

*DPI= število dni po okužbi (ang. days post infection)

4 ZAKLJUČEK

Huda viroidna zakrnelost hmelja je zelo agresivna bolezen, ki se pojavlja samo Sloveniji. Glavni povzročitelj boleznij je viroid CBCVd, ki se v okuženih rastlinah vedno pojavlja v kombinaciji z vsesplošno razširjenim viroidom HLVD, pogosto pa so v obolelih rastlinah prisotni tudi virusi. Ker gre za povsem nov viroid na hmelju in do sedaj nepoznano viroidno obolenje, je potrebno etiološko ovrednotiti vpliv CBCVd na hmelj v obliki samostojnih okužb in vpliv v obliki mešanih okužb s HLVD pa tudi z ostalimi viroidi in virusi. Vendar pri pripravi CBCVd inokula iz obolelih rastlin, ki ga potrebujemo za izvedbo teh raziskav, naletimo na težavo nezmožnosti eliminacije ostalih patogenov.

V ta namen smo razvili metodo umetnega okuževanja hmelja in ostalih gostiteljskih rastlin, kot je paradižnik, s sintetičnim monomerom in dimerom viroida CBCVd. Umetno sintetizirana cDNA v obliki monomera ali dimera je vstavljena v plazmid, ki omogoča prepis iz DNA v RNA. RNA nato služi kot inokulum v procesu umetnega okuževanja preko injiciranja v steblo. Pri tem smo potrdili višjo stopnjo infektivnosti dimerov in nakazali možnost vpliva strukture dimerov na uspešnost okuževanja različnih gostiteljev.

Razvita metoda tako omogoča okuževanje rastlin samo s CBCVd in predstavlja pomembno tehniko pri nadaljnjih etioloških in epidemioloških študijah hude viroidne zakrnelosti hmelja in ostalih viroidnih obolenj, kjer nastopa CBCVd.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (MR štipendija št. 36371, projekti: L4-6809, V4-1405, raziskovalni program: P4-0077). Hkrati se avtorji za nasvete pri izvedbi poskusa zahvaljujemo tudi prof. dr. Teruo Sano (Hirosaki University, Japonska) in dr. Jaroslav Matousek (Institute of Plant Molecular Biology, Česke Budějovice, Češka).

5 VIRI IN LITERATURA

- 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.
- Barbara D.J., Morton A., Adams A.N., Green C.P. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the UK. *Annals of Applied Biology.* 1990; 117:359-366.
- 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.
- 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.
- Guček T., Radišek S., Jakše J., Matoušek J., Javornik B. Comparison of different methods for viroid plant inoculation. *Viroid 2015 : book of abstracts*, International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs, České Budějovice, June 25-28, 2015.
- 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.
- 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.
- Matoušek J., Orctová L., Steger G., Riesner D. Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *J Virol Methods.* 2004; 122 (2):153-64.
- Mishra A. K., Duraisamy G. S., Matoušek J., Radišek S., Javornik B., Jakše J. Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using high-throughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection. *BMC Genomic.* 2016; 17 (1):919. doi: 10.1186/s12864-016-3271-4.
- Puchta H., Ramm K., Sängner H. L. The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16 (10):4197-216.
- Radišek S., Majer A., Jakše J., Javornik B., Matoušek J. First Report of Hop stunt viroid Infecting Hop in Slovenia. *Plant Disease.* 2012; 96 (4):592-593.
- Radišek S., Guček T., Leskošek G., Benko-Beloglavec A., Jakše J., Javornik B. *Huda viroidna zakrnelost hmelja*. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. 2017.
- Sano T. Hop stunt viroid. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J., Semancik, J. (eds) *Viroids*. CSIRO Publishing. Cllingwood, Australia. 2003.
- Sano T. History, Origin, and Diversity of Hop Stunt Disease and Hop Stunt Viroid. *Acta Hort.* 2013; 1010, *ISHS*:87- 96.
- 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.
- Verniere C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella L., Chabrier C., Bove J.M., Duran Vila N. Citrus viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliate orange. *Plant Disease.* 2004; 88:1189-1197.
- 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 trifoliate orange. *Phytopathology.* 2006; 96 (4):356-68.