

OPTIMIZACIJA DOLOČANJA HMELJEVEGA LATENTNEGA VIROIDA (HLVd) Z UPORABO RT-PCR V REALNEM ČASU

Tanja GUČEK⁵, Nataša ŠTAJNER⁶, Jernej JAKŠE⁷, Branka JAVORNIK⁸ in Sebastjan RADIŠEK⁹

Izvirni znanstveni članek / original scientific paper

Prispelo / received: 28. 10. 2016

Sprejeto / accepted: 22. 11. 2016

Izvleček

Hmeljev latentni viroid (HLVd) na večini sort hmelja ne povzroča izrazitih bolezenskih znamenj, vendar pa negativno vpliva tako na količino kot tudi kvaliteto pridelka. Prav zaradi povzročanja neizrazitih znamenj okužbe in širjenja z vegetativnim razmnoževanjem je prisoten v večini svetovnih pridelovalnih območji hmelja. V primeru viroidnih boleznih uporaba fitofarmaceutskih sredstev ni mogoča, zato preprečevanje širjenja bolezni temelji na sanitarnih ukrepih in vzgoji neokuženega sadilnega materiala. Pri tem so ključnega pomena zanesljive in hitre metode za določanje viroidov. Za določevanje HLVd v hmelju so v uporabi poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) in hibridizacija, najpogosteje pa verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). Z namenom nadgradnje obstoječih metod določanja HLVd smo razvili metodo RT-PCR v realnem času (RT-qPCR), ki jo odlikuje visoka stopnja občutljivosti, hitrost, analitiko prijaznejše rokovanje in možnost nadgradnje za hkratno določanje tudi ostalih patogenov, ki jih določamo pri hmelju.

Ključne besede: hmelj, RT-PCR v realnem času, viroid, HLVd

OPTIMIZATION OF DETECTION OF HOP LATENT VIROID (HLVd) WITH REAL TIME RT-PCR

Abstract

Hop latent viroid (HLVd) in most hop varieties does not produce visible symptoms; however, it has a negative impact on both the quantity and quality of the crop. The unexpressed symptoms of the infection and its spreading by vegetative propagation are the reason, that it has been present in the majority of hop production regions. In the case of viroid diseases, the use of plant protection products is not possible, so the prevention of

⁵ Univ. dipl. biokem., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

⁶ Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: natasa.stajner@bf.uni-lj.si

⁷ Prof. dr., prav tam, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

⁸ Prof. dr., prav tam, e-naslov: branka.javornik@bf.uni-lj.si

⁹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

spread of the disease is based on sanitary measures and production of healthy planting material. In this case, reliable and rapid method for detection of viroids, are crucial. For identification of HLVd in hops different methods such are polyacrylamide electrophoresis (PAGE) and hybridization are used, but the most commonly used is reverse transcription combined with polymerase chain reaction (RT-PCR). In order to upgrade the existing methods for HLVd detection, we have developed real time RT-PCR (RT-qPCR), which is distinguished by a high degree of sensitivity, speed, analyst-friendly handling and the possibility of upgrading to multiplex detection of other pathogens that are also detected in hop.

Key words: hop, Real-time RT-PCR, viroid, HLVd

1 UVOD

Viroidi so najenostavnejši rastlinski patogeni, ki so sestavljeni iz krožne RNA molekule velikosti od 246-401 nukleotidov in so sposobni samostojnega podvojevanja (Flores, 2001; Hammond in Owens, 2006). Kljub enostavni strukturi lahko povzročajo zelo hude bolezni, pri katerih mehanizem delovanja viroidov in z njimi povezana patogeneza še vedno ni docela poznana, obstajajo samo hipoteze o biologiji interakcij med rastlinami in viroidi (Guček in sod., 2014). Viroidi imajo relativno širok spekter gostiteljev, med katerimi so številne gospodarsko pomembne kmetijske rastline, okrasne rastline in celo nekatere drevesne vrste. Gostiteljsko so omejeni na eno ali več rastlinskih vrst, na katerih pa lahko okužba posameznega viroida povzroča različne bolezenske znake (Hadidi in sod., 2003; Flores, 2001). Ti so najpogosteje vidni kot zaostajanje v rasti, nekroze in deformacije listov, stebila in plodov, zamik cvetenja, v najhujših primerih pa rastline tudi odmrejo (Hadidi in sod., 2003; Hammond in Owens, 2006; Kovalskaya in Hammond, 2014). Na izražanje simptomov lahko vpliva izolat viroida, gostitelj, razvojna faza rastline, okolje in kombinacija več hkrati prisotnih viroidov v gostitelju. Pri viroidnih boleznih so hkratne okužbe z več viroidi namreč zelo pogoste, značilne pa so predvsem za agrume in vinsko trto (Kovalskaya in Hammond, 2014; Narayanasamy, 2008). Izjema ni niti hmelj, ki ga lahko okužijo hmeljev latentni viroid (HLVd), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd), viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in apple fruit crinkle viroid (AFCVd) (Pethybridge in sod., 2008; Jakše in sod., 2015). HLVd je vsesplošno razširjen v vseh svetovnih pridelovalnih območjih hmelja in na večini sort ne povzroča vidnih bolezenskih znakov, vendar negativno vpliva na količino in kakovost pridelka. Posledice okužbe s HLVd so vidne v zmanjšanju velikosti storžkov, spremembi kvalitete eteričnih olj in padcu vsebnosti alfa-kislin (Puchta in sod., 1988; Barbara in sod., 1990).

Serološke metode, ki so sicer pogoste pri določanju virusov, za določanje viroidov niso primerne, ker so sestavljeni samo iz RNA molekule (Hammond in Owens, 2006). Kljub preprosti strukturi pa njihovo določanje ni enostavno, kajti vsaka

kombinacija viroida in gostitelja je tako specifična, da je za pravilen rezultat potrebno vse korake, od vzorčenja do analize, narediti po točno določenem postopku (Hadidi in sod., 2003). Za določanje in kvantifikacijo viroidov so bile razvite številne diagnostične metode, od tradicionalnih, kot je biološko indeksiranje, do metod, ki temeljijo na analizi nukleinskih kislin, in novejših, ki omogočajo tudi odkrivanje novih viroidov in gostiteljev (Narayanasamy, 2011; Guček in sod., 2016). Za določanje viroidov pri hmelju so poleg biološkega indeksiranja, ki temelji na simptomih testnih in gostiteljskih rastlin, v uporabi tudi PAGE, hibridizacija in RT-PCR (Guček in sod., 2016). Za testiranje prisotnosti HLVd pri hmelju je bila v Sloveniji najprej vpeljana povratna poliakrilamidna gelska elektroforeza (R-PAGE) (Knapič in Javornik, 1999), ki se uporablja pri analizi manjšega števila vzorcev.

Z vpeljavo metode hibridizacije točkovnega odtisa (dot-blot) v kombinaciji z RT-PCR, pa je določanje viroida HLVd postalo hitro, enostavno in zanesljivo (Jakše in Radišek, 2005). Kljub uspešni analizi velikega števila vzorcev z dot-blot hibridizacijo, se je za rutinska testiranja okuženih rastlin uveljavila metoda RT-PCR, ki omogoča občutljivejšo analizo (Jakše in Radišek, 2005). Poleg RT-PCR se pri diagnostiki RNA virusov in viroidov v zadnjem desetletju množično uveljavlja tudi RT-qPCR, ki omogoča analitiku varnejšo uporabo, še večjo občutljivost ter večje možnosti pri hkratnem določanju omenjenih patogenov (Boonham in sod., 2004; Botermans in sod., 2013; Luigi in Faggioli, 2011).

V ta namen smo razvili RT-qPCR za določanje HLVd na hmelju, katere optimizacija je predstavljena v nadaljevanju. Osnova metode je uporaba specifičnih sond z vezanim reporterskim barvilom in dušilcem (TaqMan). Med pomnoževanjem se sonda razgradi in se barvilo loči od molekul dušilca ter emitira fluorescenco, ki je enaka količini produkta. Pozitivno reakcijo zaznamo s povečanjem fluorescence in ko le-ta preseže prag, dobimo Ct/Cq vrednost, ki je obratno sorazmerna začetni količini RNA. Metoda je primerna za uporabo pri rutinskih testiranjih rastlin v okviru certifikacijskih shem vzgoje sadilnega materiala, potrjevanju bolezenskih žarišč in kot podpora epidemiološkim študijam.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Priprava vzorcev

Za optimizacijo reakcije RT-qPCR smo uporabili RNA izolirano iz vzorcev hmelja (storžkov in listja), sort Celeia, Aurora, Savinjski golding in Bobek, ki so bili v letih 2014 in 2015 nabrani na različnih lokacijah hmeljišč v Savinjski dolini. Vzorčeni so bili storžki in listi rastlin, ki so kazale vidne bolezenske znake, različnih razvojnih stopenj, nabrani na različnih višinah rastline. Za določitev specifičnosti reakcije smo uporabili tudi RNA, izolirano iz rastlin sorte Celeia, ki

so bile poleg HLVD biolistično okužene tudi z viroidoma CBCVD in HSVd in se vzdržujejo na izolirani lokaciji raziskovalne postaje Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS). Za negativno kontrolo smo uporabili vzorce neokuženih rastlin, sorte Celeia, ki jih vzdržujemo v rastlinjaku na IHPS ter sterilno vodo (Sigma-Aldrich). RNA smo izolirali na osnovi komercialnega kompleta Spectrum® Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich) (Jakše in sod., 2015). Z namenom določitve vpliva metode izolacije RNA na določanje viroidov, smo razvito RT-qPCR metodo preizkusili še z uporabo reagenta CTAB pri katerem iz vzorcev izoliramo celokupne nukleinske kisline (Kump in Javornik, 1996). Koncentracijo in kvaliteto izolirane RNA smo izmerili spektrofotometrično z inštrumentom BioPhotometer D30 (Eppendorf). Za pozitivno kontrolo RT-qPCR reakcije smo uporabili umetno sintetizirana zaporedja (gBlocks, proizvajalec Integrated DNA Technologies (IDT)) viroida HLVD.

2.2 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond

Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond smo uporabili zaporedja viroida HLVD, ki se nahaja v bazi GenBank in jo ureja NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Glede na zaporedje HLVD iz hmelja, pod pristopno številko NC_003611, smo naredili poravnavo z zaporedji pod naslednjimi pristopnimi številkami: HH970095, DD220189, AJ290412, AJ290406, EF613189, X07397, EF613188, EF613184, EF613187, EF613186, EF613183, AJ290407, AJ290411, AJ290410, AJ290409, EF613192, EF613185, EF613181, EF613190, EF613182, AJ290405, EF613191, AJ290404, AJ290408, DL463097, DL461531, DL463096 in DL461530. Poravnave med zaporedji viroidov smo naredili s programom ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Začetne oligonukleotide in sonde smo na podlagi teh poravnav nato načrtovali s pomočjo orodij PrimerQuest in OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/>), na mestih, ki so bila med poravnanimi zaporedji najbolj ohranjena.

Z namenom analize kvalitete RNA in kontrole poteka reakcije smo testirali ustreznost številnih genov za notranjo kontrolo pomnoževanja, od pogosto uporabljenega gena 18S rRNA (NCBI pristopna številka: AF206931), do CAC (ang. Clathrin adaptor complexes medium subunit, SGN-U314153), SAND (ang. SAND family protein, NM_128399), YLS8 (ang. Yellow leaf specific protein 8, NM_120912), nad5 (ang. NADH dehydrogenase subunit 5, D37958) in več genov, izbranih iz transkriptoma z viroidi okuženega hmelja (mRNA1192, mRNA170, mRNA109) (Botermans in sod., 2013; Menzel in sod., 2002; Štajner in sod., 2013). Začetne oligonukleotide in sonde za notranjo kontrolo pomnoževanja za gene izbrane iz transkriptoma z viroidi okuženega hmelja, smo prav tako načrtovali s pomočjo orodij PrimerQuest in OligoAnalyzer 3.1. Začetne oligonukleotide za notranjo kontrolo pomnoževanja smo uporabili v ločeni reakciji in tako preverili kvaliteto reagentov in izolirane RNA. Sonde za viroid in notranjo kontrolo

pomnoževanja smo označili z reporterskim barvilom FAM in dvema dušilcema, ZEN in Iowa Black FQ. Načrtovani začetni oligonukleotidi in sonde so bili naročeni pri proizvajalcu Integrated DNA Technologies (IDT).

2.3 Razvoj RT-qPCR

Optimizacija metode RT-qPCR je potekala tako na vzorcih iz hmelja, in sicer naravno okuženega (HLVd, HLVd + CBCVd) oziroma biolistično okuženega (HLVd, HLVd + CBCVd, HLVd + HSVd, HLVd + HSVd + CBCVd) kot tudi na vzorcih umetno sintetiziranega viroida HLVd (gBlocks). Za negativne kontrole smo uporabili zdrav hmelj brez virusov in viroidov, hmelj, negativen na HLVd in vodo.

Vzorci smo analizirali z reakcijo RT-qPCR v enem koraku, v treh ponovitvah za vsak vzorec, na ploščah za 96 vzorcev. Za analizo smo uporabili detekcijski sistem LightCycler96 (Roche) in program LightCycler96 Software 1.1.0.1320, pri čemer so bile vse nastavitve programa avtomatske. Optimizacijo smo začeli s testiranjem načrtovanih začetnih oligonukleotidov s PCR v realnem času na osnovi SYBR Green kemije (kit LightCycler RNA Master SYBR Green I, Roche), s čimer smo preverili ali začetni oligonukleotidi lahko namnožijo naše zaporedje, sledili smo navodilom proizvajalca. Reakcijska mešanica je vsebovala 3,75 μL LightCycler RNA Master SYBR Green I, 0,65 μL $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ (3,25 mM), 0,3 μL začetnih oligonukleotidov HLVd-F1/R1 (0,3 μM vsak). Reakcijski mešanici smo do končnega volumna 10 μL dodali še 2 μL RNA (vzorec) in sterilno vodo. Program reakcije je bil sledeč: 30 min pri 61°C, 30 s pri 95°C, 45 ciklov na 10 s pri 95°C, 10 s pri 60°C in 10 s pri 72°C. Programu smo na koncu dodali tudi korak taljenja (disociacijska analiza) z 10 s pri 95°C, 60 s pri 65°C in 1 s pri 97°C.

Na osnovi uspešnega pomnoževanja s SYBR Green tehnologijo smo optimizacijo za posamezne viroide nadaljevali z uporabo TaqMan kemije, ki je bolj tarčno specifična. Uporabili smo komercialni komplet QuantiFast Probe RT-PCR (Qiagen). Reakcijska mešanica je vsebovala 5 μL 2x QuantiFast probe RT-PCR Master Mix, 0,1 μL QuantiFast RT Mix, 0,6 μL začetnih oligonukleotidov HLVd-F1/R1 (0,6 μM vsak) in 0,1 μL sonde HLVd-P (0,1 μM). V primeru notranjih kontrol pomnoževanja smo dodali 0,3 μL posameznega začetnega oligonukleotida (0,3 μM vsak) in 0,1 μL sonde (0,1 μM). Reakcijski mešanici smo do končnega volumna 10 μL dodali še 2 μL RNA (vzorec) in sterilno vodo. Program reakcije je bil sledeč: 10 min pri 50°C, 5 min pri 95°C, 40 ciklov na 10 s pri 95°C in 30 s pri 62°C.

2.4 RT-PCR

Rezultate metode RT-qPCR smo primerjali z že uveljavljeno metodo RT-PCR za določanje viroida HLVd v hmelju (Jakše in Radišek, 2005; Jakše in sod., 2015). V ta namen smo uporabili komercialni komplet One Step RT-PCR (Qiagen) in HLVd M/P par začetnih oligonukleotidov (Hataya in sod., 1992). Izolirano RNA (~200 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, 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 pod UV lučjo.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Namen laboratorijskega dela je bil razviti hitro in občutljivo metodo RT-qPCR za določanje viroida HLVd v hmelju. Optimizacija metode je potekala na treh različnih skupinah vzorcev HLVd, in sicer iz hmelja iz okuženih hmeljišč, biolistično okuženega hmelja in umetno sintetiziranega viroida. Pri sami optimizaciji reakcije smo zaradi znane koncentracije viroida v vzorcu za pozitivno kontrolo reakcije uporabili umetno sintetiziran HLVd. Testirani vzorci so se razlikovali tudi v načinu izolacije, v prvem primeru smo RNA izolirali s komercialno dostopnim kompletom, v drugem pa smo s CTAB reagentom izolirali celokupne nukleinske kisline. Čeprav smo primerjali različne sorte okuženega hmelja kot tudi biolistično okužen hmelj, med izolacijama ni bilo večjih razlik, Cq-vrednosti so bile pri izolaciji s komercialnim kompletom v povprečju za 1 cikel manjše kot pri uporabi CTAB reagenta (rezultati niso prikazani). V primeru uporabe metode RT-qPCR za potrditev prisotnosti viroida v vzorcu je izolacija s CTAB reagentom dovolj zanesljiva, predvsem pa veliko cenejša kot uporaba komercialnega kompleta.

3.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond

S poravnavo izbranih zaporedij za HLVd s programom ClustalW2, smo glede na zaporedje viroida HLVd (NC_003611) določili ohranjene dele zaporedij, na katerih smo nato načrtovali začetne oligonukleotide in sonde (preglednica 1). Izmed testiranih genov za notranjo kontrolo pomnoževanja, ki so se glede na rezultate RT-qPCR izkazali za našim vzorcem najbolj ustrezne (nad5, mRNA170, CAC, mRNA1192 in YLS8), smo z uporabo programa RefFinder izbrali par z največjo stabilnostjo, ki je uporaben za normalizacijo vzorcev (Taylor in sod., 2010), in

sicer rastlinska/hmeljna gena mRNA170 in CAC (rezultati niso prikazani) (preglednica 1).

Preglednica 1: Zaporedja začetnih oligonukleotidov (F/R) in sond (P) za viroid HLVd in rastlinske gene za notranjo kontrolo pomnoževanja, velikost ampliconov in Tm

Table 1: Primer (F/R) and probe (P) sequences for viroid HLVd and genes for amplification of the internal control, amplicon size and Tm.

Viroid/Gen	Začeten oligonukleotid/ Sonda*	Zaporedje 5'- 3'	Amplicon [bp]	Tm [°C]
HLVd	HLVd_F1	CGGCGACCTGAAGTTG	113	53,6
	HLVd_R1	CGGCGCTCAAGAGTTG		53,9
	HLVd_P	CTTCTTCTTGTTGCGCTCCTGCGTGG		63,5
mRNA170	mRNA170_F	CAAGGAAGGAGTGTGGAGAA	111	54,5
	mRNA170_R	CCGTGACCGTCTTTCTTCTT		54,8
	mRNA170_P	CCACGAAGACAAGGGCGAGAAGAAGAAG		62,3
CAC	CAC-F1	CTGGCCATGTGAGAATTCCTT	100	55,5
	CAC-R1	CTCGCAATTTTTGTCACTACAACA		54,3
	CAC-P1	CTGCCCATTTTGGAGACCAACTTCTTGG		61,6

*Začetni oligonukleotid= F/R; sonda= P

3.2 Razvoj RT-qPCR

Začetne oligonukleotide načrtovane za določanje viroida HLVd smo najprej testirali z uporabo SYBR Green kemije na vzorcih s HLVd okuženega hmelja. V vzorcih je prišlo do namnožitve, vendar pa je uporaba SYBR Green kemije nespecifična, saj se SYBR Green molekule vežejo in fluorescirajo v vsaki nastali dvoverižni DNA, tako da smo pogosto dobili pozitivne rezultate tudi za vzorce zdravega hmelja in vodo. Optimizacijo smo nato nadaljevali z uporabo bolj specifične TaqMan kemije.

Optimizacijo koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond smo naredili s pomnoževanjem tarčnega produkta s predlaganimi koncentracijami in sicer pri začetnih oligonukleotidih smo testirali koncentracije od 300 nM do 1200 nM, in pri sondah od 100 nM do 250 nM (Luigi in Faggioli, 2011). Glede na rezultate smo kot optimalno koncentracijo za začetne oligonukleotide za viroid HLVd določili 600 nM in za sonde 100 nM. Koncentracije smo določili tudi za gene za notranjo kontrolo pomnoževanja (mRNA170 in CAC), in sicer 300 nM za začetne oligonukleotide in 100 nM za sonde.

Kot pozitivne kontrole reakcije smo uporabili umetno sintetizirana zaporedja (gBlocks, proizvajalec IDT) viroida HLVD (NCBI: NC_003611). V ta namen smo testirali različne koncentracije gBlocks od 5 ng do 0,00005 fg umetno sintetiziranega viroida HLVD na reakcijo. Kot pozitivne kontrole smo za nadaljnje delo uporabili koncentracije od 50 fg do 0,5 fg, pri katerih so bile Cq-vrednosti med 18 in 25.

3.2.1 Določanje mejne vrednosti

Mejno vrednost za viroid HLVD smo določili na podlagi analize različnih setov vzorcev, pri čemer smo bili pozorni predvsem na negativne vzorce hmelja. Pri določitvi mejne vrednosti, ki je Cq-vrednost, nad katero se smatra, da je vzorec negativen, smo si pomagali s formulo $N_{Ct} = M - 3 \cdot SD$, v kateri N_{Ct} predstavlja mejno vrednost, M je povprečje šestih Ct/Cq-vrednosti zdravih vzorcev, SD pa standardna deviacija (Chandelier in sod., 2006). Glede na nizke Cq-vrednosti pozitivnih vzorcev, smo povprečno mejno Cq-vrednost za viroid HLVD določili pri 33 ciklih (preglednica 2). V primeru Cq-vrednosti med 32 in 34 je analizo smiselno ponoviti oziroma vzorce analizirati z drugo metodo, kot je na primer RT-PCR. Te vrednosti so bile določene glede na številne ponovitve analiz, z namenom, da se izognemo lažno negativnim oziroma pozitivnim rezultatom. Za viroide je že v uporabi metoda RT-qPCR, pri kateri so kot mejno vrednost določili 32 ciklov (Botermans in sod., 2013), iz česar lahko sklepamo, da se določanje viroidov razlikuje od preostalih RT-qPCR metod in da so mejne vrednosti lahko precej nižje kot običajno.

Preglednica 2: Izračun mejne vrednosti za viroid HLVD glede na Chandelier in sod. (2006)

Table 2: Calculation of cut off value for viroid HLVD in respect of Chandelier et al. (2006).

HLVD			
Vzorec	Povprečna Cq-vrednost	SD*	$N_{Ct} = M - 3 \cdot SD$
Pozitivni vzorci			
gBlocks* 0,5 fg	24,80	0,05	-
HLVD 10^{-2} (iz hmeljišča)	22,17	0,13	-
HLVD 10^{-2} (umetna okužba)	21,13	0,11	-
Negativni vzorci			
BVV= zdrav hmelj	34,68	0,61	$34,68 - 3 \cdot 0,61 = 32,85$
K	-	-	-
Povprečna mejna vrednost za HLVD= 32,85 (~33)			

*SD= standardna deviacija; N_{Ct} = mejna vrednost; M= povprečna Cq-vrednost; gBlocks= umetno sintetiziran HLVD; K= voda

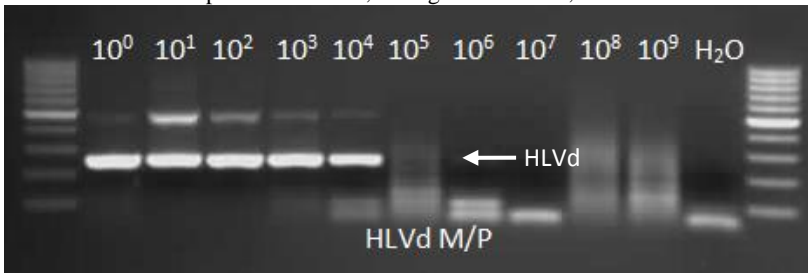
viroidov v hmelju, RT-PCR (Jakše in sod., 2015). V primeru RT-PCR, smo viroid HLVD zaznali pri vzorcih do redčitve 10^{-4} (slika 2), kar pomeni, da ima metoda RT-PCR okrog 100-krat manjšo občutljivost glede na RT-qPCR.

Preglednica 3: Primerjava Cq-vrednosti metode RT-qPCR in rezultatov RT-PCR za serijo redčitev (10^0 do 10^{-9}) za viroid HLVD

Table 3: Comparison of Cq values of RT-qPCR and RT-PCR results for dillution series (10^0 to 10^{-9}) for viroid HLVD.

Redčitev	RT-qPCR (Cq-vrednost)	RT-PCR*
10^0	17,04	+
10^{-1}	17,97	+
10^{-2}	20,09	+
10^{-3}	23,09	+
10^{-4}	26,23	+
10^{-5}	29,67	-
10^{-6}	32,10	-
10^{-7}	34,86	-
10^{-8}	34,15	-
10^{-9}	-	-
K*	-	-

*+= pozitiven vzorec, -= negativen vzorec, K= voda



Slika 2: Rezultati RT-PCR za serijo redčitev (10^0 do 10^{-9}) za viroid HLVD (2% agarozni gel)

Figure 2: RT-PCR results for dillution series (10^0 to 10^{-9}) for viroid HLVD (2% agarose gel).

3.3.3 Selektivnost

Selektivnost metode RT-qPCR za viroid HLVD smo testirali z dodajanjem zdravega tkiva hmelja umetno sintetiziranemu viroidu (končna koncentracija viroida v reakciji = 50 fg) v razmerju do 1:20 (Baskarathevan in sod., 2016) (preglednica 4). Iz rezultatov je razvidno, da je test za viroid HLVD dovolj

občutljiv, kajti viroid HLVD zazna tudi pri 20x večjem razmerju tkiva hmelja glede na viroid. Z dodajanjem tkiva hmelja viroidu je namreč zaradi spreminjanja skupnega volumna prišlo do redčitve viroida, ki smo ga ne glede na količino dodanega tkiva še vedno zaznali. Hkrati smo v ločeni reakciji analizirali tudi gen mRNA170 kot notranjo kontrolo pomnoževanja, katere Cq-vrednost je ne glede na povečano količino dodanega hmelja, zaradi spreminjanja skupnega volumna ostala konstantna, okrog 28 (preglednica 4).

Preglednica 4: Cq vrednosti viroida HLVD in notranje kontrole pomnoževanja mRNA170 glede na količino dodanega hmelja v razmerju do 1:20 (razmerje viroid: hmelj)

Table 4: Cq values for viroid HLVD and housekeeping gen mRNA170 based on the amount of added hop in ratio from 1:20 (ratio viroid: hop).

Razmerje viroid:hmelj	Cq vrednost za HLVD	Cq vrednost za mRNA170
1:0	19,03	-
1:1	20,05	28,66
1:5	21,57	28,31
1:10	22,53	28,17
1:15	23,77	27,93
1:20	23,07	27,99

3.3.4 Ponovljivost in reproduktibilnost

Ponovljivost in reproduktibilnost metode smo testirali s petimi neodvisnimi testi, ki so bili izvedeni v različnih časovnih točkah in z različnima operaterjema. V ta namen smo za viroid HLVD testirali vzorce z visoko, srednjo in zelo nizko koncentracijo (na meji detekcije) v osmih ponovitvah, z dvema različnima operaterjema, v istem dnevu oziroma ob različnih dnevih, na istem detekcijskem sistemu z uporabo istega komercialnega kompleta.

Za testirane vzorce smo dobili zelo dobro ponovljivost, tako glede na istega operaterja, kot tudi med operaterjema in različnimi časovnimi točkami. Standardna deviacija je bila kot pričakovano najnižja pri najvišji koncentraciji analiziranih vzorcev in je za vse rezultate v povprečju znašala samo 0,20, medtem ko je bila najvišja pri vzorcih s koncentracijami na meji detekcije in je v povprečju znašala 0,81 (preglednica 5). Zaradi zelo visoke ponovljivosti večjih razlik ni bilo opaziti niti med različnimi operaterji (operater 1 in 2), kot tudi ne med različnimi časovnimi točkami (analiza 1-5). Iz tega lahko sklepamo, da je metoda za omenjen detekcijski sistem in uporabljen komplet reagentov zelo robustna. Seveda bi bile

potrebne še dodatne analize s testiranjem v različnih laboratorijih, na različnih detekcijskih sistemih.

Preglednica 5: Povprečne Cq vrednosti in standardne deviacije za viroid HLVD glede na različne operaterje in časovne točke (analiza 1-5)

Table 5: Average Cq values and standard deviations for viroid HLVD according to different operators and time points (analysis 1-5).

HLVD ponovljivost	Operater 1			Operater 2	
	1. analiza	2. analiza	3. analiza	4. analiza	5. analiza
HLVD 10⁻²					
Povprečna Cq-vrednost	22,38	21,93	21,79	22,25	22,53
SD*	0,13	0,25	0,17	0,25	0,21
Povprečna SD	0,20				
HLVD 10⁻⁴					
Povprečna Cq-vrednost	28,89	28,56	28,65	28,89	28,84
SD	0,24	0,20	0,25	0,18	0,30
Povprečna SD	0,23				
HLVD 10⁻⁶					
Povprečna Cq-vrednost	33,13	32,50	33,33	32,84	33,05
SD	1,29	0,75	0,80	0,50	0,70
Povprečna SD	0,81				

*SD= standardna deviacija

4 ZAKLJUČKI

Metoda RT-qPCR za določanje viroida HLVD v hmelju omogoča bolj občutljivo in natančno analizo viroidov. Z njo se skrajša in olajša testiranje viroidov glede na metodo RT-PCR, pri katerem je potrebna še dodatna analiza na gelu. Metoda se lahko uporablja v kombinaciji z izolacijo s CTAB reagentom, ki glede na izolacijo RNA s komercialno dostopnim kompletom zadošča za samo potrditev viroidov. Metoda RT-qPCR je približno 100-krat bolj občutljiva kot RT-PCR, je selektivna, ponovljiva in reproduktibilna.

Metoda RT-qPCR je specifična za viroid HLVD, saj se le-ta v vzorcih okuženih z viroidom HSVd ali CBCVd ne namnoži. Prav tako prisotnost drugih viroidov nima vpliva na namnožitev HLVD. Glede na priporočeno formulo (Chandelier in sod., 2006) smo določili tudi mejno vrednost RT-qPCR pomnoževanja, ki je za viroid HLVD približno 33 ciklov. Mejna vrednost je za vpeljavo/validacijo metode ključna, saj na osnovi te vrednosti določimo mejo pri kateri je nek vzorec pozitiven oz. negativen. V primeru rezultatov, ki se gibljejo okrog teh vrednosti, je smiselno analizo ponoviti oziroma rezultate potrditi z uporabo druge metode, kot je na

primer RT-PCR. Glede na rezultate RT-qPCR razvitega za pospiviroide (Botermans in sod., 2013) je lahko mejna Cq vrednost tudi pri 32 ciklih, kar je glede na standardno mejno vrednost pri 40 ciklih precej manj.

Pomembno vlogo pri določanju viroidov v vzorcih hmelja ima tudi uporaba notranje kontrole pomnoževanja, ki omogoča kontrolo reagentov, kvalitete RNA in samega poteka reakcije. V primeru analize hmelja je smiselna uporaba genov kot sta CAC in mRNA170, ki sta se glede na rezultate analize s programom RefFinder izkazala kot najbolj stabilna v primeru vzorcev okuženih z viroidom.

Metoda RT-qPCR bo primerna za uporabo pri rutinskih testiranjih rastlin v okviru certifikacijskih shem sadilnega materiala ali potrjevanja bolezenskih žarišč in epidemioloških študijah. Hkrati pa bo služila tudi za osnovo za razvoj RT-qPCR za določanje drugih viroidov v hmelju in hkratno določanje viroidov.

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).

5 LITERATURA

- 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.
- Baskarathevan J., Taylor R.K., Ho W., McDougal R.L., Shivas R.G., Alexander B.J.R. Real-time PCR Assay for the Detection of *Puccinia psidii*. *Plant Disease*. 2016; 100: 617- 624.
- Bonham N., Gonzáles Pérez L., Mendez M.S., Lilia Peralta E., Blockley A., Walsh K., Barker I., Mumford R.A. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*. 2004; 116: 139-146.
- Botermans M., van de Vossen B.T.L.H., Verhoeven J.Th.J., Roenhorst J.W., Hoftman M., Dekter R., Meekes E.T.M. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*. 2013; 187: 43-50.
- Chandelier A., Ivors K., Garbelotto M., Zini J., Laurent F., Cavelier M. Validation of a real-time PCR method for the detection of *Phytophthora ramorum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2006; 36: 409-414.
- Flores R. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*. 2001; 324: 943-52.
- Guček T., Radišek S., Jakše J., Javornik B. Biologija interakcij med rastlinami in viroidi. *Hmeljarski bilten*. 2014; 21: 27-37.
- Guček T., Trdan S., Jakše J., Javornik B., Matoušek J., Radišek S. Diagnostic techniques for viroids. *Plant Pathology*. 2016; doi: 10.1111/ppa.12624
- Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 2003.

- Hammond R.W., Qwens R.A. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. Online: *APSnet Features*. 2006; doi: 10.1094/APSnetFeature-2006-1106.
- Hataya T., Katsuyuki H., Suda N., Nagata T., Shifang L., Itoga Y., Tanikoshi T., Shikata E. Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 1992; 58: 677-684.
- Jakše J. in Radišek S. Vzpostavitev identifikacijskega sistema za določanje hmeljevega latentnega viroida. *Hmeljarski bilten*. 2005; 12: 49-57.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. Deep-sequencing revealed a CBCVd viroid as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*. 2015; EST | DOI: 10.1111/ppa.12325.
- Knapič V. in Javornik B. Viroidi v slovenskih kultivarjih hmelja (*Humulus lupulus* L.). *Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož*. 1999; 311-318.
- Kovalskaya N., in Hammond R.W. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Science*. 2014; 228: 48-60.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114: 149-159.
- Luigi M. in Faggioli F. Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology*. 2011; 130: 109-116.
- Matoušek J., Orctová L., Steger G., Riesner D. Biolistics inoculation of plants with viroid nucleic acids. *Journal of Virological Methods*. 2004; 122:153-164.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*. 2002; 99: 81-92.
- Narayanasamy P. Molecular Techniques for Detection of Microbial Pathogens. Chapter 2, *Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management: Microbial Plant Pathogens*. 2008; 1: 7-158.
- Narayanasamy P. Diagnosis of Viral and Viroid Diseases of Plants. Chapter 5, *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Viral and Viroid Pathogens*. 2011; 3: 295-312.
- Pethybridge S.J., Hay F.S., Barbara D.J., Eastwell K.C., Wilson C.R. Viruses and Viroids Infecting Hop: Significance, Epidemiology, and Management. *Plant Disease*. 2008; 92: 324-334.
- Puchta H., Ramm K., Sängler H. The molecular structure of hop latent viroid (HLVd), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16: 4197-4216.
- Štajner N., Cregeen S., 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: e68228.
- Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010; 50: S1-5.