

Razvoj Crispr/Cas diagnostike za določanje viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na hmelju

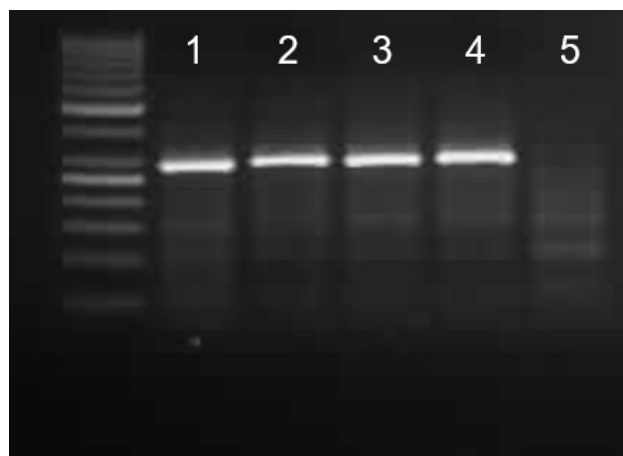
Dr. Tanja Guček in dr. Sebastjan Radišek,
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

V zadnjih 40 letih so svet pretresle številne epidemije, kot so HIV, Ebola, Zika in COVID-19. V vseh primerih je odziv javnega zdravstva na prisotno virusno grožnjo oviralo pomanjkanje hitrega in zanesljivega molekularnega diagnostičnega testiranja. Kljub temu da živimo v zelo razviti družbi, hitro in natančno določanje patogenov še vedno predstavlja kritično točko tako v humani kot v rastlinski virologiji. V Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin na IHPS se trudimo z razvojem **novih metod**, ki bi pripomogle k odkrivanju novih žarišč in zavezitvi širjenja bolezni hude viroidne zakrnelosti hmelja, ki jo povzroča **CBCVd** (viroid razpokanosti skorje agrumov; »citrus viroid«). Trenutno je za detekcijo viroida CBCVd v hmelju v rutinski uporabi metoda **RT-PCR**, ki je od leta 2022 akreditirana po mednarodnem standardu **SIST ISO/EN 17025**. Za raziskave imamo v uporabi tudi občutljivejše metode (to je t.i. RT-PCR v realnem času; mRT-qPCR), ki omogočajo sočasno detekcijo tako viroida **CBCVd** kot **HLVd** (hmeljevega latentnega viroida) in **HSVd** (viroida zakrnelosti hmelja). Na ta način lahko z uporabo metode **mRT-qPCR** dobimo v eni reakciji odgovor, koliko viroidov je prisotnih v analiziranem hmelju.

V okviru projekta »Razvoj in vpeljava Crispr/Cas diagnostike za terensko detekcijo viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) v hmelju (*Humulus lupulus L.*)« razvijamo novo metodo (to je t.i. Crispr/Cas-RT-RPA) za določanje viroida CBCVd, ki bo bistveno skrajšala čas analize, hkrati pa bo enako kakovostna, cenovno ugodna in primerna za številne načine uporabe v laboratoriju in na **terenu**. Namreč metode, ki temeljijo na PCR, potrebujejo zaradi zahtevnih postopkov in dolgotrajnih inkubacij za analizo tudi do 8 ur, medtem ko bi s Crispr/Cas-RT-RPA to lahko skrajšali na eno uro.

Poleg skrajšanja časa in enostavnosti je možno metodo prilagoditi tudi uporabi na terenu, na način, da bi lahko **na licu mesta list hmelja zmelili v priloženi tekočini in na podoben način kot pri hitrih testih za COVID-19 ugotovili prisotnost viroida**. Zadeva ni tako enostavna kot pri virusih, ker je v primeru viroidov potrebno pred uporabo hitrega testa tekočino inkubirati pri določeni temperaturi, da dobimo večjo koncentracijo viroida, ki ga lahko potem detektiramo. V okviru projekta smo že uspešno optimizirali prvi del metode in dobili ustrezne rezultate. Za namene uporabe na terenu smo prav

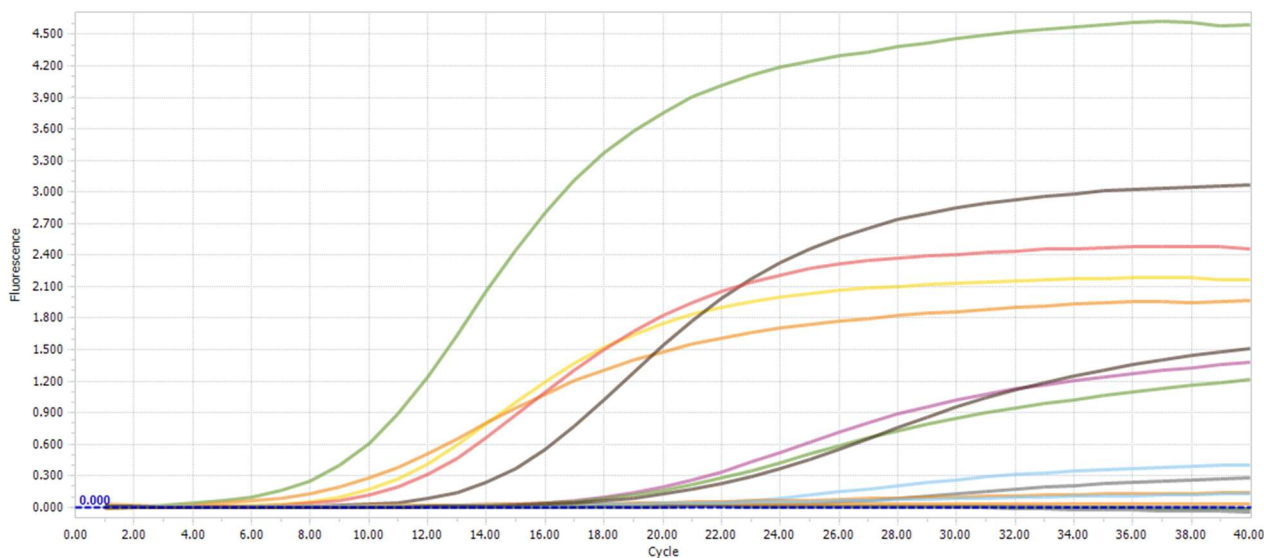
tako primerjali več različnih načinov mletja, kar smo objavili v letošnjem Hmeljarskem biltenu. Projekt je v fazi preizkušanja različnih načinov uporabe hitrih testov in validacije. Z uporabo vseh izboljšav pričakujemo, da bo nova metoda skrajšala in poenostavila način detekcije viroidov v hmelju.



Rezultat metode RT-PCR je signal na gelu. Če je v vzorcih prisoten viroid CBCVd, dobimo signal (številka 1-4), če pa viroida ni v vzorcih hmelja, na gelu ne dobimo signala (številka 5).



Prikaz uporabe baterijskega načina mletja vzorcev hmelja, ki je lahko v kombinaciji z novo razvito metodo primeren tudi za določanje viroida CBCVd na terenu (Foto: S. Žgajner).



Prikaz namnožitve viroida CBCVd z uporabo RT-RPA, ki je prvi del CRISPR/Cas metode. Krivulje predstavljajo vzorce hmelja, v katerih je prisoten CBCVd.

Preizkus uporabe brezpilotnih letalnikov (dronov) za odkrivanje nevarnih bolezni hmelja

Mag. Matej Knapič,
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije se je skupaj z glavnim nosilcem projekta Hmezad exim d.d. v začetku leta prijavil na razpis v okviru HORIZON projekta ICAERUS, in sicer smo pripravili prijavo s kratico projekta DAEPHC na temo **uporabe dronov v kmetijstvu** za zgodnje odkrivanje verticilijske hmeljeve uvelosti in viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd). Izbrani smo bili izmed 38 prijavi s še štirimi projekti.

V okviru projekta smo kupili dva drona, in sicer prvega z multispektralno kamero ter drugega s termo kamero. Želeli smo preveriti primernost senzorjev (kamer) za zgodnje odkrivanje obeh bolezni hmelja. Projekt smo zasnovali tako, da smo z obema kamerama posneli šest izbranih hmeljišč, kjer smo pričakovali pojav posamezne bolezni in sicer v obdobju od zadnje dekade junija do sredine avgusta (slika 1). Snemanje smo praviloma izvedli na višini 40 m, kar pomeni, da je ločljivost posnetka med 2 do 5 cm, odvisno od kamere. Multispektralna kamera beleži odboj svetlobe v posameznem pasu svetlobe, in sicer beleži odboj v zelenem, rdečem, robno rdečem in bližnje infrardečem delu svetlobe. Odboj srednje oziroma dolgovalovnega sevanja, ki ga zabeleži termo kamera, smo preračunali v °C. Za namen kontrole smo v dvoje hmeljišč postavili po dva senzorja za spremljanje temperature lista in zraka v hmeljiščih (slika 2).



Slika 1: Dron tik pred vzletom (Foto: J. Ferlin)