

VZPOSTAVITEV IDENTIFIKACIJSKEGA SISTEMA ZA DOLOČEVANJE HMELJEVEGA LATENTNEGA VIROIDA

Jernej JAKŠE¹ in Sebastjan RADIŠEK²

UDK/UDC 632.95 : 633.791 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 18. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

Testiranje hmeljnih rastlin na okužbo s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd) je Evropska organizacija za varstvo rastlin (EPPO) uvedla v certifikacijsko shemo produkcije sadilnega materiala, katero je prevzela tudi Slovenija. Rastline okužene s HLVd so ponavadi brez simptomov, se pa lahko občutno zniža pridelek alfa kislin. Identifikacija HLVd s klasičnimi morfološkimi metodami zaradi tega ni izvedljiva, imamo pa voljo sodobne molekulske tehnike, ki temeljijo na povratni poliakrilamidni elektroforezi, hibridizaciji in reverzni transkripciji z verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR). Slednji dve odlikujeta predvsem hitrost in zanesljivost obenem pa se tudi dopolnjujeta. Njihova razvoj in vpeljava v diagnostiko sta predstavljena v nadaljevanju.

Ključne besede: HLVd, RT-PCR, hibridizacija, patogeni hmelja

REESTABLISHMENT OF THE IDENTIFICATION SYSTEM FOR DETECTION OF HOP LATENT VIROID

ABSTRACT

Testing hop plants for HLVd infection is being considered under the European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) certification scheme for the production of planting material and it has been fully adopted by Slovenia. Plants infected by HLVd are usually symptomless, but decline in total yield of alpha acids has been reported. Identification of HLVd by classical morphological methods is not possible due to the non-expressed symptoms, but novel molecular techniques are capable of detecting it. They are mainly based on reverse PAGE electrophoresis, hybridization and RT-PCR. The latter two are considered to be quick, reliable and complementary. Their development and utilization in HLVd diagnostics is presented in the paper.

Keywords: HLVd, RT-PCR, hybridization, hop pathogens

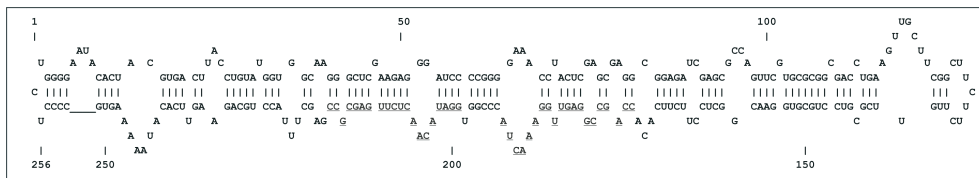
¹ doc. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

² dr. znanosti, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Diagnostični laboratorij, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

1 UVOD

Viroidi so enoverižne, krožne, nizko molekularne RNA molekule, katerih obstoj in patogenost sta dokazana že v mnogih rastlinskih vrstah. Povzročajo mnogo pomembnih boleznih s simptomi, ki so navidez podobni virusnim obolenjem. Viroidne RNA molekule ponavadi niso daljše od 400 baznih parov (bp) in nimajo kodirajočih regij, ki bi se prepisale v protein. Značilna je njihova sekundarna struktura (Slika 1), ki je določena z medsebojnim parjenjem nukleotidnih baz molekule, zaradi česar ima viroid značilno paličasto strukturo. Ta se v denaturacijskih pogojih poruši in prevzame zaprto-krožno obliko. Za vse viroidne bolezni je značilno, da so popolnoma odvisne od metabolizma gostiteljske rastline, njihova replikacija in patogeneza pa je pogojena z viroidnimi strukturnimi lastnostmi in sposobnostjo interakcije s celičnimi faktorji. Dve ključni vprašanji, ki se vseskozi pojavljata pri viroidih, sta kako povzročajo bolezenske simptome brez kodirajočih proteinov in zakaj imajo značilno sekundarno strukturo. Nedavne študije so pokazale, da so viroidne molekule sposobne vključiti mehanizem RNA utišanja pomembnih fizioloških genov gostitelja [14].

Do sedaj sta bila pri hmelju opisana dva viroida: (1) hmeljev stunt viroid (HSVd, 297 bp) [13], ki je zaenkrat omejen le na Japonsko in okužuje tudi sadne vrste in (2) hmeljev latentni viroid (HLVd, 256 bp) [11], ki je vsesplošno razširjen v intenzivni pridelavi hmelja z neizrazitimi simptomi okužbe, vendar lahko pri nekaterih kultivarjih hmelja izredno škodljivo vpliva na pridelek [10]. Pri tem je treba izpostaviti kvantitativne spremembe nekaterih sekundarnih metabolitov lupulinske frakcije, prav tako pa se lahko nekoliko zmanjšajo storžki hmelja rastlin okuženih s HLVd v primerjavi z neokuženimi rastlinami [1, 2, 3]. Čeprav so morfološki znaki okužbe neizraziti, so biokemične spremembe storžkov v nasprotju z imenom bolezni, ki ga označuje za latentnega. Nedavno so tudi v Sloveniji povezali pojav kržljivosti hmelja s kombinacijo pomanjkljive preskrbe z borom, stresnih vremenskih razmer in hkratne izrazitejši navzočnosti HLVd [7].



Slika 1: Nukleotidno zaporedje hmeljnega latentnega viroida (HLVd) v termodinamično optimizirani sekundarni strukturi. Mesti prileganja začetnih oligonukleotidov pri RT-PCR reakciji sta podčrtani. Povzeto po [11].

Figure 1: The nucleotide sequence of hop latent viroid (HLVd) arranged in a thermodynamically optimized secondary structure. Primer annealing sites employed in the RT-PCR reaction are underlined. According to [11].

Testiranje hmeljnih rastlin na okužbo s HLVd je Evropska organizacija za varstvo rastlin (European and Mediterranean Plant Protection Organisation – EPPO) uvedla v certifikacijsko shemo produkcije sadilnega materiala hmelja. Tega je tudi v celoti prevzela slovenska certifikacijska shema, zaradi česar se je pojavila potreba po razvoju in vpeljavi testov določanja za HLVd. Za vse teste določanja patogena velja, da morajo biti hitri, enostavi in zanesljivi. V preteklosti so bili pri nas izvedeni poskusi s povratno poliakrilamidno elektroforezo (R-PAGE) in obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) za

določevanje HLVd [8]. R-PAGE tehnika ni primerna za detektiranje viroida v večjem številu vzorcev. Zaradi tega smo se odločili za vpeljavo metode hibridizacije točkovnega odtisa (DOT-BLOT) v kombinaciji z uporabo RT-PCR metode, ki izpolnjujeta kriterije enostavnosti, hitrosti in zanesljivosti in se v metodološkem smislu medsebojno dopolnjujeta, saj prva temelji na tehniki hibridizacije nukleinskih kislin, druga pa na *in vitro* pomnoževanju RNA molekule. V nadaljevanju bova predstavila vpeljavo obeh tehnik, ki se sedaj rutinsko uporabljata pri testiranju sadilnega in žlahniteljskega materiala hmelja.

2 MATERIAL IN METODE

V primeru dela z RNA je potrebno paziti na morebitne kontaminacije z RNazami. Natančna navodila glede izogibanja kontaminacij z RNazami in uporabe inhibitorjev so na voljo v splošnih laboratorijskih priročnikih.

2.1 Rastlinski material

Detekcijo viroida smo opravili na 20-ih sadikah hmelja, ki so bile certifikata A, gojenih v rastlinjaku Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (po pet različnih rastlin štirih kultivarjev hmelja 'Aurora' 1-5, 'Savinjski Golding' 6-10, 'Celeia' 11-15 in 'Taurus' 16-20), in na dveh vzorcih hmeljnih storžkov ('Aurora' -21 in 'Savinjski Golding' - 22). V primeru rastlin smo izolirali celokupne nukleinske kisline (TNA) ali rastlinski sok (SAP) iz mladih listov (2-4 cm² tkiva), pri storžkih pa smo uporabili za izolacijo ovršne lističe (približno tretjino celega storžka), ki smo jim odstranili lupulinske žleze.

2.2 Izolacija vzorcev

Pri optimizaciji metode smo uporabili tri različne ekstrakcijske raztopine, dve za izolacijo celokupnih nukleinskih kislin (TNA), (CTAB [2 % CTAB, 0,1 M TRIS-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% Na-sulfit, 2 % PVP-40, 0,4 % β-merkaptioetanol] in AMES [3 % SDS, 20 % etanol, 1 M NaCl, 0,5 M Na-acetat, 10 mM MgCl₂, pH 6,0]), [5] in raztopino za izolacijo rastlinskega soka (SAP) (HOP EXTRACTION raztopina [200 mM K₂HPO₄, 10 mM DIECA, 5 mM DTT, 0,1 %, Triton X-100]) [3].

CTAB izolacija. Postopek je identičen že objavljenemu postopku izolacije rastlinske DNA [9], na voljo je pri avtorjih. Vzorce smo shranjevali pri -20 °C.

AMES izolacija. Postopek je bil identičen CTAB izolaciji, le ob uporabi AMES ekstrakcijskega pufra.

Izolacija rastlinskega soka. Rastlinski vzorec smo homogenizirali ob dodatku 1 ml HOP EXTRACTION raztopine, centrifugirali 5 min pri 14.000 vrt/min in dobljeni supernatant takoj nanесли na membrano. Ostalo raztopino smo zavrgli.

2.3 RT-PCR reakcija

Za RT-PCR reakcijo smo uporabili komercialni RT-PCR komplet (Access RT-PCR, Promega) po navodilih proizvajalca. V reakcijsko tubico smo zmešali 1,5 µl redčene matrične DNA (preizkušali smo redčitve TNA vzorcev od 1:10 do 1:25000, SAP vzorcev pri RT-PCR nismo uporabili) in po 15 pmol HLVd 1P in 1M začetnega oligonukleotida (HLVd 1P: 5'-GGATACAACCTTTGAGCGCC-3', HLVd 1M: 5'-TAGTTTCCAACCTCCGGCTGG-3') [6] (sl. 1).

Mešanico smo denaturirali 5 min pri 94 °C, jo nato takoj ohladili na ledu in dodali komponente RT-PCR kompleta. Reakcijo smo inkubirali v cikličnem termostatu z naslednjim temperaturnim profilom: 48 °C 45 min, sledila je 2 min denaturacija pri 94 °C in nato 33 ciklov pomnoževanja: 94 °C 30 sec, 57 °C 1 min in 68 °C 2 min, ki se je zaključilo s 7 min inkubacijo pri 68 °C in hlajenjem vzorca pri 12 °C. Pomnožene vzorce smo analizirali na 1,5-odstotnem agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom v koncentraciji 0,5 µg/ml gela.

2.4 Izdelava sonde HLVD

Za izdelavo sonde smo uporabili plazmid pHLP121 [11,12], ki vsebuje dve kopiji (dimer, 2x256 bp) cDNA HLVD, vstavljeni v plazmid Bluescribe M13+ (Stratagene) v restrikcijsko mesto *Sma*I. 20 µg plazmidne DNA smo linearizirali 16 ur pri 37°C s 60 U encima *Hind*III (Sigma) v volumnu 50 µl. Razrezan plazmid smo izolirali iz 0,8% agaroznega gela po postopku Boylea in Lewa [4] in mu spektrofotometrično določili koncentracijo.

Sondo (1 µg lineariziranega plazmida) smo označili z digoksigeninom z uporabo DIG Northern Strater Kit kompleta (Roche) po priporočilih proizvajalca kompleta. Koncentracijo sonde smo določili s primerjavo standarda po po priporočilih proizvajalca kompleta.

2.5 Priprava membrane in hibridizacija točkovnega odtisa

Priprava membran. Vzorce TNA smo pripravili v volumnu 100 µl z redčenjem v 4 × SSC [iz 20x koncentrirane raztopine: 3M NaCl, 0,2M NaH₂PO₄]. Za vsak vzorec smo pripravili 3 redčitve: 0,1, 1 in 5 µl vzorca TNA, ki smo ga zmešali v 4 × SSC. V primeru SAP vzorcev smo pripravili 3 redčitve v 4 × SSC: 1, 10 in 100 µl (neredčeno) vzorca. Preverili smo nivo detekcije pri denaturiranih (5 min 95 °C) in nedenaturiranih TNA vzorcih. Za nanos vzorcev smo uporabili dot-blot vakuumsko napravo (Biometra- Whatman), ki omogoča nanos 96-ih vzorcev na membrano mikrotiterskega formata (8 × 12 cm). Po nanosu vzorcev na membrano smo napravo vakuumirali 5 min in membrane sparli z 200 µl 4 × SSC pufra. Membrane smo zračno posušili in fiksirali nukleinske kisline na UV transiluminatorju (312 nm) do 5 min. Membrane smo nato uporabili v postopku hibridizacije ali shranili pri -20 °C.

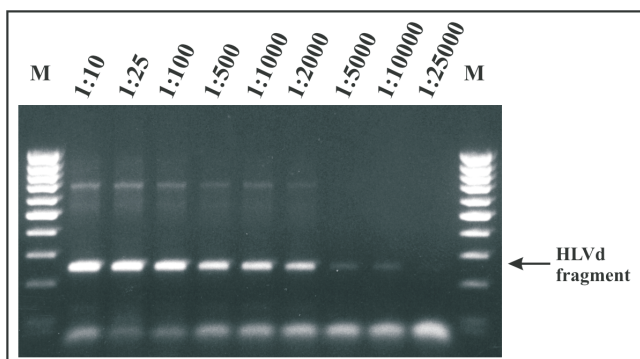
Hibridizacija in detekcija. Membrane smo predhibridizirali do dve uri pri 68 °C v 8 ml DIG Easy Hyb raztopine (komponenta kompleta, Roche), ki smo ga predhodno segreti na 68 °C. 450 ng sonde smo denaturirali 4 min pri 95 °C in zmešali s svežo hibridizacijsko raztopino (4 ml, DIG Easy Hyb) in hibridizirali preko noči pri 68 °C. Po hibridizaciji smo membrane spirali 20 min pri sobni temperaturi v 25 ml 2 × SSC in 0,01-odstoten SDS, 20 min pri 55 °C v 25 ml 2 × SSC in 0,01-odstoten SDS in dvakrat po 20 min pri 55 °C v 25 ml 0,5 × SSC in 0,01-odstoten SDS. Takoj smo nadaljevali s postopkom detekcije po priporočilih proizvajalca kompleta. Po končani detekciji smo rentgenski film izpostavili membrani za 10 min in ga razvili v GBX razvijalcu, spirali v vodi in fiksirali v GBX fiksirju (Kodak).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Zaradi vsesplošne razširjenosti HLVD pri gojenem hmelju smo predpostavljali okuženost vseh analiziranih vzorcev.

3.1 RT-PCR

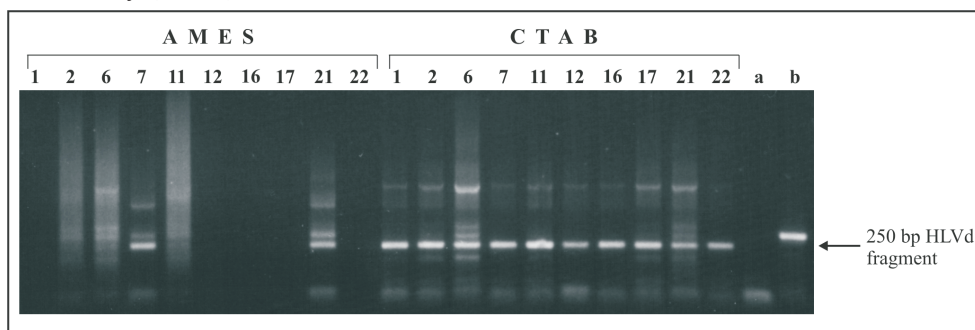
Pri občutljivosti RT-PCR reakcije smo ugotovili, da še vedno z gotovostjo detektiramo viroidno RNA v vzorcu, ki smo ga redčili 1:2000 (1 μ l TNA vzorca v 2 ml vode) (slika 2). Slabotno pomnožen fragment pričakovane dolžine 250 bp pa je bil delno opazen še v vzorcih redčenih 1:5000 in 1:10000. Glede na rezultate priporočamo pripravo RT-PCR reakcije v redčitvenem območju od 1:100 do 1:1000. V nekaterih primerih smo pri manj redčenih vzorcih opazili tudi 500 in 750 bp dolge fragmente, ki so bili posledica večkratne krožnega prepisa RNA molekule zaradi prevelike koncentracije matrične RNA.



Slika 2: Občutljivost RT-PCR reakcije pri različnih redčenjih vzorca, M dolžinski marker 100 bp lestvica (Fermentas)

Figure 2: Sensitivity of RT-PCR reaction at different dilution levels, M molecular weight marker 100 bp ladder (Fermentas)

Pri primerjavi različnih izolacijskih raztopin za TNA, se je CTAB raztopina izkazala za boljšo izbiro kot AMES raztopina. V vseh primerih smo pri vzorcih izoliranih s CTAB raztopino brez težav pomnožili viroidno RNA, medtem ko smo pri AMES vzorcih detektirali do 70 % izpad RT-PCR reakcije (slika 3).



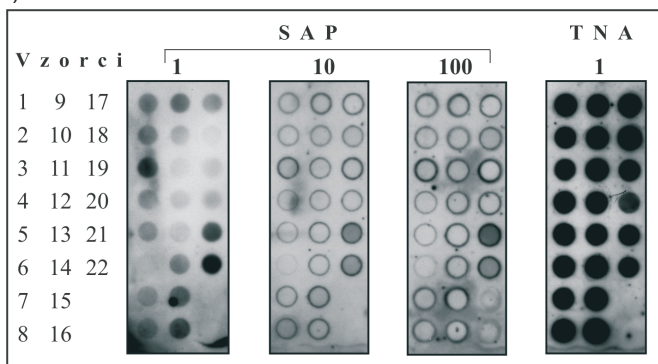
Slika 3: RT-PCR rezultati 10-ih vzorcev hmelja izoliranih z AMES in CTAB ekstrakcijsko raztopino. Predviden HLVd fragment dolžine 250 bp smo pomnožili pri vseh 10-ih CTAB vzorcih. Pri AMES ekstrakcijski raztopini smo zasledili močno inhibicijo, saj smo le v dveh vzorcih (7 in 21) pomnožili HLVd fragment; a vzorec brez TNA (slepi vzorec), b kontrolna RNA pomnožitev (323 bp, kontrola RT-PCR kompleta).

Figure 3: RT-PCR results of 10 hop samples extracted with AMES and CTAB buffer. Predicted 250 bp HLVd fragment is amplified in all ten CTAB samples. Strong inhibition of reaction in AMES samples is detected, since the HLVd band was amplified in only two samples (7 and 21); a - blank sample (no nucleic acids added), b - control RNA amplification (323 bp, control from RT-PCR kit).

Pri RT-PCR analizi s CTAB ekstrakcijsko raztopino smo dokazali predpostavljeno domnevo, da so vsi analizirani vzorci hmelja okuženi s HLVD (rezultati niso prikazani). CTAB ekstrakcijska raztopina se je izkazala za boljše pri RT-PCR analizi v primerjavi z AMES raztopino, zato za nadaljnje delo priporočamo njeno uporabo pri izolaciji TNA. Nivo detekcije RT-PCR reakcije se kljub zmanjšanemu volumnu za 70% od priporočenega ni spremenil, smo pa s tem občutno zmanjšali stroške analize.

3.2 Hibridizacija

Pri hibridizaciji točkovnega odtisa smo primerjali rezultate dobljene pri uporabi SAP ali TNA vzorcev in različne redčitve teh vzorcev. Izolacija SAP vzorcev je hitrejša (15 min) v primerjavi z izolacijo TNA (3 ure). Iz dobljenih rezultatov lahko potrdimo neuporabnost vzorcev soka (SAP), saj je bil signal hibridizacije neizrazit in je bilo težko določiti ali je vzorec pozitiven ali negativen (slika 4). Pri 1 μ l vzorcih soka smo dobili hibridizacijske signale šibke intenzitete, pri večjih volumnih (10 in 100 μ l) pa so bili signali izredno neizraziti. Le pri vzorcih hmeljnih storžkov (vzorca 21 in 22) so bili signali močnejši, kar potrjuje večjo koncentracijo viroida v storžkih. Zmanjšano intenziteto signalov nekateri avtorji razlagajo z aktivnimi RNazami v rastlinskem soku [3]. Pri uporabi TNA vzorcev smo dobili signale močne intenzitete pri 1 μ l vzorcu. Čeprav je postopek izolacije TNA v primerjavi z izolacijo rastlinskega soka daljši, pa priporočamo prav uporabo teh vzorcev, saj dobimo zanesljive hibridizacijske signale. CTAB in AMES vzorci so pri hibridizaciji dali identične rezultate (rezultati niso prikazani).

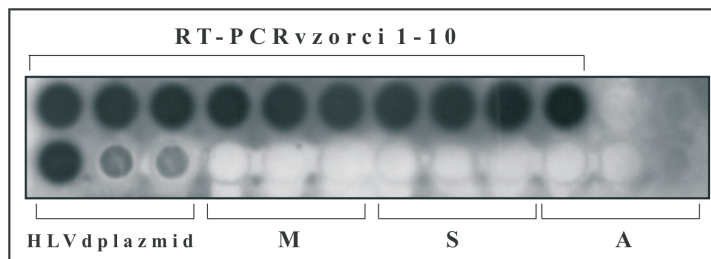


Slika 4: Rezultati hibridizacije 22-ih vzorcev soka (SAP) in celokupnih nukleinskih kislin (TNA) (izoliranih s CTAB ekstrakcijsko raztopino)

Figure 4: Hybridization results of 22 sap (SAP) and total nucleic acids (TNA) samples (CTAB isolation)

V našem primeru smo za določitev signala ozadja uporabljali TNA ostalih kmetijskih rastlin (koruza, sončnica, lucerna), kjer nismo zasledili hibridizacijskega signala. Kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili pozitivno RT-PCR reakcija (0,5 μ l), ki smo jo predhodno denaturirali. S tem smo potrdili tudi identičnost RT-PCR vzorcev in naše sonde. Za kontrolo pa odsvetujemo uporabo plazmida, ker smo opazili slabe in neponovljive hibridizacijske signale pri uporabi različnih, relativno visokih

koncentracij plazmida (10 ng in navzdol) (slika 5). Identičnost HLVD RT-PCR produktov smo potrdili tudi s sekvenčno analizo in s primerjavo z objavljenim GenBank zaporedjem (rezultati niso prikazani). TNA vzorcev ni potrebno denaturirati, ker nismo opazili razlik med jakostjo hibridizacijskih signalov denaturiranih in nendenaturiranih TNA vzorcev (rezultati niso prikazani).



Slika 5: Pri desetih hmeljnih vzorcih smo napravili dot-blot detekcijo RT-PCR vzorcev pri zaostrenih pogojih in pri vseh dobili jasne hibridizacijske signale. Pri hibridizaciji na nekatere rastlinske TNA vzorce (M – koruza, S – sončnica, A – lucerna) nismo zasledili hibridizacijskih signalov. Pri hibridizaciji na plazmidno pHLP121 DNA smo zasledili jasen hibridizacijski signal le pri 10 ng DNA (HLVD: 10, 1 in 0,1 ng).

Figure 5: Identity of 10 amplified RT-PCR products was confirmed by stringent DOT-BLOT hybridization, in which strong hybridisation signals were observed. Hybridisation to other plant TNA samples (maize - M, sunflower - S and alfalfa - A) revealed no sequence homology to the HLVD probe used. Plasmid DNA pHLP121 revealed a strong hybridization signal only at 10 ng DNA (HLVD: 10, 1 and 0.1 ng).

S pomočjo RT-PCR produkta smo določili tudi domnevni nivo detekcije hibridizacije. Iz gela smo izolirali RT-PCR produkt, mu določili koncentracijo spektrofotometrično in pripravili njegove redčitve z znanim številom molekul RT-PCR produkta. Določili smo, da je spodnji nivo detekcije metode okrog 108 molekul RT-PCR produkta, kar odgovarja približno 28 pg RT-PCR produkta oz. molekul HLVD.

4 ZAKLJUČEK

Kombinacija hibridizacije in RT-PCR reakcije se je pokazala za optimalno izbiro tehnik za določanje hmeljnega latentnega viroida. Metodološko se tehniki razlikujeta, saj prva temelji na hibridizaciji in druga na in vitro pomnoževanju DNA. S tem smo še dodatno izboljšali zanesljivost testiranja.

Glede na dobljene rezultate priporočamo uporabo ekstrakcijske raztopine CTAB za izolacijo celokupnih nukleinskih kislin, ker smo dobili najboljše rezultate tako pri hibridizaciji kot pri RT-PCR določanju viroida. Ekstrakcijska raztopina AMES je dala pri hibridizaciji enake rezultate kot CTAB, medtem ko smo zasledili velik izpad pomnoževanja vzorcev pri RT-PCR določanju. Uporabo hmeljnega rastlinskega soka odsvetujemo, ker v našem primeru vzorci niso dali jasnih hibridizacijskih signalov in so tudi neprimerni za RT-PCR reakcijo.

Obe tehniki smo uspešno vpeljali za rutinsko testiranje matičnih rastlin in rastlin, ki so v procesu eliminacije hmeljevega latentnega viroida. Pri tem v sistemu testiranja najprej uporabimo tehniko hibridizacije, ki omogoča hkratno testiranje velikega števila vzorcev. V primeru odsotnosti hibridizacijskih signalov oz. negativnih vzorcev analizo nadaljujemo z občutljivejšo RT-PCR analizo, ki dokončno ovrže ali potrdi prisotnost HLVd.

5 VIRI

1. Adams, A.N., Morton, A., Barbara, D.J., Ridout, M.S., The distribution and spread of hop latent viroid within two commercial plantings of hop (*Humulus lupulus*).- *Annals of Applied Biology*, 121(1992)3, s. 585-592.
2. Adams, A.N., Barbara, D.J., Morton, A., Effects of hop latent viroid on weight and quality of the cones of the hop cultivar Wye Challenger.- *Annals of Applied Biology*, 118(1991)(Suppl.), s. 126-127.
3. 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*, 117(1990)2, s. 359-366.
4. Boyle J.S., Lew A.M., An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification.- *Trends in Genetics*, 11(1995)1, s. 8.
5. EPPO. Diagnostic protocols for regulated pests: Chrysanthemum stunt viroid.- *PM*, 7/6(2001)1.
6. Hataya, T., Hikage, K., Suda, N., Nagata, T., Li, S., Itoga, Y., Tanikoshi, T., Shikata E., Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR).- *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 58(1992)5, s. 677-684.
7. Knapič, V., Vpliv okužbe z viroidno latentno boleznijo in stresnih vremenskih razmer na hmelj.- *Hmeljarski bilten*, 10(2003), s. 39-53.
8. Knapič, V., Javornik, B., *Viroidi v slovenskih kultivarjih hmelja (*Humulus lupulus* L.)*.- V: Maček, Jože (ur.). *Zbornik predavanj in referatov 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Portorožu od 3. do 4. marca 1999*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, (1999), s. 311-318.
9. Kump, B., Javornik, B., Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) populations by RAPD markers.- *Plant Science*, 114(1996)2, s. 149-159.
10. Matoušek, J., Patzak, J., Orctová, L., Schubert, J., Vrba, L., Steger, G., Riesner, D., The variability of hop latent viroid as induced upon heat treatment.- *Virology*, 287(2001)2, s. 349-58.
11. Puchta, H., Ramm, K., Saenger, H.L., The molecular structure of hop latent viroid (HLVd), a new viroid occurring worldwide in hops.- *Nucleic Acids Research*, 16(1988)10, s. 149-158.
12. Puchta, H., Sanger, H.L., An improved procedure for the rapid one-step-cloning of full-length viroid cDNA.- *Archives of Virology*, 101(1988)1-2, s. 137-140.

13. Sano, T., Shikata, E., Hop stunt viroid disease.- Proceedings Int. Workshop on Hop Virus Diseases Rauschholzhausen 1988, A. Eppler Edt., Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, (1989), s. 159-164.
14. Wang, M.B, Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., Waterhouse, P.M., On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites.- Proceedings of the National Acadademy of Sciences USA, 101(2004)9, s. 3275-3280.