

DOLOČANJE VIROIDOV BREZ IZOLACIJE NUKLEINSKIH KISLIN: SANJE ALI REALNOST?

Tanja GUČEK¹ in Sebastjan RADIŠEK²

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Received / Prispelo: 25. 10. 2023

Accepted / Sprejeto: 11. 12. 2023

Izvleček

Na hmelju viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) v kombinaciji s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd) povzroča bolezen hudo viroidno zakrnelost hmelja. Z namenom omejitve nadaljnega širjenja bolezni v Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin (DL) razvijamo metodo za hitro detekcijo viroida CBCVd na terenu. V raziskavi smo na vzorcih treh sort hmelja primerjali dva standardna načina izolacije nukleinskih kislin in dva načina »hitre izolacije«. Vzorce smo na prisotnost viroidov CBCVd in HLVd analizirali s PCR s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) in RT-PCR v realnem času za sočasno določanje (duplex, duRT-qPCR). V primeru hitre izolacije smo testirali vpliv inhibicije na občutljivost reakcije. Dodatno smo testirali tudi vpliv shranjevanja in rastlinski sok pred analizo dlje časa hranili pri – 70 °C. Viroid CBCVd in HLVd smo uspešno določili pri vseh štirih načinih izolacije z obema metodama. Kot pričakovano smo z duRT-qPCR pri hitri izolaciji zaznali inhibicijo in 100-krat manjšo občutljivost kot pri uporabi standardnih metod. Sorta hmelja in hranjene vzorcev na rezultate ni imelo vpliva. Uporabljeni protokola za hitro izolacijo tako predstavljata dober potencial za uporabo pri detekciji viroidov na terenu. Glede na rezultate raziskave lahko sklepamo, da je določanje viroidov brez izolacije nukleinskih kislin zelo blizu realnosti in to niso le sanje rastlinskih diagnostikov.

Ključne besede: CBCVd, HLVd, hitra izolacija, rastlinski sok, RT-PCR, duRT-qPCR

DETECTION OF VIROIDES WITHOUT NUCLEIC ACID ISOLATION: DREAM OR REALITY?

Abstract

On hops, citrus bark cracking viroid (CBCVd) in combination with hop latent viroid (HLVd) causes the severe hop stunt disease. In order to limit further spread of the disease, the Diagnostic Laboratory for Plant Protection (DL) is developing a method for rapid detection of CBCVd in the field. In the research, we compared two standard methods of isolation of nucleic acids and two methods of "fast isolation" on samples of three hop varieties. The samples were analysed for the presence of CBCVd and HLVd viroids using reverse transcription PCR (RT-PCR) and duplex real

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

² Dr., IHPS, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

time RT-PCR (duRT-qPCR). In the case of fast isolation, we tested the influence of inhibitors on the sensitivity of the reaction. Additionally, we also tested the effect of storage and stored the crude extract at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a longer time period before analysis. Viroid CBCVd and HLVD were successfully determined in all four isolations using both methods. As expected, we detected inhibition and 100 times lower sensitivity with duRT-qPCR for fast isolation than when using standard methods. The variety of hops and storage had no effect on the results. The used protocols for fast isolation, thus represents a good potential for use in the detection of viroids in the field. Based on the results of the research, we can conclude that the determination of viroids without isolation of nucleic acids is very close to reality and is not only a dream of plant diagnosticians.

Key words: CBCVd, HLVD, fast isolation, crude extract, RT-PCR, duRT-qPCR

1 UVOD

Pri diagnostiki rastlinskih patogenov predstavlja prvi korak določitve patogena izolacija njegovega genoma (DNA/RNA molekul) iz rastline. Za izbor ustrezne metode je nujno razumeti lokalizacijo patogena v rastlini in prisotnost rastlinskih komponent, ki bi lahko inhibirale reakcijo pomnoževanja (Ivanov in sod., 2020). Izolacija nukleinskih kislin (NA; DNA in RNA) je najpomembnejša metoda uporabljena v molekularni biologiji, saj kakovost in integriteta izoliranih NA neposredno vpliva na rezultat (Tan in Yiap, 2009). Prisotnost viroidov v rastlinah se določa na osnovi prisotnosti RNA (Ivanov in sod., 2020). Določanje viroidov je še posebej zahtevno, ker je RNA molekula, zaradi prisotnosti RNaz, zelo nestabilna in ima po izolaciji iz celic zelo kratko obstojnost (Tan in Yiap, 2009).

V primeru rastlin je dostopnost NA za izolacijo odvisna od homogenizacije tkiva, ki se razlikuje glede trdote tkiva. V primeru mehkih tkiv je dovolj že samo stresanje v ustreznem pufru ali pa uporaba ročnega homogenizatorja in ekstrakcijske vrečke z mrežo. V primeru trših tkiv se lahko uporablja terilnice, kovinske kroglice, naprave za mletje z rezili. V primeru izotermnih metod pomnoževanja (RPA, LAMP, itd.) lahko učinkovita homogenizacija iz celic sprosti dovolj NA, da za detekcijo patogenov ni potrebno dodatno čiščenje in izolacija. Ne glede na to je za povečanje količine izoliranih NA potrebno izvesti dodatne postopke čiščenja (Ivanov in sod., 2020).

Dva ključna koraka priprave vzorca NA sta liza celic in izolacija NA. V najboljšem primeru mora metoda omogočati učinkovito lizo celic in porušiti celično steno in organele ter sprostiti znotrajcelične komponente brez zaviranja nadaljnjih korakov izolacije in detekcije. Za lizo celic obstajajo številne kemične in mehanske metode, ki imajo svoje prednosti in slabosti. Kemične metode so enostavne in ne potrebujejo veliko opreme, vendar pa lahko uporabljeni reagenti zavirajo nadaljnje detekcijske metode. Za uspešno analizo je zato potrebno izvesti dodatno čiščenje. Po drugi strani pri mehanskih metodah ne potrebujemo reagentov, vendar pa lahko zaradi

trenja in segrevanja poškodujejo DNA/RNA in za izvedbo potrebujejo vpeljavo dodatne opreme (Emaus in sod., 2020).

Metode za izolacijo NA najpogosteje temeljijo na ekstrakciji tekoče-tekoče (LLE) in ekstrakciji v trdni fazi (SPE). Metode so zelo raznolike in za čiščenje in koncentriranje NA uporabljajo različne interakcije (elektrostatske, hidrofobne, vodikove vezi) (Emaus in sod., 2020). Med prvimi razvitimi LLE metodami je ekstrakcija na osnovi fenola in kloroforma, ki NA izolira v zgornji vodni plasti, medtem ko hidrofobni lipidi migrirajo v gostejšo organsko fazo, proteini pa se zberejo vmes (Tan in Yiap, 2009). Za izolacijo rastlinskih patogenov se tradicionalne uporablja CTAB detergent, ki omogoča izolacijo iz bakterij, gliv, rastlin in živali (Ivanov in sod., 2020). Metoda se lahko uporablja v kombinaciji s fenol-kloroformom in obsega številne korake (3 in 4 h), vendar zagotavlja visoko koncentracijo izoliranih NA (Guček in sod., 2020). CTAB metoda zahteva uporabo centrifuge, vodne kopeli in zdravju škodljivih reagentov, kar predstavlja omejitev pri aplikaciji na terenu (Ivanov in sod., 2020). V primeru SPE metod se najpogosteje uporablja kolone na osnovi silika filtrov. Ti kompleti uporabljajo reagente na osnovi soli, ki prekinejo raztapljanje biopolimera in olajšajo adsorpcijo NA na silicijev dioksid. Adsorbirane NA nato speremo z alkoholom in speremo s topilom z nizko ionsko močjo (Emaus in sod., 2020). Za izolacijo RNA iz rastlin so na voljo številni komercialno dostopni kompleti na osnovi kolon, ki so različno časovno obsežni in zagotavljajo visoko kakovost izoliranih NA (Guček in sod., 2020; Ivanov in sod., 2020). Večina komercialno dostopnih kompletov za izolacijo NA potrebuje laboratorijsko opremo, kar je za uporabo na terenu nepraktično. Za uporabo na terenu že obstajajo prenosne centrifuge, razvoj pa poteka tudi v uporabo 3D tiskanja za namene manjše prenosne opreme (Ivanov in sod., 2020).

Na splošno uspešna izolacija NA zahteva učinkovito lizo celic, denaturacijo nukleo-proteinskih kompleksov, inaktivacijo nukleaz (DNaze, RNaze) brez prisotnosti kontaminacije. Tarčne NA morajo biti brez nečistoč, kot so proteini, polisaharidi, lipidi, druge nukleinske kisline (DNA brez RNA in obratno) in metaboliti (Tan in Yiap, 2009). PCR je občutljiv na inhibitorje, kot so polifenoli, tanini, pektin in ksilen, kar pogosto vodi v zmanjšanje občutljivosti in lažno negativne rezultate (Silva in sod., 2018; Ivanov in sod., 2020). Izotermne metode pomnoževanja uporabljajo druge encime, ki so odporni na rastlinske inhibitorje, vendar pa lahko reakcijo inhibira prisotnost drugih NA iz ozadja (Ivanov in sod., 2020). Na reakcijo pomnoževanja lahko negativno vplivajo tudi reagenti, ki se uporabljajo za izolacijo NA. Ostanki fenol-kloroforma lahko povzročijo inhibicijo katerekoli encimske reakcije. Prisotnost EDTA lahko veže magnezijeve ione in inhibira PCR, RPA in LAMP. Detergenti, kot sta CTAB in SDS, lahko inhibirajo RPA (Ivanov in sod., 2020). Zato je za pridobitev zanesljivih in ponovljivih rezultatov ključno, da se z metodo izolacije NA odstrani inhibitorje (Emaus in sod., 2020).

Z razvojem detekcijskih metod je prišlo tudi do razvoja zelo različnih metod izolacije NA, ki med drugim omogočajo izolacijo s pomočjo avtomatizacije, uporabe kolon, filtrov, kroglic, čipov in so lahko celo specifične za določeno zaporedje. V zadnjih

letih so številne izboljšave privedle k večjemu izkoristku, zmanjšanju prisotnosti nečistoč, zmanjšanju časa priprave vzorca in volumna izolacije NA. Med pomembnejšimi je razvoj v smeri poenostavitve in avtomatizacije z namenom testiranja na terenu oziroma izven laboratorija (Emaus in sod., 2020, Ivanov in sod., 2020). Pri rastlinah je najenostavnejši način, da to dosežemo, z uporabo ekstrakcijske vrečke z mrežo, ročnega homogenizatorja in ustreznega pufra. Toda ta metoda ne omogoča očiščenja NA celičnih komponent, ki lahko inhibirajo detekcijo patogenov. Prav tako se učinkovitost izolacije zmanjša (Ivanov in sod., 2020). Glede na naše podatke je najhitrejši način izolacije NA iz rastlin, živali in mikrobov z uporabo hitrih testov (lateral flow stick) na osnovi papirnatih diskov, ki vežejo NA in omogočajo izolacijo NA že v 30 s (Zou in sod., 2017).

Z namenom razvoja izotermnih metod pomnoževanja za določanje viroida CBCVd na terenu smo v raziskavi želeli razviti metodo »hitre izolacije« oziroma priprave rastlinskega ekstrakta. V ta namen smo primerjali štiri metode izolacije NA, dve standardni metodi (CTAB reagent in komercialen komplet reagentov) in dve na novo razviti metodi hitre izolacije za uporabo na terenu. Trenutno so v DL v uporabi metode, ki so zamudne, zahtevajo uporabo kakovostnih nukleinskih kislin in drage opreme, kar je lahko ovira za izvajanje detekcije na terenu. Razvoj novih metod hitre izolacije nam bo omogočil hitro določanje viroidov brez dolgotrajnega postopka izolacije NA in posledično možnost uporabe na terenu.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za analizo primerjave izolacij smo uporabili hmelj sort Celeia (CEL), Aurora (AU) in Bobek (BO) okužen z viroidoma CBCVd in HLVd. Kot negativno kontrolo smo uporabili rastline divjega hmelja negativne na viroid CBCVd in HLVd. Rastline so del Referenčne zbirke DL in so bile na prisotnost viroidov predhodno testirane z RT-PCR. Zaradi neenakomerne razporeditve viroidov po rastlini smo vzorčili 4-6 simptomatičnih listov iz različnih delov rastline in vzorce združili v en vzorec. Rastline smo vzorčili na dan analize, do pričetka analize so bili vzorci shranjeni pri +4 °C.

2.2 Standardna izolacija nukleinskih kislin

V primeru standardne izolacije nukleinskih kislin smo izvedli primerjavo med hišno metodo in komercialnim kompletom reagentov. Prva omogoča izolacijo celokupnih nukleinskih kislin (TNA) z uporabo CTAB reagenta po obsežnem protokolu, ki zahteva 4 ure. Druga pa omogoča izolacijo RNA z uporabo kolon na osnovi silikatov in zahteva 1,5 ure. Metodi sta v DL v rutinski uporabi in omogočata zanesljivo določanje viroidov (Guček in sod., 2020). Vse izolacije smo izvedli v dveh tehničnih ponovitvah in hkrati pripravili kontrolne izolacije (PIC, pozitivna kontrola izolacije; BVV, zdrav hmelj brez virusov in viroidov; NIC, negativna kontrola izolacije).

2.2.1 Izolacija s CTAB reagentom

Kot prvi način standardne izolacije smo iz hmelja TNA izolirali z uporabo CTAB reagenta kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017). Uporabili smo 100 mg tkiva (listi hmelja), ki smo ga zdrobili v terilnicah. Vzorce smo raztopili v 50 μ l TE pufra (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) in jih shranili pri -20 °C. Da bi preprečili vpliv inhibitorjev, smo pred analizo izolirano TNA 10-krat razredčili v vodi brez RNaz (Sigma-Aldrich, ZDA).

2.2.2 Izolacija s komercialnim kompletom reagentov

Kot drugi način standardne izolacije smo vzorce hmelja izolirali s komercialno dostopnim kompletom Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (SPT, Sigma-Aldrich, ZDA), po A-protokolu iz Jakše in sod. (2015). Vzorce listov hmelja (100 mg) smo zdrobili z uporabo terilnice in priloženega pufra. Izolirano RNA smo shranili pri -70 °C. Pred analizo smo izolirano RNA 10-krat razredčili v vodi brez RNaz, da bi preprečili vpliv inhibitorjev. Raziskavo smo izvedli z namenom detekcije viroida CBCVd in kot dodatno naknadno analizirali prisotnost viroida HLVd, zato rezultati v primeru SPT za viroid HLVd niso podani.

2.3 »Hitra izolacija« nukleinskih kislin

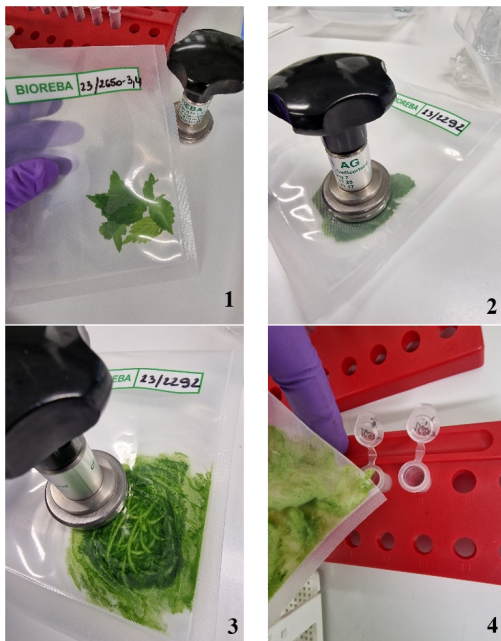
Pri »hitri izolaciji« nukleinskih kislin oziroma pripravi rastlinskega soka za direktno določanje viroidov CBCVd in HLVd smo primerjali dva protokola (PI in PII). Želeli smo uporabiti načine, ki omogočajo čim bolj enostavno pripravo rastlinskega soka, brez zahtevne opreme in daljših postopkov, da bi uporaba le-teh lahko bila mogoča tudi na terenu. Protokola sta se razlikovala v uporabi različnih raztopin za drobljenje in razredčenje vzorcev, hkrati pa smo primerjali tudi vpliv centrifugiranja. V primeru PI smo izvedli centrifugiranje, v primeru PII pa samo mešanje. V primeru PI smo izvedli preliminarno analizo in vzorce razredčili 5- in 20-krat in na osnovi teh rezultatov nadaljevali testiranje. Pri drugem testiranju smo pred testiranjem z duRT-qPCR in RT-PCR z namenom določitve vpliv inhibicije pripravili serijo razredčitev (10x, 20x, 50x, 100x). Z namenom analize občutljivosti smo na enem setu vzorcev izvedli dodatno serijo razredčitev (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).

Vpliv hrambe na rezultate duRT-qPCR in RT-PCR smo določili z različnimi časi hranjenja vzorcev pri -70 °C oziroma -20 °C. V ta namen smo rastlinski sok pridobljen po PI in PII pred analizo z duRT-qPCR hranili 24 h pri -70 °C in razredčili 10- in 100-krat. Analizo že razredčenih vzorcev (shranjenih pri -20 °C) smo izvedli v časovnem obdobju od 0 h (duRT-qPCR za CBCVd in interno kontrolo mRNA1192), 24 h (duRT-qPCR za HLVd in interno kontrolo mRNA170; RT-PCR za CBCVd), 48 h (analiza občutljivosti) do 18 dni (RT-PCR za HLVd).

2.3.1 PROTOKOL I (PI)

Kot način prve »hitre izolacije« smo vzorce hmelja za direktno določanje pripravili po modificiranem protokolu raziskovalcev iz Univerze v Hohenheimu (osebni razgovor

z mag. Swati Jagani, 2023). Vzorec listov hmelja (100 mg) smo s pomočjo ročnega homogenizatorja (Bioreba, Švica) zdrobili v vrečki za ekstrakcijo (univerzalna velikost, Bioreba, Švica). Vzorcju smo za lažje mletje dodali 600 μ L vode tretirane z DEPC (Merck, Nemčija). Ko smo liste zdrobili, smo sok prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko in centrifugirali 4 minute pri 12 700 vrtljajih na minuto in 4 °C (slika 1). Supernatant smo nato odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in ostalo zavrgli. Vzorce smo razredčili v 10 mM Tris (Invitrogen, ZDA). V okviru preliminarne analize smo izvedli 5- in 20-kratno razredčitvi, v nadaljevanju pa 10-, 20-, 50- in 100-kratne. Vzorce smo analizirali takoj oziroma v primeru testiranja daljšega shranjevanja hranili pri -70 °C 24 h oziroma dlje.



Slika 1: Prikaz izvedbe »hitre izolacije«. Prikazani so posamezni koraki, pri katerih smo liste hmelja z uporabo vrečk za ekstrakcijo in ročnega homogenizatorja zmelili v rastlinski sok in prenesli v mikrocentrifugirko.

2.3.2 PROTOKOL II (PII)

Kot primer druge »hitre izolacije« smo vzorce hmelja za direktno določanje pripravili po protokolu Marqués in sod. (2022). Vzorec listov hmelja (100 mg) smo s pomočjo ročnega homogenizatorja (Bioreba, Švica) zdrobili v vrečkah za ekstrakcijo (univerzalna velikost, Bioreba, Švica). Vzorcju smo za lažje mletje dodali 600 μ L raztopine za mletje (15 % PEG 4000, 20 mM NaOH). Ko smo liste zdrobili, smo sok prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko (slika 1) in zmešali. Vzorce smo razredčili v TE

pufu (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Vzorce smo analizirali takoj oziroma v primeru testiranja daljšega shranjevanja hranili pri -70 °C 24 h oziroma dlje.

2.4 RT-PCR in duRT-qPCR reakcija

RT-PCR smo izvedli s kompletom One Step Ahead RT-PCR (Qiagen, Nemčija) v inštrumentu Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf). Z RT-PCR smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (ZO) ločeno analizirali prisotnost HLVd in CBCVd v vzorcih hmelja, kot predhodno opisano v Guček in sod. (2019). Namnožene produkte smo analizirali na 2 % agaroznem gelu v 1x TBE pufu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) in detektirali z UV lučjo (Syngene, ZDA). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 170 V in 180 mA.

Analizo duRT-qPCR smo izvedli s kompletom SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline, Meridian Bioscience) in encimom reverzno transkriptazo MultiScribe Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) v inštrumentu LightCycler96 (Roche). Z duRT-qPCR smo sočasno analizirali prisotnost viroida (CBCVd oziroma HLVd) in interne kontrole (mRNA1192 oziroma mRNA170) v vzorcih hmelja s specifičnimi ZO, kot predhodno opisano v Guček (2020). Vzorce smo analizirali z reakcijami v enem koraku, v dveh tehničnih ponovitvah na ploščah za 96 vzorcev z detekcijskim sistemom LightCycler96 (Roche) in programom LightCycler96 Software 1.1.0.1320, pri čemer so bile vse nastavitve programa avtomatske.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru preliminarne analize smo vzorce izolirane s hitro izolacijo po protokolu I (PI) razredčili 5- in 20-krat, da bi ugotovili vpliv inhibicije na reakcijo duRT-qPCR. V primeru 5-kratne razredčitve smo potrdili inhibicijo, ker pri nobenem vzorcu nismo dobili pozitivnega rezultata (rezultati niso prikazani). Pri 20-kratni razredčitvi istih vzorcev smo v povprečju dobili za viroid CBCVd Cq-vrednosti okrog 25 in za HLVd okrog 28 pri pozitivnih vzorcih (preglednica 1). Pri zdravem vzorcu (BVV) smo dobili pozitivne Cq-vrednosti za mRNA1192 in mRNA170, medtem ko smo pri večini ostalih vzorcev dobili negativne rezultate. Tako pri viroidih (HLVd) kot pri interni kontroli smo zaradi prevelike količine rastlinske RNA in možnih prisotnih inhibitorjev dobili lažno negativne rezultate. Zaradi inhibicije smo se pri nadaljnjih analizah PI in PII odločili za dodatne razredčitve vzorcev (10-, 20-, 50- in 100-kratna). Analizo duRT-qPCR smo za CBCVd in HLVd na istih vzorcih izvedli s standardno metodo CTAB in SPT (samo CBCVd) in v povprečju dobili za 6 do 10 ciklov nižje Cq-vrednosti. Najnižje Cq-vrednosti smo za viroid CBCVd dobili pri CTAB izolaciji, medtem ko smo pri interni kontroli za mRNA1192 nižje Cq-vrednosti dobili pri SPT. Rezultati so pričakovani, kajti z uporabo komercialnega kompleta SPT dobimo manj izolirane RNA, ki je bolj čista, glede na hišno metodo (preglednica 1). Prav tako smo pričakovali, da bomo s PI dobili višje Cq-vrednosti kot s CTAB in SPT, ker smo s hitro metodo zaradi odsotnosti lize celic in čiščenja NA izolirali manj viroidne RNA.

Preglednica 1: Rezultati detekcije viroidov CBCVd in HLVd z metodo duRT-qPCR za vzorce različnih sort hmelja izolirane s standardno metodo (CTAB in SPT) in hitro izolacijo (PI). Za vzorce so podane povprečne Cq-vrednosti za CBCVd, HLVd, mRNA1192 in mRNA170.

CTAB*				
Oznaka vzorca	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	14,10	17,75	23,22	18,02
CBCVd + HLVd CEL	14,58	20,08	22,37	17,49
CBCVd + HLVd BO	14,82	20,79	22,16	17,58
PIC	19,21	31,44	19,24	14,64
BVV	-	-	18,63	16,55
NIC	-	-	-	-
SPT				
Oznaka vzorca	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	17,78	/	20,01	/
CBCVd + HLVd CEL	17,39	/	19,49	/
CBCVd + HLVd BO	17,56	/	20,01	/
PIC	17,23	/	18,75	/
BVV	-	/	24,09	/
NIC	-	/	-	/
PI 20x				
Oznaka vzorca	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	25,27	30,05	-	-
CBCVd + HLVd CEL	23,96	26,24	-	19,80
CBCVd + HLVd BO	26,60	-	-	-
BVV	-	-	26,41	22,68
NIC	-	-	-	-

* CTAB, vzorci izolirani s CTAB reagentom; SPT, vzorci izolirani s Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit; PI 20x, 20-kratna razreditev vzorcev izoliranih po protokolu I; CBCVd + HLVd, vzorec hmelja okužen s CBCVd in HLVd; AU, Aurora; CEL, Celeia; BO, Bobek; PIC, pozitivna kontrola izolacije; BVV, vzorec hmelja negativen na CBCVd in HLVd; NIC, negativna kontrola izolacije; Cq-vrednosti so podane kot povprečje dveh tehničnih ponovitev izolacije (štiri tehnične ponovitve duRT-qPCR reakcije); -, v vzorcu viroid ni prisoten; /, vzorec ni bil testiran.

Z duRT-qPCR smo vzorce različnih sort hmelja izoliranih po PI in PII analizirali na prisotnost CBCVd in HLVd. Pozitivne Cq-vrednosti smo dobili ne glede na sorto hmelja, razreditev (10-, 20-, 50- in 100-kratna) ali uporabljeno metodo (PI, PII) (preglednica 2). Med metodama PI in PII smo dobili zelo primerljive povprečne Cq-vrednosti za viroide. Za viroid CBCVd smo pri obeh metodah dobili povprečne Cq-vrednosti ~22,8 in za HLVd pri PI ~24,4 in pri PII ~22,6. Pri interni kontroli mRNA1192 smo v povprečju dobili nižje Cq-vrednosti in pri mRNA170 več pozitivnih vrednosti pri metodi PII kot pri PI. Vendar pa smo pri metodi PII v več primerih dobili lažno negativen rezultat, predvsem pri 10-kratni razredčitvi. Viroid CBCVd in HLVd smo tako večkrat ustrezno določili z uporabo metode PI. V primeru interne kontrole smo

pri mRNA170 s PI in PII v večini primerov dobili negativne rezultate, ne glede na razredčitev in vzorec. Zanimivo je, da smo pri mRNA1192 v istih vzorcih dobili pozitivne rezultate, tako da sklepamo, da negativen rezultat ni posledica inhibicije samo zaradi prevelike količine tkiva. Pri mRNA1192 smo pri 10-kratni razredčitvi potrdili inhibicijo, predvsem pri BVV vzorcu, kjer smo pri ostalih razredčitvah dobili pozitivne rezultate. Pri mRNA170 pa pozitivnega rezultata nismo dobili pri nobeni razredčitvi. ZO za mRNA170 se najverjetneje niso uspeli vezati na tarčo zaradi prevelike aktivnosti drugih metabolitov, ki so s hrambo 24 h pri -70 °C postali manj aktivni, ker smo samo v tem primeru pri mRNA170 dobili pozitiven rezultat (preglednica 2).

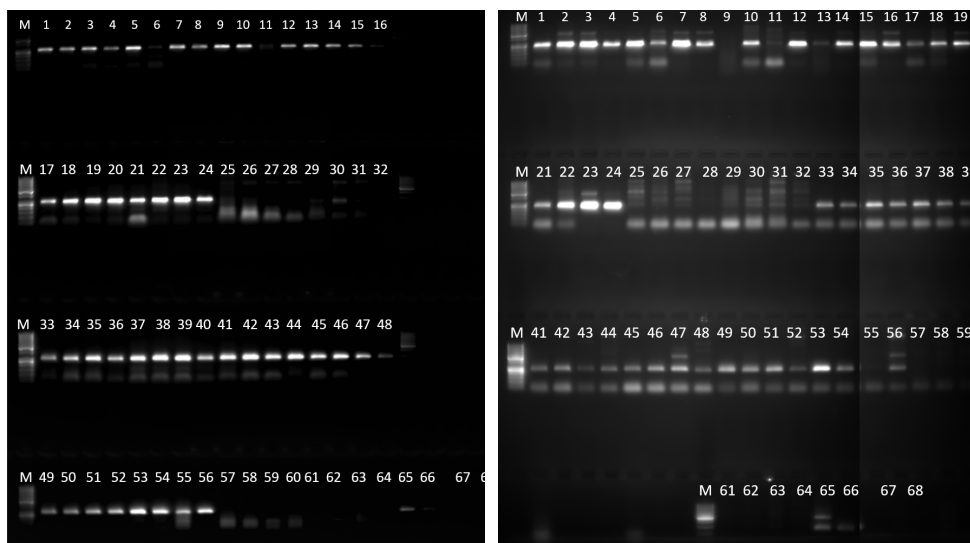
Preglednica 2: Primerjava rezultatov viroidov CBCVd in HLVd z metodo duRT-qPCR za vzorce različnih sort hmelja izolirane s hitro izolacijo po PI in PII. Podane so Cq-vrednosti za CBCVd, HLVd, mRNA1192 in mRNA170 pri različnih razredčitvah vzorcev.

Vzorec*	Razredčitev	PROTOKOL I (PI)				PROTOKOL II (PII)			
		Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170	Cq CBCVd	Cq HLVd	Cq mRNA1192	Cq mRNA170
CBCVd + HLVd AU	10x	21,44	22,89	27,20	-	20,81	21,45	21,71	-
	20x	21,86	23,14	27,50	-	23,08	20,33	24,43	21,80
	50x	22,71	23,84	28,51	-	24,10	24,23	26,20	-
	100x	23,23	24,00	29,14	-	24,17	24,52	25,97	-
	10 ⁻³	26,48	26,57	32,08	-	-	27,95	26,93	-
	10 ⁻⁴	-	30,20	-	-	-	33,97	-	-
CBCVd + HLVd AU	10x	21,55	22,79	27,05	-	21,57	19,39	22,71	-
	20x	21,95	23,08	27,17	-	22,33	20,47	23,66	21,72
	50x	22,57	23,70	28,08	-	24,63	23,73	26,45	-
	100x	23,26	24,13	28,81	-	24,29	23,52	26,56	-
	10x	20,85	23,01	27,24	18,81	21,12	20,52	21,67	21,18
CBCVd + HLVd AU (po 24 h)	100x	22,59	24,08	29,55	24,18	23,52	22,20	25,97	23,64
	10x	22,14	24,91	27,58	-	-	-	-	-
	20x	22,68	24,83	27,19	-	23,74	21,74	24,87	-
	50x	24,41	25,25	28,31	-	23,19	-	25,01	-
	100x	23,72	26,21	28,40	-	24,14	21,26	26,36	-
CBCVd + HLVd CEL	10x	22,25	24,90	27,48	-	-	-	-	-
	20x	22,11	25,33	26,95	-	23,91	24,60	25,49	-
	50x	23,63	26,32	28,11	-	23,97	21,11	25,87	-
	100x	23,77	26,70	28,48	-	24,44	24,81	27,01	-
	10x	21,37	23,14	27,55	-	18,91	20,65	-	-
CBCVd + HLVd BO	20x	22,52	23,35	27,89	-	21,48	19,09	24,67	-
	50x	23,32	24,16	28,53	-	22,75	20,00	26,66	-
	100x	23,26	24,34	28,91	-	21,38	21,69	24,97	-
	10x	21,34	22,46	26,66	-	19,43	20,36	23,33	-
	20x	22,60	22,74	27,46	-	22,54	22,31	25,44	-
CBCVd + HLVd BO	50x	23,62	24,06	28,11	-	23,90	23,61	27,15	-
	100x	23,21	24,15	28,72	-	23,24	22,42	26,85	-
	10x	-	-	25,77	-	-	-	22,74	-
	20x	-	-	26,31	-	-	-	24,81	17,39
BVV	50x	-	-	27,14	-	-	-	25,15	19,44
	100x	-	-	27,74	-	-	-	25,65	21,73
	10x	-	-	25,38	-	-	-	-	-
	20x	-	-	25,86	-	-	-	23,22	17,15
BVV	50x	-	-	27,04	-	-	-	23,30	18,79
	100x	-	-	27,44	-	-	-	25,15	22,15

* CBCVd + HLVd, vzorec hmelja okužen s CBCVd in HLVd; AU, Aurora; CEL, Celeia; BO, Bobek; BVV, vzorec hmelja negativen na CBCVd in HLVd; Cq-vrednosti so podane kot povprečje dveh tehničnih ponovitev duRT-qPCR reakcije; 10x/20x/50x/100x, 10-/20-/50- in 100-kratna razredčitev vzorca; -, v vzorcu viroid ni prisoten.

Pri analizi občutljivosti smo viroid CBCVd z metodo PI zaznali do 10⁻³, z metodo PII pa do 10⁻² (100x), viroid HLVd pa smo z obema metodama zaznali do 10⁻⁴ (preglednica 2). Občutljivost oziroma meja detekcije (LOD) pri duRT-qPCR reakciji z

uporabo standardnih metod izolacije je za CBCVd do 10^{-5} (LOQ= 10^{-4}). Glede na naše rezultate lahko sklepamo, da se v primeru uporabe hitrih metod izolacije občutljivost zmanjša 100-krat. Rezultat je pričakovan, kajti metoda hitre izolacije iz vzorcev ne omogoča specifične izolacije RNA in odstranitve inhibitorjev RT-qPCR reakcije, kot so nečistoče, proteini, polisaharidi in soli, kar posledično negativno vpliva na potek reakcije.



Slika 2: Agarozni gel RT-PCR analize vzorcev izoliranih po PI (vzorci od 33 do 64) in PII (vzorci od 1 do 32). Levo: Rezultati za RT-PCR za CBCVd viroid. Desno: Rezultati za RT-PCR za HLVD viroid. Rezultati so podani za 8 vzorcev, vsak vzorec pri 10x, 20x, 50x in 100x razredčitvi. Zadnja dva vzorca sta negativna na CBCVd in HLVD (št. od 25 do 32 in od 57 do 64). Vzorci št. 65 do 68 predstavljajo kontrole RT-PCR reakcije. M: velikostni standard 50 bp/ 100 bp.

Vpliv hrambe smo določili z različnimi časi hranjenja vzorcev pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rastlinski sok) oziroma $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (razredčeni vzorci). V primeru hrambe rastlinskega soka 24 h pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo v vzorcih pri 10- in 100-kratni razredčitvi uspešno potrdili prisotnost viroidov in namnožitev interne kontrole. Dobili smo primerljive Cq-vrednosti, tako da lahko sklepamo, da kratkotrajna hramba nima negativnega vpliva na rezultate. Prav tako smo pozitivne rezultate z duRT-qPCR dobili po hrambi že razredčenih vzorcev po 48 h (za HLVD in analizo občutljivosti). V primeru negativnih vzorcev smo z duRT-qPCR pri vseh vzorcih dobili ustrezne rezultate. Na ta način lahko sklepamo, da metodi PI in PII omogočata zanesljivo detekcijo. Zaradi sočasne izolacije nukleaz (DNaz), smo namreč pričakovali lažno pozitivne vzorce, ker bi nukleaze lahko razgradile sondo, ki bi posledično lahko fluorescirala. Glede na rezultate duRT-qPCR se je kot bolj zanesljiva metoda izkazala PI, ker smo dobili več pozitivnih Cq-vrednosti. Rezultat je pričakovan, ker metoda PI glede na PII vsebuje korak centrifugiranja, v katerem smo odstranili večje nečistoče. Ne glede na to smo z metodo PII, ki je bila precej enostavnejša in posledično primerna za uporabo na

terenu, prav tako dobili ustrezne rezultate. Zaradi prisotnosti inhibicije pri 10-kratni razredčitvi bi bilo smiselno v primeru metode PII za zanesljivo določanje uporabiti vsaj dve različni razredčitvi in se na ta način izogniti vplivu inhibicije.

Pri analizi viroidov CBCVd in HLVd z RT-PCR smo z metodo PI viroid CBCVd uspešno določili v vseh vzorcih pri vseh razredčitvah, viroid HLVd pa pri v dveh primerih neuspešno pri 50- in 100-kratni razredčitvi (slika 2, preglednica 3). V primeru uporabe metode PII smo pri CBCVd in HLVd viroid uspešno določili pri 21 od 24 vzorcev in bili neuspešni pri različnih razredčitvah (slika 2, preglednica 3).

Preglednica 3: Primerjava rezultatov za viroid CBCVd in HLVd z metodo RT-PCR za vzorce različnih sort hmelja izolirane s hitro izolacijo po PI in PII. Rezultati so prikazani za vse vzorce glede na 10-, 20-, 50- in 100-kratno razredčitev.

Protokol/Razredčitev*	Število pozitivnih vzorcev/Število vseh testiranih vzorcev	
	CBCVd	HLVd
PI		
10x	6/6	6/6
20x	6/6	6/6
50x	6/6	5/6
100x	6/6	5/6
Skupaj	24/24	22/24
PII		
10x	6/6	4/6
20x	5/6	6/6
50x	5/6	5/6
100x	5/6	6/6
Skupaj	21/24	21/24

*PI, vzorci izolirani po protokolu I; PII, vzorci izolirani po protokolu II; 10x/20x/50x/100x, 10-/20-/50- in 100-kratna razredčitev vzorca.

V primeru RT-PCR se je tako metoda PI izkazala kot zelo primerna za uporabo, predvsem z 10- in 20-kratno razredčitvijo, pri kateri smo uspešno določili vse vzorce za CBCVd in HLVd. Z metodo PI smo glede na PII dobili z RT-PCR boljše rezultate najverjetneje zaradi dodatnega koraka centrifugiranja. Rezultati so sovpadali z duRT-qPCR. S centrifugiranjem smo namreč odstranili večje dele tkiva in za analizo uporabili samo supernatant ter na ta način odstranili del inhibitorjev RT-PCR reakcije. V primeru metode PII je pri testiranju viroidov tudi z RT-PCR, zaradi prisotnosti inhibitorjev, zato smiselna uporaba vsaj dveh različnih razredčitev. Pri analizi negativnih vzorcev (slika 2) smo v vseh primerih dobili ustrezne rezultate.

Vpliv hrambe smo prav tako testirali z metodo RT-PCR, pri kateri smo viroid CBCVd določili po 24 h, viroid HLVd pa po 18 dneh in v obeh primerih dobili pozitivne signale (slika 2). Iz rezultatov lahko sklepamo, da so viroidi v rastlinskem soku oziroma

razredčenih vzorcih stabilni in lahko za krajše časovno obdobje (1 mesec) ostanejo shranjeni pri -20 °C, za daljše časovno obdobje pa pri -70 °C.

Z raziskavo smo tako potrdili, da se viroid CBCVd in HLVd lahko določi tudi brez dolgotrajnega postopka izolacije NA. Viroida smo potrdili pri treh različnih sortah in štirih različnih razredčitvah z uporabo dveh metod detekcije. Kot pričakovano smo potrdili prisotnost inhibicije, vendar v zelo omejenem obsegu, ki se ga lahko odpravi s pomočjo večjega števila razredčitev. Obe metodi hitre izolacije PI in PII sta se izkazali kot primerni za določanje viroidov CBCVd in HLVd in kažeta potencial pri nadaljnjem razvoju metod za detekcijo na terenu. Za izvajanje rutinskih pregledov na terenu bo potrebnih še nekaj izboljšav, da bo postopek omogočal čim krajšo in zanesljivo analizo. Zaradi lažno negativnih rezultatov, ki smo jih dobili pri nekaterih razredčitvah, bomo pri nadaljnjem delu poskusili metodi še dodatno optimizirati in testirati tudi druge protokole in pufre, ki so komercialno dostopni.

4 ZAKLJUČEK

Metode na osnovi določanje nukleinskih kislin še vedno predstavljajo temelj diagnostike viroidov v rastlinski patologiji. Z razvojem novih metod je določanje rastlinskih patogenov, kot so virusi in viroidi, postalo precej enostavnejše in mogoče na terenu ob samem vzorčenju rastlin. Razvoj je zato usmerjen v optimizacijo hitrih metod priprave rastlinskih ekstraktov namesto zahtevne in obsežne izolacije nukleinskih kislin. Možnost določanja patogenov na terenu iz rastlinskih ekstraktov in brez uporabe sofisticirane opreme bo z izboljšavami in optimizacijo postopkov kmalu del našega vsakdana.

Z vpeljavo dveh novih metod hitre izolacije oziroma priprave rastlinskih ekstraktov smo potrdili, da prisotnost viroidov v rastlinah lahko določamo brez izolacije nukleinskih kislin. Metodi glede na rezultate kažeta potencial za uporabo pri razvoju CRISPR/Cas-RT-RPA sistema, ki ga želimo razviti za določanje viroida CBCVd na terenu. Potrebni bo še nekaj dodatnih izboljšav in testiranje drugih komercialno dostopnih reagentov, da bomo dobili optimalno kombinacijo priprave vzorca za detekcijo na terenu in posledično zanesljive rezultate. Določanje viroidov brez izolacije nukleinskih kislin bo tako lahko postala realnost in ne samo sanje rastlinskih diagnostikov.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077).

5 LITERATURA

Bernad L., Duran-Vila N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 20: 105-113

- Emaus, M. N., Varona, M., Eitzmann, D.R., Hsieh, S., and Anderson, J.L. Version of Record: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993620302144>. 2020.
- Guček T., Jakše J., Matoušek J., Radišek S. 2019. One-Step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viroids from hop (*Humulus lupulus* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 154: 273-286
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. 2020. Primerjava metod za izolacijo RNA z namenom določanja viroidov v hmelju z RT-PCR in RT-qPCR. *Hmeljarski bilten*, 27: 5-21.
- Guček, T. 2020. Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju : doktorska disertacija = Biology of citrus bark cracking viroid (CBCVd) and development of methods for detection of viroids in hop : doctoral dissertation. Ljubljana: [T. Guček], XIV, 139 str., [33] str. pril., ilustr. <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpis/gradiva.php?id=121584>.
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. 2023. Optimization and validation of singleplex and multiplex RT-qPCR for detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd), hop latent viroid (HLVd), and hop stunt viroid (HSVd) in hops (*Humulus lupulus* L.). *Plant Disease*, 10.1094/PDIS-11-22-2606-RE
- Ivanov, Aleksandr V., Irina V. Shmyglya, Anatoly V. Zherdev, Boris B. Dzantiev, and Irina V. Safenkova. 2020. "The Challenge for Rapid Detection of High-Structured Circular Rna: Assay of Potato Spindle Tuber Viroid Based on Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Tests." *Plants* 9 (10): 1–11. <https://doi.org/10.3390/plants9101369>.
- Jakše, J., Radišek, S., Pokorn, T., Matoušek, J., Javornik, B. 2015. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64: 831-842
- Hataya T., Katsuyuki H., Suda N., Nagata T., Shifang L., Itoga Y., Tanikoshi T., Shikata E. 1992. Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 58: 677-684
- Kump, B., Javornik, B. 2016. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114: 149-158
- Marqués, M. C., Sánchez-Vicente, J., Ruiz, R., Montagud-Martínez, R., Márquez-Costa, R., Gómez, G., Carbonell, A., Daròs, J. A., and Guillermo, R. 2022. "Diagnostics of Infections Produced by the Plant Viruses TMV, TEV, and PVX with CRISPR-Cas12 and CRISPR-Cas13." *ACS Synthetic Biology*, 11 (7): 2384–93.
- Pokorn T. 2017. Identifikacija potencialnih tarč viroidnih malih RNA (vd-sRNA) v hmelju (*Humulus lupulus* L.), doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 159 str.
- Tan, S.C., Yiap, B.C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present, *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2009/574398.
- Zou, Y., Mason, M. G., Wang, Y., Wee, E., Turni, C., Blackall, P.J., Trau, M., and Botella, J.R. 2017. "Nucleic Acid Purification from Plants, Animals and Microbes in under 30 Seconds." *PLoS Biology* 15 (11): 1–22.