

OCENA STABILNOSTI IN DEKONTAMINACIJE HMELJEVIH VIROIDOV V LABORATORIJSKIH POGOJIH

Helena VOLK¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 23. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 21. 11. 2023

Izvleček

Viroidi so najpreprostejši rastlinski patogeni. Te majhne, nekodirajoče, enovijačne RNA molekule tvorijo značilne sekundarne strukture, kar jim omogoča stabilnost na okoljske razmere in preživetje izven gostitelja. To lahko povzroča težave v diagnostičnih in raziskovalnih laboratorijih, saj kontaminirajo opremo in zmanjšujejo diagnostično natančnost. V predstavljeni raziskavi smo preučevali stabilnost treh viroidov hmelja CBCVd, HLVd in HSVd v različnih pogojih, ki se uporabljajo v laboratorijih: UV obsevanje, avtoklaviranje, pomivanje z detergentom in kemijska dekontaminacija z Na-hipokloritom. V raziskavo smo vključili tudi plazmide z DNA vključki, ki kodirajo te viroide. Ugotovili smo, da se je kot najučinkovitejša metoda izkazalo tretiranje z Na-hipokloritom, kljub temu pa, za uspešno izogibanje težavam s kontaminacijo laboratorija z (viroidnimi) nukleinskimi kislinami, priporočamo uporabo kombinacije preučevanih metod in dosledno ločevanje opreme, ki je uporabljena za pripravo vzorcev in opreme, ki je uporabljena za detekcijo viroidov.

Ključne besede: viroid, CBCVd, HLVd, HSVd, PCR, kontaminacija

ASSESSING THE STABILITY AND DECONTAMINATION OF HOP VIROIDS IN LABORATORY CONDITIONS

Abstract

Viroids are the simplest plant pathogens. These small, non-coding, single-stranded RNA molecules form distinctive secondary structures, granting them stability in environmental conditions and survival outside their host. This can pose challenges in diagnostic and research laboratories, as they contaminate equipment and reduce diagnostic accuracy. In the presented study, the stability of three hop viroids CBCVd, HLVd, and HSVd was examined under various conditions used in laboratories: UV irradiation, autoclaving, washing with detergent, and chemical decontamination with Na-hypochlorite. We also included plasmids with DNA constructs that encode these viroids. We found that the most effective method was treatment with Na-hypochlorite. However, to successfully avoid laboratory contamination with (viroidal) nucleic acids, we recommend using a combination of the studied methods

¹ Dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, e-naslov: helena.volk@bf.uni-lj.si

and consistently separating equipment used for sample preparation from that used for viroid detection.

Keywords: viroid, CBCVd, HLVd, HSVd, PCR, contamination

1 UVOD

Odkar so viroide leta 1971 prvič identificirali, jih prepoznavamo kot najpreprostejše rastlinske patogene (Hadidi in sod., 2017). Viroidi so majhne, enovijačne RNA molekule, ki, z razliko od virusov, ne kodirajo peptidov ali proteinov (Flores in sod., 2005). A kljub temu, so viroidi sposobni podvajanja znotraj gostiteljske rastline in zmorejo zaobiti njene obrambne mehanizme (Darós, 2016).

Na hmelju so do sedaj identificirali štiri viroide: hmeljev latentni viroid (HLVd), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd), viroid grbavosti jabolk (AFCVd) in viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd), vsi pa so uvrščeni v družino Pospiviroidae. HLVd so prvič potrdili leta 1988 (Puchta in sod., 1988). Njegovo hitro širjenje omogoča vegetativno razmnoževanje hmelja, okužene rastline pa pogosto ne kažejo simptomov. Posledično je postal globalno najpogostejši viroid na hmeljiščih (Hadidi in sod., 2003). HSVd so prvič opazili v 1940-ih letih na Japonskem (Shikata, 1987). Za razliko od HLVd, HSVd ni globalno razširjen, zaenkrat je bil potrjen le v ZDA (Eastwell in Nelson, 2007), na Kitajskem (Guo in sod., 2008), v Južni Koreji (Cho in sod., 2011), v Sloveniji (Radišek in sod., 2012) in v Nemčiji (Seigner in sod., 2014). Okužba s HSVd vodi do manjših storžkov hmelja, zmanjšanih pridelkov in manj rastlinskih metabolitov. Različne sorte kažejo različne občutljivosti na HSVd, izražanje simptomov pa je lahko odvisno od vremenskih razmer (Mahaffee in sod., 2009). CBCVd lahko okuži tako agrume kot hmelj (Jakše in sod., 2015) in pistacijo (Al Rwahnih in sod., 2018). V Sloveniji, kjer njegovo hitro širjenje predstavlja grožnjo za hmelj, je bilo v letih 2018 in 2019 izkoreninjenih 135 hektarjev slovenskih hmeljišč. Kljub strogim ukrepom eradikacije, so v letu 2020 na nekaterih rastlinah hmelja (povprečno pri 0,09 %) CBCVd zaznali še v hmeljiščih pri 25 kmetijah (Update ..., 2021).

Viroidi se prenašajo mehansko, prek okuženih vegetativnih poganjkov, semen, peloda, orodja in stika med rastlinami ter posredno prek žuželk (Verhoeven in sod., 2010; Matsushita in Tsuda, 2014). V praksi se za zatiranje viroidov uporabljajo fitosanitarni ukrepi, kot so: uporaba certificiranega sadilnega materiala, identifikacija, temeljita dezinfekcija orodja in odstranjevanje okuženih rastlin (Agrios in sod., 1997). Slednje je pri okužbah s CBCVd problematično, saj se bolezenska znamenja izrazijo šele eno leto po okužbi in tako prvo leto predstavljajo vir mehanskega prenosa (Radišek in sod., 2020).

Značilna sekundarna struktura viroidov, majhna velikost in pomanjkanje proteinskega ovoja prispevajo k stabilnosti in odpornosti na okoljske razmere in tako se lahko izven gostitelja ohranijo različna daljša časovna obdobja. Stabilnost viroidov so preučevali na primeru viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev

(PSTVd) in pokazali, da ohrani svojo infektivnost tudi po 24 urah od nanosa na različne površine, kot so bombaž, les, guma, usnje, kovina, plastika. Zanimivo je, da je, z razliko od dolge infektivnosti na površinah, PSTVd na človeški koži ostal infektiven zgolj 30 min (Mackie in sod., 2015) do 2 uri (Verhoeven in sod., 2010). To je najverjetneje posledica prisotnosti encimov RNaz na človeški koži, ki razgradijo RNA molekule, tudi viroide. Ravno prisotnost RNaz na človeški koži lahko razloži zakaj so Timmermann in sod. (2001) ugotovili večji prenos PSTVd v primeru, da so delavci nosili rokavice za enkratno uporabo, na katerih PSTVd ohrani svojo infektivnost tudi do 24 ur (Mackie in sod., 2015). Do podobnih ugotovitev o infektivnosti so prišli tudi pri virusih. Na primeru virusa rumenega mozaika buče (ZYMV) so pokazali, da na različnih površinah ohrani infektivnost tudi po več ur, medtem kot je na človeški koži ostal infektiven zgolj 5 min (Coutts in sod., 2013). Virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ToBRFV) pa je na površinah ostal tudi do 6 mesecev, na človeški koži pa do 2 uri (Skelton in sod., 2023).

Mackie in sod. (2015) so poleg stabilnosti in ohranjanja infektivnosti viroida PSTVd na različnih površinah, preučevali tudi učinkovitost petih dezinfekcijskih sredstev za inaktivacijo viroida. V poskusih se nobena rastlina ni okužila, ko so kužnemu soku pred inokulacijo dodali posneto mleko v prahu ali gospodinjsko belilo (Na-hipoklorit), podobno pa so za virus ZYMV pokazali tudi Coutts in sod. (2013). Z drugimi štirimi dezinfekcijskimi sredstvi (etanol, Farmcleanse (aktivne snovi: 5 do 10 % soli alkalijevih kovin alkilbenzensulfonske kisline) in Virkon (aktivne snovi: Naperoksimonosulfat in Na-klorid) 1 % in 0,5 %) se je več kot polovica inokuliranih rastlin s PSTVd še vedno okužila. V kontrolnih obravnavah pa so dosegli nad 90 % okuženost rastlin: pri obdelavi z destilirano vodo se je v vsakem poskusu okužilo 9 do 10 od 10 rastlin, pri uporabi infektivnega soka brez razkužila pa je bilo okuženih vseh 10 rastlin (Mackie in sod., 2015). Ustreznost Na-hipoklorita in posnetega mleka so potrdili tudi Li in sod. (2015), ki so preučevali vpliv razkužil na PSTVd, virus mozaika pepina in paradižnikov mozaik virus. Kot uspešnega v inaktivaciji naštetih viroidov in virusov so poleg Na-hipoklorita pokazali še Virkon S, vendar moramo omeniti, da so uporabili višjo, 2 %, koncentracijo in ne 1 ali 0,5 %, kot Mackie in sod. (2015). Copes in Ojiambo (2021) sta opravila metaanalizo v kateri sta pregledala 86 raziskav vpliva Na-hipoklorita na ne-glivne rastlinske patogene. Zaključila sta, da so trenutne priporočene doze in čas učinkovanja Na-hipoklorita ustrezni, vendar je učinkovitost odvisna tudi od tarčnega organizma. Kljub tako obetavnim rezultatom kemične dezinfekcije, učinkovito obvladovanje viroidov zahteva integriran pristop: karanteno in certificiranje semen, uporabo dobre higienske prakse, vključno z uporabo učinkovitih razkužil, iskanje in odstranjevanje obolelih rastlin, dekontaminacijo rastlinjakov in kolobarjenje z negostiteljskimi rastlinami (Ling, 2017). Strogih higienskih ukrepov (razkuževanje opreme, uporaba rokavic, ločeno obutev in oblačila) in izolacije rastlin so se držali tudi na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, ko so bili zaradi okužb s CBCVD primorani v krčitev poskusnih nasadov in vzpostavitev projekta ohranjanja genskih virov za nadaljnje raziskave in razvoj hmeljarstva (Čerenak in Radišek, 2020). Taki higienski ukrepi so potrebni tudi pri eradikaciji CBCVD okuženih rastlin v hmeljiščih na kmetijah (Citrus bark ..., 2021).

Zaradi svoje sposobnosti, da ohranjajo stabilnost na različnih površinah in odpornosti na dezinfekcijska sredstva, povzročajo viroidi težave tudi v diagnostičnih in raziskovalnih laboratorijih. Stabilnost viroidov na laboratorijskih površinah bistveno zmanjšuje diagnostično natančnost, saj lahko kontaminirajo laboratorijsko opremo in površine. To problematiko so naslovili Mackie in sod. (2015), ki so preverili, ali različna razkužila vplivajo na PCR detekcijo PSTVd. V dveh poskusih je samo obdelava s posnetim mlekom v prahu razgradila in odstranila PSTVd v tolikšni meri, da PCR detekcija ni bila mogoča. Kot je razvidno iz preglednice 1 so s PCR uspešno določili viroid PSTVd pri vseh ostalih desinfekcijskih tretmajih. Zanimivo je, da sta med neučinkovitimi tudi etanol in Na-hipoklorit, ki se redno uporabljata v laboratorijih za sterilizacijo orodij in površin (Mackie in sod., 2015), kot so pulti in pipete.

Preglednica 1: Detekcija PSTVd RNA v vzorcih okuženega rastlinskega soka tretiranih z različnimi dezinfekcijskimi sredstvi (Prirejeno po: Mackie in sod. (2015)). Legenda: "+" detekcija s PCR je bila uspešna; "-" detekcija s PCR ni bila uspešna.

Tretiranje	Uspešnost detekcije PSTVd
Kontrola: Rastlinski sok zdravih rastlin	-
Kontrola: Rastlinski sok PSTVd okuženih rastlin	+
PSTVd in etanol (70 %)	+
PSTVd in posneto mleko v prahu (20%)	-
PSTVd in belilo (Na-hipoklorit), redčena 1:4	+
PSTVd in Farmcleanse, redčen 1:4	+
PSTVd in Virkon S (1 %)	+
PSTVd in Virkon S (0,5 %)	+

Različni raziskovalci do sedaj so preučevali tudi vpliv temperature na obstojnost virusov. Skelton in sod. (2023) za ToBRFV ugotovili, da je bilo 5 minutno namakanje plastičnih pladnjev v vodi pri 90 °C učinkovito, vendar 5 minut pri 70 °C ni bilo. S segrevanjem okuženega soka so pokazali, da je točka toplotne inaktivacije 90 °C, kar potrjuje, da je do deaktivacije prišlo zaradi toplotne obdelave in ne zaradi pralnega učinka vode. Choi in sod. (2014) pa so preučevali vpliv avtoklaviranja na zmožnost PCR detekcije različnih virusov. Pokazali so, da je bila mokra sterilizacija učinkovitejša od suhe sterilizacije. Poleg tega je na učinkovitost najbolj vplivalo ali so preučevali RNA virus ali DNA virus, saj je bil pri slednjih potreben daljši čas sterilizacije. Obstojnost DNA ob avtoklaviranju so preučevali že leta 1992, Dwyer in Saksena sta poročala, da 15 minut avtoklaviranja (121 °C, 15 p.s.i.) ni preprečilo PCR pomnoževanja 1 ng produkta velikosti 115 bp. Podobno so pokazali, da je šele 2 uri avtoklaviranja odstranilo nanogramske količine DNA (Gefrides in sod. 2009). Skladno z ugotovitvami Choi in sod. (2014) so tudi v tej raziskavi pokazali, da je bilo avtoklaviranje najučinkovitejše, ko površine niso bile zaščitene pred izpostavljenostjo pari.

V raziskovalnih in diagnostičnih laboratorijih je pogosta praksa, da se za zagotavljanje sterilnosti in preprečevanje kontaminacije ne uporabljajo samo kemične dezinfekcijske metode, kot sta natrijev hipoklorit (Na-hipoklorit) in 70 % etanol, temveč se v laboratorijsko delo redno vključuje tudi obsevanje z ultravijolično (UV) svetlobo. Zlasti pri pripravi verižne reakcije s polimerazo (PCR), se uporabljajo specifične komore, ki so zasnovane tako, da preprečujejo DNA kontaminacijo. Te komore so opremljene z UV lučmi, ki jih je mogoče aktivirati pred in/ali po postopku priprave vzorca za PCR, s čimer se zagotavlja, da so delovne površine in reagenti brez neželenih nukleinskih kislin, ki bi lahko vplivale na končne rezultate. Ali je obsevanje z UV svetlobo uspešno za preprečevanje kontaminacije PCR vzorca so preverjali že v začetku 90 let, ko se je metoda PCR šele uveljavljala v diagnostičnih laboratorijih. Pokazali, da je z izpostavitvijo UV svetlobi možno preprečiti nastajanje lažno pozitivnih vzorcev v diagnostiki virusov (Fox in sod., 1991, Ou in sod., 1991), medtem ko so drugi raziskovalci, ki so preučevali obstojnost DNA na UV obsevanje, prišli do nasprotnih rezultatov (Dwyer in Saksena, 1992). Gefrides in sod. (2009) pa so kasneje poročali, da je za učinkovito dekontaminacijo nekaj nanogramov DNA potrebno vsaj 2-urno obsevanje z UV svetlobo ($>7250 \text{ mJ/cm}^2$). V zaključku strokovne objave so poudarili, da je bilo avtoklaviranje učinkovitejše kot UV obsevanje pri odstranjevanju majhnih fragmentov kontaminirane DNA ($<200 \text{ bp}$) in bi ga bilo treba izbrati pred UV obsevanjem, kadar je to mogoče. To daleč najbolj uveljavljeno prakso dekontaminacije površin in opreme z nukleinskimi kislinami so leta 2018 validirali tudi Linquist in sod. in presenetljivo ugotovili, da večkratno daljše izpostavljanje pipet UV svetlobi sproži izločanje PCR inhibitornih molekul ter posledično lahko povzroči lažno negativne rezultate PCR.

V tej raziskavi smo preverili obstojnost treh viroidov hmelja (HLVd, HSVd in CBCVd) v različnih pogojih, ki jih v našem raziskovalnem laboratoriju uporabljamo med rutinskim delom: obsevanje z UV lučjo, avtoklaviranje, pomivanje z detergentom in kemijska dekontaminacija z Na-hipokloritom. Poleg RNA, izolirane iz z viroidi okuženih rastlin, smo v raziskavo vključili tudi tri plazmide z DNA vključki, ki kodirajo zapis za preučevane viroide.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Priprava vzorcev

Uporabili smo vzorce RNA CBCVd, HLVd in HSVd pozitivnih hmeljev Celeia ter plazmide pBluescript II, z ustreznimi viroidnimi vključki. RNA so izolirali na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije s CTAB metodo (Kump in Javornik, 1996, plazmide pa smo s komercialnim kompletom High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) po proizvajalčevem protokolu izolirali iz prekonočnih kultur *E. coli* DH5 α , ki so vsebovale plazmid pBluescript II s posameznim viroidnim vključkom. Koncentracijo RNA in plazmidov smo določili spektrofotometrično z napravo NanoVue (VWR). Vzorce plazmidov smo redčili tako, da smo z redčitvijo dosegli enako število molekul viroida, kot je ocenjena vsebnost viroida v vzorcih RNA

izolirane iz okuženih rastlin (0,1 %, Sečnik, 2022). Vzorce RNA in plazmidov smo v volumnu 4 µl nanesti na notranjo stran pokrovčka 15 ml centrifugirke in po končanem tretiranju z različnimi pogoji (preglednica 2) smo notranjost pokrovčka natančno s pomočjo pipetiranja sprali z 20 µl vode, ki ne vsebuje DNaz ali RNaz (IDT). Za vsako poskusno enoto smo izvedli dve ponovitvi, skupno smo torej pripravili 60 vzorcev.

Preglednica 2: Različni pogoji tretiranja RNA in plazmidov z viroidi hmelja (HLVd, HSVd in CBCVd) pri katerih smo preverili njihovo obstojnost

Tretiranje	Opis
Kontrola	Vzorec 30 min inkubiramo na sobni temperaturi.
UV	Vzorec 30 min inkubiramo pod UV svetlobo v PCR komori (LFVP122, Iskra Pio).
Avtoklav	Vzorec avtoklaviramo na programu za suho sterilizacijo (121 °C, 20 min) v avtoklavu (3870ELVC, Tutthauer).
Pomivanje	Vzorec ročno pomijemo z 0,5 ml detergenta (Chemotex) in speremo z destilirano vodo.
Na-hipoklorit	Vzorec pošpricamo z 0,1 ml Na-hipoklorita (Belilo Arekina, Šampionka, redčeno 1:4 z destilirano vodo) in po 10 min speremo z destilirano vodo.

2.2 Reverzna transkripcija

Za vzorce viroidne RNA smo izvedli reverzno transkripcijo s komercialnim kompletom High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in tako pridobili cDNA, ki smo jo nato uporabili za PCR detekcijo. Navodila proizvajalca smo deloma prilagodili, tako da smo uporabili polovični volumen reakcije (10 µl) in na račun višjega volumna RNA (6,6 µl) iz priprave reakcijske mešanice izključili vodo. Pripravili smo tudi kontrolni reakciji: v pozitivno kontrolo smo dodali 6,6 µl RNA posameznega viroida, v negativno kontrolo pa 6,6 µl vode. Reverzna transkripcija je potekala v napravi PCR (SimpliAmp Thermocycler, Applied Biosystems) pri pogojih: 25 °C, 10 min; 37 °C, 120 min; 85 °C, 5 min; 4 °C, ∞. Za vzorce plazmidov reverzna transkripcija ni smiselna, zato smo jih pripravili tako, da smo dosegli enako redčitev, kot je bila redčitev RNA vzorcev: 6,6 µl vzorca eluiranega s pokrovčkov smo zmešali z 3,4 µl destilirane vode.

2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Viroidne sekvence v vzorcih cDNA pripravljenih iz RNA in v vzorcih redčenih plazmidov smo določali s PCR. Za detekcijo smo pripravili reakcijsko mešanico volumna 20 µl, ki so jo sestavljali: 2 µl matrične DNA (cDNA ali plazmid), 10x PCR pufer (Kappa Fidelity Buffer, Roche), 1,6 µl 10 mM mešanice dNTP-jev (Promega), po 0,5 µl 10 µM ustreznega para začetnih oligonukleotidov (Preglednica 3) in 0,1 µl Taq polimeraze (lastna proizvodnja). Časovno temperaturni program pomnoževanja v napravi PCR (SimpliAmp Thermocycler, Applied Biosystems) je bil: 94 °C, 5 min; 35 ciklov (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s); 72 °C, 7 min; 4 °C, ∞. Produktom PCR smo dodali 5 µl nanašalnega bavlja (22,5% (w/v) ficoll tip 400; 0,2% (w/v) brom fenol modro; 0,67x TBE) in pomnožke ločili na 1,2 % agaroznem gelu v elektroforezni kadički (Biorad). Po 1 h ločbe pri 120 V smo agarozni gel osvetlili s transiluminatorjem (High Performance UV Transiluminator, UVP) in rezultate fotografirali.

Preglednica 3: Pari začetnih oligonukleotidov uporabljeni za PCR detekcijo viroidnih sekvenc CBCVd, HLVd in HSVd

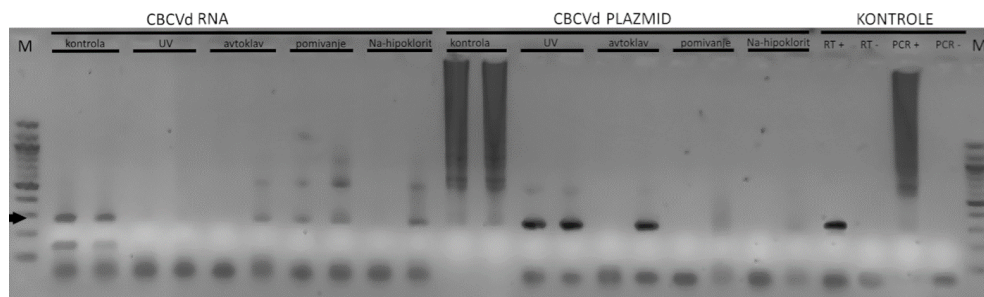
Detekcija	Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5'-3'	Vir
CBCVd	CVd-IV-F1_1	GGGGAAATCTCTTCAGACTC	Guček in sod., 2019
	CVd-IV-R1	GGGGATCCCTCTTCAGGT	
HLVd	HLVdM	TAGTTTCCAACCTCCGGCTGG	Hataya in sod., 1992
	HLVdP	GGATACAACCTCTTGAGGGCC	
HSVd	HSVd-I	GCGTCTCATCGGAAGAGCC	Matousek in sod., 2003
	HSVd-II	GACCGGTGGCATCACCTCT	

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

V tej raziskavi smo primerjali obstojnost viroidov HLVd, HSVd in CBCVd na različne tretmaje, ki jih v našem laboratoriju rutinsko uporabljamo z namenom odstranjevanja in preprečevanja morebitne kontaminacije z nukleinskimi kislinami. Ker za raziskovalno delo poleg native RNA oblike viroidov, ki so prisotni v rastlinah, pogosto uporabljamo tudi DNA molekule plazmidov z vključenimi viroidnimi sekvencami, smo tudi za te plazmide preverjali kako izbrani tretmaji vplivajo na njihovo obstojnost. Rezultati PCR pomnoževanja so prikazani na fotografijah agarozne gelske elektroforeze: na sliki 1 so prikazani rezultati za CBCVd, na sliki 2 so prikazani rezultati za HLVd, na sliki 3 pa so prikazani rezultati za HSVd.

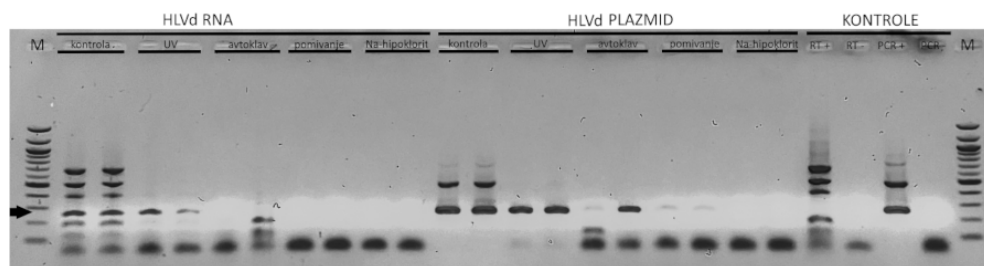
Za vzorce RNA, izolirane iz rastlin hmelja okuženega s CBCVd, se je kot uspešna metoda dekontaminacije izkazalo 30 min obsevanje z UV lučjo. Avtoklaviranje in tretiranje z Na-hipokloritom sta bila 50 % uspešna, medtem ko se je po ročnem pomivanju z detergentom viroidna RNA ohranila na pokrovcih in smo jo s PCR lahko zaznali. Iz intenzivnosti pomnožkov lahko razumemo, da so pomivanje,

avtoklaviranje in Na-hipoklorit deloma učinkovali in nekoliko znižali koncentracijo viroidne RNA. Iz rezultatov PCR pomnoževanja plazmida, ki vsebuje CBCVd zaporedje, vidimo, da so bili za odstranjevanje DNA uspešni pomivanje in Na-hipoklorit, avtoklaviranje je ponovno dalo mešano rezultate, medtem ko se je obsovetljevanje z UV lučjo izkazalo za neuspešno.

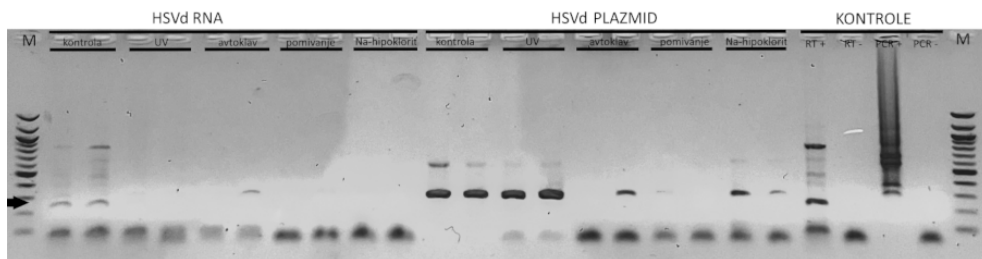


Slika 1: Rezultati agarozne gelske elektroforeze PCR detekcije viroida CBCVd tretiranega z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "M" dolžinski standard DNAmark 100bp Plus Ladder (G-biosciences); "→" pričakovana velikost PCR produkta; "RT +" pozitivna kontrola reverzne transkripcije; "RT -" negativna kontrola reverzne transkripcije; "PCR +" pozitivna kontrola PCR; "PCR -" negativna kontrola PCR.

Pri poskusu z RNA vzorci, izoliranimi iz hmelja okuženega s HLVd, smo opazili, da sta bila za odstranjevanje RNA najprimernejša pomivanje in Na-hipoklorit. Tudi tokrat se je, tako kot pri RNA CBCVd pozitivnih rastlin, avtoklaviranje izkazalo za neuspešno. Zanimivo je, da smo HLVd detektirali tudi pri vzorcih, ki smo jih obsovetlili z UV, kar ni skladno z rezultati pridobljenimi za CBCVd. V nasprotju z razlikami med RNA CBCVd in HLVd, pa so bila tretiranja enako uspešna pri obeh plazmidih. Tako sta se za plazmid, ki vsebuje sekvenčno zaporedje viroida HLVd, kot najbolj uspešni metodi izkazali Na-hipoklorit in pomivanje, pri katerem smo zaznali le blag pomnožek. Avtoklaviranje je bilo delno uspešno, UV svetloba pa ni imela večjega učinka.



Slika 2: Rezultati agarozne gelske elektroforeze PCR detekcije viroida HLVd tretiranega z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "M" dolžinski standard DNAmark 100bp Plus Ladder (G-biosciences); "→" pričakovana velikost PCR produkta; "RT +" pozitivna kontrola reverzne transkripcije; "RT -" negativna kontrola reverzne transkripcije; "PCR +" pozitivna kontrola PCR; "PCR -" negativna kontrola PCR.



Slika 3: Rezultati agarozne gelske elektroforeze PCR detekcije viroida HSVd tretiranega z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "M" dolžinski standard DNAmark 100bp Plus Ladder (G-biosciences); "→" pričakovana velikost PCR produkta; "RT +" pozitivna kontrola reverzne transkripcije; "RT -" negativna kontrola reverzne transkripcije; "PCR +" pozitivna kontrola PCR; "PCR -" negativna kontrola PCR

Tretji viroid, ki smo ga vključili v raziskavo je HSVd. RNA viroida HSVd se je v naših poskusih izkazala za najpreprostejšo za eliminacijo, saj je nismo zaznali po tretmaju z UV lučjo, ročnem pomivanju in po obdelavi z Na-hipokloritom. Deloma smo jo zaznali le pri enem avtoklavianem vzorcu. Nasprotno, pa se je plazmid, ki je vseboval sekvenčno zaporedje viroida HSVd izkazal za najbolj obstojnega, saj nismo dosegli 100 % eliminacije z nobenim od preučevanih tretmajev. Najprimernejše je bilo ročno pomivanje z detergentom kjer je prišlo do rahlega pomnoževanja pri smo enem vzorcu.

Za lažjo primerjavo smo rezultate zbrali v preglednice: rezultati za RNA, izolirano iz viroid-pozitivnih rastlin so prikazani v preglednici 4; rezultati za vse tri preučevane plazmide pa so združeni v preglednici 5.

Preglednica 4: Povzetek rezultatov PCR detekcije RNA vzorcev viroidov CBCVd, HLVd in HSVd, tretiranih z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "+" detekcija s PCR je bila uspešna; "-" detekcija s PCR ni bila uspešna.

		RNA			
		CBCVd	HLVd	HSVd	Št. pozitivnih
Kontrola	1	+	+	+	6
	2	+	+	+	
UV	3	-	+	-	2
	4	-	+	-	
Avtoklav	5	-	-	-	3
	6	+	+	+	
Pomivanje	7	+	-	-	2
	8	+	-	-	
Na-hipoklorit	9	-	-	-	1
	10	+	-	-	
Št. pozitivnih		6	5	3	14 / 30

Kot najbolj uspešna metoda za odstranjevanje viroidne RNA se je pokazalo tretiranje z Na-hipokloritom, saj smo viroid s PCR določili samo v 1 od 6 primerov. Sledita mu ročno pomivanje z detergentom (2/6 pozitivnih) in 30 min obsevanje z UV svetlobo (2/6 pozitivnih). Avtoklaviranje pa je bilo na viroidno RNA zgolj 50 % uspešno. Zanimivo je, da smo zaznali tudi razlike med obstojnostjo posameznih viroidov, HSVd se je izkazal za najmanj obstojnega, medtem ko je bil CBCVd najbolj obstojen.

Plazmidi so DNA molekule, zato smo pri njih pričakovali nekoliko večjo obstojnost od obstojnosti RNA molekul viroidov, kar se je tudi pokazalo. Podobno, kot pri RNA vzorcih, je bil tudi pri plazmidnih vzorcih najbolj učinkovit Na-hipoklorit, saj smo s PCR viroidne sekvence v plazmidih detektirali le pri 2 od 6 vzorcev. Po uspešnosti mu sledita ročno pomivanje z detergentom in ročno pomivanje (oba s 50 % uspešnostjo). Zanimivo je, da je bilo obsevanje z UV svetlobo skoraj neučinkovito saj smo s PCR lahko detektirali 5 od 6 plazmidnih vzorcev.

Preglednica 5: Povzetek rezultatov PCR detekcije plazmidnih vzorcev viroidov CBCVd, HLVd in HSVd, tretiranih z različnimi pogoji (Preglednica 2). Legenda: "+" detekcija s PCR je bila uspešna; "-" detekcija s PCR ni bila uspešna.

		PLAZMID			
		CBCVd	HLVd	HSVd	Št. pozitivnih
Kontrola	1	+	+	+	6
	2	+	+	+	
UV	3	-	+	+	5
	4	+	+	+	
Avtoklav	5	-	+	-	3
	6	-	+	+	
Pomivanje	7	-	+	+	3
	8	-	+	-	
Na-hipoklorit	9	-	-	+	2
	10	-	-	+	
Št. pozitivnih		3	8	8	19 / 30

V tej raziskavi smo na vzorcih viroidov preverili delovanje metod nukleinske dekontaminacije, ki jih redno uporabljamo v našem raziskovalnem laboratoriju. Zanimivo je, da smo kot najbolj učinkovitega določili Na-hipoklorit, ki v raziskavi Mackie in sod. (2015) ni dal zadovoljivih rezultatov. V našem poskusu smo se želeli čim bolj približati realnim metodam, ki jih uporabljamo v laboratoriju. Na-hipoklorit je koroziven, zato smo ga po 10 min spirali z destilirano vodo, medtem kot so Mackie in sod. (2015) Na-hipoklorit inaktivirali z Na-tiosulfatom. Spiranje Na-hipoklorita je lahko povzročilo tudi spiranje RNA viroida in DNA plazmida, posledično učinka dekontaminacije ne moremo nujno pripisati zgolj delovanju Na-hipoklorita na RNA in DNA. Do podobnega sinergističnega učinka spiranja s preučevano metodo

dekontaminacije je lahko prišlo tudi pri metodi ročnega pomivanja s tekočim detergentom. Ne glede na to, so rezultati za naše delo zelo informativni, saj smo preučili postopke, kot so se in se redno uporabljajo pri laboratorijskem delu. Podobno smo pri avtoklaviranju izbrali metodo suhe sterilizacije, ki je primerna za sterilizacijo pipet. Mokre sterilizacije, za katero so raziskovalci poročali, da je bolj učinkovita (Gefrides in sod., 2009; Choi in sod., 2014), nismo preskusili, saj ni primerna za našo opremo. Z namenom dekontaminacije nukleinskih kislin, vsi raziskovalci v našem laboratoriju pred pripravo PCR reakcijskih mešanic, komoro, pripomočke za delo in potrošni material, obsevamo z UV svetlobo (15 do 30 min). V tej raziskavi smo pokazali, da je obsevanje z UV svetlobo delno učinkovito (2 od 6 vzorcev sta bila na PCR pozitivna) za viroide, ki so RNA molekule. Za plazmide, ki so DNA molekule, pa je bilo 30 min obsevanje z UV skoraj neučinkovito (5 od 6 vzorcev je bilo na PCR pozitivnih). Daljših časov obsevanja, ki jih priporočajo Gefrides in sod. (2009) se nismo posluževali.

Zaskrbljujoči so rezultati različnih raziskovalcev, ki so pokazali na dolgo stabilnost viroidov (Mackie in sod., 2015; Verhoeven in sod. 2010) in virusov (Coutts in sod., 2013; Skelton in sod., 2023) na različnih površinah, tudi plastiki (npr. pipete, rokavice, centrifugirke, pult), kovini (pincete, skalpeli, delovna površina v laminariju) in bombažu (laboratorijske halje). Nobena od metod, ki jih v našem delu vključujemo v rutinsko delo, se ni izkazala za 100 % učinkovito pri dekontaminaciji laboratorijski površin in materiala na katerih so neželene nukleinske kisline. Za uspešno raziskovalno in laboratorijsko delo se še naprej poslužujemo kombinacije vseh zgoraj naštetih metod, ki jih dosledno izvajamo pred in po delu z viroidi. Ključen ter najpreprostejši ukrep za uspešno delo in izogib problemov s kontaminacijo pa je, da ločimo prostore ter opremo v katerih potekajo priprava vzorcev in izolacija nukleinskih kislin, od prostorov ter opreme v katerih poteka priprava reakcijskih mešanic za PCR. Poleg tega je nujna tudi redna menjava zaščitnih rokavic in zaščitnih halj.

4 ZAKLJUČEK

V predstavljeni raziskavi smo preverili obstojnosti treh viroidov hmelja (HLVd, HSVd in CBCVd) v različnih pogojih, ki so običajni za rutinsko delo v našem laboratoriju. Med preučevanimi metodami so bile obsevanje z UV lučjo, avtoklaviranje, pomivanje z detergentom ter kemijska dekontaminacija z Na-hipokloritom. Ne le da smo preučevali RNA, izolirano iz z viroidi okuženih rastlin, v raziskavo smo prav tako vključili tri plazmide z DNA vključki, ki kodirajo zapis za obravnavane viroide. Naše ugotovitve so pokazale, da je dekontaminacija z Na-hipokloritom najučinkovitejša metoda. Vendar pa se za maksimalno učinkovitost in preprečevanje morebitne kontaminacije laboratorija z viroidnimi nukleinskimi kislinami priporoča kombinirana uporaba vseh preučevanih metod. Pomembno je, da laboratorijsko okolje in delo organiziramo tako, da omogočimo preventivno zaščitno ravnanje pred morebitno kontaminacijo z viroidnimi nukleinskimi kislinami. Poleg v tej raziskavi preučevanih metod dekontaminacije, vključimo še dosledno ločevanje opreme (pipete,

centrifuge, brezprašne komore), uporabljene za pripravo vzorcev, od tiste, ki se uporablja za detekcijo viroidov. Priporočamo ločene prostore za vsak korak detekcije viroidov: izvajanje homogenizacije rastlinskega materiala, izolacije nukleinskih kislin, pripravo PCR mešanice, dodajanje nukleinskih kislin in za detekcijo pomnožkov z agarozno elektroforezo. Pri prehajanju med prostori je potrebno zamenjati rokavice, halje in obutev. Možnost kontaminacije zmanjšamo tudi z uporabo komercialnih kompletov, ki omogočajo reverzno transkripcijo in PCR amplifikacijo hkrati, v eni reakcijski mešanici.

5 ZAHVALA

Hvala dr. Tanji Guček (Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije), ki je za potrebe te raziskave pripravila vzorce RNA, izolirane iz z viroidi okuženih rastlin hmelja. Za sodelovanje in pomoč pri delu poskusa gre zahvala tudi Emi Rutar in Juliji Novak, obe Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, ki sta se raziskavi pridružili v okviru maturitetne projektne naloge pri predmetu Biotehnologija. Raziskava je nastala s finančno podporo ARIS projekta Z4-3214 in ARIS programa P4-0077.

6 LITERATURA

- Agrios, G. N. (1997). Plant pathology. San Diego, Elsevier.
- Al Rwahnih, M., Rowhani, A., Westrick, N., Stevens, K., Diaz-Lara, A., Trouillas, FP., Preece, J., Kallsen, C., Farrar, K., Golino, D. (2018). Discovery of Viruses and Virus-Like Pathogens in Pistachio using High-Throughput Sequencing. *Plant Disease*, 102(7), 1419-1425.
- Cho, I.S., Chung, B.N., Cho, J.D., Choi, S.K., Choi, G.S., Kim, J-S. (2011). Hop stunt viroid (HSVD) Sequence Variants from Dapple Fruits of Plum (*Prunus salicina* L.) in Korea. *Research in Plant Disease. Korean Society of Plant Pathology*. 7, 3, 358-363.
- Choi, W.S., Rodríguez, R.A., Sobsey, M.D. (2014). Persistence of viral genomes after autoclaving. *Journal of Virological Methods*, 198, 37-40.
- Citrus bark cracking viroid (CBCVD0). (2021). EPPO Datasheet: Citrus bark cracking viroid. <https://gd.eppo.int/taxon/CBCVD0/datasheet> (9. nov. 2023).
- Copes, W.E., Ojiambo, P.S. (2021). Efficacy of Hypochlorite in Disinfesting Nonfungal Plant Pathogens in Agricultural and Horticultural Plant Production: A Meta-Analysis. *Plant Disease* 105:12, 4084-4094.
- Coutts, B.A., Kehoe, M.A., Jones, R.A.C. (2013). Zucchini yellow mosaic virus: Contact Transmission, Stability on Surfaces, and Inactivation with Disinfectants. *Plant Disease*, 97(6), 765-771.
- Čerenak, A., Radišek, S. (2020). Ohranjanje genskih virov hmelja ob krčitvi poskusnih nasadov zaradi okužb s CBCVd. *Hmeljar*, 82(1-2), 53-54.
- Darós, J. A. (2016). Viroids: small noncoding infectious RNAs with the remarkable ability of autonomous replication. V: Wang, A., Zhou, X. (ur.). *Current Research Topics in Plant Virology* (str. 295-322). Cambridge, Springer.
- Dwyer, D. E., Saksena, N. (1992). Failure of ultra-violet irradiation and autoclaving to eliminate PCR contamination. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 87-88.
- Eastwell, K. C., Nelson, M. E. (2007). Occurrence of Viroids in Commercial Hop (*Humulus lupulus* L.) Production Areas of Washington State. *Plant Health Progress*, 8, 1.
- Flores, R., Hernandez, C., de Alba, A. E. M., Daros, J. A., Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 117-139.

- Fox, J.C., Ait-Khaled, M., Webster, A., Emery, V.C. (1991). Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer? *Journal of Virological Methods*, 33(3), 375-82.
- Gefrides, L. A., Powell, M. C., Donley, M. A., Kahn R. (2010). UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Science International: Genetics*, 4 (2), 89-94.
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. (2019). Preizkušanje različnih metod okuževanja rastlin s CBCVd. *Hmeljarski bilten*, številka 26, str. 36-49.
- Guo, L., Liu, S., Wu, Z., Mu, L., Xiang, B. (2008). Hop stunt viroid (HSVd) newly reported from hop in Xinjiang, China. *Plant Pathology*, 57, 4.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik J.S. (2003). *Viroids*. Collingwood, CSIRO: 362 str.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Palukaitis P. (2017). *Viroids and Satellites*. London, Elsevier: 688 str.
- 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.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matousek J., Javornik B. (2015). Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64, 1, 831-842.
- Kump, B., Javornik, B. (1996). Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114, 149-158.
- Li, R., Baysal-Gurel, F., Abdo, Z. (2015). Evaluation of disinfectants to prevent mechanical transmission of viruses and a viroid in greenhouse tomato production. *Virology Journal* 12 (5), 2-10.
- Ling, K-S. (2017). Decontamination Measures to Prevent Mechanical Transmission of Viroids. V: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P. (ur.). *Viroids and Satellites* (str. 437-445). Cambridge, Academic Press.
- Linquist, V., Stoddart, C.A., McCune, J.M. (1998). UV irradiation of polystyrene pipets releases PCR inhibitors. *Biotechniques*, 24 (1), 50-51.
- Mackie, A.E., Coutts, B.A., Barbeti, M.J., Rodoni, B.C., McKirdy, S.J., Jones, R.A.C. (2015). Potato spindle tuber viroid: Stability on Common Surfaces and Inactivation With Disinfectants. *Plant Disease*, 99 (6), 770-775.
- Mahaffee, W.F., Pethybridge, S.J., Gent, D.H. (2009). *Compendium of hop diseases and pests*. St Paul, American Phytopathological Society, APS Press.: 93 str.
- Matousek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludvikova, I. (2003). Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant Soil and Environment*, 49(4), 168-175.
- Matsushita, Y., Tsuda, S. (2014). Distribution of Potato spindle tuber viroid in reproductive organs of petunia during its developmental stages. *Phytopathology*, 104(9), 964-969.
- Ou, C.Y., Moore, J.L., Schochetman, G. (1991). Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 10(4), 442-446.
- Puchta, H., Ramm, K., Sanger, H. L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Research*, 16, 10, 4197-4216.
- Radišek, S., Majer, A., Jakše, J., Javornik, B., Matoušek, J. (2012). First report of hop stunt viroid infecting hop in Slovenia. *Plant Disease*, 96, 4, 2 str.
- Radišek, S., Guček, T., Kolenc, U., Friškovec, I., Benko-Beloglavac, A. (2020). Stanje okuženosti hmeljišč s hudo viroidno zakrnelostjo hmelja v letu 2020. *Hmeljar*, 82, 1-12, 52-53.
- Sečnik, A. (2022). Ocenjena vsebnost viroida v povprečnem vzorcu RNA izolirane iz okuženih rastlin. Osebna komunikacija (december, 2022).

- Seigner, L., Lutz, A., Seigner, E. (2014). Monitoring of Important Virus and Viroid Infections in German Hop (*Humulus lupulus* L.) Yards. *BrewingScience*, 67, 5: 81-87.
- Shikata, E. (1987). Hop stunt. V: Diener, T. O. (ur.). *The Viroids*. (str. 279-290). New York, Plenum Press.
- Skelton, A., Frew, L., Ward, R., Hodgson, R., Forde, S., McDonough, S., Webster, G., Chisnall, K., Mynett, M., Buxton-Kirk, A., Fowkers, A.R., Weekes, R., Fox, A. (2023). Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Survival and Disinfection Efficacy on Common Glasshouse Surfaces. *Viruses*, 15, 10, 2076, 1-14.
- Timmermann, C., Muhlbach, H. P., Bandte, M., and Buttner, C. (2001). Control of mechanical viroid transmission by the disinfection of tables and tools. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 66, 2a, 151-156.
- Update of the situation of Citrus bark cracking viroid in Slovenia. EPPO Reporting Service no. 05 - 2021 Num. article: 2021/109. <https://gd.eppo.int/reporting/article-7048> (9. nov. 2023).
- Verhoeven, J., Th, J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Roenhorst, J. W. (2010). Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveoles*, *Solanum jasminoides* and potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 417-421.