

PRIMERJAVA METOD ZA IZOLACIJO RNA Z NAMENOM DOLOČANJA VIROIDOV V HMELJU Z RT-PCR IN RT-qPCR

Tanja GUČEK¹, Jernej JAKŠE² in Sebastjan RADIŠEK³

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 25. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 11. 11. 2020

Izvleček

Za določanje viroidov v hmelju rutinsko uporabljamo metodi RT-PCR in RT-qPCR (RT-PCR v realnem času), ki omogočata hitro, zanesljivo in občutljivo detekcijo. Glavno težavo pri določanju viroidov predstavlja izolacija RNA, ki lahko zaradi nizke koncentracije viroida ali prisotnosti PCR inhibitorjev povzroči lažno negativne rezultate. Za določanje viroidov v hmelju smo primerjali šest komercialno dostopnih kompletov reagentov za izolacijo RNA (Sigma-Aldrich TRIzol, SpectrumTM Plant Total kit, New England Biolabs (NEB) Monarch Total RNA Miniprep kit, Macherey-Nagel (MN) NucleoSpin[®] RNA Plus kit, Bioline ISOLATE II RNA Plant Kit, Qiagen RNeasy[®] Plant Mini Kit) in »hišno« metodo za izolacijo celokupnih nukleinskih kislin s CTAB reagentom. Primerjali smo okužene (CBCVd + HLVd) in neokužene rastline hmelja, različna tkiva (liste in storžke) ter različne načine homogenizacije (uporaba stiskalnice in terilnice). Vzorcem smo izmerili koncentracijo in jih analizirali z RT-PCR in RT-qPCR metodama. Z RT-PCR smo najmočnejše signale zaznali po CTAB izolaciji. V primeru uporabe komercialno dostopnih reagentov, smo izolirali le RNA in z RT-qPCR vzorce z uporabo Qiagen, NEB in MN kompletov, pomnožili brez nespecifičnih signalov. Za manj občutljivo določanje viroidov z RT-PCR je uporaba CTAB izolacije zadostna, v primeru vzorcev z nižjimi koncentracijami viroida pa se priporoča uporaba komercialno dostopnih reagentov.

Ključne besede: izolacija RNA, viroidi, hmelj, RT-PCR, RT-qPCR

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

² Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

³ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

COMPARISON OF RNA EXTRACTION KITS FOR DETECTION OF HOP VIROIDS WITH RT-PCR AND RT-qPCR

Abstract

RT-PCR and RT-qPCR (real-time RT-PCR) methods are routinely used to determine viroids in hops, allowing rapid, reliable, and sensitive detection. The main limitation is RNA isolation, which can result in false negative results, due to low viroid concentration or the presence of PCR inhibitors. Six commercial RNA extraction reagents (Sigma-Aldrich TRIzol, Spectrum™ Plant Total kit, New England Biolabs (NEB) Monarch Total RNA Miniprep kit, Macherey-Nagel (MN) NucleoSpin® RNA Plus kit, Bioline ISOLATE II RNA Plant Kit, Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit) and total nucleic acids isolation method using CTAB reagent were compared for their ability to extract hop viroids. Infected (CBCVd + HLVd) and healthy hop plants, different tissue (leaves and cones) and homogenization methods (use of press and mortar) were tested. The concentration of the samples was measured and analyzed by RT-PCR and RT-qPCR. With RT-PCR, the strongest signals were detected after CTAB isolation. In the case of the use of commercial extraction kits, only RNA was isolated, and samples isolated with Qiagen, NEB and MN kits, were amplified by RT-qPCR without non-specific signals. For less sensitive determination of viroids by RT-PCR, the use of CTAB isolation is sufficient. While in the case of testing samples with lower viroid concentrations, the use of commercially available reagents is recommended.

Key words: RNA isolation, viroids, hops, RT-PCR, RT-qPCR

1 UVOD

Hmelj je gostitelj štirih viroidov, ki so kljub svoji preprosti strukturi lahko zelo agresivne patogene RNA molekule, ki vodijo tudi do odmrtnosti rastline (Jakše in sod., 2015). Viroidna RNA ne vsebuje zapisa za proteine, a vseeno vsebuje strukturne elemente, ki omogočajo razmnoževanje, gibanje po rastlini in zmožnost, da se izognejo obrambnemu odzivu gostitelja (Daros, 2016). Viroidi, ki okužijo hmelj, so hmeljev latentni viroid (HLVd), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd), viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in viroid grbavosti jabolk (AFCVd) (Jakše in sod., 2015; Puchta in sod., 1988; Sano in sod., 2004; Sasaki in Shikata, 1977). Bolezenska znamenja okužbe s CBCVd obsegajo zakrnelost rastlin, krajšanje in zbitost vmesnih členov trt in stranskih poganjkov, predčasno cvetenje, pokanje trt, deformacije listov in suho trohno korenike (Jakše in sod., 2015). Razvoj bolezenskih znamenj je odvisen od sorte hmelja, razvojne faze rastline, vpliva okolja in kombinacije več sočasno prisotnih viroidov. Okužene rastline niso ozdravljive, zato jih je potrebno uničiti in hkrati z ustreznimi ukrepi poskrbeti, da se širjenje bolezni čim bolj omeji (Guček, 2020).

Za uspešno zajezeitev širjenja bolezni so ključne zanesljive metode določanja viroidov. Ker viroidi po rastlinah niso enakomerno razporejeni in se njihova koncentracija zelo spreminja, je optimizacija metod za njihovo določanje zelo zahtevna (Malfitano in sod., 2005; Palacio-Bielsa in sod., 1999). Za določanje viroidov v hmelju so najpogostejše v uporabi PAGE, hibridizacija točkovnega odtisa (dot-blot) in reverzni prepis z verižno reakcijo s polimerazo v enem koraku (RT-PCR) (Guček in sod., 2017), za občutljivejšo določanje pa se uporablja tudi RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) (Matoušek in sod., 2017; Seigner in sod., 2020).

Kljub številnim izboljšavam glede občutljivosti in cene RT-PCR in RT-qPCR metod, predstavljaja glavno težavo izolacija nukleinskih kislin, ki je velikokrat časovno preobsežna, prezahtevna in cenovno neugodna (Palacio-Bielsa in sod., 1999). Kakovost končnih rezultatov je pogojena s količino in kakovostjo izoliranih nukleinskih kislin. Zmanjšana občutljivost PCR reakcij zaradi prisotnosti inhibitorjev, kot so polisaharidi, sekundarni metaboliti in polifenoli, lahko vodi v lažno negativne rezultate (Bernad in Duran-Vila, 2006; Kunta in sod., 2007). Vpliv izolacije na določanje nizkega števila tarče mora biti čim manjši, zato je izbor ustrezne metode izolacije, kot so uporaba izbranih kemikalij za čiščenje, kolone na osnovi silikatov, magnetne kroglice, liofilizacija in druge, ključen dejavnik (Mirmajlessi in sod., 2015). Kljub številnim poskusom izolacije virusne in viroide RNA iz rastlinskih tkiv (Faggioli in sod., 1998; Sipahioglu in sod., 2007; Paylan in sod., 2014; Umana in sod., 2013; Arruabarrena in sod., 2016), univerzalne metode, ki bi izločila vse inhibitorje, še niso odkrili.

Ne glede na vse mora biti metoda izolacije cenovno ugodna, enostavna, primerna za rutinsko uporabo z različnimi rastlinskimi vzorci in z minimalno možnostjo kontaminacij. Učinkovita metoda izolacije v kombinaciji s hitro in občutljivo diagnostično metodo omogoča zanesljivo določanje viroidov (Guček in sod., 2017). Z namenom izbora zanesljive, hitre in cenovno ugodne izolacije nukleinskih kislin iz hmelja za določanje z RT-PCR in RT-qPCR smo na različnih vzorcih hmelja testirali sedem načinov izolacij.

2 MATERIAL IN METODE

Izolacijo smo izvajali na okuženih (CBCVd + HLVd) in neokuženih (brez-virusnih in brez-viroidnih, BVV) rastlinah hmelja, pri čemur so vzorci predstavljali tri različne tipe tkiv: mladi listi, stari listi in storžki. Vzorcem smo izmerili koncentracijo in jih analizirali z RT-PCR in RT-qPCR.

2.1 Rastlinski material in vzorčenje

V poskus smo vključili rastline hmelja sorte Celeia, ki so bile okužene s CBCVd in HLVd, ter neokužene rastline hmelja sorte Bobek, ki so bile v predhodnih testiranjih potrjene kot BVV. Rastline smo vzgajali v rastni komori pri temperaturi 25 °C v času osvetljevanja (13 h) in 18 °C v času teme (11 h).

Za analizo smo uporabili sveže tkivo, tako da smo ločeno vzorčili 3-4 mlade (najmanjši svetlozeleni listi) in 3-4 starejše liste (večji že porumeneli listi) hmelja. Za testiranje smo uporabili tudi zamrznjene storžke hmelja sorta Celeia, ki so bili okuženi s CBCVd in HLVd, in pred analizo hranjeni pri -70 °C. Pri vsaki izolaciji nukleinskih kislin smo analizirali štiri vzorce (v treh ponovitvah) in negativno kontrolo izolacije (NKI, brez tkiva):

- Vzorec 1: sveži mladi listi hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVd + HLVd
- Vzorec 2: sveži stari listi hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVd + HLVd
- Vzorec 3: zamrznjeni storžki hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVd + HLVd
- Vzorec 4: sveži listi BVV hmelja sorte Bobek
- NKI: negativna kontrola izolacije

2.2 Izolacija RNA in celokupnih nukleinskih kislin (TNA)

Izolacijo RNA smo izvedli z uporabo šestih komercialno dostopnih kompletov reagentov, celokupnih nukleinskih kislin pa s CTAB postopkom. Pri izolaciji RNA smo uporabili kolone na osnovi silikatov (razen pri TRIzolu), na katere se RNA veže in očisti z uporabo specifičnih pufrov. Razlika med posameznimi izolacijami je bila v sestavi uporabljenih pufrov, času in hitrosti centrifugiranja ter korakih čiščenja, pri enem je bila dodana tudi encimska razgradnja DNA. Zaradi omejitve kolon se RNA izolira iz manjših količin (do 100 mg), zato smo tkivo hmelja (listi ali storžki) homogenizirali v terilnicah, pri CTAB izolaciji (100 mg) pa v stiskalnici z avtomatsko pipeto (Meku, Nemčija). Za pripravo reagentov smo uporabili vodo tretirano z DEPC (Sigma-Aldrich) in v vseh korakih uporabljali zaščitne rokavice, da smo preprečili prisotnost RNaz. Izolirano RNA smo shranili pri -70 °C. Pri delu smo uporabljali namizno centrifugo 5427 R (Eppendorf).

2.2.1 Izolacija celokupnih nukleinskih kislin z uporabo CTAB reagenta

Tkivo hmelja (100 mg) smo zmleli z uporabo stiskalnice z avtomatsko pipeto (Meku, Nemčija). Celokupne nukleinske kisline (v nadaljevanju TNA, ang. total nucleic acids) smo iz hmelja izolirali z uporabo CTAB reagenta kot že predhodno

opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017). TNA smo raztopili v 50 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0).

2.2.2 Izolacija RNA z uporabo TRIzol reagenta

Tkivo hmelja (100 mg) smo v terilnici homogenizirali v 500 µl TRIzol reagenta. Vzorcju smo dodali 150 µl kloroforma, ga premešali, na sobni temperaturi (ST) inkubirali 30 min in centrifugirali 15 min na 12.000 rpm pri 4 °C. Supernatant (200 µl) smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 200 µl 2-propanola in 20 µl 3M natrijevega acetata, ter 1 uro inkubirali pri -20 °C. Vzorec smo ponovno centrifugirali 15 min na 12.000 rpm pri 4 °C, supernatant odlili, dodali 500 µl 70 % (v/v) etanola in premešali. Etanol smo odstranili in TNA raztopili v 50 µl vode brez RNaz (ang. RNase-free Water, Sigma-Aldrich).

2.2.3 Izolacija RNA s Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma)

Izolacijo celokupne RNA smo izvedli s komercialno dostopnim kompletom Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (SPT, Sigma-Aldrich), po A protokolu (Jakše in sod., 2015). Vzorec (do 100 mg) smo zdrobili z uporabo terilnice in priloženega pufru. Po čiščenju smo RNA iz kolone sprali s 50 µl »Elution solution« s centrifugiranjem 1 min pri 12.000 rpm na 4 °C.

2.2.4 Izolacija RNA z Monarch Total RNA Miniprep kit (NEB)

Z uporabo Monarch Total RNA kita smo vzorec (do 100 mg) v terilnici homogenizirali v 800 µl »DNA/RNA Protection Reagent«, centrifugirali 2 min pri 16.000 g na ST in supernatant odpipetirali v novo mikrocentrifugirko. Vzorcju smo dodali enak volumen »RNA Lysis Buffer«, dobro premešali in odpipetirali v kolono za odstranitev DNA (ang. rDNA removal column), centrifugirali 30 s pri 16.000 g na ST in kolono zavrgli. Vzorcju smo dodali enak volumen 95 % (v/v) etanola, ga premešali s pipetiranjem in prenesli v kolono za čiščenje RNA (ang. RNA purification column). Vzorec smo centrifugirali 30 s pri 16.000 g na ST in RNA očistili v treh korakih, s 500 µl »RNA Priming Buffer« in dvakrat s 500 µl »RNA Wash Buffer«, z vmesnim centrifugiranjem 30 s pri 16.000 g na ST. RNA smo sprali s 50 µl vode brez nukleaz (ang. Nuclease free water) s centrifugiranjem 1 min pri 16.000 g na ST. Zaradi omejenega števila kolon smo vzorce analizirali v dveh ponovitvah.

2.2.5 Izolacija RNA z RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)

Za izolacijo RNA z RNeasy® Plant Mini Kit smo tkivo hmelja (do 100 mg) v terilnici homogenizirali v 450 µl »RLT Buffer«, dobro premešali in prenesli v kolono »QIAshredder spin column«. Vzorec smo centrifugirali 2 min pri 12.700

rpm na ST in 500 µl supernatanta prenesli v novo mikrocentrifugirko ter mu dodali 250 µl 100 % (v/v) etanola. Vzorec smo dobro premešali, odpipetirali v kolono »RNeasy spin column« in centrifugirali 15 s pri 12.000 rpm na ST. RNA smo očistili v treh korakih, tako da smo v kolono odpipetirali 700 µl »RW1 Buffer« in dvakrat 500 µl »RPE Buffer«, z vmesnim centrifugiranjem 15 s pri 12.000 rpm na ST. Kolono smo na koncu še dodatno posušili s centrifugiranjem in RNA sprali s 50 µl vode brez RNaz s centrifugiranjem 1 min pri 12.000 rpm na ST.

2.2.6 Izolacija RNA z NucleoSpin® RNA Plus kit (MN)

Za izolacijo RNA z NucleoSpin® RNA Plus kitom smo vzorec (do 100 mg) v terilnici homogenizirali v 500 µl »Buffer LBP«, ga prenesli v kolono za odstranitev genomske DNA (ang. NucleoSpin gDNA Removal Column) in centrifugirali 1 min pri 11.000 g na ST. Kolono smo zavrgli in vzorcu dodali 150 µl »Binding Solution BS«, dobro premešali in odpipetirali v kolono za čiščenje RNA (ang. NucleoSpin RNA Plus Column). Vzorec smo centrifugirali 30 s pri 11.000 g na ST in RNA očistili v treh korakih, z 200 µl »Buffer WB1«, 600 µl in 250 µl »Buffer WB2« in vmesnim centrifugiranjem 30 s pri 11.000 g na ST. RNA smo sprali z vodo brez RNaz v dveh korakih po 30 µl in centrifugiranjem 2 min pri 11.000 g na ST.

2.2.7 Izolacija RNA z ISOLATE II RNA Plant Kit (Bioline)

S kompletom ISOLATE II RNA Plant Kit smo ob izolaciji RNA še dodatno očistili z encimsko razgradnjo DNA. Tkivo hmelja (do 100 mg) smo v terilnici homogenizirali v 350 µl »Buffer RLY« in 3,5 µl β-merkaptetanola. Vzorec smo prenesli v kolono »ISOLATE II Filter« in centrifugirali 1 min pri 11.000 g na ST. Supernatant smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, mu dodali 350 µl 70 % (v/v) etanola, ga dobro premešali in odpipetirali v kolono »ISOLATE II RNA Plant Column«. Vzorec smo centrifugirali 30 s pri 11.000 g na ST, v kolono odpipetirali 350 µl »Membrane Desalting Buffer« in s ponovnim centrifugiranjem posušili membrano. Razgradnjo DNA smo izvedli z dodatkom 95 µl »DNase mixa« (100 µl encima Dnase I + 900 µl Reaction Buffer for DNase I) in 15 min inkubiranjem na ST. RNA smo nato očistili v treh korakih, z 200 µl »Wash Buffer RW1«, 600 µl in 250 µl »Wash Buffer RW2« in vmesnim centrifugiranjem 30 s pri 11.000 g na ST. RNA smo sprali s 30 µl vode brez RNaz s centrifugiranjem 1 min pri 11.000 g na ST. Zaradi omejenega števila kolon smo vzorce analizirali v dveh ponovitvah.

2.2.8 Meritve koncentracije nukleinskih kislin

Za merjenje koncentracije TNA in RNA smo uporabili fluorometer Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) z ustreznim kompletom reagentov Qubit dsDNA BR Assay kit za DNA in Qubit RNA BR Assay kit za RNA, glede na navodila

proizvajalca. Fluorometer ne omogoča meritev čistosti RNA (razmerje absorbanco), zato so podani samo rezultati za koncentracijo.

2.3 RT-PCR in agarozna gelska elektroforeza

Obratno prepisovanje in PCR smo izvajali v enem koraku (RT-PCR) s kompletom One Step RT-PCR (Qiagen) v inštrumentu Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf). Pred analizo smo izolirano RNA redčili v vodi brez RNaz (10-krat za RT-PCR, 100-krat za RT-qPCR), da bi preprečili vpliv inhibitorjev. Z RT-PCR smo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi 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 pufru obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/ml) in detektirali z UV lučjo (Syngene, ZDA). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 160 V in 180 mA.

2.4 RT-qPCR za sočasno določanje viroidov (mRT-qPCR)

Obratno prepisovanje in PCR v realnem času smo izvajali v enem koraku (RT-qPCR) s kompletom SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline) in encimom reverzno transkriptazo MultiScribe Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) v inštrumentu LightCycler96 (Roche). Z RT-qPCR smo sočasno (mRT-qPCR) analizirali prisotnost CBCVd in HLVd v vzorcih hmelja, v kombinaciji s HSVd, ki je občasno lahko prisoten, kot predhodno opisano v Guček (2020). Ker so bili vsi vzorci na HSVd negativni, rezultati za HSVd niso prikazani. Za mejno vrednost smo pri CBCVd uporabili $C_q = 29$, pri HLVd pa $C_q = 31$ (Guček, 2020). V primeru, da smo z mRT-qPCR dobili negativen rezultat smo vzorec analizirali tudi s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za interno kontrolo (mRNA170), ki omogočajo analizo kvalitete izolirane RNA, kot predhodno opisano v Guček (2020).

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Viroidi v rastlinah niso enakomerno razporejeni, prav tako pa se čez leto spreminja njihova koncentracija (Li in sod., 1995; Morton in sod., 1993; Rodio in sod., 2006; Zhu in sod., 2001), zato ima pri določanju viroidov velik vpliv tkivo in čas vzorčenja. Ob neustreznem vzorčenju ali neuspešni izolaciji RNA je lahko vzorec lažno negativen. Občutljivost analize lahko povečamo z analizo večje količine vzorca (100 mg), ki ga skoncentriramo na majhen volumen izolirane RNA (50 µl). To nam sicer lahko omogoča uspešno določanje viroidov, a hkrati lahko skoncentriramo tudi nečistoče in inhibitorje, zaradi katerih pomnoževanje tarčnih molekul ni optimalno (Xu in sod., 2017). Z namenom izbora ustreznega načina izolacije nukleinskih kislin iz vzorcev hmelja okuženih s hudo viroidno

zakrnelostjo za določanje z RT-PCR in RT-qPCR, smo primerjali sedem izolacij nukleinskih kislin.

3.1 Meritve koncentracij nukleinskih kislin

Pri uporabi CTAB reagenta smo dobili najvišje koncentracije glede na vse ostale izolacije RNA (preglednica 1). CTAB reagent je uspešno razbil celično membrano, s fenolom pa smo učinkovito odstranili proteine, zato je bila koncentracija TNA visoka. Glede na ostale izolacije smo pri CTAB za homogenizacijo uporabili večjo količino tkiva, ker smo uporabili stiskalnico in dobili bolj reprezentativen vzorec. Za izolacijo TNA smo uporabili samo del homogenega vzorca, da smo med posameznimi izolacijami analizirali primerljive količine tkiva.

Preglednica 1: Koncentracija nukleinskih kislin v vzorcih hmelja glede na posamezno izolacijo.

Vzorec/ponovitev ¹	Koncentracija TNA/RNA [ng/μl] ²						
	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Vzorec 1/1	3260	135	1110	1050	887	1900	574
Vzorec 1/2	301	127	1390	762	1280	1670	396
Vzorec 1/3	2730	108	943	778	563	nt	nt
Vzorec 2/1	1120	< 100	1850	473	371	1340	< 100
Vzorec 2/2	416	< 100	1640	815	626	696	< 100
Vzorec 2/3	237	< 100	647	653	281	nt	nt
Vzorec 3/1	560	< 100	252	135	< 100	239	< 100
Vzorec 3/2	1280	< 100	353	< 100	< 100	235	< 100
Vzorec 3/3	499	< 100	425	127	< 100	nt	nt
Vzorec 4/1	< 100	407	108	296	< 100	134	152
Vzorec 4/2	186	412	127	258	< 100	127	163
Vzorec 4/3	nt	359	nt	nt	nt	100	< 100
NKI	-	-	-	-	-	-	-

¹vzorec 1, sveži mladi listi okuženega hmelja; 2, sveži stari listi okuženega hmelja; 3, zamrznjeni okuženi storžki; 4, listi BVV hmelja; NKI, negativna kontrola izolacije

²CTAB: merjenje DNA, ostale: merjenje RNA; CTAB, CTAB reagent; TRIzol, TRIzol reagent; Sigma, SpectrumTM Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin[®] RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy[®] Plant Mini Kit; nt, ni bilo testirano

Pri izolaciji RNA smo primerjali TRIzol in najpogosteje uporabljene komplete za izolacijo iz rastlinskih tkiv, ki omogočajo hitro izolacijo na osnovi čiščenja preko silikatnih membran, velikokrat brez uporabe toksičnih in nevarnih reagentov, kot so fenol, kloroform, gvanidinijev tiocianat in β-merkaptotetanol. Pri izolaciji RNA s

TRIZol reagentom smo dobili izrazito nižje koncentracije glede na ostale izolacije (preglednica 1). Vzorci mladega listja so imeli več kot 10-krat nižje vrednosti kot pri CTAB reagentu, pri vzorcih starega listja in zamrznjenih storžkov pa je bila koncentracija pod 100 ng/μl. Najvišje koncentracije RNA smo dobili z uporabo Sigma in NEB kompletov, najnižje pa zaradi dodatne encimske razgradnje DNA z Bioline (preglednica 1).

Glede na tkivo so bile v povprečju koncentracije pri svežem tkivu mladih okuženih listov (CBCVd + HLVd) dvakrat višje kot pri starih listih in vsaj trikrat višje kot pri zamrznjenih storžkih (preglednica 1). Med tkivom starih listov in storžkov so bile z uporabo kompletov vsaj štirikratne razlike (z izjemo Bioline), prav tako so bile vrednosti primerljive pri TRIZol in CTAB reagentu (preglednica 1). Na splošno se za določanje viroidov uporablja sveže tkivo, v predhodnih raziskavah je bilo namreč omenjeno, da se iz zamrznjenega tkiva izolira nižje koncentracije nukleinskih kislin, kar se ujema z našimi rezultati (Sipahioglu in sod., 2007). Alternativa zamrzovanju bi bilo sušenje tkiva, kar se je v omenjeni raziskavi pokazalo kot ustrezno. Pri BVV rastlinah smo določili nižje koncentracije, ker v rastlinah ni bilo prisotne viroidne oziroma virusne RNA (vzorec 4). V negativni kontroli izolacije (NKI) je bila koncentracija pod mejo določitve, iz česar lahko sklepamo, da se med postopkom dela vzorci niso kontaminirali.

3.2 Rezultati RT-PCR

Ne glede na vrsto vzorca (sveže ali zamrznjeno), starost (starejši ali mladi listi) ali vrsto tkiva (listi ali storžki) smo CBCVd in HLVd s CTAB reagentom z RT-PCR uspešno zaznali v vseh vzorcih (slika 1a, preglednica 2). Pri TRIZolu smo CBCVd uspešno določili samo pri svežih mladih listih, pri HLVd pa tudi pri zamrznjenih storžkih. Pri mladih listih so bili signali za HLVd zelo šibki, na gelu smo dobili tudi nespecifične fragmente velikosti okrog 500 bp (slika 1b, preglednica 2). Amplikoni različnih dolžin so posledica nespecifične vezave reverzne transkriptaze z gostiteljsko RNA, ki tvori termostabilne zanke. Nativna RNA se lahko veže tudi sama nase in deluje kot začetni oligonukleotid za reverzno transkriptazo, zato so na gelu vidne različne dolžine (Tuiskunen in sod., 2010; Umaña in sod., 2013). V primeru starejšega tkiva izolacija ni bila uspešna, razlog bi bil lahko v prisotnosti nečistoč (kontaminacija s fenolom) in nižji koncentraciji viroidov v starejših listih (Guček, 2020).

Metodi sta se razlikovali v načinu homogenizacije in reagentu za lizo celic. Pri CTAB reagentu smo tkivo homogenizirali v stiskalnici, pri TRIZol reagentu in ostalih izolacijah pa v terilnicah. Uporaba stiskalnice se je izkazala kot ustrežnejša, uporabili smo lahko večjo količino vzorčenega tkiva, ki smo ga zmleli v homogen vzorec. Pri terilnicah smo lahko uporabili le manjše dele vzorčenega tkiva, v skupni količini do 100 mg. Kljub temu razgradnja celic ni bila ustrezna, še vedno

so bile prisotne nečistoče, kar je vodilo do obarvanja oborjenih nukleinskih kislin in lažno negativnih rezultatov.

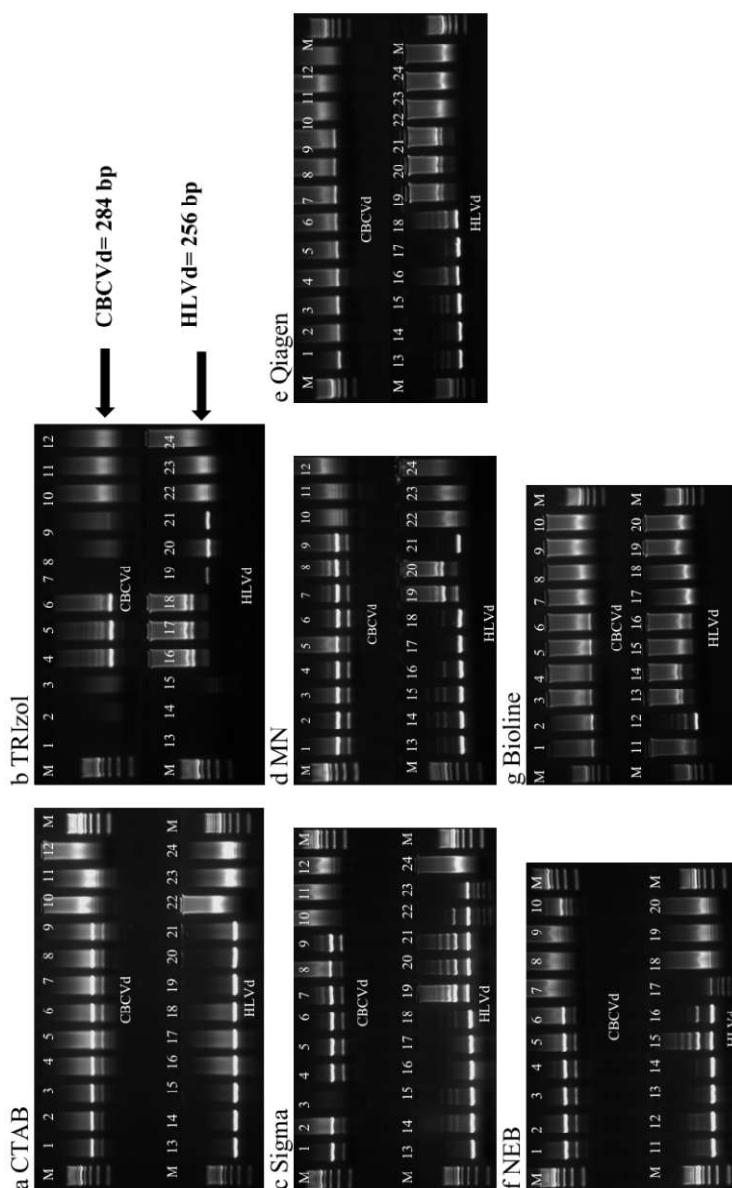
Preglednica 2: Rezultati RT-PCR za viroid CBCVd in HLVd glede na posamezno izolacijo.

Vzorec/ ponovitev ¹	CBCVd ²						HLVd							
	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Vzorec 1/1	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	(+)
Vzorec 1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Vzorec 1/3	+	+	+	+	+	nt	nt	+	(+)	+	+	+	nt	nt
Vzorec 2/1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)
Vzorec 2/2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)
Vzorec 2/3	+	-	+	+	+	nt	nt	+	-	+	+	+	nt	nt
Vzorec 3/1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)
Vzorec 3/2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	+	(+)
Vzorec 3/3	+	-	+	+	+	nt	nt	+	+	+	+	(+)	nt	nt
Vzorec 4/1	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	+	-	-	(+)	-
Vzorec 4/2	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Vzorec 4/3	nt	-	nt	nt	nt	-	-	-	nt	nt	nt	nt	-	-
NKI	-	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-

¹vzorec 1, sveži mladi listi okuženega hmelja; 2, sveži stari listi okuženega hmelja; 3, zamrznjeni okuženi storžki; 4, listi BVV hmelja; NKI, negativna kontrola izolacije; vzorec 1/1-3, tehnična ponovitev vzorca (vzorci narejeni v treh ponovitvah)

²CBCVd, viroid razpokanosti skorje agrumov; HLVd, hmeljev latentni viroid; CTAB, CTAB reagent; TRIzol, TRIzol reagent; Sigma, Spectrum™ Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin® RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy® Plant Mini Kit; +, pozitiven signal na CBCVd/HLVd; (+), šibek pozitiven signal na CBCVd/HLVd; -, negativen signal na CBCVd/HLVd (sivi okvirček); nt, ni bilo testirano*rezultat po ponovitvi RT-PCR reakcije

Pri izolaciji s kompleti Sigma, MN, Qiagen, NEB in Bioline smo CBCVd z RT-PCR uspešno določili pri vseh vzorcih (slika 1c-g). Intenziteta signalov je bila najmočnejša pri Sigma, MN in NEB kompletu (slika 1c, d, f). Pri CBCVd smo z Bioline kompletom dobili zelo šibke signale (slika 1g). Pri določanju HLVd smo tako v mladem kot starem tkivu okuženega listja dobili pozitivne signale, pri storžkih pa smo imeli težave s slabšo intenziteto signalov (slika 1c-g). S kompletom Sigma in NEB smo pri storžkih dobili močne signale, z MN nekoliko šibkejše, pri uporabi Bioline in Qiagen kompleta pa zelo šibke (slika 1e, g). Zelo šibek rezultat pri storžkih je lahko posledica nečistoč, kot so polifenoli in polisaharidi, zato je bila koncentracija RNA nižja in RT-PCR reakcija inhibirana. Zaradi nečistoč smo na gelu videli nespecifičen fragment velikosti okrog 500 bp, ki je bil prisoten pri Sigma, MN, Qiagen in NEB kompletih (slika 1c-f, preglednica 2).



Slika 1: Analiza RT-PCR rezultatov na 2 % agaroznem gelu za izolacijo TNA in RNA. Od 1-12: Vzorci testirani na CBCVd (284 bp), od 13-24: vzorci testirani na HLVd (256 bp). **a) CTAB reagent. b) TRIzol reagent.** Vzorci po vrsti: stari okuženi listi (3x), mladi okuženi listi (3x), okuženi storžki (3x), listi BVV hmelja (2x), NKI. **c) Sigma komplet. d) MN komplet. e) Qiagen komplet.** Od 1-12: Vzorci po vrsti: mladi okuženi listi (3x), stari okuženi listi (3x), okuženi storžki (3x), listi BVV hmelja (2x), NKI. **f) NEB komplet. g) Bioline komplet.** Vzorci po vrsti: stari okuženi listi (2x), mladi okuženi listi (2x), okuženi storžki (2x), listi BVV hmelja (3x), NKI. M: 100 bp GeneRuler DNA Ladder.

Bioline komplet se je od ostalih izolacij RNA razlikoval po koraku encimske razgradnje DNA, ki je zaradi dodatnega čiščenja negativno vplivala na zaznavanje obeh viroidov. Kljub dodatni razgradnji je bil na gelu pri HLVD še vedno viden nespecifičen fragment (slika 1g). Pri uporabi Qiagen kompleta sicer nismo dobili najintenzivnejših signalov, a je bilo število nespecifičnih fragmentov najmanjše, iz česar lahko sklepamo, da je bilo po izolaciji prisotnih najmanj nečistoč (slika 1e). Pri Sigmii je bil en vzorec mladih okuženih listov negativen na CBCVD in dva vzorca BVV hmelja pozitivna, pri NEB pa smo dobili pozitiven rezultat pri NKI, kar je bilo posledica kontaminacije med RT-PCR, zato smo reakcijo ponovili (slika 1c, f).

Glede na kakovost signalov po RT-PCR reakciji lahko povzamemo, da so za določanje CBCVD v hmelju primerni CTAB reagent, Sigma, MN, NEB in Qiagen kompleti. Z Bioline kompletom smo dobili slabšo kakovost signalov, kar je lahko problematično ob nižji koncentraciji viroidov v rastlini. S TRIzol reagentom je bilo določanje viroidov v primeru starejšega tkiva in storžkov neuspešno zaradi prisotnih nečistoč. V primeru določanja HLVD se omenjene komplete lahko uporabi za testiranje vzorcev listja, pri zamrznjenih storžkih pa je glede na slabšo intenziteto signalov primernejša uporaba Sigma in NEB kompleta (slika 1c, f).

3.3 Rezultati mRT-qPCR

Izolirane vzorce smo analizirali tudi z mRT-qPCR na CBCVD, HLVD in HSVd in ne glede na viroid ali tkivo pri vseh izolacijah dobili pozitivne rezultate, razen pri TRIzol reagentu (preglednica 3). Pri HLVD smo v primeru vzorca 4/1 izoliranega s Sigma in MN kompletom ($C_q = 29$ in 30), zaradi 10 ciklov višje C_q -vrednosti od pozitivnih vzorcev, vzorca potrdili kot negativna (preglednica 3).

Pri izolaciji TNA, smo vse vzorce testirali tudi z začetnimi oligonukleotidi za interno kontrolo mRNA170. V primeru CTAB izolacije so bili vsi vzorci pozitivni ($C_q = 11-13$), pri TRIzol reagentu pa so bile C_q -vrednosti za mlade liste in storžke (3/2) višje ($C_q = 16-23$), v primeru starih listov in dveh storžkov (3/1 in 3/3) pa negativne (preglednica 3). Glede na negativne C_q -vrednosti lahko sklepamo, da nam s TRIzol reagentom ni uspelo izolirati RNA, posledično tudi pri RT-PCR nismo dobili pozitivnih signalov (slika 1b).

Pri pozitivnih vzorcih smo najnižje C_q -vrednosti ($C_q = 13$) dobili pri CTAB izolaciji za HLVD v mladih listih, najvišje pa pri Bioline v storžkih ($C_q = 24$). Na splošno so bile najvišje C_q -vrednosti pri vzorcih izoliranih z Bioline kompletom ($C_q = 19-24$) in TRIzol reagentom ($C_q = 20-21$), kar se sklada tudi s šibkejšimi signali na gelu (preglednica 3, slika 1b, g). Zelo primerljive rezultate smo dobili pri vzorcih izoliranih s Sigma ($C_q = 16-20$), Qiagen ($C_q = 17-22$) in NEB ($C_q = 17-21$). Najnižje vrednosti in posledično največ viroida smo izolirali s CTAB reagentom

(Cq= 13-19) in MN kompletom (Cq= 15-19). Vsi vzorci BVV hmelja in NKI so bili testirani kot negativni (Cq $\geq$ 29). Najčistejša izolirana RNA je bila s kompleti Qiagen, NEB in MN, kajti v NKI (in nekaterih BVV) ni bilo nespecifičnega pomnoževanja (preglednica 3). Za testiranje vzorcev z nizkimi koncentracijami (blizu mejnih vrednosti) je zato bolj priporočljiva uporaba kompletov Qiagen, NEB in MN, da se izognemo lažno negativnim rezultatom.

Preglednica 3: Rezultati mRT-qPCR (Cq-vrednosti) za viroid CBCVd in HLVd glede na posamezno izolacijo.

Vzorec/ ponovitev ¹	CBCVd ²							HLVd						
	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Vzorec 1/1	15.63	20.24	20.23	17.48	21.12	20.82	19.07	12.99	21.05	17.62	16.91	18.31	18.88	18.57
Vzorec 1/2	17.13	20.45	19.68	17.63	21.00	20.56	19.66	15.58	21.31	17.19	17.41	18.06	18.62	19.14
Vzorec 1/3	15.80	20.99	19.97	17.84	21.71	nt	nt	13.59	21.54	17.24	17.26	18.77	nt	nt
Vzorec 2/1	18.78	-	15.87	16.30	18.51	17.38	19.17	16.60	-	15.82	17.27	18.96	17.34	20.11
Vzorec 2/2	19.06	-	16.01	15.19	17.69	17.44	19.42	16.99	-	15.86	16.82	18.21	17.27	20.37
Vzorec 2/3	18.44	-	17.20	15.85	19.23	nt	nt	16.62	-	17.28	17.03	19.51	nt	nt
Vzorec 3/1	16.71	-	17.01	18.87	21.53	18.47	23.82	17.43	-	18.06	18.98	21.01	19.09	23.70
Vzorec 3/2	17.05	21.16	16.89	19.53	21.64	18.87	24.03	17.82	20.11	17.84	19.37	21.39	19.40	23.83
Vzorec 3/3	15.21	-	16.43	18.80	21.91	nt	nt	15.69	-	17.21	18.90	21.52	nt	nt
Vzorec 4/1	33.75	29.55	29.62	30.75	-	-	-	36.08	-	29.17	30.02	-	33.19	31.31
Vzorec 4/2	-	29.70	31.10	-	-	-	32.35	-	31.53	31.93	-	-	-	31.71
Vzorec 4/3	nt	29.88	nt	nt	nt	-	-	nt	32.58	nt	nt	nt	31.57	33.53
NKI	33.04	33.17	31.22	32.73	-	-	-	33.38	35.41	30.93	-	-	-	30.00

¹vzorec 1, sveži mladi listi okuženega hmelja; 2, sveži stari listi okuženega hmelja; 3, zamrznjeni okuženi storžki; 4, listi BVV hmelja; NKI, negativna kontrola izolacije

²CBCVd, viroid razpokanosti skorje agrumov; HLVd, hmeljev latentni viroid; CTAB, CTAB reagent; TRIzol, TRIzol reagent; Sigma, SpectrumTM Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin[®] RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy[®] Plant Mini Kit; Cq $\leq$ 29, pozitiven signal na CBCVd/HLVd; Cq $\geq$ 29/ - / obarvano, negativen signal na CBCVd/HLVd; nt, ni bilo testirano

V predhodnih raziskavah so za izolacijo virusne in viroidne RNA primerjali različne metode na osnovi fenolov, β -merkaptetanola, silikatov, litijevega klorida, CTAB reagenta in komercialno dostopnih reagentov (Faggioli in sod., 1998; Zhang in sod., 1998; Sipahioglu in sod., 2007; Paylan in sod., 2014; Umana in sod., 2013; Buzkan in sod., 2004; Nouayti in sod., 2018; Arruabarrena in sod., 2016). V večini primerov so se za viroide kot najbolj optimalne izkazale metode, ki so bile posebej modificirane glede na analizirano tkivo in patogen in kombinacije dveh različnih

metod (TNA + komplet reagentov) (Paylan in sod., 2014; Umana in sod., 2013; Arruabarrena in sod., 2016; Sipahioğlu in sod., 2007).

Preglednica 4: Povzetek primerjave izolacij glede na ceno, čas, RT-PCR in RT-qPCR rezultate.

Postavka/ metoda ¹	Izolacija ²						
	CTAB	TRIzol	Sigma	MN	Qiagen	NEB	Bioline
Cena kemikalij na vzorec	1 €	3 €	4 €	4,8 €	7 €	5 €	6 €
Časovni obseg dela	4 h	4 h	1,5 h	1 h	1 h	1 h	1,5 h
RT-PCR							
Mladi okuženi listi	+	+	+	+	+	+	(+)
Stari okuženi listi	+	-	+	+	+	+	(+)
Storžki	+	-	+	(+)	(+)	+	(+)
mRT-qPCR (Cq-vrednost)	13-19	20-21	16-20	15-19	17-22	17-21	19-24
Ustreznost izolacije	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗

¹RT-PCR, intenziteta signala pri posameznem tkivu: +, pozitiven signal na CBCVd/HLVd; (+), šibek pozitiven signal na CBCVd/HLVd; -, negativen signal na CBCVd/HLVd; mRT-qPCR, razpon Cq-vrednosti pri posamezni izolaciji

²CTAB, CTAB reagent; TRIzol, TRIzol reagent; Sigma, Spectrum™ Plant Total kit; NEB, Monarch Total RNA Miniprep kit; MN, NucleoSpin® RNA Plus; Bioline, ISOLATE II RNA Plant Kit; Qiagen, RNeasy® Plant Mini Kit

Izolacija TNA predstavlja cenejšo alternativo komercialno dostopnim kompletom, ampak je zahtevnejša in časovno zamudnejša kot izolacija RNA s kompleti reagentov (preglednica 4). Intenziteta signalov pri RT-PCR za CBCVd in HLVd je bila najmočnejša po izolaciji s CTAB reagentom (slika 1a). Rezultati RT-PCR (slika 1) in mRT-qPCR (preglednica 3) za TNA in RNA so bili primerljivi. Pri Bioline kompletu smo zaradi encimske razgradnje dobili slabše rezultate (slika 1g), v primeru TRIzol reagenta pa zaradi nečistoč v nekaterih vzorcih RNA nismo uspešno izolirali (slika 1b, preglednica 4). Glede na tkivo smo CBCVd in HLVd uspešno določili v svežih listih, pri zamrznjenih storžkih smo pri HLVd dobili šibkejšje signale (slika 1), zato je za določanje HLVd primernejša uporaba svežega tkiva.

4 ZAKLJUČEK

Izbor ustrezne metode izolacije viroidne RNA je odvisen od koncentracije viroida v rastlini, vzorčenega tkiva in metode določanja. Za vsako kombinacijo viroid-gostitelj je zato potrebno določiti specifičen način vzorčenja in izolacije, ki mora biti zanesljiv in cenovno ugoden. Z namenom izbora ustrezne izolacije za določanje CBCVd in HLVd smo primerjali sedem RNA izolacij (preglednica 4).

V primeru, da določamo viroide v vzorcih hmelja z RT-PCR je CTAB izolacija kljub daljšemu časovnemu obsegu a z nizko ceno, glede na naše rezultate, ustrenejša (preglednica 4). Kompleti reagentov so zaradi cene primernejši za analize manjšega števila vzorcev z RT-qPCR. Z mRT-qPCR smo ob uporabi Qiagen, NEB in MN kompletov dobili zanesljive rezultate brez nespecifičnih pomnoževanj v NKI (preglednica 3). Uporaba TRIzola in Bioline kompleta za testirane vzorce ni bila optimalna (preglednica 4). Za določanje CBCVd in HLVd z RT-PCR in RT-qPCR nam je tako na voljo več načinov izolacij nukleinskih kislin, za katerega se odločimo pa je odvisno od analiziranega vzorca.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (štipendija za mladega raziskovalca št. 36371 in raziskovalni program P4-0077).

LITERATURA

- Arruabarrena A, Benítez-Galeano MJ, Giambiasi M, Bertalmío A, Colina R, Hernández-Rodríguez L. Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *J Virol Methods*. 2016;237:14-17.
- Bernad L. in Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*. 2006; 20: 105–113.
- Daròs J.A. Viroids: Small noncoding infectious RNAs with the remarkable ability of autonomous replication. V: *Current research topics in plant virology*. Wang A., Zhou X. (ur.). Switzerland, Springer International Publishing. 2016: 295-322.
- EPPO. First report of Citrus bark cracking viroid in Germany. *EPPO Reporting Service 2019 no. 8- Diseases*. 2019. 165.
- Faggioli F, Pasquini G, Barba M. Comparison of different methods of RNA isolation for plum pox virus detection by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Virol*. 1998;42(4):219-221.
- Guček T., Trdan S., Jakše J., Javornik B., Matoušek J., Radišek S. Diagnostic techniques for viroids. *Plant Pathology*. 2017; 66: 339–358.
- Guček T. Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju. *Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta*, 2020. 188 str.
- Hataya T., Katsuyuki H., Suda N., Nagata T., Shifang L., Itoga Y., Shikata E. Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 1992; 58: 677–684.
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*. 2015; 64: 831–842.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114: 149–158.
- Kunta M., da Graca J. V., Skaria M. Molecular detection and prevalence of citrus viroids in Texas. *Hortscience*. 2007; 42: 600–604.
- Li S.-F., Onodera S., Sano T., Yoshida K., Wang G.-P., Shikata E. Gene Diagnosis of Viroids Comparisons of Return-PAGE and Hybridization Using DIG-labeled DNA and

- RNA Probes for Practical Diagnosis of Hop Stunt, Citrus Exocortis and Apple Scar Skin Viroids in Their Natural Host Plants. *Japanese Journal of Phytopathology*. 1995; 61: 381–390.
- Malfitano M., Barone M., Duran-Vila N., Alioto D. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 2005; 87: 115–121.
- Matoušek J., Siglová K., Jakše J., Radišek S., Brass J. R. J., Tsushima T., Guček T., Duraisamy G.S., Sano T., Steger, G. Propagation and some physiological effects of Citrus bark cracking viroid and Apple fruit crinkle viroid in multiple infected hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Plant Physiology*. 2017; 213: 166–177.
- Mirmajlessi S. M., Loit E., Mand M., Mansouripour S. M. Real-Time PCR Applied to Study on Plant Pathogens: Potential Applications in Diagnosis - a Review. *Plant Protection Science*. 2015; 51: 177–190.
- Mishra A. K., Duraisamy G. S., Matoušek J., Radišek S., Javornik B., Jakše J. Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using high-throughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection. *BMC Genomics*. 2016; 17: 919.
- Morton A., Barbara D. J., Adams A. N. The distribution of hop latent viroid within plants of *Humulus lupulus* and attempts to obtain viroid-free plants. *Annals of Applied Biology*. 1993; 123: 47–53.
- Načrt izrednih ukrepov za izkoreninjenje viroidnih zakrnelosti hmelja. Benko Beloglavec A. (ur.). Ljubljana, UVHVVR. 2019: 26 str.
- Palacio-Bielsa A., Foissac X., Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridisation. *European Journal of Plant Pathology*. 1999; 105: 897–903.
- Paylan I. C., Çandar A., Gümüş M., Pazarlar S., Önder S. A comparison of six total RNA isolation methods for diagnosis of GYSVd-1 (Grapevine yellow speckle viroid-1) on *vitis vinifera* L. leaves. *Pakistan Journal of Botany*. 2014; 46: 2089–2093.
- Pokorn T. Identifikacija potencialnih tarč viroidnih malih RNA (vd-sRNA) v hmelju (*Humulus lupulus* L.) [na spletu]. *Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta*. [Dostopano 30 april 2019]. Pridobljeno od: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=97741>.
- Puchta H., Ramm K., Sängner H. L. Nucleotide sequence of a hop stunt viroid isolate from the German grapevine cultivar „Riesling“. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16: 2730.
- Rodio M. E., Delgado S., Flores R., Di Serio F. Variants of Peach latent mosaic viroid inducing peach calico: uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *Journal of General Virology*. 2006; 87: 231–240.
- Sano T., Yoshida H., Goshono M., Monma T., Kawasaki H., Ishizaki K. Characterization of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species. *Journal of General Plant Pathology*. 2004; 70: 181–187.
- Sasaki M. in Shikata E. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 1977; 53: 109–112.
- Seigner L., Liebrecht M., Keckel L., Einberger K., Absmeier C. Real-time RT-PCR detection of Citrus bark cracking viroid (CBCVd) in hops including an mRNA-based internal positive control. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2020; doi: 10.1007/s41348-020-00317-x: 5 str.

- Sipahioglu HM, Ocak M, Usta M. Compariosn of Three Conventional Extraction Methods for the Detection of Plant Virus/Viroid RNAs from Heat Dried High-phenolic Host Leaves. Published online 2007;6: 102-107.
- Tuiskunen A., Leparç-Goffart I., Boubis L., Monteil V., Klingström J., Tolou H. J., Plumet S. Self-priming of reverse transcriptase impairs strand-specific detection of dengue virus RNA. *Journal of General Virology*. 2010; 91: 1019–1027.
- Umaña R., Pritsch C., Arbiza J. R., Rivas F., Pagliano G. Evaluation of four viroid rna extraction methods for the molecular diagnosis of cevd in citrus lemon using RT-PCR, dot blot and northern blot. *Biotechnologia Aplicada*. 2013; 30: 131–136.
- Xu R., Shieh Y. C., Stewart D. S. Comparison of RNA extraction kits for the purification and detection of an enteric virus surrogate on green onions via RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2017; 239: 61–68.
- Zhu Y., Green L., Woo Y. M., Owens R., Ding B. Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology*. 2001; 279: 69–77.