

PRIMERJAVA RAZLIČNIH NAČINOV HOMOGENIZACIJE TKIVA ZA HITRO DOLOČANJE VIROIDOV V HMELJU

Tanja GUČEK¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Arrived: 18. 11. 2024

Sprejeto / Accepted: 23. 11. 2024

Izvleček

Homogenizacija je pomemben proces v številnih industrijskih panogah, kot so farmacija, živilstvo, kozmetika in biotehnologija. Pri diagnostiki rastlinskih patogenov predstavlja homogenizacija ključen korak določitve patogena, saj omogoča izolacijo njegovega genoma iz rastline. Na trgu je dostopnih veliko različnih tipov homogenizatorjev, ki se uporabljajo za specifične aplikacije, zato je težko izbrati pravega. Z namenom razvoja metode za hitro detekcijo viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na terenu smo v raziskavi primerjali pet različnih ročnih homogenizatorjev v treh različnih pufrih. Vzorce smo na prisotnost viroidov CBCVd in hmeljevega latentnega viroida (HLVd) analizirali s RT-PCR v realnem času za sočasno določanje. Dodatno smo HLVd testirali z RT-RPA s komercialnim kompletom reagentov AmplifyRP® XRT. Pri uporabi različnih homogenizatorjev smo viroide v vzorcih hmelja uspešno potrdili pri vseh. Za uspešno detekcijo je zadostovala že manjša stopnja homogenizacije z uporabo kovinskega pestila ali baterijskega homogenizatorja. V primeru uporabe različnih pufrov smo potrdili velik vpliv na rezultate. Pri vodi tretirani z DEPC in komercialnem pufru GEB3 smo dobili pozitivne rezultate, pri pufru GEB4 pa smo bili uspešni samo pri 10 % vzorcev. Pri RT-RPA smo za HLVd prav tako potrdili vpliv pufru in boljše rezultate pri uporabi pufru GEB3. Rezultati RT-RPA so se ujemali z mRT-qPCR, pri nekaterih homogenizatorjih smo imeli težave z nespecifičnimi signali v zdravih vzorcih hmelja. V raziskavi smo s primerjavo različnih ročnih homogenizatorjev potrdili, da lahko z vsemi homogenizatorji z uporabo ustreznega pufru dobimo zanesljive rezultate s hitro izolacijo, kar lahko uporabimo pri detekciji viroidov na terenu.

Ključne besede: detekcija na terenu, ročni homogenizatorji, RT-RPA, RT-qPCR

COMPARISON OF DIFFERENT TYPES OF TISSUE HOMOGENIZATION FOR FAST DETECTION OF HOP VIROID

Abstract

Homogenization is an important process in many industries such as pharmaceuticals, food, cosmetics and biotechnology. In the plant pathogen

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

diagnostics, homogenization is a key step in determine the pathogen, as it enables the isolation of its genome from the plant. There are various types of homogenizers available, each one designed for a specific application, so choosing the right one can be difficult. In order to develop method for the rapid detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd) in the field, we compared five different hand homogenizers in three different buffers. The samples were analyzed for the presence of CBCVd and hop latent viroid (HLVd) by real-time PCR for simultaneous detection. HLVd was additionally tested by RT-RPA using the commercial kit AmplifyRP® XRT. When using different homogenizers, viroids in hop samples were successfully confirmed with all of them. A small degree of homogenization using a metal pestle or battery homogenizer was sufficient for successful detection. In the case of using different buffers, we confirmed a large impact on the results. With DEPC treated water and the commercial GEB3 buffer, we obtained positive results, but with the GEB4 buffer, we were only successful at 10 % samples. With RT-RPA for HLVd we also confirmed the influence of the buffer and better results when using the GEB3 buffer. The RT-RPA results agreed with mRT-qPCR, with some homogenizers we had problems with non-specific signals in healthy hop samples. In the research, by comparing different hand homogenizers, we confirmed that by using any of them with suitable buffer, we can get reliable results with fast isolation, which can be used in the detection of viroids in the field.

Key words: detection in the field, hand homogenizers, RT-RPA, RT-qPCR

1 UVOD

Homogenizacija je ključen korak vsake raziskave, ki vključuje izolacijo določenih komponent iz intaktnega vzorca (Burden, 2012). Proces vključuje zmanjšanje velikosti delcev vzorca z uporabo homogenizatorjev z namenom, da se proizvede enakomeren in stabilen izdelek. Obstaja velik izbor metod, reagentov in orodji, ki so uporabljeni v številnih različnih kombinacijah homogenizacije vzorcev (Burden 2012; Drawell 2023; BioCompare 2024). Postopek homogenizacije je v objavljenih protokolih zelo pogosto slabo opisan in se podaja med raziskovalci kot dobro varovana družinska skrivnost. Posledično je med laboratoriji zelo velika variacija v metodologiji. Mogoče je vpliv homogenizacije na poskus minimalen, ampak izbira ustreznega orodja, kemije in metode lahko ima zelo velik vpliv na končni rezultat (Burden, 2012).

Za razvoj uspešnega načina homogenizacije je pomembno poznati značilnosti končnega lizata in omejitve tarčne molekule. Glavne biokemijske tarče iz bioloških vzorcev so proteini, DNA in RNA, ki zahtevajo učinkovito lizo celic brez razgradnje nukleinskih kislin (NA; DNA in RNA) (Tan in Yiap, 2009; Burden, 2012). Pri testiranju proteinov se uporabljajo pogoji brez denaturacije, brez močnih detergentov ali kaotropov (npr. urea), ki prekinajo hidrofobne interakcije v proteinih (Burden, 2012). V primeru izolacije RNA je potrebno izvesti lizo celic v kombinaciji z denaturacijo nukleo-proteinskih kompleksov in inaktivacijo nukleaz (RNaze) pri zelo nizkih temperaturah (Tan in Yiap, 2009; Burden, 2012). Hkrati je zelo pomembno, da je tarčna RNA brez nečistoč, kot so proteini, polisaharidi, lipidi, druge nukleinske

kislina (RNA brez DNA in obratno) in metaboliti (Tan in Yiap, 2009). Pri izolaciji DNA se prav tako ob homogenizaciji iz celic sprostijo nukleaze, ki jih inaktiviramo z dodatkom EDTA, ki veže Mg^{2+} ion, ki je nujen za aktivnost DNaz (Burden, 2012).

Za izbor ustrezne metode homogenizacije je nujno razumeti lokalizacijo patogena v rastlini in prisotnost rastlinskih komponent, ki bi lahko negativno vplivale na rezultat (Ivanov in sod., 2020). Homogenizacija mora omogočati učinkovito lizo celic in porušiti celično steno in organele ter sprostiti znotrajcelične komponente brez zaviranja nadaljnjih korakov izolacije in detekcije (Emaus in sod., 2020). Za lizo celic se lahko uporablja kemične in mehanske metode ali kombinacijo obeh. Kemične metode se lahko izvedejo z denaturacijo ali brez, mehanske pa lahko omogočajo delno ali celovito lizo celic (Burden, 2012; Emaus in sod., 2020).

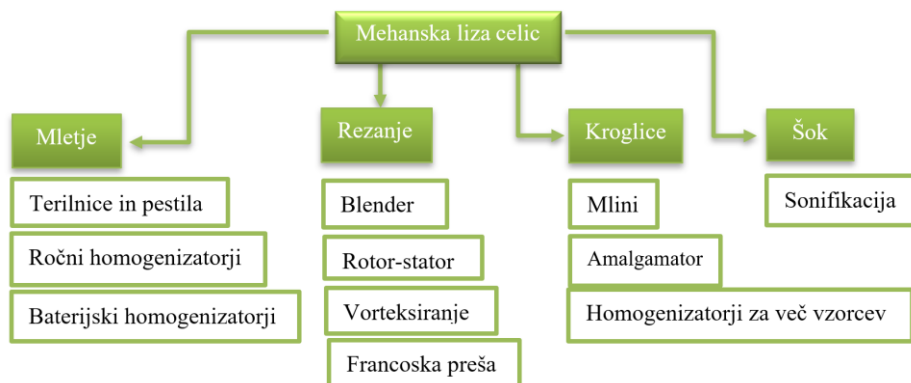
V primeru kemičnih metod se za lizo celic uporablja pufre, ki imajo določen pH in lahko nadzorujejo ionsko moč in aktivnost nukleaz ter s tem zagotavljajo stabilnost. Surfaktanti oziroma detergenti lahko povzročijo lizo bioloških membran, saj so sestavljeni iz hidrofobnega repa in hidrofilne glave. Po učinkovitosti se med sabo lahko precej razlikujejo, kar je odvisno predvsem od tipa hidrofilnega dela (ionski ali ne-ionski) (preglednica 1) (Burden, 2012). Za izolacijo NA iz rastlin se najpogosteje uporablja kationski detergent CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid) (Burden, 2012; Ivanov in sod., 2020). Poleg detergentov se za kemijsko lizo celic uporabljajo kaotropi, encimi in drugi aditivi, kot so na primer stabilizatorji (sukroza, sorbitol...), ki še dodatno pomagajo pri učinkovitejši lizi celic (Burden, 2012).

Preglednica 1: Seznam detergentov uporabljenih za lizo celic in njihove značilnosti (povzeto po Burden, 2012).

Detergent	Tip	Značilnosti	Uporabljena koncentracija
SDS (natrijev dodecilsulfat)	anionski	Močan detergent, ki uniči membrano in denaturira proteine.	Od 1 do 10 %
Natrijev deoksiholat	kationski	Spada med žolčne kisline. Uporablja se za raztapljanje proteinov in prekinitev interakcij med proteini.	0,5 %
CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid)	kationski	Uporablja se za izolacijo DNA iz rastlin. Polisaharidi iz rastlin so netopni v CTAB pufru in visokih koncentracijah NaCl. Zato se lahko DNA loči od rastlinskih karbohidratov.	2 %
NP-40 (nonil fenoksi-polietoksi-etanol)	ne-ionski	Blagi surfaktant, ki lahko raztopi citoplazemsko membrano. Jedrne membrane ne raztopi, zato se ga uporablja za njegovo izolacijo.	Od 0,1 do 1 %
Triton X-100	ne-ionski	Blagi surfaktant, ki ima polietilen oksid za hidrofilno skupino in tetrametilbutil fenilno skupino za hidrofoben del.	Za lizo do 5 %, za spiranje od 0,1 do 0,5 %

Detergent	Tip	Značilnosti	Uporabljena koncentracija
Tween 20	ne-ionski	Surfaktant, ki je modificiran sorbitol prijazen do biomolekul in zato pogosto uporabljen v hrani, farmaciji in raztopinah za spiranje.	0,1 %

Za mehansko lizo celic se lahko uporablja različne načine homogenizacije, od mletja, rezanja, uporabe kroglic in šoka (slika 1) (Burden, 2012; Ivanov in sod., 2020). Obstaja ogromno število metod (omenjene so samo nekatere), za večjo učinkovitost lize pa se pogosto uporabljajo kombinacije različnih načinov in tipov homogenizacije. Mletje (ang. grinding) se lahko uporablja za mokre, suhe, zamrznjene, sveže in trde vzorce. Zaradi trenja lahko pride do segrevanja, zato se vzorce pogosto prej zamrzne ali pa se uporabi tekoči dušik. Za mletje so še vedno pogosto v uporabi terilnice in pestila, obstaja pa tudi veliko različnih ročnih homogenizatorjev (stekleni, plastična in kovinska pestila...). Prednost je, da so cenovno ugodni in enostavni za uporabo, težavo pa ponovno predstavlja analiza večjega števila vzorcev. V tem primeru se lahko uporabi baterijske ročne homogenizatorje, ki so hitrejši ampak še vedno dovolj praktični, da se jih lahko uporabi tudi zunaj laboratorija (Burden, 2012).



Slika 1: Shematski prikaz načinov mehanske lize celic. Mletje, rezanje, uporaba kroglic in šoka. Povzeto po Burden, 2012.

Drug način mehanske lize celic predstavlja rezanje (ang. shearing), ki se izvaja z uporabo sekljalnikov (»blender«), rotor-stator naprav (podobno paličnem mešalniku), vorteksov (v kombinaciji s kroglicami), francoske preše (za tekoče vzorce) in številnih drugih orodjih. Eden izmed pogosto uporabljenih načinov mehanske lize celic je uporaba kroglic, ki so lahko različnih velikosti in materialov (kovinske, silikatne, keramične...). Za rastline se priporoča uporaba 2,8 do 3 mm velikih kroglic v mikrocentrifugirkah z manj kot 50 mg vzorca in do 500 µL pufru. Za mešanje se lahko uporabljajo »amalgmatorji« (ang. dental mixers), ki tubice zaklenejo v malo »stresajočo roko«, ki hitro oscilira. Za več vzorcev (do 24) obstajajo homogenizatorji (npr. FastPrep®), ki delujejo na podoben način kot

centrifuga, le da oscilirajo pri visokih hitrostih (8000 rpm). Za analiziranje večjega števila vzorcev se uporabljajo »mešalni mlini« (ang. mixer mills), ki vzorce držijo v stojalih in stresajo v obliki številke 8 (npr. Geno/Grinder®). Za nekatere vzorce je primerna uporaba šoka, kjer s pomočjo sonifikacije in pritiska v nekaj sekundah povzroči lizo celic (Burden, 2012). Na trgu je dostopnih veliko različnih tipov homogenizatorjev, ki se uporabljajo za specifične aplikacije, zato je težko izbrati pravega.

Z namenom razvoja metode CRISPR/Cas12a-RT-RPA za hitro detekcijo viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na terenu smo v raziskavi primerjali pet različnih ročnih homogenizatorjev (plastično in kovinsko pestilo, baterijski homogenizator, kovinske kroglice, Bioreba homogenizator z vrečko) v treh različnih pufrih. Vzorce smo na prisotnost viroida CBCVd in HLVd analizirali s RT-PCR v realnem času za sočasno določanje (duplex, duRT-qPCR in multiplex, mRT-qPCR). Dodatno smo HLVd testirali z RT-RPA (pomnoževanje z rekombinazno polimerazo, RPA) s komercialnim kompletom reagentov AmplifyRP® XRT for HLVd. Primerjava različnih načinov homogenizacije nam bo omogočila razvoj hitre izolacije, ki bo v kombinaciji z razvojem metode za hitro določanje viroidov primerna tudi za uporabo na terenu.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za analizo primerjave homogenizatorjev smo uporabili hmelj sorte Celeia (CEL), Aurora (AU) in Bobek (BO) okužen z viroidoma CBCVd in HLVd. Kot negativno kontrolo smo uporabili hmelj sorte Celeia negativen na viroid CBCVd in HLVd. Rastline so del Referenčne zbirke DL in so bile na prisotnost viroidov predhodno testirane z RT-PCR PCR po ustaljenem protokolu (Guček in sod., 2019). 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 (Poskus I) ali pa smo vzorce shranili pri – 70 °C (Poskus II).

2.2 Izolacija nukleinskih kislin s CTAB reagentom

Z namenom primerjave rezultatov »hitre« izolacije z rutinsko izolacijo nukleinskih kislin, smo iz hmelja NA 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 µl 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 NA 10-krat razredčili v vodi brez RNaz (Sigma-Aldrich, ZDA).

2.3 Primerjava različnih homogenizatorjev in pufrov "hitre" izolacije

Pri »hitri izolaciji« nukleinskih kislin (NA) oziroma pripravi rastlinskega soka za direktno določanje viroidov CBCVD in HLVd smo primerjali dva poskusa (PI in PII). V prvem poskusu (PI) smo primerjali pet različnih homogenizatorjev:

- plastično pestilo (Kimble, DWK Life Sciences, ZDA)
- kovinsko pestilo (Kimble)
- baterijski homogenizator (Kimble; uporaba v kombinaciji s plastičnimi pestili Kimble)
- kovinske kroglice (velikost 5 mm, Qiagen, Nemčija)
- Bioreba homogenizator z vrečko (Bioreba, Švica)

Vzorci različnih sort hmelja smo z različnimi homogenizatorji zmleli v vodi tretirani z DEPC (Merck, Nemčija). Na ta način smo želeli preveriti učinkovitost homogenizatorjev. V drugem poskusu (PII) smo z istimi homogenizatorji primerjali dva različna pufra GEB3 in GEB4 (General Extextraction Buffer 3 ali 4, Agdia, ZDA), z namenom, da ugotovimo vpliv pufrov na homogenizacijo. Hkrati smo med poskusi analizirali tudi vpliv svežega (PI) in zamrznjenega tkiva (PII) hmelja na homogenizacijo. Dodatno smo za namene testiranja HLVd z RT-RPA metodo izvedli še primerjavo dveh načinov mletja (točka 2.5).

2.3.1 POSKUS I (PI)

Pri prvem poskusu (PI) primerjave različnih homogenizatorjev pri »hitri« izolaciji smo vzorce hmelja za direktno določanje pripravili po modificiranem protokolu naših predhodnih raziskav (Guček in Radišek, 2023a). Svežemu vzorec listov hmelja (50 mg) smo za lažje mletje dodali 1 mL vode tretirane z DEPC (Merck, Nemčija). Vsak vzorec smo analizirali v dveh tehničnih ponovitvah. V primeru plastičnega (okrajšava S1) in kovinskega (S2) pestila, baterijskega homogenizatorja (S3) in kovinskih kroglic (S4) smo vzorec mleli v vodi tretirani z DEPC v 1,5 mL mikrocentrifugirski (slika 2). V primeru Bioreba ročnega homogenizatorja (Bioreba, Švica) smo vzorec zdrobili v vrečki za ekstrakcijo (univerzalna velikost, Bioreba, Švica) in sok prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Vse vzorce smo centrifugirali 4 minute pri 12 700 rpm (vrtljajih na minuto) in 4 °C. Supernatant smo nato odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in ostalo zavrgli. Vzorce smo razredčili v 10 mM Tris (Invitrogen, ZDA), uporabili smo 20- in 100-kratno redčitev. Vzorce smo z mRT-qPCR in duRT-qPCR analizirali še isti dan.

2.3.2 POSKUS II (PII)

Pri drugem poskusu (PII) primerjave različnih homogenizatorjev pri »hitri« izolaciji smo vzorce hmelja analizirali po istem postopku kot pri prvem poskusu. Razlika je bila samo, da smo uporabili zamrznjeno tkivo hmelja in namesto vode tretirane z DEPC dodali dva različna pufra GEB3 in GEB4 (Agdia, slika 3). Pufer GEB3 in GEB4 smo pripravili po navodilih proizvajalca in umerili pH za GEB3 od pH 7,2 do 7,8 in za GEB4 od pH 7,2 do 7,6. Vzorce smo po homogenizaciji in centrifugiranju 20-krat

razredčili v 10 mM Tris (Invitrogen, ZDA). Vzorce smo z duRT-qPCR, mRT-qPCR in RT-RPA analizirali še isti dan.

2.4 duRT-qPCR in mRT-qPCR reakcija

Analizo duRT-qPCR in mRT-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, Švica). Z duRT-qPCR smo sočasno analizirali prisotnost viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192 v vzorcih hmelja s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (ZO), kot predhodno opisano v Guček in Radišek (2023b). Z mRT-qPCR smo sočasno analizirali prisotnost viroidov CBCVd, HLVd in HSVd hmelja s specifičnimi ZO, kot predhodno opisano v Guček in sod. (2023). Vzorce smo analizirali z reakcijami v enem koraku, v eni ali 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.

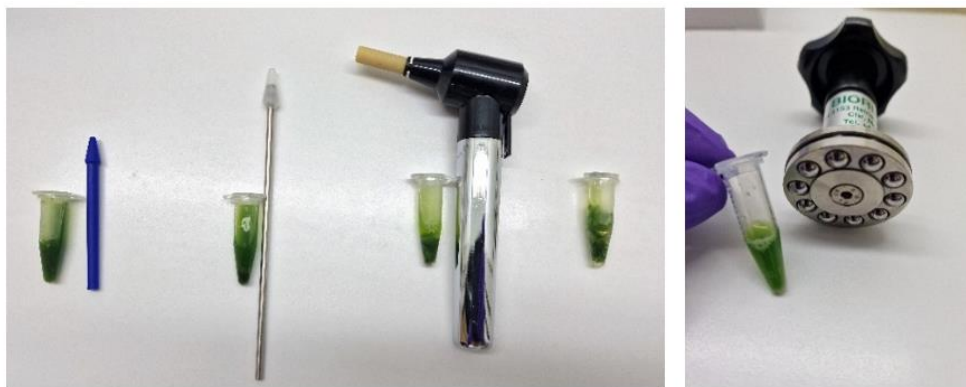
2.5 RT-RPA reakcija

RT-RPA reakcijo smo izvedli s kompletom AmplifyRP® XRT for HLVd (XCS 76500, Agdia, ZDA) v inštrumentu LightCycler96 (Roche). Reakcijo smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca in vzorce pomnoževali 20 min pri 42 °C. Pri prvem testiranju RT-RPA kita za določanje HLVd smo primerjali dva načina homogenizacije vzorcev (A1 in A2). V prvem primeru smo za analizo uporabili 0,15 g listov hmelja (hmelj sorte Celeia (CEL) okužen s CBCVd in HLVd, hmelj sorte Celeia brez virusov in viroidov (BVV)), ki smo jih homogenizirali v priloženi vrečki s pufrom (A1). V drugem primeru smo 0,05 g listov hmelja (CEL, BVV) homogenizirali s plastičnim pestilom v epici v GEB3 pufru (Agdia) (A2). V nadaljevanju smo z RT-RPA na HLVd analizirali vzorce hmelja homogenizirane v pufru GEB3, ki so bili del PII.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 POSKUS I

V prvem poskusu primerjave različnih načinov homogenizacije smo pri mletju v vodi tretirani z DEPC dobili zelo različne stopnje homogenizacije (slika 2). V primeru uporabe plastičnega in kovinskega pestila smo lahko liste hmelja zmleli na manjše delce in z mešanjem in drgnjenjem ob rob mikrocentrifugirke dobili dobro homogen vzorec. Ves pufer smo dodali že na začetku mletja, kar nam je v nekaterih primerih povzročalo težave, ker je zaradi intenzivnega mešanja pufer šel čez rob mikrocentrifugirke. Podobne težave nam je povzročala uporaba baterijskega homogenizatorja, kjer je zaradi vrtnčenja med mešanjem prišlo do špricanja in uhajanja pufra čez rob. Temu bi se lahko izognili s postopnim dodajanjem manjših količin pufra. V primeru uporabe baterijskega homogenizatorja smo liste zmleli na manjše dele, vendar ne tako homogeno kot s samimi pestili. Težave smo imeli s samim postopkom, ker nam je nastavek uhajal iz ročaja, zaradi premočnega mešanja.



Slika 2: Prikaz vzorcev hmelja zmletih z vodo tretirano z DEPC z uporabo različnih ročnih homogenizatorjev (PI). Od leve proti desni plastično in kovinsko pestilo, baterijski homogenizator, kovinska kroglica in Bioreba homogenizator.

Ko smo za mešanje uporabili kovinske kroglice smo si pomagali z uporabo vorteksa, ker je bilo zaradi količine tkiva in velikosti kroglice ročno težko izvesti mešanje. Glede na ostale načine mletja, se je v tem primeru tkivo najmanj zmelalo (slika 2). Za boljšo homogenost vzorca bi najverjetneje potrebovali hitrejša mešanja z uporabo homogenizatorja. Pri uporabi ročnega homogenizatorja in Bioreba vrečke smo dobili najbolj homogen vzorec (slika 2), ki pa ga je bilo nekoliko težje s pipeto prenesti iz vrečke v mikrocentrifugirko, zaradi penjenja in razporeditve po celi vrečki. Razlika v stopnji homogenizacije je bila tudi zaradi razlik v tkivu, v primeru sorte Aurora in Celeia smo imeli na voljo namreč bolj suhe in starejše liste, v primeru sorte Bobek pa mehkejše in mlajše.

Pri analizi rezultatov smo z mRT-qPCR dobili zelo malo pozitivnih vrednosti pri viroidu CBCVd, pri viroidu HLVd pa smo dobili največ pozitivnih vrednosti pri uporabi kovinskih kroglic, baterijskega homogenizatorja in kovinskega pestila (preglednica 2). V primeru plastičnega pestila in Bioreba homogenizatorja nismo dobili pozitivnih vrednosti, razlog je najverjetneje v prisotnih inhibitorjih. Zaradi zelo dobre homogenizacije tkiva je bilo v homogenatu prisotnih več inhibitorjev, ki so imeli negativen vpliv na mRT-qPCR reakcijo. Z mRT-qPCR reakcijo smo analizirali tudi vzorce izolirane s CTAB reagentom in pri vseh dobili pozitiven signale s Cq-vrednostmi med 13 in 16 (preglednica 2), kar pomeni, da je bila v vzorcih prisotna velika koncentracija viroidov CBCVd in HLVd. V primeru duRT-qPCR smo vzorce analizirali pri 20- in 100-kratni redčitvi in zaradi boljše občutljivosti metode dobili več pozitivnih vrednosti za CBCVd (preglednica 2). Pri analizi interne kontrole mRNA1192, ki nam pove informacijo o kvaliteti izolirane RNA, smo skoraj pri vseh vzorcih dobili pozitivne vrednosti, ki pa so precej višje kot v predhodnih primerih, ko smo analizirali vzorce izolirane s CTAB ali komercialnimi kiti (Guček in Radišek, 2023a). Rezultati za viroid CBCVd so podobni kot pri analizi HLVd viroida, razen da smo v tem primeru bili uspešni tudi pri uporabi plastičnega pestila in Bioreba homogenizatorja. Cq-vrednosti za homogenizacijo v vodi tretirani z DEPC so precej višje kot s standardno izolacijo s CTAB reagentom, kljub temu so lahko z vsemi načini uspešno potrdili prisotnost viroidov v vzorcih.

Preglednica 2: Rezultati analize vzorcev hmelja z različnimi homogenizatorji v vodi tretirani z DEPC z duRT-qPCR in mRT-qPCR. Podane so povprečne Cq-vrednosti za negativne vzorce hmelja (BVV) in različne sorte hmelja okužene s CBCVd in HLVd. Za duRT-qPCR so podani rezultati za 20- in 100-kratno redčitev. Obarvani okvirčki predstavljajo pozitivne rezultate za CBCVd in HLVd.

Oznaka vzorca	duRT-qPCR				mRT-qPCR	
	Cq CBCVd 20x	Cq CBCVd 100x	Cq mRNA1192 20x	Cq mRNA1192 100x	Cq CBCVd 20x	Cq HLVd 20x
Plastično pestilo (S1)						
BVV	-	-	31,88	33,52	-	-
BVV	-	-	32,77	35,54	-	-
AU	27,90	29,54	33,27	35,67	-	-
AU	26,37	26,89	34,12	35,42	-	-
CEL	29,99	-	32,22	33,28	-	-
CEL	-	-	31,56	33,30	-	-
BO	28,15	28,60	31,06	31,79	-	-
BO	24,59	25,29	30,73	32,38	-	-
Kovinsko pestilo (S2)						
BVV	-	-	33,77	-	-	-
BVV	-	-	32,34	34,09	-	-
AU	23,72	23,96	32,73	32,65	-	26,09
AU	28,20	29,06	33,56	35,46	-	27,43
CEL	26,47	26,72	30,11	31,54	-	-
CEL	-	-	35,08	34,50	-	-
BO	24,50	25,06	30,59	31,72	-	-
BO	26,43	27,51	31,92	32,47	-	30,05
KIMBLE baterijski (S3)						
BVV	-	-	33,19	35,96	-	-
BVV	-	-	33,84	33,53	-	-
AU	26,73	27,91	32,09	32,63	-	27,80
AU	28,61	28,40	-	36,07	-	-
CEL	26,58	26,94	29,82	31,19	-	-
CEL	25,89	26,75	30,46	31,57	-	25,23
BO	24,75	26,32	30,83	32,83	24,74	25,00
BO	24,42	25,93	30,44	31,83	24,43	24,85

Oznaka vzorca	duRT-qPCR				mRT-qPCR	
	Cq CBCVd 20x	Cq CBCVd 100x	Cq mRNA1192 20x	Cq mRNA1192 100x	Cq CBCVd 20x	Cq HLVd 20x
Kovinske kroglice (S4)						
BVV	-	-	-	-	-	-
BVV	-	-	34,28	35,09	-	-
AU	29,33	-	34,97	-	-	29,80
AU	29,47	-	34,48	-	-	30,13
CEL	29,49	-	35,54	-	-	30,21
CEL	27,51	28,59	30,76	33,34	-	26,90
BO	27,41	29,45	35,00	35,46	26,78	27,05
BO	26,97	27,80	32,09	34,03	25,99	27,24
Bioreba vrečka (B1)						
BVV	-	-	33,20	33,89	-	-
BVV	-	-	34,21	30,28	-	-
AU	27,30	27,35	31,31	31,59	-	-
AU	27,19	26,94	30,96	31,22	-	-
CEL	-	-	28,31	30,97	-	-
CEL	-	-	30,05	31,34	-	-
BO	24,39	25,65	27,32	28,83	-	-
BO	25,07	25,37	27,59	28,36	-	-
CTAB						
BVV	/	/	/	/	-	-
BVV	/	/	/	/	-	-
AU	/	/	/	/	16,91	16,50
AU	/	/	/	/	16,33	16,17
CEL	/	/	/	/	16,37	15,90
CEL	/	/	/	/	15,70	15,45
BO	/	/	/	/	14,22	13,98
BO	/	/	/	/	14,99	14,78
Kontrole						
CBCVd	11,95	/	16,69	/	13,65	-
gBI CBCVd	9,71	/	-	/	9,92	-
HLVd	/	/	/	/	-	16,37

Oznaka vzorca	duRT-qPCR				mRT-qPCR	
	Cq CBCVd 20x	Cq CBCVd 100x	Cq mRNA1192 20x	Cq mRNA1192 100x	Cq CBCVd 20x	Cq HLVd 20x
gBI HLVd	/	/	/	/	-	9,24
BVV	-	/	20,15	/	-	-
H2O	-	/	-	/	-	-

*BVV, hmelj brez virusov in viroidov; AU, hmelj sorte Aurora okužen s CBCVd in HLVd; CEL, hmelj sorte Celeia okužen s CBCVd in HLVd; BO, hmelj sorte Bobek okužen s CBCVd in HLVd; CBCVd, hmelj okužen s CBCVd- pozitivna kontrola amplifikacije; gBI, gBlocks umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd ali HLVd; H2O, voda brez nukleaz- negativna kontrola amplifikacije; -, negativen rezultat; /, ni bilo testirano

3.2 POSKUS II

Pri analizi vzorcev hmelja s pufroma GEB3 in GEB4 smo pri drugem poskusu (PII) dobili glede stopnje homogenizacije podobne rezultate kot pri PI (slika 3). Pri večini vzorcev nismo dobili tako homogenih vzorcev kot pri PI. Glavno razliko glede na PI je predstavljala uporaba zamrznjenega tkiva, ki je negativno vplivala na mletje, ker se vzorci niso tako lepo zmleli. Zamrznjeno tkivo nekaterih vzorcev se je zaradi večjega števila analiz pred postopkom mletja delno odtalilo in postalo težavno za mletje z uporabo pestil. Težavo je predstavljalo tudi penjenje vzorcev zaradi pufrov GEB3 in GEB4 (slika 3), ki smo jim v postopku priprave dodali Tween 20 (Agdia).



Slika 3: Različni homogenizatorji od leve proti desni. Plastično in kovinsko pestilo, baterijski homogenizator, kovinska kroglica, ročni homogenizator z Bioreba vrečko. Prikaz homogenizacije z različnimi pestili in končnega homogenata listov hmelja v pufrih GEB3 in GEB4.

Vzorci smo analizirali z mRT-qPCR in duRT-qPCR in dobili veliko razliko med rezultati vzorcev homogeniziranimi z GEB3 in GEB4 pufrom (preglednica 3). Pri GEB3 pufru smo dobili pozitivne vrednosti pri vseh homogenizatorjih in obeh viroidih. V primeru GEB4 pufra pa smo bili pri viroidu HLVd uspešni samo pri treh vzorcih in pri viroidu CBCVd pri dveh, kar je nekje 10 % učinkovitost homogenizacije. Glede na to, da smo uporabili iste vzorce in homogenizatorje in oba pufra uporabljali sočasno, sklepamo, da je lahko razlog v neuspešni detekciji samo v uporabi pufra GEB4. Ker je pufer komercialno dostopen ne vemo kaj so njegove sestavine, predvidevamo pa, da je pufru GEB4 dodana neka komponenta, ki preprečuje uspešno detekcijo viroidov v hmelju. Rezultati nas ne presenečajo, ker smo v predhodnih testiranjih pufrov GEB3 in GEB4 (neobjavljeno) dobili primerljive rezultate in bili večkrat neuspešni pri določanju viroidov. Takrat smo mislili, da je bil razlog v uporabi neustreznega tkiva oziroma redčenju homogenata v vodi namesto Tris, ampak je bil vzrok v sestavi pufra. Vpliv pH v tem primeru najverjetneje nima vloge, ker je razlika med pufroma minimalna.

Preglednica 3: Rezultati analize vzorcev hmelja z različnimi homogenizatorji v GEB3 in GEB4 pufru z duRT-qPCR in mRT-qPCR za CBCVd in HLVd. Podane so Cq-vrednosti za negativne vzorce hmelja (BVV) in različne sorte hmelja okužene s CBCVd in HLVd pri 20-kratni redčitvi vzorcev. Podane so tudi vrednosti fluorescence za RT-RPA za HLVd za vzorce v GEB3 pufru. Obarvani okvirčki predstavljajo pozitivne rezultate za CBCVd in HLVd.

Oznaka vzorca	duRT-qPCR		mRT-qPCR		RT-RPA
	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Cq CBCVd	Cq HLVd	Fluorescenca za HLVd (au)
GEB3+ plastično pestilo (S1)					
BVV S1-G3	-	-	-	-	0,0907035
AU S1-G3	24,67	-	25,46	23,97	0,116957
CEL S1-G3	21,52	-	21,39	21,09	0,225781
BO S1-G3	25,55	-	-	31,78	0,0923695
GEB3+ kovinsko pestilo (S2)					
BVV S2-G3	-	-	-	-	0,11248
AU S2-G3	24,51	-	25,29	25,93	0,127637
CEL S2-G3	21,70	-	21,65	21,08	0,203339
BO S2-G3	24,66	-	25,63	28,25	0,093333
GEB3+ KIMBLE baterijski (S3)					
BVV S3-G3	-	-	-	-	0,107973
AU S3-G3	22,38	-	22,57	22,11	0,184288
CEL S3-G3	21,20	-	21,35	19,93	0,273003
BO S3-G3	-	-	-	-	0,0883392
GEB3+ kovinske kroglice (S4)					
BVV S4-G3	-	-	-	-	0,148126
AU S4-G3	-	-	-	26,40	0,0947697

Oznaka vzorca	duRT-qPCR		mRT-qPCR		RT-RPA
	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Cq CBCVd	Cq HLVD	Fluorescenca za HLVD (au)
CEL S4-G3	25,64	-	-	25,09	0,1969
BO S4-G3	25,38	-	-	26,86	0,106099
Bioreba vrečka+GEB3 (B1)					
BVV B1-G3	-	29,46	-	-	0,054335
AU B1-G3	-	-	-	-	0,0718663
CEL B1-G3	23,10	-	23,66	22,29	0,193504
BO B1-G3	-	30,47	-	-	0,0723803
GEB4+ plastično pestilo (S1)					
BVV S1-G4	-	-	-	-	/
AU S1-G4	-	-	-	-	/
CEL S1-G4	-	-	-	-	/
BO S1-G4	-	-	-	32,10	/
GEB4+ kovinsko pestilo (S2)					
BVV S2-G4	-	-	-	-	/
AU S2-G4	-	-	-	-	/
CEL S2-G4	-	-	-	-	/
BO S2-G4	-	-	-	-	/
GEB4+ KIMBLE baterijski (S3)					
BVV S3-G4	-	-	-	-	/
AU S3-G4	-	-	-	-	/
CEL S3-G4	-	-	-	-	/
BO S3-G4	-	-	-	27,95	/
GEB4+ kovinske kroglice (S4)					
BVV S4-G4	-	-	-	-	/
AU S4-G4	-	-	-	-	/
CEL S4-G4	25,92	-	-	27,98	/
BO S4-G4	-	-	-	-	/
Bioreba vrečka+GEB4 (B1)					
BVV B1-G4	-	25,30	-	-	/
AU B1-G4	-	-	-	-	/
CEL B1-G4	24,41	-	-	-	/
BO B1-G4	-	27,52	-	-	/
Kontrole					
CBCVd	14,71	18,32	-	/	/

Oznaka vzorca	duRT-qPCR		mRT-qPCR		RT-RPA
	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Cq CBCVd	Cq HLVd	Fluorescenca za HLVd (au)
gBlocks CBCVd	10,49	-	08,45	/	/
BVV	-	21,13	/	/	/
H2O	-	-	/	/	/
HLVd	/	/	-	17,19	/
gBlocks HLVd	/	/	-	14,52	/
Tris 10 mM	/	/	-	-	/

*BVV, hmelj brez virusov in viroidov; AU, hmelj sorte Aurora okužen s CBCVd in HLVd; CEL, hmelj sorte Celeia okužen s CBCVd in HLVd; BO, hmelj sorte Bobek okužen s CBCVd in HLVd; CBCVd, hmelj okužen s CBCVd- pozitivna kontrola amplifikacije; gBl, gBlocks umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd ali HLVd; H2O, voda brez nukleaz- negativna kontrola amplifikacije; -, negativen rezultat; /, ni bilo testirano

Kot pričakovano smo z duRT-qPCR dobili več pozitivnih vrednosti za viroid CBCVd, ker je metoda bolj občutljiva (preglednica 3). Viroid CBCVd smo uspešno določili pri vseh pozitivnih vzorcih z uporabo plastičnega in kovinskega pestila. Pri baterijskem homogenizatorju in kroglicah smo bili malo manj uspešni in najmanj pri uporabi Bioreba homogenizatorja. Za viroid HLVd smo dobili vse ustrezne rezultate z uporabo plastičnega in kovinskega pestila in kovinskih kroglic. Manj uspešni smo bili pri uporabi baterijskega in Bioreba homogenizatorja. Rezultati se med viroidoma CBCVd in HLVd precej ujemajo, razlike v Cq vrednostih so večje med vzorci, različnih sort, ker je bila že v osnovi razlika med koncentracijami viroidov v tkivih. Zanimivo je, da smo za isti vzorec, naprimer hmelj sorte Celeia (CEL) z uporabo različnih homogenizatorjev (plastično, kovinsko, baterijsko) dobili enake Cq-vrednosti za CBCVd in HLVd, iz česar lahko sklepamo, da omenjeni homogenizatorji omogočajo primerljivo stopnjo homogenizacije. Primerljive so tudi vrednosti za sorto Aurora, pri sorti Bobek pa smo že v osnovi imeli višje Cq-vrednosti, posledično pri uporabi baterijskega homogenizatorja nismo dobili pozitivne vrednosti. Koncentracija viroida CBCVd je bila v tkivu sorte Celeia precej višja kot pri ostalih, ker smo pri vzorcu CEL dobili pozitivne signale tudi pri Bioreba homogenizatorju pri GEB3 in GEB4 pufru, kot pri kovinskih kroglicah pri GEB4 pufru.

Če rezultate primerjamo s prvim poskusom (preglednica 2), kjer smo prav tako uspešno določili viroid CBCVd z vsemi homogenizatorji, lahko ugotovimo, da so Cq-vrednosti iz PI precej višje kot pri PII (preglednica 3). Uporaba pufru GEB3 je omogočila večjo stabilizacijo komponent in zmanjšala vpliv inhibitorjev, ker smo dobili z GEB3 več pozitivnih vrednosti. Vendar pa je uporaba pufru GEB3 glede na PI negativno vplivala na detekcijo interne kontrole mRNA1192, ker smo dobili samo dva pozitivna signala. Razlog bi lahko bil tudi v uporabi zamrznjenega tkiva, ampak glede na to, da z rednimi analizami pogosto testiramo tkivo, ki je zamrznjeno in odtaljeno, in interna kontrola vseeno deluje, sklepamo, da bi lahko bil razlog v uporabi pufru GEB3. Glede na rezultate obeh poskusov lahko sklepamo, da lahko viroida CBCVd in HLVd v hmelju z RT-qPCR uspešno detektiramo po

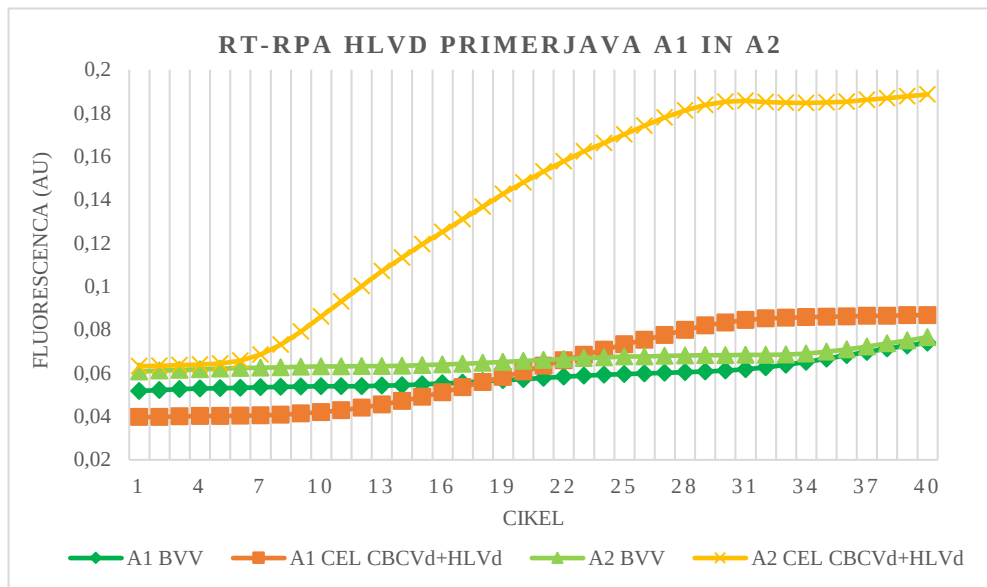
homogenizaciji s katerimkoli od uporabljenih ročnih homogenizatorjev. Na rezultate ima velik vpliv uporaba ustreznega pufru, uporabljeno tkivo (mehko/krhko/staro...) in kot pričakovano, sama koncentracija viroida v vzorcu. Za detekcijo viroidov v hmelju smo potrdili ustreznost pufru GEB3 in neustreznost pufru GEB4. Z vodo tretirano z DEPC smo lahko uspešno določili viroide ampak smo dobili zelo visoke Cq-vrednosti, ki so bile precej višje kot s CTAB reagentom, kar lahko vodi v napačno interpretacijo in lažno negativne rezultate. Uporaba pufru GEB3 je posledično primernejša. Razlika med posameznimi ročnimi homogenizatorji je bila predvsem v stopnji homogenizacije, ki pa se je razlikovala tudi zaradi razlik v uporabljenem tkivu. Zanimivo je, da smo lahko viroide uspešno določili že ob manjši stopnji homogenizacije, ko smo na primer uporabili kovinske kroglice, hkrati pa smo bili neuspešni pri Bioreba vrečkah, kjer smo dobili najbolj homogene vzorce. Tako da, glede na stopnjo homogenizacije težko govorimo o vplivu na rezultat. Glede na rezultate sklepamo, da je najboljša neke vrste srednja pot. Pri uporabi pufru GEB3 smo dobili najboljše rezultate pri plastičnem in kovinskem pestilu, ki imata slabšo stopnjo homogenizacije kot Bioreba vrečke, ampak boljše kot kovinske kroglice in baterijski homogenizator. Če povzamemo, v primeru, da liza celic ni zadostna tvegamo, da se v pufer ne sprosti dovolj viroida in posledično, zaradi slabše občutljivosti metode dobimo lažno negativne rezultate. V primeru zelo dobre homogenizacije pa se zaradi uspešne lize celic v pufer sprosti tudi veliko drugih komponent, ki inhibirajo reakcijo in ponovno dobimo lažno negativne rezultate. Rešitev je tako v uporabi plastičnih in kovinskih pestil, ki zagotovijo ustrezno homogenizacijo in pozitivne rezultate.

Rezultate težko primerjamo s predhodnimi objavami, ker je, kot že omenjeno, postopek homogenizacije v objavljenih protokolih zelo pogosto slabo opisan. Ker se sklepa, da je vpliv homogenizacije na poskus minimalen, se na ta del ne polaga veliko opazenj. Raziskovalci, ki na novo razvijajo metode imajo tako težave kje dobili informacije o ustrezni izbiri metode homogenizacije. Ker je med laboratoriji zelo velika variacija v metodologiji, je potrebno za uspešno detekcijo patogenov postopek homogenizacije dobro optimizirati. Izbira ustreznega orodja, kemije in metode lahko ima zelo velik vpliv na končni rezultat (Burden, 2012).

3.3 RT-RPA

Dodatno smo vzorce na prisotnost viroida HLVd analizirali z metodo RT-RPA in testirali komercialno dostopen kit AmplifyRP® XRT. Zaradi enostavnosti uporabe RT-RPA kita smo uspeli viroid HLVd v vzorcu določiti v 30 minutah. Vzorec smo najprej zmleli (5 min), zmešali z reagenti proizvajalca (5 min) in nato pomnožili pri konstantni temperaturi (20 min). Rezultate smo spremljali v realnem času in za rezultat dobili krivuljo, ki je pomenila povišanje fluorescence (slika 4). Metoda je podobna RT-qPCR, vendar v tem primeru nimamo Cq-vrednosti ampak vrednosti fluorescence. Krivuljo dobimo, če se nam fluorescenca ustrezno poviša, kar pomeni, da je v vzorcu prisotna tarča, ki je viroid HLVd. V prvem delu testiranja kita smo primerjali dva različna načina homogenizacije (A1 in A2) in dobili v vzorcih okuženega hmelja (CEL CBCVd+HLVd) višje vrednosti fluorescence kot pri neokuženem hmelju (BVV), kjer je vrednost ostala nespremenjena skoraj do konca

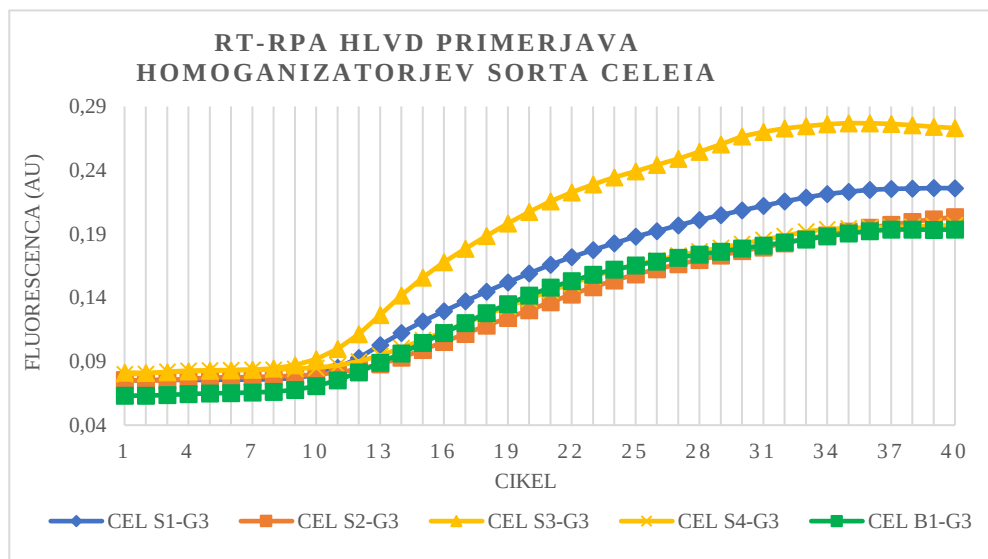
reakcije. Glede na primerjavo načinov homogenizacije smo dobili pri A1, kjer smo uporabili ročni homogenizator Bioreba in priloženo vrečko s pufrom proizvajalca, precej nižje vrednosti, kot pa pri uporabi načina A2 (slika 4). Pri A2 smo vzorce zmleli v mikrocentrifugirki z GEB3 pufrom in dobili za več kot 2-krat višjo vrednost fluorescence (slika 4). Glede na vrednosti fluorescence v negativnih vzorcih bi za način A1 težko z gotovostjo trdili, da je vzorec pozitiven, ker je razlika v maksimalni vrednosti fluorescence zanemarljiva.



Slika 4: Rezultati primerjave RT-RPA za določanje HLVD v zdravih vzorcih (BVV) in okuženih vzorcih (CEL, CBCVd+HLVd) hmelja z dvema načinoma homogenizacije (A1 in A2). Podane so vrednosti fluorescence v različnih časovnih točkah.

Glede na rezultate smo se odločili, da v drugem delu testiramo vzorce zmlete v GEB3 pufu. Z RT-RPA smo na viroid HLVD testirali vzorce poskusa II (PII) (preglednica 3) in dobili rezultate primerljive z RT-qPCR. Potrdili smo manjšo občutljivost metode RT-PCR, ker smo lahko uspešno detektirali samo vzorce s Cq vrednostjo nižjo kot 26. Pri uporabi nekaterih homogenizatorjev, kot sta kovinsko pestilo in kovinske kroglice smo dobili v negativnih vzorcih visoke vrednosti fluorescence, kar kaže na kontaminacijo. Razlog bi lahko bil v predhodni uporabi pestila in kroglic za mletje pozitivnih vzorcev. Kljub temu, da smo jih pred uporabo razkužili, bi lahko ostanki vplivali na lažno pozitiven rezultat. Glede na to, da pri občutljivejšem RT-qPCR nismo dobili nobenih vrednosti, bi lahko bil razlog tudi v kontaminaciji med pipetiranjem RT-RPA reakcije. Najvišje vrednosti fluorescence za viroid HLVD smo dobili za vzorce CEL pri uporabi baterijskega homogenizatorja in plastičnega pestila (slika 5). Pri uporabi Bioreba homogenizatorja, kovinskih kroglic in kovinskega pestila smo dobili primerljive vrednosti fluorescence. Tudi za vzorec AU smo dobili najvišje vrednosti pri uporabi baterijskega homogenizatorja (preglednica 3). Glede na rezultate lahko sklepamo, da je pri uporabi RT-RPA

metode za detekcijo viroida HLVD najučinkovitejša uporaba baterijskega homogenizatorja in plastičnega pestila. Težavo zagotovo predstavlja kontaminacija, katere vpliv bi lahko zmanjšali z dodatno optimizacijo celotnega postopka uporabe komercialno dostopnega kita AmplifyRP® XRT.



Slika 5: Rezultati primerjave RT-RPA za določanje viroida HLVD z različnimi homogenizatorji na vzorcih hmelja sorte Celeia okuženega s CBCVD in HLVD. Podane so vrednosti fluorescence v različnih časovnih točkah za homogenizacijo v pufru GEB3 s plastičnim pestilom (S1-G3), kovinskim pestilom (S2-G3), baterijskim homogenizatorjem (S3-G3), kovinskimi kroglicami (S4-G3) in Bioreba vrečkami (B1-G3).

4 ZAKLJUČKI

Homogenizacija je proces, ki se mu navadno ne posveča veliko pozornosti. Vsak laboratorij proces izvaja po svojih najboljših zmožnostih, glede na izkušnje pridobljene med delom. Zaradi finančnih omejitev in posledično poenostavljenih načinov homogenizacije, ta del izolacije NA pogosto predstavlja ozko grlo in posledično časovno obremenitev procesa izolacije. Z izbiro ustreznega orodja, kemije in metode homogenizacije lahko optimiziramo proces in dobimo zanesljive rezultate. Z uporabo ročnih homogenizatorjev in ustreznih pufrov lahko izolacijo NA optimiziramo tudi za možnost uporabe na terenu.

V raziskavi smo primerjali pet različnih ročnih homogenizatorjev in tri pufre. Z namenom razvoja metode CRISPR/Cas12a-RT-RPA za hitro detekcijo viroida CBCVD smo želeli optimizirati metodo homogenizacije, ki bi bila primerna za uporabo na terenu. Pri uporabi različnih homogenizatorjev smo viroide v vzorcih hmelja uspešno potrdili pri vseh načinih, čeprav so bile Cq-vrednosti višje kot pri standardni izolaciji s CTAB reagentom. Za potrditev prisotnosti viroidov v vzorcih je zadostovala že manjša stopnja homogenizacije z uporabo kovinskih kroglic ali baterijskega homogenizatorja. V primeru uporabe različnih pufrov smo z RT-qPCR

in RT-RPA dobili najboljše rezultate pri uporabi pufru GEB3. Pri testiranju kita AmplifyRP® XRT so se rezultati RT-RPA za HLVD ujekali z RT-qPCR. Pri nekaterih homogenizatorjih smo z RT-RPA imeli težave z nespecifičnimi signali v zdravih vzorcih hmelja. V raziskavi smo s primerjavo različnih ročnih homogenizatorjev potrdili, da lahko z vsemi homogenizatorji z uporabo ustreznega pufru dobimo zanesljive rezultate s hitro izolacijo, kar lahko uporabimo pri detekciji viroidov na terenu.

Zahvala: Avtorica se za finančno podporo zahvaljujem Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077). Za pomoč pri tehnični izvedbi procesa se avtorica še posebej zahvaljujem Sabini Gobec, Silviji Žgajner in Mariji Grašinar Ašenberger.

5 VIRI

- BioCompare. 2024. Laboratory-Homogenizers. <https://www.biocompare.com/Protein-Biochemistry/12986-Laboratory-Homogenizers/>. Dostopano:10.10.2024
- Burden, D. 2012. Guide to the Disruption of Biological Samples. *Random Primers*, 25 (12): 1–25
- Drawell. 2023. [What Are Different Types of Homogenizers and How to Select the Appropriate Type](https://www.drawellanalytical.com/what-are-different-types-of-homogenizers-and-how-to-select-the-appropriate-type/). <https://www.drawellanalytical.com/what-are-different-types-of-homogenizers-and-how-to-select-the-appropriate-type/>. Dostopano: 10.10.2024
- Emaus, M. N., Varona, M., Eitzmann, D.R., Hsieh, S., Anderson, J.L. 2020, [Nucleic acid extraction: Fundamentals of sample preparation methodologies, current advancements, and future endeavors](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993620302144). Version of Record: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993620302144>
- 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. 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
- Guček, T. in Radišek, S. 2023a, Določanje viroidov brez izolacije nukleinskih kislin: sanje ali realnost? *Hmeljarski bilten*, 30: 5-17
- Guček, T. in Radišek, S. 2023b, Validacija metode duRT-qPCR za določanje viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) na hmelju z uporabo mRNA1192 interne kontrole. *Hmeljarski bilten*, 30: 26-39
- 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](https://doi.org/10.3390/plants9101369), *Plants*, 9 (10): 1–11, <https://doi.org/10.3390/plants9101369>
- Kump, B., Javornik, B. 2016, Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers, *Plant Science*, 114: 149-158
- 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