UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Špela MASTNAK

ELIMINACIJA HMELJEVEGA LATENTNEGA VIROIDA (HLVd) PRI HMELJU (*Humulus lupulus* L.) SORTE CICERO

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Špela MASTNAK

ELIMINACIJA HMELJEVEGA LATENTNEGA VIROIDA (HLVd) PRI HMELJU (*Humulus lupulus* L.) SORTE CICERO

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ELIMINATION OF HOP LATENT VIROID (HLVd) IN HOP (*Humulus lupulus* L.) CULTIVAR CICERO

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije Oddelku za varstvo rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Zlato LUTHAR in za somentorja dr. Sebastjana RADIŠKA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: akad. prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: dr. Sebastjan RADIŠEK
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin

Član: doc. dr. Jernej JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Špela Mastnak se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani obliki.

Špela Mastnak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 633.791:578.89:632.38:57.086 (043.2)

KG žlahtnjenje rastlin/viroidi/HLVd/hmeljev latentni viroid/hmelj/*Humulus lupulus*/Cicero/brezviroidne rastline/RT-PCR metoda/agarozna elektroforeza

KK AGRIS H01/F30

AV MASTNAK, Špela

SA LUTHAR, Zlata (mentorica)/RADIŠEK, Sebastjan (somentor)

KZ SI-1000 LJUBLJANA

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

LI 2011

IN ELIMINACIJA HMELJEVEGA LATENTNEGA VIROIDA (HLVd) PRI HMELJU (*Humulus lupulus* L.) SORTE CICERO

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 43, [1] str., 4 pregl., 21 sl., 29 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Želeli smo vzgojiti brezviroidne rastline hmelja, sorte Cicero. V ta namen smo izolirali 292 meristemov v sterilnih razmerah iz terminalnih in lateralnih brstov. Kultivirali smo jih na MSB gojišču za iniciacijo brstov. Poganjke velike 2 do 3 cm smo subkultivirali na MSK gojišču za koreninjenje. Nekaj dni po inokulaciji meristemov smo ugotovili, da se jih 46,6 % ni regeneriralo. Pri izolaciji in subkultivaciji je prišlo do okužb, zaradi česar smo izgubili nadaljnjih 40,4 % meristemov in regenerantov. Neregenerirane in okužene meristeme smo zavrgli, ostalim smo odstranili kalus in jih prestavili v gojilno posodo s svežim MSK gojiščem. Po štiri do petkratnem subkultiviranju, smo jih 36 oz. 12,3 % testirali z RT-PCR metodo in agarozno elekroforezo na prisotnost HLVd viroida. Po prvem testiranju, smo dobili 24 oz. 66,7 % regenerantov, ki niso vsebovali viroida. Od teh se jih je 22 oz. 91,7 % uspešno aklimatiziralo. Te smo ponovno testirali na HLVd viroid in potrdili pri 20-ih odsotnost viroida. Na osnovi dobljenih rezultatov smo potrdili uspešnost eliminacije HLVd viroida z uporabljeno metodo. Upoštevati je potrebno sterilnost med inokulacijo in *in vitro* gojenjem ter higieno med aklimatizacijo, da ne bi prihajalo do nepotrebnih okužb gojišč in rastlin. Izolacija meristemov mora biti izvedena natančno in hitro, zaradi nepotrebnih izsušitev ter mehanskih in termičnih poškodb.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 633.791:578.89:632.38:57.086 (043.2)

CX plant breeding/viroid/ HLVd/hop latent viroid/hops/*Humulus lupulus*/Cicero/viroid free plants/RT-PCR/agarose electrophoresis

CC AGRIS H01/F30

AU MASTNAK, Špela

AA LUTHAR, Zlata (supervisor)/ RADIŠEK, Sebastjan (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2011

TI ELIMINATION OF HOP LATENT VIROID (HLVd) IN HOP (*Humulus lupulus* L.) CULTIVAR CICERO

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 43, [1] p., 4 tab., 21 fig., 29 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of the study was to establish a protocol for producing viroid-free hop plants, variety Cicero. 292 meristems were isolated from the terminal and lateral buds in the sterile conditions. They were cultivated on MSB medium for bud initiation. Shoots high 2 to 3 cm were subcultivated on MSK medium, for rooting. A few days after inoculation we found that 46.6 % of meristems were not regenerated. At isolation and sub-cultivation an infection had occurred, so we lost further 40.4 % meristems and regenerants. From regenerated meristems the callus was removed and moved to a growing container with fresh medium. After four to five times of subcultivation, we tested 36 or 12.3 % of regenerants on the presence for HLVd viroid, by RT-PCR method and agarose electrophoresis. After the first test, we confirmed 24 or 66.7 % of the regenerants, that were viroid-free. 22 or 91.7 % of this meristems were successfully acclimatized. These meristems were tested again and 20 regenerants did not contain viroid. Based on the results we proved the effectiveness of elimination HLVd with this method. We recommend consideratio of the sterility during the inoculation and *in vitro* growth and hygiene during acclimatization to avoid any unnecessary medium and plant infections. Meristems isolation must be accurate and rapid to prevent dehidration or mechanical and thermal injury.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA III
KEY WORDS DOCUMENTATION IV
KAZALO VSEBINE V
KAZALO PREGLEDNIC VIII
KAZALO SLIK IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI XI

1 UVOD 1

1.1 NAMEN NALOGE 1

1.2 DELOVNA HIPOTEZA 1

2 PREGLED OBJAV 2

2.1 HMELJNA RASTLINA 2

2.2 SLOVENSKA SORTA HMELJA CICERO 2

2.3 VIROID 3

2.3.1 Replikacija viroidov 5

2.3.2 Prenos in izraženost okužbe viroidov 5

2.4 HMELJEV LATENTNI VIROID 6

2.5 DOLOČANJE VIROIDNE RNA (METODE DETEKCIJE) 7

2.5.1 R-PAGE (povratna elektroforeza na poliakrilamidnem gelu) 8

2.5.2 Dot-blot metoda 8

2.5.3 RT-PCR (reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo) 8

2.6 MIKROPROPAGACIJA 9

2.6.1 Gojenje matičnih rastlin in izbira izsečka 10

2.6.2 Inciacija kulture 10

2.6.3 Faza razmnoževanja poganjkov 10

2.6.4 Koreninjenje *in vitro* 10

2.6.5 Koreninjenje *in vivo* 11

2.6.6 Aklimatizacija 11

2.6.7 Somaklonska variabilnost 11

3 MATERIAL IN METODE DELA 13

3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ 13

3.1.1 Priprava založne raztopine hormona BAP (benzilaminopurin) 13

3.1.2 Priprava založne raztopine hormona IBA (indol-3-maslena kislina) 14

3.2 IZOLACIJA IN GOJENJE MERISTEMOV ZA ELIMINACIJO VIROIDA 14

3.2.1 Izolacija meristema 14

3.2.2 Označevanje meristemov 15

3.2.3 *In vitro* gojenje 16

3.3 REVERZNA TRANSKRIPCIJA IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO 18

3.3.1 Priprava raztopin 18

3.3.2 Izolacija celokupnih nukleinskih kislin TNA 20

3.3.3 Redčenje vzorcev 21

3.3.4 Testiranje viroida z RT-PCR metodo 21

3.3.5 Agarozna elektroforeza 23

3.4 AKLIMATIZACIJA 25

4 REZULTATI 28

4.1 IZOLACIJA MERISTEMOV 28

4.1.1 Odstotek okuženih meristemov in regenerantov 29

4.1.2 Odstotek regeneriranih in neregeneriranih meristemov 29

4.2 ANALIZA HLVd VIROIDA Z RT-PCR METODO 30

4.2.1 Prvo testiranje *in vitro* gojenih regenerantov na HLVd viroid 30

4.2.2 Drugo testiranje *in vivo* gojenih rastlin na HLVd viroid 34

5 RAZPRAVA IN SKLEPI 36

5.1 RAZPRAVA 36

5.2 SKLEPI 37

6 POVZETEK 39

7 VIRI 41

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev viroidov po skupinah s podanim številom nukleotidov (Knapič in Javornik, 1998; Singh in sod., 2003; Pallas in sod., 2003) 4

Preglednica 2: Število izoliranih meristemov hmelja sorte Cicero, glede na izvor poganjkov 28

Preglednica 3: Število *in vitro* regenerantov hmelja sorte Cicero prvega testiranja na HLVd viroid, glede na izvor poganjkov 30

Preglednica 4: Število *in vivo* in *in vitro* rastlin hmelja sorte Cicero drugega testiranja na HLV d viroid, glede na izvor poganjkov 34

KAZALO SLIK

Slika 1:	Nukleotidno zaporedje hmeljevega latentnega viroida (HLVd) v termodinamično optimizirani sekundarni strukturi (Puchta in sod., 1988)	6
Slika 2:	Zgradba viroida: T1 in T2 - prva in druga terminalna cona, P - cona patogenosti, C - konservirani center, V - cona variabilnosti (Knapič in Javornik, 1999)	7
Slika 3:	Priprava vzorcev hmelja sorte Cicero za izolacijo meristemov: A - nabrani poganjki hmelja, hranjeni v vodi; B - razrezani poganjki na nodije z delom internodija, z apikalnim brstom (TP) in dvema stranskima brstoma (LP1 in LP2)	14
Slika 4:	Apikalni meristem izoliran iz hmelja sorte Cicero (Radišek in sod., 2007)	15
Slika 5:	Označevanje brstov oz. meristemov na glavnih in stranskih poganjkih hmelja sorte Cicero: TP - terminalni primarni meristem, LP1 - lateralni primarni meristem na nodiju 1, LP2 - lateralni primarni meristem na nodiju 2, TS - terminalni sekundarni meristem, LS1 - lateralni sekundarni meristem na nodiju 1, LS2 - lateralni sekundarni meristem na nodiju 2	16
Slika 6:	*In vitro* gojen meristem na MSB gojišču za inciacijo brstov (Radišek in sod., 2007)	17
Slika 7:	Regeneranti hmelja sorte Cicero z dvema do tremi internodiji: A - regenerant na MSB gojišču primeren za koreninjenje; B - koreninjeni regeneranti na MSK gojišču	17
Slika 8:	Izolacija DNA hmelja sorte Cicero: A - suspenzija, ki je nastala po inkubaciji vzorcev s CTAB pufrom; B - ločeni fazi, ki sta nastali po centrifugiranju, v supernatantu se nahaja izolirana DNA; C - DNA pelet	21
Slika 9:	Agarozna elektroforeza: A - nanos vzorcev na gel; B - potovanje vzorcev po gelu	24
Slika 10:	Aklimatizacija hmelja sorte Cicero: A - regenerant z očiščenim koreninskim sistemov; B - regenerant z oznako v šotnem lončku	25
Slika 11:	Aklimatizirane rastline hmelja sorte Cicero, v rastni komori	26
Slika 12:	Aklimatizirana rastlina hmelja sorte Cicero	27
Slika 13:	Odstotek izoliranih meristemov ter okuženih meristemov in regenerantov hmelja sorte Cicero, glede na izvor poganjkov	29
Slika 14:	Odstotek regeneriranih in neregeneriranih meristemov hmelja sorte Cicero, glede na izvor poganjkov	30

Slika 15: Agarozni gel, RT-PCR analiza določanja HLVd viroida v regenerantih hmelja sorte Cicero: 1 do 5 – negativni vzorec, K - HLVd pozitivna kontrola (256 bp namnožen fragment), P - kontrolna RNA pomnožitev RT-PCR kita (323 bp), M - dolžinski marker (100-1000 bp) 31

Slika 16: Agarozni gel, RT-PCR analiza določanja HLVd viroida v regenerantih hmelja sorte Cicero: 6 do 28 + pozitivni in – negativni vzorec, K - HLVd pozitivna kontrola (256 bp namnožen fragment), P - kontrolna RNA pomnožitev RT-PCR kita (323 bp), M - dolžinski marker (100-1000 bp) 32

Slika 17: Agarozni gel, RT-PCR analiza določanja HLVd viroida v regenerantih hmelja sorte Cicero: 29 do 36 + pozitivni in – negativni vzorec, K - HLVd pozitivna kontrola (256 bp namnožen fragment), P - kontrolna RNA pomnožitev RT-PCR kita (323 bp), M - dolžinski marker (100-1000 bp) 32

Slika 18: Odstotek brezviroidnih in viroidnih regenerantov hmelja sorte Cicero 33

Slika 19: Brezviroidne rasline hmelja sorte Cicero po prvem testiranju na aklimatizaciji v rastni komori 33

Slika 20: Brezviroidne rastline hmelja sorte Cicero v rastlinjaku pred drugim testiranjem na HLVd viroid 34

Slika 21: Primera somaklonske variabilnosti mikropropagiranih regenerantov iz meristemov hmelja sorte Cicero 35

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava oz. simbol	pomen
amol	attomole, 10^{-18}
AMV/Tfl pufer	reverzna transkriptaza/polimeraza - encimski pufer
BAP	6-benzilamino purin (citokinin)
cDNA	komplementarna DNA
CTAB	cetil trimetil-amonijev bromid (kationski detergent)
DEPC	dietil pirokarbonat
DICA	dikloroizocianurna kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid
Dot blot	točkovna hibridizacija
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
HCl	vodikov klorid
HLVd	hmeljev latentni viroid
HSVd	hmeljev stunt viroid
IBA	indol-3-maslena kislina
$MgSO_4$	magnezijev sulfat
MS	mikro in makroelementi (Murashige in Skoog gojišče)
MSB	MS gojišče za inciacijo brstov
MSK	MS gojišče za koreninjenje
NaAc	natrijev acetat
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
PCR	verižna reakcija s polimerazo
pg	pikogram, 10^{-12} grama
fg	femtogram, 10^{-15} grama
RNA	ribonukleinska kislina
R-PAGE	povratna elektroforeza na poliakrilamidnem gelu
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
TBE	tris-borat-EDTA pufer
TE	tris - EDTA
TNA	celokupne nukleinske kisline, DNA in RNA
TRIS	tris hidroksimetil aminometan
U	enota encima
µl	mikroliter
Φ	premer

1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je azijskega porekla in se je s preseljevanjem staroslovanskih ljudstev, zanesel tudi v naše kraje. Na slovenskem se omenja uporaba hmelja za varjenje piva že okrog leta 1160. Prelomnica v razvoju hmeljarstva je nastala med vladavino Marije Terezije, ko so ustanovili kmetijske družbe, ki so vzpodbujale in pospeševale pridelavo hmelja. Intenzivno se je pričela razvijati pridelava hmelja po letu 1870 in sicer na območju Savinjske doline s sorto Golding (Čerenak in sod., 2002).

Hmelj in hmeljarstvo sta simbola Spodnje Savinjske doline še danes. Leta 2008 je bilo s hmeljem v Sloveniji posajenih 1638 ha zemljišč (Statistični letopis, 2009).

Hmeljev latentni viroid (HLVd) je škodljiv hmelju, saj negativno vpliva na količino ter kakovost pridelka in je razširjen v mnogih državah sveta. Kot navajata Barbara in Adams (2003) so strokovnjaki v različnih državah proučevali in pisali o okuženosti hmelja s HLVd že leta 1990 v Veliki Britaniji in Koreji, 1992 na Japonskem, 1993 v Braziliji, 1994 na Češkem, 1995 na Poljskem, 1998 v Sloveniji in 1999 v Nemčiji.

V Sloveniji je bila potrjena vsesplošna razširjenost HLVd v matičnih nasadih, tkivnih kulturah, brezvirusnih sadikah in pridelovalnih nasadih hmelja, čemur je v največji meri pripomoglo vegetativno razmnoževanje okuženih rastlin (Leskovšek in sod., 2009).

Rastline okužene s HLVd so ponavadi brez simptomov (Jakše in Radišek, 2005), odzivi rastline na okužbo z viroidom so zelo podobni okužbi z virusom ali fiziološkemu stresu (Knapič, 2003).

1.1 NAMEN NALOGE

Že opravljene raziskave so pokazale, da okužba s HLVd vpliva na zmanjšanje količine pridelka, kar je posledica slabšega razvoja storžkov, prav tako pa ima tudi vpliv na zmanjšanje vsebnosti alfa kislin v pridelanem hmelju (Leskovšek in sod., 2009).

Naš namen je bil vzgojiti brezviroidne sadike hmelja, sorte Cicero. Ker hmelj razmnožujemo vegetativno, je pomembno, da so brezviroidne že matične rastline, da lahko zagotovimo pridelavo brezviroidnih sadik, kar poveča kvaliteto sadilnega materiala in s tem pridelek.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da bomo s pomočjo kulture meristemov uspešno eliminirali pri hmelju splošno razširjen hmeljev latentni viroid (HLVd) iz rastlin sorte Cicero in da bomo prisotnost oz. eliminacijo potrdili na izolirani viroidni RNA iz glavnih in stranskih poganjkov z večkratnim testiranjem z metodo RT-PCR za namnožitev viroide RNA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJNA RASTLINA

Hmelj je zelnata trajnica, ovijalka in dvodomna rastlina, kar pomeni, da so na eni rastlini le moški ali ženski cvetovi. Hmelj, ki ga danes gojimo, izhaja iz divje rastočih hmeljev Evrope in zahodne Azije.

Botanično uvrščamo hmelj med dvokaličnice, v red koprivovcev (Urticales), kamor spada tudi navadna kopriva in skupaj s konopljo v družino konopljevk (Cannabaceae).

Danes poznamo v rodu *Humulus* dve vrsti: navadni hmelj (*Humulus lupulus*) in enoletni ali japonski hmelj (*Humulus japonicus*). Z evolucijo in z razširjanjem s prvotnih rastišč so se razvili različni tipi divjega navadnega hmelja, ki so danes uvrščeni v podvrste. Med seboj se razlikujejo po zgradbi listov in drugih lastnostih.

Rastlino hmelja sestavljajo podzemni vegetativni deli, nadzemni vegetativni deli in razmnoževalni organi. Nadzemni deli na koncu vsake rastne sezone propadejo, prezimijo le podzemni deli.

Agroekološke razmere za gojenje hmelja (Čerenak in sod., 2002):

- temperatura; biološki procesi se pri hmelju pričnejo spomladi, ko je povprečna dnevna temperatura zraka več dni zaporedoma višja od 4 do 5 ^{o}C. Optimalno rast hmelja omogočajo temperature med 15 in 18 ^{o}C. Spodnja temperatura za normalno rast hmelja med rastno dobo je 10 ^{o}C,
- padavine; hmelj, je glede preskrbljenosti z vodo zahtevna rastlina, ki jo številni strokovnjaki uvrščajo med rastline humidnih območij. Ocenjeno je, da potrebuje hmelj v rastni dobi od 500 do 600 mm padavin,
- osvetlitev; hmelj je ena izmed občutljivejših rastlin glede pomanjkanja svetlobe. Je rastlina kratkega dne, začetek cvetenja pa je odvisen tudi od temperature zraka. Dolžina osvetlitve, skrajšana na manj kot 13 ur na dan, vpliva tudi na prekinitev rasti in odmiranje nadzemnih delov rastline jeseni.

2.2 SLOVENSKA SORTA HMELJA CICERO

Cicero je pozen, triploidni križanec med Auroro in autotetraploidnim sejančkom Savinjskega goldinga. Povprečen pridelek je 1500 kg/ha. Gostota sajenja je 3200 rastlin/ha.

Rastline imajo obliko srednje širokega valja. Trta je srednje debela, vijolična. Listi so veliki in temno zelene barve. Storžki so dolgi povprečno 26 milimetrov. Uspeva na dobro odcednih in zračnih tleh.

Korenika Cicera je srednje občutljiva na sistemične okužbe hmeljeve peronospore (*Pseudoperonospora humuli*), listi so odporni, storžki pa nekoliko občutljivi na sekundarne okužbe.

Sorta ima blago hmeljno aromo. Kohumulona vsebuje 26 %, eteričnih olj 0,9 do 2,3 ml/100 g in 5 - 7 % alfa kislin. Cicero je dobro skladiščno obstojen. Organoleptična ocena hmeljnega piva s Cicerom je pokazala, da je grenčica prijetna (Čerenak in sod., 2002).

2.3 VIROID

Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, ki so se sposobni v rastlinski celici sami razmnoževati in s tem zniževati pridelek (Knapič in Javornik, 1999).

Gostitelji viroidov so višje rastline, ki so gospodarsko pomembne in jih pridelujemo večinoma kot monokulture (preglednica 1):

- citrusi (*Citrus* L.), kokos (*Cocos nucifera* L.) in avokado (*Persea americana* Mill.),
- koščičasto sadje (*Prunus* L.),
- vinska trta (*Vitis vinifera* L.),
- hmelj (*Humulus lupulus* L.),
- krompir (*Solanum tuberosum* L.) in paradižnik (*Lycopersicum esculentum* Mill.) ter
- krizanteme (*Dendranthema x grandiflorum* Kitamura).

Večina rastlin, katere okužujejo viroidi, razmnožujemo vegetativno. Najbolj patogene oblike, tako vrst viroidov kot različkov znotraj ene vrste, so odkrili v območju s toplejšo oz. vročo klimo (Knapič, 1997).

Viroide sestavlja ribonukleinska kislina (RNA), ki je enoverižna in ima 246 do 375 baz. Ker nimajo strukturnih beljakovin, so v bistvu gole, infekciozne nukleinske kisline (Knapič in Javornik, 1998). Strukturno so podobni intronom skupine I. Nekateri predpostavljajo, da so se razvili iz teh struktur (Holland, 1990). Introni so vmesni predeli nukleinskih kislin, ki ne kodirajo beljakovin in imajo sposobnost izreza iz heterologne RNA z lastno aktivnostjo (Brown, 1992). Po drugi hipotezi naj bi viroidi evolucijsko nastali, kot prve molekule sposobne podvajanja. Z razvojem DNA genomov naj bi se ohranili kot introni (Robertson, 1992).

Tako kot intron tudi viroidi ne kodirajo beljakovin, zato morajo za pomnoževanje, procesiranje in transport v rastlinah uporabljati beljakovine gostitelja (Virščck-Marn in sod., 2007).

Viroidi so termostabilni, zato se prenašajo tudi pri razmnoževanju brezvirusnih rastlin, katere so bile očiščene virusov s termoterapijo (Morton in sod., 1993).

Preglednica 1: Razvrstitev viroidov po skupinah s podanim številom nukleotidov (Knapič in Javornik, 1998; Singh in sod., 2003; Pallas in sod., 2003)

VIROID	GOSTITELJSKA RASTLINA	GOSTITELJSKA DRUŽINA	ŠTEVILO NUKLEOTIDOV
Skupina A: ATIPIČNI VIROIDI: tip ASBVd			
ASBVd - sončne opekline avokada	avokado	Lauraceae - lovorovke	246-250
PLMVd - latentni mozaik breskve	breskev	Rosaceae - rožnice	336-337
Skupina B: TIPIČNI VIROIDI			
Podskupina B1: tip PSTVd			
CSVd - pritlikavost krizantem	krizantema	Compositae - košarice, Solanaceae - razhudnikovke	354, 356
CEVd - eksokortis agrumov	agrum	Rutaceae - rutičevke, Vitaceae - vinikovke, Compositae - košarice, Solanaceae - razhudnikovke	370-375
CVd-II - citrus viroid species II	agrum	Rutaceae - rutičevke	(ni podatka)
CVd - IV - citrus viroid species IV	(ni podatka)	(ni podatka)	284
CTiVd - tinangaja, bolezen kokosovega oreha	palma	Palmae - palme	254
CCCVd - kadang kokosovega oreha	palma	Palmae - palme	246-247
CLVd - latentna bolezen kolumneje	kolumneja	Solanaceae -razhudnikovke, Gesneriaceae -gesnerijevke	370, 372
HLVd - latentna bolezen hmelja	hmelj	Cannabaceae - konopljevke	256
HSVd - zmanjšana rast hmelja	hmelj	Cannabaceae - konopljevke, Rosaceae - rožnice, Rutaceae - rutičevke, Vitaceae-vinikovke, Cucurbitaceae - bučevke	297-303
IRVd - iresine viroid	(ni podatka)	Amaranthaceae - ščirovke	(ni podatka)
PSTVd - vretenatost krompirjevih gomoljev	krompir	Solanaceae - razhudnikovke in drugi	356, 359-360
TASVd - zakrnelost vršičkov paradižnika	paradižnik	Solanaceae - razhudnikovke	360, 363
TPMVd - moški plod paradižnika	paradižnik	Solanaceae - razhudnikovke	360
Podskupina B2: tip ASSVd			
ADFVd - apple dimple fruit viroid	jablana	Rosaceae - rožnice	(ni podatka)
ASSVd - krastavost plodov jabolk	jablana	Rosaceae - rožnice	329-330
CBLVd - zvijanje listov citrusa	grenivka	Rutaceae - rutičevke, Lauraceae - lovorovke	318
CVd - III - citrus viroid species III	agrum	Rosaceae - rožnice	(ni podatka)
GYSVd - rumena lisavost vinske trte	vinska trta	Vitaceae - vinikovke	366-368
PBCVd - mehurjasti rak hruške	hruška	Rosaceae - rožnice	315
Nerazvrščene vrste viroidov			
BSVd - burdock stunt viroid			
NgSVd - nicotiana glutinosa stunt viroid			
PMMVd - pigeon pea mosaic mottle viroid			
TBTVd - tomato bunchy top viroid			

2.3.1 Replikacija viroidov

Viroidi se replicirajo izključno s pomočjo encimov v celici gostitelja, neodvisno od DNA. Prisotnost viroidnih dimerov, trimerov in višjih oligomerov v okuženem tkivu kaže na to, da poteka replikacija po sistemu kotalečega obroča. Razen dveh viroidov (ASBVd – sončne opekline avokada in PLMVd – latentnega mozaika breskve) potrebujejo vsi ostali, med njimi tudi HLVd, za cepitev oligomerov v celičnem jedru prisotne specifične ribonukleaze. Pozitivna (originalna) vijačnica RNA se prepiše v multimerno negativno (komplementarno) vijačnico RNA s pomočjo jedrne, od DNA odvisne RNA polimeraze II (Diener in sod.,1993). Ta pa se prepiše v multimerno pozitivno vijačnico z jedrno, od DNA odvisno RNA polimerazo I. Po endonukleolitični odcepitvi nastanejo monomerne enote pozitivne vijačnice, ki se kovalentno povežejo v krožen viroid (Holland, 1990).

2.3.2 Prenos in izraženost okužbe viroidov

Viroidi se zlahka prenašajo mehansko: z dotikom okuženih rastlin, z okuženim orodjem pri rezi, okopavanju, trganju in pri razmnoževanju s potaknjenci. Težje se prenašajo s semenom ali s cvetnim prahom (Krajačić in sod., 1995).

Glede na izraženost simptomov viroidne okužbe pri rastlinah, lahko oblikujemo tri skupine (preglednica 1) (Knapič, 1997):

- simptomi se ne izrazijo, okužba je latentna - hmeljev latentni viroid HLVd, (Singh in sod., 2003),
- viroidi na nekaterih rastlinskih vrstah povzročajo simptome, na drugih pa ne, čeprav jih okužujejo – hmeljev stunt viroid HSVd (pri vinski trti in marelicah ne povzroča vidnih znamenj okužbe, medtem ko pri hmelju, slivah in breskvah so vidni močni simptomi kržljavosti),
- viroid ima različke, ki so na isti rastlinski vrsti različno patogeni – viroidno vretenavost krompirjevih gomoljev povzročajo trije različki: PSTVd-mild, PSTVd-intermedium in PSTVd-severe.

Pri hmelju sta opisana dva viroida (preglednica 1) (Jakše in Radišek, 2005):

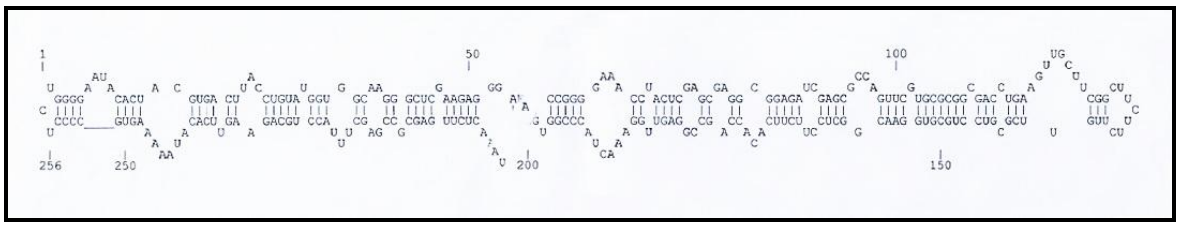
- hmeljev stunt viroid (HSVd z 297 baznimi pari), ki je za enkrat omejen le na Japonsko in Združene države Amerike (Oregon) in okužuje tudi sadne vrste ter
- hmeljev latentni viroid (HLVd z 256 baznimi pari), ki je vsesplošno razširjen v intenzivni pridelavi in pri nekaterih kultivarjih hmelja izredno škodljivo vpliva na pridelek.

V Nemčiji je bilo odkrito, da HLVd v naravi okužuje tudi koprivo (Barbara in Adams, 2003).

2.4 HMELJEV LATENTNI VIROID

Leta 1988 so Puchta in sod. prvi poimenovali in opisali hmeljev latentni viroid (HLVd). Uvrščen je v družino Pospiviroidea v rod *Cocadviroid* (Barbara in Adams, 2003).

HLVd sestavlja enoverižna RNA z 256 baznimi pari (preglednica 1), ki se navznoter komplementarno povezujejo v nukleotidne pare (Goldbach in sod., 1992). Značilna je njihova sekundarna struktura, ki je določena z medsebojnim parjenjem nukleotidnih baz molekule, zaradi česar ima viroid značilno paličasto strukturo (slika 1 in 2). Ta paličasta struktura se v postopku denaturacije poruši in prevzame zaprto-krožno obliko (Jakše in Radišek, 2005).



Slika 1: Nukleotidno zaporedje hmeljevega latentnega viroida (HLVd) v termodinamično optimizirani sekundarni strukturi (Puchta in sod., 1988)

Število oz. odstotek posameznih baz v verigi RNA je:

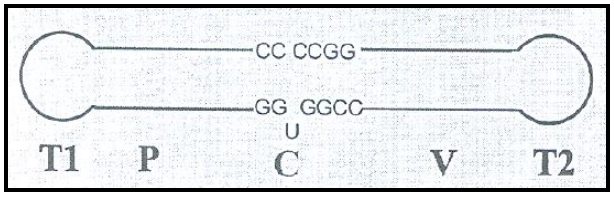
- adenozinmonofosfat (AMP) = 54, kar predstavlja 21,1 %,
- uracilmonofosfat (UMP) = 56, kar predstavlja 21,9 %,
- citozinmonofosfat (CMP) = 71, kar predstavlja 27,7 %,
- gvaninmonofosfat (GMP) = 75, kar predstavlja 29,3 %.

Viroidna nukleinska kislina, lahko rečemo, da je sama sebi komplementarna in tvori v 23 dvovijačnih odsekih 83 baznih parov, ki so med seboj ločeni s 24 enovijačnimi odseki. Prostih je 90 baz in v parih je 166 baz (slika 1).

Sestava zaporedja HLVd je bila ugotovljena s pomočjo cDNA, sintetizirane z reverzno transkripcijo z več začetnimi oligonukleotidi. Iz teh podatkov so izdelali model sekundarne strukture HLVd (slika 1) (Puchta in sod., 1988).

S pomočjo viroidne sekvenčne homologije, je bila določena struktura viroida (slika 2) (Knapič in Javornik, 1999):

- T1 in T2 - prva in druga terminalna cona, na katerih se viroidi spajajo z drugimi molekulami,
- P - cona patogenosti, ki določa gostitelja,
- C - konservirani center, ki je pri sorodnih viroidih zelo podobno sestavljen,
- V - cona variabilnosti v kateri nastaja največ sprememb v zaporedju baz.



Slika 2: Zgradba viroida: T1 in T2 - prva in druga terminalna cona, P - cona patogenosti, C - konservirani center, V - cona variabilnosti (Knapič in Javornik, 1999)

Zaradi prisotnosti HLVd, se je pri tuji hmeljni sorti Omega, zmanjšal pridelek storžkov za 27 % in vsebnost alfa kislin za 31 %. Skupno zmanjšanje alfa kislin na rastlino je v raziskavi presegalo 50 %. Zmanjšan pridelek storžkov je bil zaradi manjših storžkov na okuženih rastlinah. Kemična analiza hmelja je pokazala, da sta beta kislina in vsebnost olja v storžkih okuženih rastlin višja, kot v storžkih zdravih rastlin. To nakazuje na to, da infekcija z viroidom pospešuje dozorevanje storžkov.

Raziskave v Veliki Britaniji so pokazale, da koncentracija patogena HLVd zelo niha, na območju nadzemnih delov rastline, še posebej zgodaj v rastni sezoni. V bližini osnove oz. baze rastline je relativno visoka, v vrhu trte je koncentracija zanemarljiva. Med sezono rasti, se nivo viroida v rastlini poviša in HLVd postane popolnoma sistemičen do približno sredine septembra. Podobno so pokazale raziskave na Češkem. Vzorce listov, so nabrali iz rastlin en meter od tal, ki so rastle na polju, v maju in juniju in izmerili vsebnost HLVd 5 pg/mg, izredno nizko stopnjo patogena 0,5 pg/mg, so izmeril v vzorcih pobranih aprila (Barbara in Adams, 2003).

V Angliji so proučevali distribucijo širitve HLVd viroida z okuženih rastlin in zaradi naključne razporeditve okužb v nasadu so sklepali na možnost vektorja, ki bi iz 100 % okužene vrste prenašal viroid po hmeljišču. Raziskave s hmeljevo listno ušjo (*Phorodon humuli*) kot mogočim vektorjem HLVd so ovrgle hipotezo, da bi uši prenašale okužbo z rastline na rastlino (Barbara in sod., 1992).

2.5 DOLOČANJE VIROIDNE RNA (METODE DETEKCIJE)

Viroidi so premajhni, da bi jih bilo mogoče zaznati z elektronsko mikroskopijo in ker nimajo beljakovin, jih ni mogoče zaznati s serološkimi testi (kot je ELISA). Edini mogoči način detekcije so molekulske metode, ki temeljijo na identifikaciji in karakterizaciji ribonukleinskih kislin (Knapič in Javornik, 1999).

V Sloveniji sta bili v obdobju 1997 - 2001 za določanje HLVd viroida uvedeni dve diagnostični metodi: povrtana elektroforeza na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE) ter reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR). V letu 2004 je sledil razvoj točkovne hibridizacijske metode (Dot blot), ki je primernejša za rutinske analize in

ob kombinaciji z RT-PCR zagotavlja zanesljiv identifikacijski sistem za testiranje sadilnega in žlahtniteljskega materiala (Jakše in Radišek, 2005).

2.5.1 R-PAGE (povratna elektroforeza na poliakrilamidnem gelu)

S povratno elektroforezo viroidne RNA na poliakrilamidnem gelu je mogoče ločiti ribonukleinsko kislino viroida od rastlinske DNA in RNA. Ker je R-PAGE metoda dovolj zanesljiva za določanje viroidov ustreza tudi za serijsko testiranje in je hkrati najcenejša molekulska metoda.

R-PAGE izkorišča sekundarno strukturo viroida (slika 1), ki je v naravnem stanju paličaste strukture (slika 2), v denaturacijskih razmerah, pa se vezi med komplementarnimi baznimi pari pretrgajo in nastane krožna molekula RNA. Ta v gelu potuje počasneje od ostalih ravnih - linearnih rastlinskih RNA in DNA molekul in se na ta način od njih loči.

V slovenskih sortah hmelja so z metodo povratne elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE) dokazali okuženost vseh vzorcev s HLVd (Knapič in Javornik, 1999).

Elektroforeza poteka s pomočjo enosmernega toka skozi gel, kamor nanesemo vzorce. Pri drugem teku zamenjamo smer električnega toka, še prej pa z visoko temperaturo (95 ^{o}C) razklenemo molekule RNA viroida. S tem zmanjšamo hitrost gibanja RNA viroida skozi gel. Po določenem času ustavimo potovanje RNA, gel obarvamo in dobimo sliko gibanja RNA (Pepelnjak, 1992).

2.5.2 Dot-blot metoda

Molekulska hibridizacija je občutljiva metoda za določanje viroidne RNA, ki se jo z lahkoto avtomatizira, zato je zelo primerna za pregledovanje velikega števila vzorcev. Pri hibridizaciji se viroidna in druga RNA veže na nitrocelulozno ali najlonsko membrano, na ustrezna zaporedja RNA pa se veže specifična sonda. Sonde so kratke verige nukleotidov, ki se komplementarno prilegajo (hibridizirajo) specifičnim zaporedjem nukleotidov v molekulah RNA ali cDNA. Ker so označene bodisi z radioaktivnim izotopom bodisi z neradioaktivnim označevalcem, ki oddaja vidno svetlobo, jih lahko detektiramo. Tako prepoznamo viroid ali pa kakšno drugo zaporedje nukleotidov, saj se metoda uporablja tudi za analizo genomov različnih organizmov (Komel, 1997).

2.5.3 RT-PCR (reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo)

Pri določanju viroidov, je zelo uporabna metoda RT-PCR (reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo), saj lahko z ustrezno optimizacijo ugotovimo že 1 fg RNA, torej je metoda vsaj tisočkrat občutljivejša od ostalih metod detekcije (Goldbach in sod., 1992). Ker se v postopku PCR lahko namnožuje samo DNA molekula, se za detekcijo viroidne RNA uporablja še njen prepis v DNA. Pri RT-PCR je pred namnoževanjem DNA potreben

prepis viroidne RNA molekule z encimom reverzno transkriptazo v cDNA, ki jo namnožimo v PCR aparaturi.

Segment DNA, ki se namnožuje, je določen s kratkima sintetičnima molekulama DNA (začetnima oligonukleotidoma), ki se vežeta na obe matrični verigi DNA in encimu DNA polimerazi omogočita sintezo DNA verig med njima. Za začetek moramo imeti znano sekvenco genoma, kar je pri HLVd znano. Namnožene PCR produkte, nadalje analiziramo z uporabo horizontalne agarozne elektroforeze.

Namnožitev viroidne RNA oz. cDNA z RT-PCR lahko uporabimo tudi v kombinaciji z ostalimi metodami detekcije (PAGE, molekulska hibridizacija), kjer lahko vključitev namnoževanja oz. namnoženih produktov olajša delo oz. izboljša detekcijske sposobnosti metode (Knapič in Javornik, 1998).

Agarozna elektroforeza

Z elektroforezo ločujemo molekule v električnem polju na osnovi njihove različne hitrosti potovanja. Hitrost potovanja je odvisna od velikosti in oblike molekule, njene mase in od velikosti njenega naboja.

2.6 MIKROPROPAGACIJA

Mikropropagacija je temeljna tehnika tkivnih kultur in osnova za vse ostale tehnike, kajti končen cilj tudi zahtevnejših postopkov je rastlina, ki jo s temi metodami ohranjamo in razmnožujemo.

V postopku tkivnih kultur razlikujemo dve glavni poti regeneracije: po poti iz apikalnih in aksilarnih meristemov in po poti iz adventivnih meristemov. Ta lahko nastane neposredno iz inokuliranega tkiva ali pa nastopa kot vmesna faza kalus.

Za začetek procesa mikropropagacije uporabimo vršičke oz. izolirane meristeme odvzete iz glavnega ali stranskih poganjkov. Če smo to uspešno opravili, so ob enem vršičku oz. meristemu nastali številni novi, kar imenujemo kulturo poganjkov. Poganjke je v tej fazi možno gojiti teoretično neomejeno dolgo z načinom, ki ga imenujemo 'subkultiviranje poganjkov'. V tej fazi se vzorce ali ohranja ali razmnožuje. Naslednji stopnji sta koreninjenje in aklimatizacija sadik.

V procesu mikropropagacije ločimo več faz in jih delimo na:

- faza 0: gojenje matičnih, donorskih rastlin in izbira izsečka,
- faza 1: iniciacija kulture (inokulacija, regeneracija),
- faza 2: razmnoževanje poganjkov,
- faza 3: podaljševanje poganjkov, če je potrebno,
- faza 4: koreninjenje in
- faza 5: aklimatizacija.

Pri različnih rastlinah so lahko težavne različne faze, za končen uspeh pa je potrebno obvladati prav vse.

2.6.1 Gojenje matičnih rastlin in izbira izsečka

Ni vseeno ali so matične rastline rasle na prostem ali v rastlinjaku. Zelo pomembne so rastne razmere zlasti vpliv odmerkov gnojenja, osvetlitve, vodnega režima, kar vse močno vpliva na kasnejši uspeh mikropropagacije.

Izsečke (delčke materinih rastlin) jemljemo iz različnih tkiv in organov. Pri izbiri izsečka si torej želimo dobiti čim bolj sterilen delček rastline, ki naj zajema del meristemskega tkiva. Nasploh velja pravilo, da so najbolj aktivna mlada tkiva - najbolj nezreli embriji, nato apikalni meristemi, aksilarni meristemi v stranskih brstih, kambijske cone v čebulicah, gomoljih in podobno. Kar pa se tiče sterilnosti, so najbolj sterilna semena, notranji del rastlin, brsti znotraj glavic, posebej težavna pa so tkiva lesnatih večletnih rastlin, kjer so pogosto sistemsko okužena skoraj vsa tkiva. Pri rastlinah, gojenih v rastlinjaku posebej poskrbimo, da jih vedno zalivamo le spodaj in jih ne orošujemo ter pazimo tudi, da jih ne napadajo uši in drugi škodljivci ali okužujejo glivične in bakterijske bolezni.

2.6.2 Inciacija kulture

Odbira ali izrez primernega tkiva ter predhodno ali naknadno razkuževanje je prvi postopek mikropropagacije.

Na učinkovitost razkuževanja vpliva izbrano sredstvo ter koncentracija in čas tretiranja.

Razkužen rastlinski material od razkuževanja naprej obravnavamo kot sterilen. Vsi nadaljnji postopki potekajo v komorah za aseptično delo.

2.6.3 Faza razmnoževanja poganjkov

To je faza, ko izseček oz. inokulum zraste, se diferencira in začne oblikovati nove poganjke. Postopek je uspešen, če nastane čim večje število normalno raslih poganjkov v čim krajšem času. V tej fazi dodamo gojiščem običajno citokinine, avksine pa izpustimo ali dodamo le v majhni koncentraciji.

Način, kako poganjke razmnožujemo in subkultiviramo, je močno odvisen od vrste rastlin in njenega načina rasti v *in vitro* razmerah.

2.6.4 Koreninjenje *in vitro*

Poganjke, ki so primerno veliki subkultiviramo na gojišče za koreninjenje. V tej fazi, lahko poganjki poženejo korenine ali pa na odrezanem mestu nastane kalus in nato šele korenine. Tako nastale korenine nimajo spojen prevodni sistem s poganjkom, zato sadike kasneje

propadejo. Potrebno je odstraniti kalus, če je nastal v fazi množenja poganjkov oz. korenine ter zmanjšati vsebnost avksinov v gojišču na minimum.

Velikost poganjkov, ki jih koreninimo, je tudi odločilna, ne le za fazo koreninjenja, temveč tudi za fazo aklimatizacije. Tudi tu velja pravilo, da so velike razlike med posameznimi vrstami, tako premajhni dostikrat ne koreninijo, preveliki pa radi kasneje propadejo.

In vitro nastale korenine po mnenju nekaterih raziskovalcev slabo delujejo zaradi nerazvitih koreninskih laskov in delno kasneje odmrejo.

Za koreninjenje se običajno izbirajo gojišča z znižano koncentracijo makro- in mikoelementov, z znižano koncentracijo saharoze in agarja (da jih lažje izvlečemo), brez hormonov ali le z avksini.

2.6.5 Koreninjenje *in vivo*

Koreninjenje *in vivo*, to je neposredno v substratu za aklimatizacijo, se v zadnjih letih vse bolj uveljavlja. Postopek je relativno preprost. Poganjke, ki so navadno manjši kot ukoreninjeni, posadimo v posode s substratom, orosimo in primerno zalijemo. Koreninjenje *in vivo* lahko zviša uspeh mikropropagacije ter močno zniža stroške, je pa zelo odvisno od rastlinske vrste in vitalnosti poganjka.

2.6.6 Aklimatizacija

Aklimatizacija sadik je zadnja stopnja mikropropagacije. V tej fazi poganjke, rasle v heterotrofnih razmerah, ponovno navajamo na avtotrofni način rasti. Uspeh aklimatizacije je odvisen od vpliva predhodnih laboratorijskih postopkov in od vpliva dejavnikov, izbranih v procesu aklimatizacije.

V predhodnih postopkih najbolj vpliva izbira gojišča, na katerem smo gojili poganjke ali koreninili ter fizikalni pogoji zlasti v zadnjih dneh gojitve.

Poseben pomen za uspeh aklimatizacije se pripisuje izbiri rastnega substrata. Praviloma substrata ne avtoklaviramo, ker s tem lahko nastajajo škodljive snovi in ker se v sterilnem substratu še lažje razvijejo specifične glive, ker smo odstranili naravno ravnovesje. Substrati so lahko različno sestavljeni. Mešanice šote, peska, komposta in drugih sestavin so običajne. Zahteve po hranilih so različne, glede na rastline. Tako nekatere v fazi aklimatizacije v močnejših substratih propadejo, druge pa potrebujejo dodatek tekočih gnojil za uspešno rast (Bohanec, 1992).

2.6.7 Somaklonska variabilnost

Somaklonska variabilnost je nastanek dednih sprememb gojenih rastlin v *in vitro* razmerah, ki so nastale brez uporabe mutagenih snovi ali sevanja. Pri številnih rastlinah opazimo

variabilnost izzvano s samim postopkom *in vitro* gojenja oz. sestavinami gojišč. Izvor te variabilnosti je lahko dveh vrst:

- variabilnost je lahko posledica obstoječe genetsko raznolike strukture tkiv inokulirane rastline, ki se izrazi s postopki tkivnih kultur,
- variabilnost lahko nastane na novo, kot posledica postopkov in komponent gojišč.

Somakloni so lahko genetsko najrazličnejšega izvora. Variabilnost je lahko posledica anevploidije, prestrukturiranj kromosomov, točkovnih genskih mutacij in drugega.

Najbolj pogoste spremembe so strukturne spremembe kromosomov, zlasti delecije in duplikacije. Kromosomi se ne prelamljajo na povsem naključnih mestih, temveč na mestih, ki se najkasneje replicirajo. Na osnovi te ugotovitve, znanstveniki sklepajo, da razmere v tkivnih kulturah na nek način preprečujejo, da bi replikacija DNA tekla normalno hitro. Celice lahko začno mitozo prej, kot je v celoti končana replikacija, kar povzroči na teh mestih prelome kromosomov. Z molekulskega stališča, pripisujejo ta pojav hipo/hiper metilaciji (kaže, da sta metilacija DNA in počasnost replikacije tesno povezani).

Poleg genetskih sprememb, lahko k somaklonski variabilnosti štejemo tudi epigenetske spremembe, ki so posledica gojenja v kulturi in se praviloma ne prenašajo na potomstvo.

Uporabna vrednost somaklonske variabilnosti v žlahniteljske namene je v odpornosti na herbicide, odpornosti na sol, večjem vigorju rastlin, odpornosti na bolezni in na nizke temperature (Bohanec, 1992).

3 MATERIAL IN METODE DELA

Del podzemnega stebla štirih sadik hmelja sorte Cicero smo v marcu 2008 nabrali v sortimetnem nasadu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) in posadili v štiri lonce ter prenesli v rastlinjak na odganjanje. Meristeme smo izolirali aprila 2008 v sterilnih razmerah iz apikalnih (terminalnih) končnih brstov in aksilarnih (lateralnih) stranskih brstov (slike 3, 4 in 5). Po izolaciji meristemov, smo jih inokulirali na MSB (Murashige in Skoog, 1962) gojišče za regeneracijo.

3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ

Pripravili smo MSB gojišče za regeneracijo brstov z naslednjo sestavo (za 1 L):

- 4,43 g/L MS (Murashige in Skoog, 1962) mikro in makroelementi (basal salt medium - SIGMA),
- 20 g/L glukoza (Kemika),
- 7 g/L agar (Fluka).

V čašo z volumnom 1 L, smo nalili približno ½ L destilirane vode in vanjo stresli natehtane sestavine, razen agarja in dobro premešali na magnetnem mešalniku.

MSB gojišču za regeneracijo brstov smo dodali 2 mg/L (20 ml založne raztopine, poglavje 3.1.1) hormona BAP (citokinin), gojišču za koreninjenje (MSK) pa 0,5 mg/L (5 ml založne raztopine, poglavje 3.1.2) hormona IBA (avksin). Ko smo dodali še ustrezen hormon, smo prelili gojišče v 1000 ml bučko in z destilirano vodo umerili na 1 L. Iz merilne bučke smo prelili nazaj v čašo in umerili pH vrednost gojišča na 5,7 do 5,8.

Po umeritvi pH vrednosti smo dodali agar in ga postopno raztopili s pomočjo mikrovalovne pečice (približno štirikrat, do vretja), da je postala raztopina bistra. Med raztapljanjem smo vsaki 2 minuti raztopino premešali.

MSB gojišče za regeneracijo brstov smo po raztapljanju agarja razdelili po 4 ml v vsako epruveto Φ16 mm oz. po 25 ml v epruveto Φ 25 mm. Epruvete smo pokrili s pokrovčkom, jih dali v stojalo in vse skupaj avtoklavirali 20 minut pri 121 ºC in pritisku 1,1 bar.

MSK gojišče za koreninjenje smo po raztapljanju agarja razdelili po 20 ml v gojilne posode, jih zaprli s pokrovčki in avtoklavirali 20 minut pri 121 ºC in pritisku 1,1 bar.

3.1.1 Priprava založne raztopine hormona BAP (benzilaminopurin)

V 50 ml čašo smo zatehtali 10 mg BAP in raztopili z nekaj kapljicami 1N NaOH. Nato smo dodali približno 40 ml destilirane vode in prelili raztopino v 100 ml merilno bučko ter dolili do oznake destilirano vodo. Založno raztopino hormona smo prelili v 100 ml

erlenmajerico, jo primerno označili (ime hormona, koncentracija založne raztopine in datum priprave) in pokrili z alu folijo.

3.1.2 Priprava založne raztopine hormona IBA (indol-3-maslena kislina)

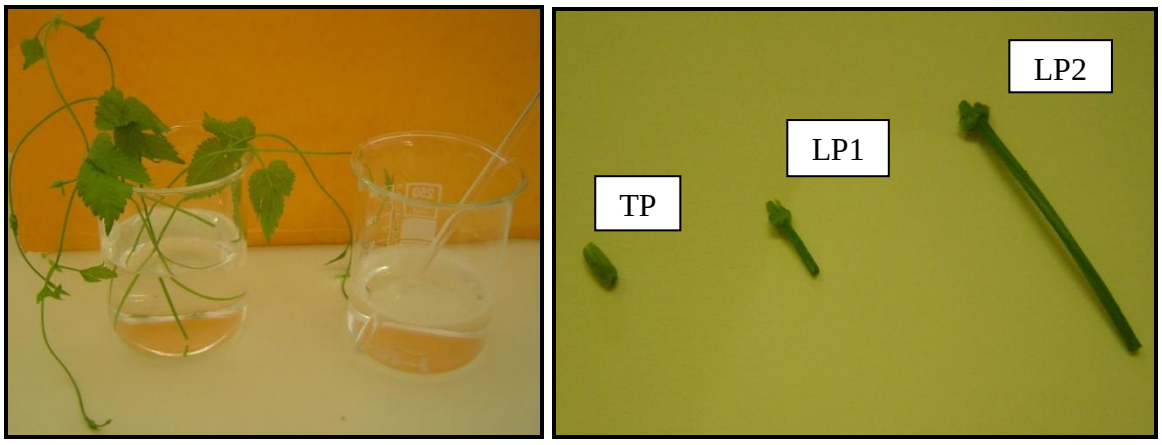
V 50 ml čašo smo zatehtali 10 mg IBA in raztopili z nekaj kapljicami etanola. Nato smo dodali približno 40 ml destilirane vode in prelili raztopino v 100 ml merilno bučko ter dolili do oznake destilirano vodo. Založno raztopino hormona smo prelili v 100 ml erlenmajerico, jo primerno označili (ime hormona, koncentracija založne raztopine in datum priprave) in pokrili z alu folijo.

3.2 IZOLACIJA IN GOJENJE MERISTEMOV ZA ELIMINACIJO VIROIDA

3.2.1 Izolacija meristema

Delo je potekalo v brezprašni komori. Vanjo smo postavili stereomikroskop in ga razkužili s 70 % etanolom. Pripravili in razkužili smo si tudi orodje: skalpel, pinceto in preparirno iglo.

Nato smo si pripravili rastlinski material. Nabrali smo glavne in stranske poganjke hmelja, s tremi internodiji in jih označili. Vsak poganjek posebej, smo pripravili za razkuževanje tako, da smo poganjek s škarjami razrezali na dva nodija z deli internodijev s po dvema stranskima brstoma (LP1 in LP2) in apikalnim brstom (TP) ter odstranili večje listke (slika 3 A in 3 B).



A B

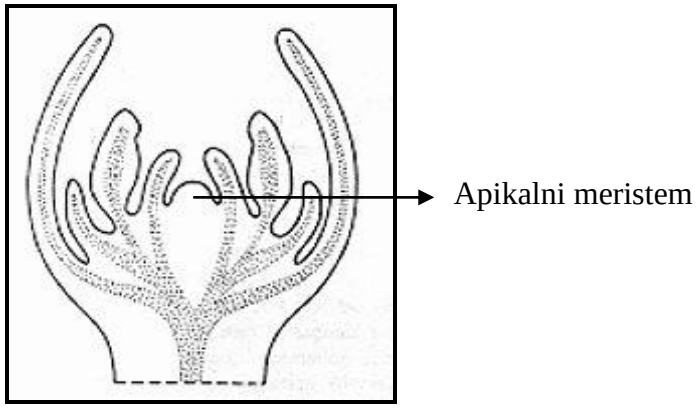
Slika 3: Priprava vzorcev hmelja sorte Cicero za izolacijo meristemov: A - nabrani poganjki hmelja, hranjeni v vodi; B - razrezani poganjki na nodije z delom internodija, z apikalnim brstom (TP) in dvema stranskima brstoma (LP1 in LP2)

Brste smo razkužili v brezprašni komori. V čaši smo pripravili 1,66 % (1,66 g/100 ml destilirane vode) raztopino dikloroizocianurne kisline $C_3Cl_2N_3NaO_3$ (DICA), dodali 3 kapljice močila Tween-20 in dobro premešali, da se je DICA raztopila. V pripravljeno

raztopino smo potopili apikalne brste oz. internodije s stranskimi brsti in na čašo natančno označili izvor le-teh. Razkuževali smo 7 minut in nato trikrat spirali po 5 minut s sterilno destilirano vodo. Po spiranju smo pustili brste v zadnji vodi do izolacije.

Meristeme smo izolirali v brezprašni komori. Razkuženi apikalni brst smo vzeli iz čaše in položili na razkuženo delovno površino stereomikroskopa. Nastavili smo si 40 - kratno povečavo in pričeli z lupljenjem brsta. S preparirno iglo smo odstranili ovršne liste, vse do samega središča z meristemom in dveh primordialnih listov (slika 4). Čim bolj je brst očiščen oz. izoliran čim manjši del meristema, tem večja je verjetnost regeneracije brezviroidne rastline. Pri delu, smo bili pozorni na to, da nismo poškodovali samega meristema (da ga nismo zmečkali, prebodli…). Pomembno je, da smo bili zelo hitri, da se meristem zaradi osvetlitve z lupo ni posušil. Izolirani meristem smo z dolgo pinceto ali iglo inokulirali na MSB gojišče v epruveto.

Enako smo izolirali meristeme iz nodijev, samo da smo najprej odrezali posamezni stranski brst iz nodija.



Slika 4: Apikalni meristem izoliran iz hmelja sorte Cicero (Radišek in sod., 2007)

3.2.2 Označevanje meristemov

Meristeme smo označili tako, da smo iz etikete na lončku, ki je bila na matični rastlini prepisali oznako.

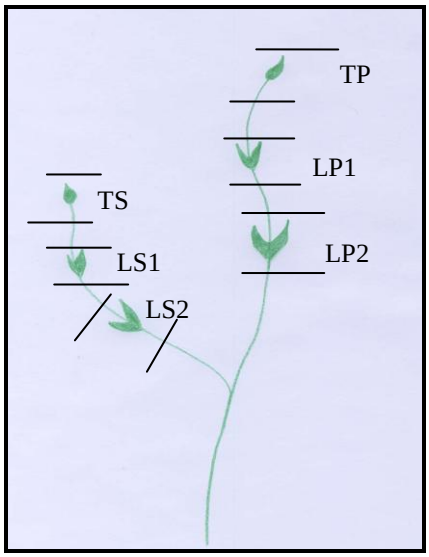
Nato smo označili iz katerega poganjka je bil izoliran meristem (slika 5):

Glavni poganjek:

- primarni apikalni oz. terminalni primarni meristem – TP,
- lateralni primarni meristem na nodiju 1 – LP1,
- lateralni primarni meristem na nodiju 2 – LP2.

Stranski poganjki:

- sekundarni apikalni oz. terminalni sekundarni meristem – TS,
- lateralni sekundarni meristem na nodiju 1 - LS1,
- lateralni sekundarni meristem na nodiju 2 – LS2.



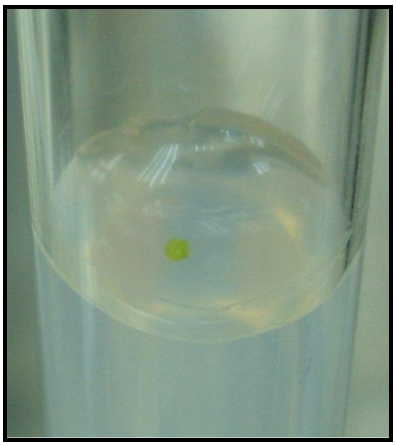
Slika 5: Označevanje brstov oz. meristemov na glavnih in stranskih poganjkih hmelja sorte Cicero: TP - terminalni primarni meristem, LP1 - lateralni primarni meristem na nodiju 1, LP2 - lateralni primarni meristem na nodiju 2, TS - terminalni sekundarni meristem, LS1 - lateralni sekundarni meristem na nodiju 1, LS2 - lateralni sekundarni meristem na nodiju 2

3.2.3 *In vitro* gojenje

Na epruveto smo označili: sorto, datum izolacije in zaporedno številko vzorca, ki smo jo ohranili do aklimatizacije regenerantov.

Epruvete z meristemi (slika 6) smo postavili v stojala in jih dali v rastno komoro, z naslednjimi pogoji:

- temperatura je bila 24 ºC (+/- 2 ºC),
- dan je trajal 16 ur,
- noč je trajala 8 ur.



Slika 6: *In vitro* gojen meristem na MSB gojišču za inciacijo brstov (Radišek in sod., 2007)

Meristeme smo najprej kultivirali na MSB gojišču za regeneracijo brstov (slika 6). Ko so oblikovali 2 do 3 internodije, smo regenerante odrezali iz skupkov in jih prestavili na MSK gojišče za koreninjenje (slika 7 A in 7 B).

A B

Slika 7: Regeneranti hmelja sorte Cicero z dvema do tremi internodiji: A - regenerant na MSB gojišču primeren za koreninjenje; B - koreninjeni regeneranti na MSK gojišču

Brste in kasneje regenerante, smo v brezprašni komori, subkultivirali najmanj enkrat mesečno. V enem mesecu, je tkivo porabilo dostopna hranila v gojišču in ga je bilo potrebno zamenjati s svežim. Iz epruvet smo s sterilno pinceto, previdno izvlekli regenerante in jih položili na sterilno podlago. Če je bilo potrebno smo odstranili kalus in regenerante prestavili v epruveto oz. gojilno posodo s svežim gojiščem (slika 7 B). S tem smo omogočili neprekinjen dostop hranil, nismo ovirali nadaljnje rasti ter preprečili širjenje okužb, če so se pojavile na posameznih regenerantih znotraj gojilne posode. Vsak regenerant smo tudi mikropropagirali.

Po štiri do petkratnem subkultiviranju smo regenerante testirali na prisotnost HLVd viroida z RT-PCR metodo.

3.3 REVERZNA TRANSKRIPCIJA IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

3.3.1 Priprava raztopin

Priprava dietil pirokarbonatne vode (DEPC)

DEPC je reagent, ki inhibira aktivnost RNAze, ki razgrajuje RNA. Je kot osnova za razkuževanje steklovine in plastike ter za pripravo vodnih raztopin.

K 999 ml destilirane vode smo dodali 1 ml DEPC. Nato smo dali vodo na inkubacijo za 3 ure na 37 ºC, vodo smo vmes večkrat premešali. Po treh urah, smo vodo avtoklavirali 15 minut pri 121 ^{o}C in pritisku 1,1 bar.

Priprava TBE pufra

V čašo z volumnom 1 L smo nalili približno 0,5 L destilirane vode in vanjo stresli: 108 g Trizma base in 55 g borove kisline ter dodali 40 ml 0,5 M EDTA raztopine (pH 8). Sestavine smo dobro premešali. Nato smo raztopino prelili v merilno bučko in z destilirano vodo umerili na 1 L. Raztopino smo prelili v reagentno steklenico in jo zaprli. Nato smo raztopino avtoklavirali 15 minut pri 121 ºC in pritisku 1,1 bar.

Priprava raztopin za ekstrakcijo DNA

EDTA 0,5 M; pH 8: 200 ml

- EDTA 37,22 g,
- H_2O do 200 ml.

Zatehtali smo EDTA in stresli v čašo z DEPC vodo. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli in mešali, dokler se EDTA ni raztopila. Ko se je raztopina zbistrila, smo jo prelili v merilno bučko in dodali še preostanek vode do 200 ml. Nato smo raztopino prelili nazaj v čašo in umerili pH na 8. pH smo uravnavali s koncentrirano NaOH (približno 3 ml). Pripravljeno raztopino smo avtoklavirali.

TRIS 1 M ; pH 8: 100 ml

- TRIS 12,11 g,
- H_2O do 100 ml.

Zatehtali smo TRIS in ga stresli v čašo z DEPC vodo. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli in mešali, dokler se TRIS ni raztopil. Ko se je raztopina zbistrila, smo jo prelili v merilno bučko in dodali še preostanek vode do 100 ml. Nato smo raztopino prelili nazaj v

čašo in umerili pH na 8. pH smo uravnavali s koncentrirano HCl (približno 3 ml). Pripravljeno raztopino smo avtoklavirali.

NaAc (natrijev acetat) 3 M; pH 5,2: 100 ml

- NaAc 24,61 g,
- H_2O do 100 ml.

Zatehtali smo NaAc in ga stresli v čašo z DEPC vodo. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli in mešali, dokler se NaAc ni raztopil. Nato smo dodali še nekaj vode in umerili pH. pH smo umerili z ocetno kislino (približno 15 ml). Raztopino smo prelili v merilno bučko in dodali še preostanek vode do 100 ml. Nato smo pripravljeno raztopino avtoklavirali.

TE pufer: 200 ml

- TRIS 1M, pH 8,0; 2 ml,
- EDTA 0,5 M, pH 8,0; 0,4 ml,
- sterilna H_2O do 200 ml.

Dobljeno raztopino smo avtoklavirali.

Ekstrakcijski pufer CTAB: 200 ml

- CTAB 4 g,
- TRIS 1M, pH 8,0; 20 ml,
- EDTA 0,5M, pH 8,0; 8 ml,
- NaCl 16,36 g.

Vse sestavine smo dali v čašo z DEPC vodo. Raztopino smo segrevali v vodni kopeli, dokler se ni zbistrila. Nato smo jo prelili v merilno bučko in dodali še preostanek vode do 200 ml. Dobljeno raztopino smo avtoklavirali. Po avtoklaviranju, ko se je raztopina ohladila, smo ji dodali 400 µl merkaptoetanola.

Izopropanol oz. 2–propanol

Izopropanol smo hranili v zamrzovalniku na -20 ^{o}C.

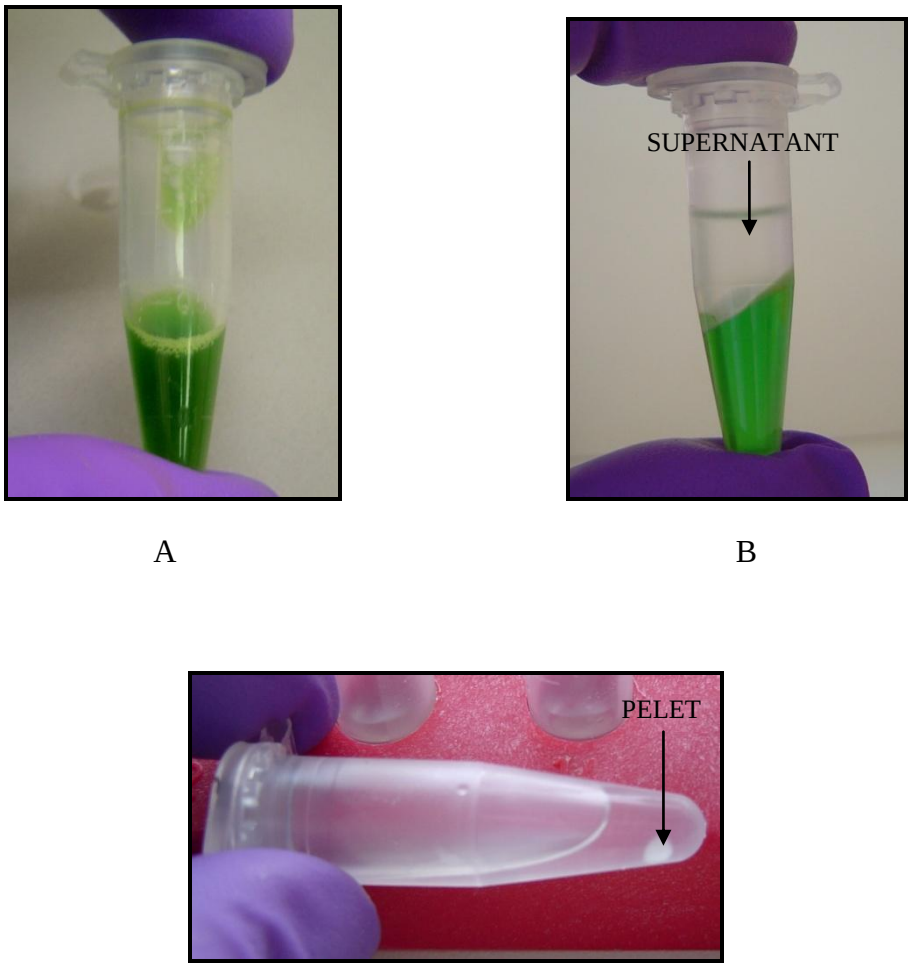
Kloroform / izoamilalkohol

Razmerje: 24:1 = 23 ml kloroforma + 1 ml izoamilalkohol

Kloroform smo nalili v merilni valj in s pipeto dodali 1 ml izoamilalkohola. Zmes smo premešali in hranili v hladilniku.

3.3.2 Izolacija celokupnih nukleinskih kislin TNA

Prižgali smo vodno kopel, jo umerili na 68 ^{o}C in segreli CTAB ekstrakcijski pufer. V čisto in suho terilnico smo dali ustrezno količino rastlinskega materiala in dodali 600 µl na 68 ºC segretega CTAB pufra ter vse skupaj dobro zdrobili v suspenzijo, da ostanki rastlisnkega materiala niso bili več vidni. Iz terilnice smo sok zlili v označeno sterilno 1,5 ml Eppendorf centrifugirko oz. mikrocentrifugirko in jo zaprli. Mikrocentrifugirke smo inkubirali v vodni kopeli 1,5 do 2 uri na 68 ºC. Vzorce smo večkrat premešali (slika 8 A). Po 1,5 do 2 urah smo vzeli vzorce iz inkubacije in dodali 500 µl mešanice kloroform/izoamilalkohol, v razmerju 24:1 (nastali sta dve fazi, zato smo vsebino mikrocentrifugirke dobro premešali, da je nastala suspenzija). Vzorce smo centrifugirali 15 minut, s hitrostjo 12000 obratov/minuto pri temperaturi 4 ºC. Po končanem centrifugiranju, smo mikrocentrifugirke zložili na stojalo (nastali sta dve fazi) (slika 8 B). Supernatant (vrhnjo prozorno tekočino) smo s 1000 µl pipeto previdno odpipetirali v novo označeno mikrocentrifugirko. Za vsak vzorc, smo zamenjali nastavek na mikropipeti. Nato smo dodali 50 µl NaAc in 500 µl ledeno hladnega izopropanola (2-propanol), hranjenega na -20 ºC. Mikrocentrifugirke smo zaprli in jih skupaj s stojalom nežno pretresli. Vzorce smo postavili v zamrzovalnik (na -20 ºC) za 20 - 30 minut in jih vmes enkrat rahlo premešali. Nato smo jih ponovno centrifugirali 15 minut, s hitrostjo 12000 obratov/minuto pri temperaturi 4 ºC. Po centrifugiranju, smo previdno odlili supernatant, da nismo izgubili usedline - peleta (slika 8 C). Vsaki mikrocentrifugirki smo dodali 500 µl 70 % etanola in mikrocentrifugirke pretresli tako, da se je pelet odlepil od stene mikrocentrifugirke, da ga je lahko etanol oblil. Zelo previdno smo odlili alkohol in ponovno centrifugirali 1 minuto, s hitrostjo 12000 obratov/minuto pri temperaturi 4 ºC, da se je preostanek alkohola posedel. S 100 µl pipeto smo previdno odpipetirali preostanek alkohola in pustili mikrocentrifugirke približno 2 minuti odprte, da je etanol izhlapel in se je pelet osušil. Nato smo s 100 µl pipeto dodali 40 µl TE pufra (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) tako, da je bil pelet v pufru. Po končanem delu, smo mikrocentrifugirke postavili za približno 30 minut v hladilnik, da so se nukleinske kisline raztopile, nato smo jih dali v zamrzovalnik na -20 ºC.



A B

C

Slika 8: Izolacija celokupnih nukleinskih kislin hmelja sorte Cicero: A - suspenzija, ki je nastala po inkubaciji vzorcev s CTAB pufrom; B - ločeni fazi, ki sta nastali po centrifugiranju, v supernatantu se nahaja izolirana DNA; C - DNA pelet

3.3.3 Redčenje vzorcev

Po izolaciji celokupnih nukleinskih kislin smo vzorce redčili v razmerju 1:200 z DEPC vodo. Redčenje smo opravili v dveh korakih in sicer tako, da smo najprej vzorce redčili v razmerju 1:10 (izolirani TNA smo dodali 40 µl TE pufra in 400 µl DEPC vode), nato pa še v razmerju 1:20 (5 µl redčenega vzorca 1:10 smo prenesli v novo PCR epruveto in dodali 95 µl DEPC vode). Po končanem delu, smo vzorce hranili na temperaturi -20 ^{o}C.

3.3.4 Testiranje viroida z RT-PCR metodo

Metoda RT-PCR je sestavljena iz procesa prepisovanja virusne RNA v komplementarno DNA (cDNA) in procesa pomnoževanja dobljene cDNA. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda encimske sinteze nukleinskih kislin, s katero *in vitro* lahko v kratkem času pomnožimo 10^{n} (n je število ciklov) značilen odsek DNA. Reakcija temelji na vezavi

in podaljševanju dveh začetnih nukleotidov, ki omejujeta tarčni odsek DNA (Erlich in sod., 1991). Po denaturaciji DNA se začetna oligonukleotida vežeta na komplementarno vijačnico DNA in med njima poteka sinteza nove verige.

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) sestavljajo trije cikli (Erlich in sod., 1991):

- denaturacija DNA
- vezava začetnih oligonukleotidov
- sinteza nove verige DNA na osnovi tarčne DNA.

Za določevanje HLVd viroida smo uporabili začetna oligonukleotida:
1P: 5'-GGATACAACTCTTGAGCGCC-3' in 1M: 5'-TAGTTTCCAACTCCGGCTGG-3'
10 mM, proizvajalca Sigma-Aldrich (Hataya in sod., 1992).

Za RT-PCR analizo smo uporabili komercialni komplet Promega Access RT-PCR System, ki vsebuje naslednje kemikalije:

- AMV/Tfl 5 x (reverzna transkriptaza/polimeraza) reakcijski pufer,
- $MgSO_4$ 25 mM,
- dNTP 10 mM,
- kontrola kita (Positive Control RNA) 1,25 amol/µ,
- začetna oligonukleotida kontrole: Down stream control in Up stream control 15 µM,
- AMV RT - reverzna transkriptaza 5U/µl
- Tfl Poly - polimeraza 5U/µl
- vodo (Nuclease clear Free Water).

Vzorce, ki smo jih predhodno razredčili z DEPC vodo v PCR epruvetah, smo ročno premešali in nato še centrifugirali. Nove PCR epruvete, smo postavili na ledeno podlago in vanje odpipetirali 2 µl vzorca DNA. Enako smo storili pri 2 pozitivnih HLVd kontrolah (K1 in K2) in kontroli kita. Vzorcem smo dodali še 1,2 µl začetnega oligonukleotida HLVd -P in HLVd - M. Kontroli kita smo dodali svoja začetna oligonukleotida in sicer *Down stream control* in *Up stream control*. Vzorce smo dobro zaprli in jih dali v PCR aparat na denaturacijo, ki je trajala 5 minut pri temperaturi 94 ^{o}C. Previdno smo odprli pokrov PCR aparata, preverili, da so vzorčki dobro zaprti in jih zložili nazaj v stojalo ter dali za nekaj minut v zamrzovalnik na -20 ^{o}C.

Med denaturacijo smo si pripravili mešanico v 1,5 ml centrifugirko z naslednjimi sestavinami:

- voda - Nuclease Free Water (6,78 µl/vzorec),
- AMV/Tfl reakcijski pufer 5 x (3 µl/vzorec),

- $MgSO_4$ 25 mM (0,72 µl/vzorec),
- dNTP 10 mM (0,3 µl/vzorec),
- AMV RT - reverzna transkriptaza 5U/µl (0,3 µl/vzorec),
- Tfl Poly - polimeraza 5U/µl (0,3 µl/vzorec).

Najprej smo mešanico ročno premešali, nato smo jo še centrifugirali.

V vsak vzorec smo odpipetirali 11,4 µl mešanice, nato smo epruvete dobro zaprli, jih premešali in centrifugirali do 4000 obratov. Nato smo jih dali v PCR aparat na inkubacijo po naslednjem temperaturnem profilu:

48 °C 45 min
94 °C 2 min

94 °C 30 sec
57 °C 1 min } 33 ×
68 °C 2 min

68 °C 7 min
hlajenje 8 °C

Po PCR inkubaciji smo dali vzorce v zamrzovalnik do naslednjega dne, ko smo pričeli z elektroforezo. Naslednji dan, smo vzorce odtalili in vsakemu dodali 6 µl nanašalnega barvila [12,5 % (w/v) fikol 400, 0,2 % (w/v) brom fenol modro, 0,67xTBE; priprava 100 ml: 12,5 g fikol tip 400, 0,2 g brom fenol modro, 6,7 ml 10xTBE, vode do 100 ml]. Nato smo vzorce ročno premešali in centrifugirali do 4000 obratov/minuto. Tako pripravljene vzorce smo nanesli na agarozno elektroforezo.

3.3.5 Agarozna elektroforeza

Elektroforeza je proces ločevanja nabitih molekul v električnem polju. Pri tem je gibanje molekul ovirano glede na njihovo velikost in viskoznost gela. Na elektroforetsko mobilnost, ki je razmerje med nabojem na molekuli in zavornim koeficientom oz. med hitrostjo potovanja molekule in električnim potencialom, vplivajo:

- lastnosti vzorca; če je naboj večji molekule hitreje potujejo, če so molekule večje potujejo počasneje,
- električno polje; večji ko je tok, hitrejše je potovanje in večji ko je upor, počasnejše so
- pufer; večja ko je ionska jakost pufra, več toka lahko prevaja in
- nosilec; lahko je inerten ali pa se molekule nanj vežejo in s tem upočasni gibanje.

Priprava gela

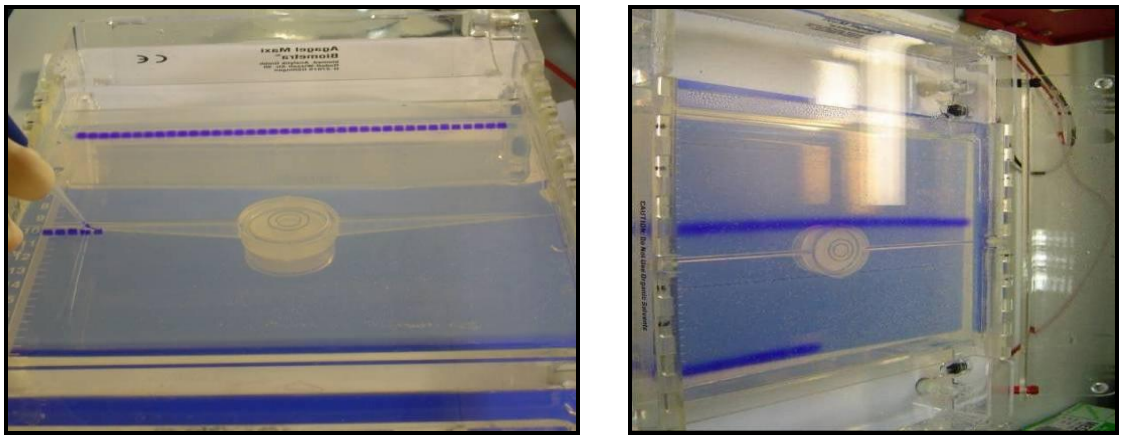
Priprava 1,5 % agaroznega gela: zatehtali smo 4,5 g SeaKem LE agaroze in stresli v erlenmajerico. Nato smo pripravili raztopino: 30 ml TBE in 270 ml destilirane vode. Vse skupaj smo v steklenici premešali ter raztopili v mikrovalovni pečici. Raztopino smo nato pod tekočo vodo ohladili na 60 - 70 ºC. Nadaljnje delo je potekalo v digestoriju. Dodali smo 15 µl etidijevega bromida (10 mg etidijevega bromida/ml destilirane H_2O) in dosegli koncentracijo 0,5 µg/ml gela ter dobro premešali. Raztopino smo zlili v pripravljen model elektroforezne posode, ki smo ga predhodno postavili na nivelirno mizo. Po približno 30 minutah se je gel strdil. Previdno smo iz modela odstranili glavnik in tesnilo, ki sestavljata model. Gel smo potopili v 0,5 kratno raztopino TBE pufra v elektroforezni posodi.

Nanos vzorcev na gel

Vzorce smo s pipeto nanesli v odprtine gela, ki smo ga predhodno pripravili v elektroforezni posodi (slika 9 A). Na konec gela smo nanesli še 6 µl markerja (Gene Ruler 100 bp Ladder). Elektroforezno posodo smo zaprli s pokrovom in priključili na električni tok na 150 V. Vzorci so potovali približno eno uro (slika 9 A in 9 B).

Obdelava rezultatov

Gel s stojalom smo vzeli iz elektroforezne posode in ga fotografirali z digitalnim sistemom za arhiviranje agaroznih gelov GenGenius s programom GeneSnap.



A B

Slika 9: Agarozna elektroforeza: A - nanos vzorcev na gel; B - potovanje vzorcev po gelu

3.4 AKLIMATIZACIJA

Po večkratnem subkultiviranju in testiranju hmeljnih rastlin na okužbo z latentnim viroidom HLVd smo regenerante, ki niso vsebovali viroida, pripravili na aklimatizacijo oz. smo jih presadili v šotne lončke in jih gojili v mini rastlinjakih. Regenerante z razvitim koreninskim sistemom smo previdno izvlekli iz gojilnih posod ter z destilirano vodo sprali ostanke gojišča na koreninah. Nato smo jih posadili v namočene šotne lončke (slika 10 A in 10 B). V en mini rastlinjak smo presadili 15 regenerantov.

A B

Slika 10: Aklimatizacija hmelja sorte Cicero: A - regenerant z očiščenim koreninskim sistemov; B - regenerant z oznako v šotnem lončku

Šotne lončke (Jiffy product international AS, Norveška), ki smo jih uporabili, so imeli naslednjo sestavo:

- pH 5,5 (+/- 0,5),
- gnojilo Nitramix (dušik 12 %, fosfor 6 %, kalij 6 %),
- mikroelementi,
- 95 % organske snovi.

Nadaljnja oskrba je potekala v rastni komori, z naslednjimi pogoji:

- dan se je pričel ob 6.00 in je trajal 18 ur,
- noč se je pričela ob 19.00 in je trajala 6 ur,
- dnevna temperatura je bila 18 ^{o}C,
- nočna temperatura je bila 14 ^{o}C,
- v rastni komori je bila 60 % vlaga.

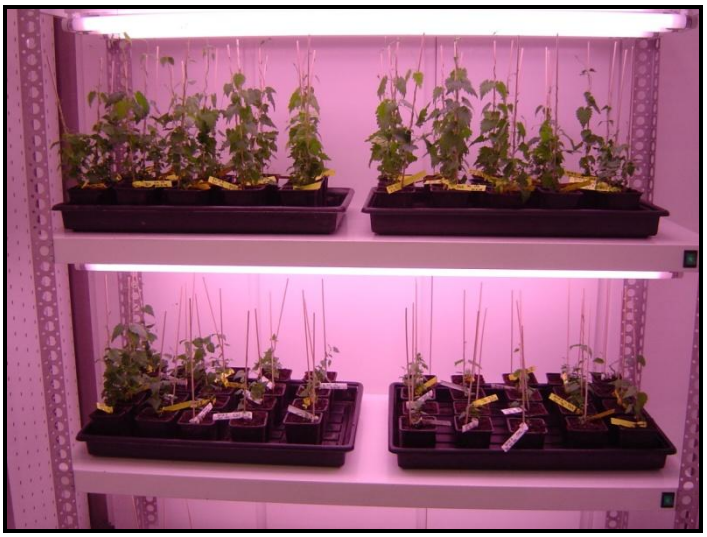
Regenerante smo dnevno rosili z destilirano vodo. Po potrebi smo omočili šotne lončke z vodovodno vodo tako, da smo v podstavek nalili vodo in počakali, da so se šotni lončki prepojili. Pazili smo, da rastline niso ležale v vodi. Če je bilo potrebno, smo otresli kondenz na pokrovu mini rastlinjaka.

Zaradi pojava hmeljeve pepelovke (*Sphaerotheca humuli*), smo po enem tednu poškropili rastline s fungicidom Zato s polovično koncentracijo (0,1 g/L). Po približno dveh tednih smo poškropili rastline še s fungicidom Merpan, prav tako s polovično koncentracijo (0,1 g/L). Škropljenje s polovično koncentracijo z Merpanom smo ponovili še v tretjem tednu.

Po treh do štirih tednih, so korenine prerasle šotne lončke in smo jih posadili v male plastične lončke, velikosti 8x8x8 cm (slika 11). Uporabili smo Gramo profi – substrat z malo mlete, zmerno mlete in močno mlete šote z dodatki:

- 50 - 300 mg/L N,
- 80 - 300 mg/L P_2O_5,
- 80 - 400 mg/L K_2O,
- sol <1,5 g/L,
- pH 5 - 6,5.

Rastline smo ovili na oporo ter zalivali po potrebi, največ 2 krat tedensko (slika 11).



Slika 11: Aklimatizirane rastline hmelja sorte Cicero, v rastni komori

Po dveh tednih, smo rastline pričeli dognojevati s polovično koncentracijo gnojila Horty za okrasne rastline, z naslednjo sestavo:

- 6-8-6 + mikroelementi (Fe, Mg, B, Zn, Mn, Cu, Mo),
- dušik; skupni 72 g/L, amonijski 20 g/L, nitratni 22 g/L, amidni 30 g/L,

- fosfor; vodotopni P_2O_5 100 g/L,
- kalij; vodotopni K_2O 80 g/L.

Po naslednjih dveh tednih, smo rastline presadili v velike plastične lonce (velikosti 15x15x20 cm) in jim dali višjo oporo. Ko so bile rastline približno enajst tednov na aklimatizaciji, smo jih prestavili v neogrevan rastlinjak in jih pričeli dognojevati s polnim odmerkom gnojila (slika 12).

Slika 12: Aklimatizirana rastlina hmelja sorte Cicero

Ko so bile rastline 15 tednov na aklimatizaciji, smo jih ponovno z enakimi metodami in enakimi postopki testirali na HLVd viroid.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA MERISTEMOV

Iz mladih poganjkov matičnih rastlin hmelja sorte Cicero, smo v aseptičnih razmerah skupno izolirali 292 meristemov (preglednica 2).

Preglednica 2: Število izoliranih meristemov hmelja sorte Cicero, glede na izvor poganjkov

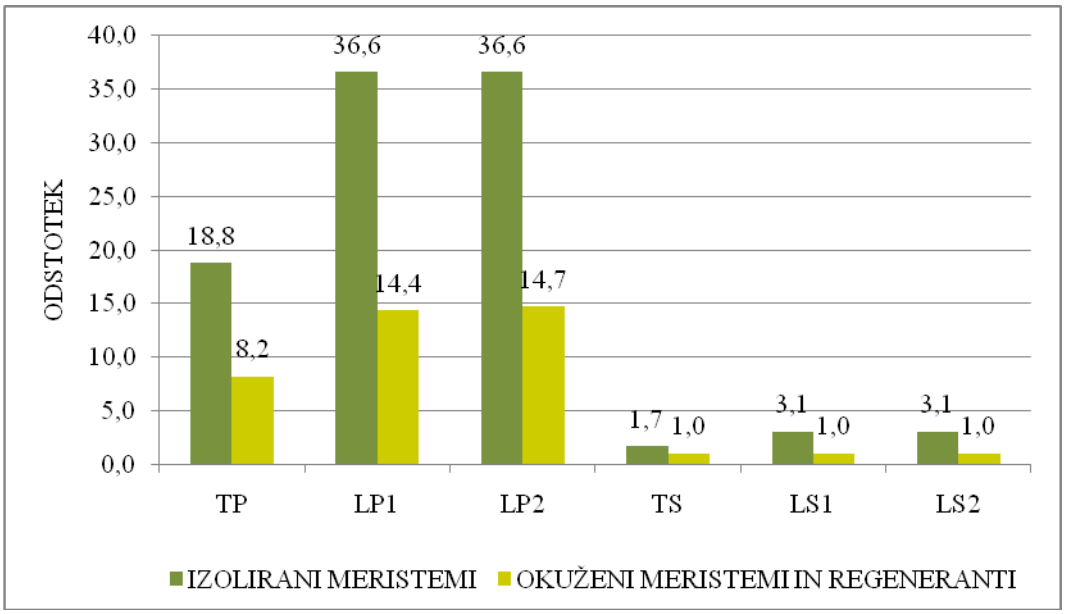
OZNAKA MERISTEMOV	ŠTEVILO MERISTEMOV
TP	55
LP1	107
LP2	107
TS	5
LS1	9
LS2	9
SKUPNO	292

Iz glavnih poganjkov smo izolirali 55 terminalnih primarnih meristemov (TP), 107 lateralnih primarnih meristemov na nodiju 1 (LP1) in 107 lateralnih primarnih meristemov na nodiju 2 (LP2).

Iz stranskih poganjkov smo izolirali 5 terminalnih sekundarnih meristemov (TS), 9 lateralnih sekundarnih meristemov na nodiju 1 (LS1) in 9 lateralnih sekundarnih meristemov na nodiju 2 (LS2) (preglednica 2).

4.1.1 Odstotek okuženih meristemov in regenerantov

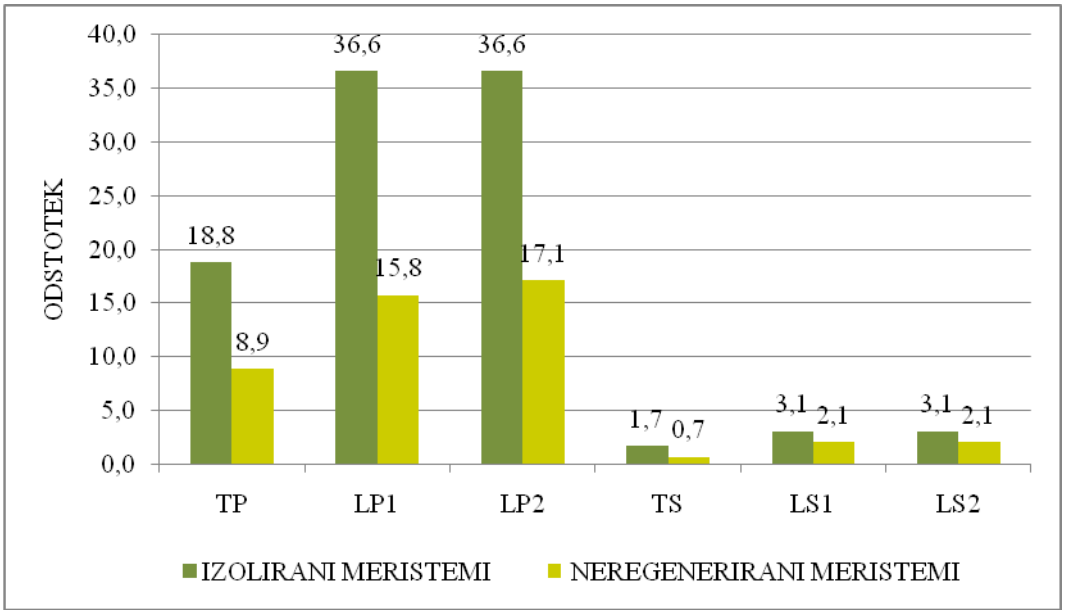
Pri izolaciji meristemov in kasnejšemu subkultiviranju je prišlo do okužb, zaradi česar smo izgubili 118 oz. 40,4 % meristemov in regenerantov. Od tega je bilo največ 14,7 % LP2 okuženih meristemov in nastalih regenerantov, nekoliko manj 14,4 % se je okužilo LP1 meristemov in regenerantov ter 8,2 % je bilo okuženih TP meristemov. Po 1 % je bilo okuženih TS, LS1 in LS2 meristemov in nastalih regenerantov (slika 13).



Slika 13: Odstotek izoliranih meristemov ter okuženih meristemov in regenerantov hmelja sorte Cicero, glede na izvor poganjkov

4.1.2 Odstotek regeneriranih in neregeneriranih meristemov

Nekaj dni po inokulaciji meristemov na MSB gojišču smo ugotovili, da se jih 136 oz. 46,6 % ni regeneriralo. Od tega se ni regeneriralo 17,1 % LP2 meristemov in 15,8 % LP1 meristemov ter 8,9 % TP meristemov. Pri LS1 in LS2 se ni regeneriralo 2,1 % meristemov in pri TS se ni regeneriralo 0,7 % meristemov (slika 14). Predvidevamo, da je do tega prišlo zaradi poškodb pri izolaciji meristemov. Ker meristemi niso pričeli z rastjo, smo jih zavrgli.



Slika 14: Odstotek regeneriranih in neregeneriranih meristemov hmelja sorte Cicero, glede na izvor poganjkov

4.2 ANALIZA HLVd VIROIDA Z RT-PCR METODO

Po opisanih postopkih, smo po nekaj tednih kultiviranja in mikropropagacije, izvedli testiranje na HLVd viroid.

4.2.1 Prvo testiranje *in vitro* gojenih regenerantov na HLVd viroid

Testirali smo 36 regenerantov, ki so bili dobro razviti oz. so imeli dovolj listov za izolacijo DNA in kjer pri subkultiviranju ni prišlo do okužb. 2 regeneranta (označena z *) nista imela dovolj listne mase, zato ju nismo testirali (preglednica 3).

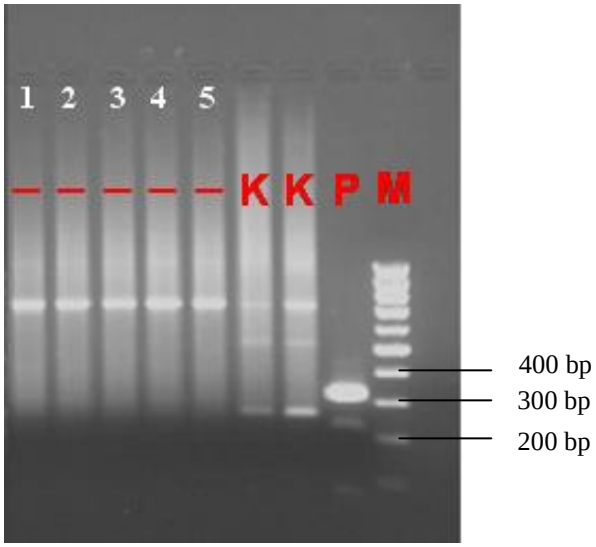
Preglednica 3: Število *in vitro* regenerantov hmelja sorte Cicero prvega testiranja na HLVd viroid, glede na izvor poganjkov

OZNAKA MERISTEMOV	ŠTEVILO *IN VITRO* REGENERANTOV
TP	5
LP1	18+1*
LP2	13+1*
TS	0
LS1	0
LS2	0
SKUPAJ	36+2*

Vsi regeneranti so bili iz meristemov, ki smo jih izolirali iz glavnih poganjkov. 5 je bilo izoliranih iz terminalnega primarnega meristema (TP), 18 je bilo izoliranih iz lateralnega

primarnega meristema na nodiju 1 (LP1) in 13 je bilo izoliranih iz lateralnega primarnega meristema na nodiju 2 (LP2) (preglednica 3).

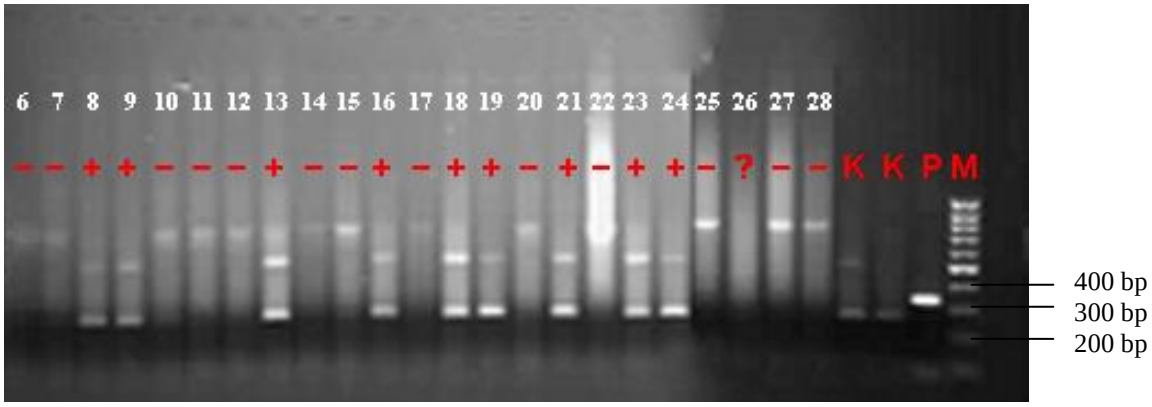
Pri vzorcih z oznako 1-5 smo z RT-PCR metodo ugotovili, da ni prisoten fragment dolžine 256 bp in s tem potrdili, da hmeljne rastline ne vsebujejo HLVd (slika 15).



Slika 15: Agarozni gel, RT-PCR analiza določanja HLVd viroida v regenerantih hmelja sorte Cicero: 1 do 5 – negativni vzorec, K - HLVd pozitivna kontrola (256 bp namnožen fragment), P - kontrolna RNA pomnožitev RT-PCR kita (323 bp), M - dolžinski marker (100-1000 bp)

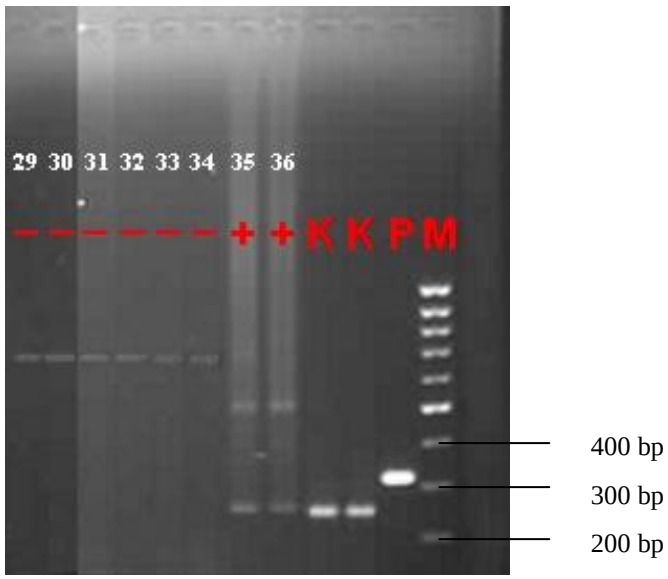
Pri vzorcih z oznako 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 20, 22, 25, 27 in 28 smo z RT-PCR metodo ugotovili, da ni prisoten fragment dolžine 256 bp in s tem potrdili, da hmeljne rastline ne vsebujejo HLVd (slika 16).

Pri vzorcih z oznako 8, 9, 13, 16, 18, 19, 21, 23, in 24 smo z RT-PCR metodo ugotovili, da je prisoten fragment dolžine 256 bp in s tem potrdili, da hmeljne rastline vsebujejo HLVd. Vzorec številka 26 po agaroznem gelu ni potoval oz. ni imel sledi, zato mu nismo določili viroidnosti in smo ga zavrgli (slika 16).

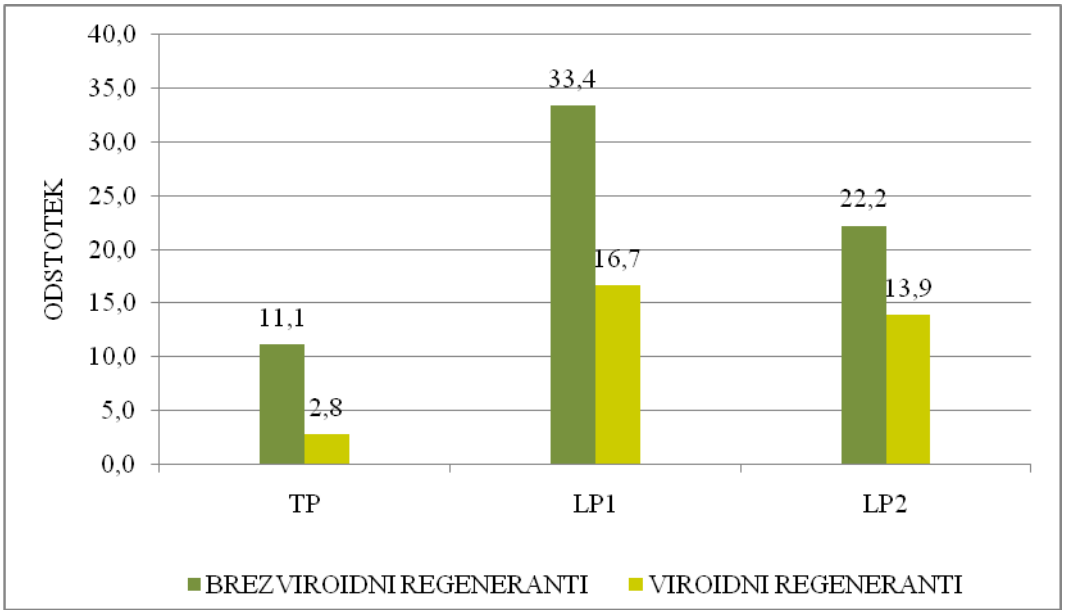


Slika 16: Agarozni gel, RT-PCR analiza določanja HLVd viroida v regenerantih hmelja sorte Cicero: 6 do 28 + pozitivni in – negativni vzorec, K - HLVd pozitivna kontrola (256 bp namnožen fragment), P - kontrolna RNA pomnožitev RT-PCR kita (323 bp), M - dolžinski marker (100-1000 bp)

Pri vzorcih z oznako 29, 30, 31, 32, 33 in 34 smo z RT-PCR metodo ugotovili, da ni prisoten fragment dolžine 256 bp in s tem potrdili, da hmeljne rastline ne vsebujejo HLVd. Pri vzorcih 35 in 36 je bil prisoten fragment dolžine 256 bp, torej so rastline vsebovale HLVd (slika 17).



Slika 17: Agarozni gel, RT-PCR analiza določanja HLVd viroida v regenerantih hmelja sorte Cicero: 29 do 36 + pozitivni in – negativni vzorec, K - HLVd pozitivna kontrola (256 bp namnožen fragment), P - kontrolna RNA pomnožitev RT-PCR kita (323 bp), M - dolžinski marker (100-1000 bp)



Slika 18: Odstotek brezviroidnih in viroidnih regenerantov hmelja sorte Cicero

Po prvem testiranju smo dobili 24 oz. 66,7 % regenerantov, ki so bili brezviroidni. 4 oz. 11,1 % so bili izolirani iz terminalnega primarnega meristema (TP), 12 oz. 33,4 % je bilo izoliranih iz lateralnega primarnega meristema na nodiju 1 (LP1) in 8 oz. 22,2 % je bilo izoliranih iz lateralnega primarnega meristema na nodiju 2 (LP2) (slika 15, 16, 17 in 18).

11 regenerantov je bilo viroidnih, 1 ni imel sledi, torej 33,4 % regenerantov smo zavrgli (slika 15, 16, 17 in 18).

AKLIMATIZACIJA

24 brezviroidnih regenerantov smo prestavili iz *in vitro* gojilnih posod v šotne lončke in jih dali v mini rastlinjake na aklimatizacijo.

Slika 19: Brezviroidne rasline hmelja sorte Cicero po prvem testiranju na aklimatizaciji v rastni komori

Med aklimatizacijo sta propadli 2 brezviroidni rastlini. Ena je bila izolirana iz TP in druga iz LP1 meristema. Uspešno se jih je aklimatiziralo 91,7 % brezviroidnih rastlin.

4.2.2 Drugo testiranje *in vivo* gojenih rastlin na HLVd viroid

Drugo testiranje na HLVd viroid smo opravili, ko so bile rastline hmelja že aklimatizirane v rastlinjaku.

Slika 20: Brezviroidne rastline hmelja sorte Cicero v rastlinjaku pred drugim testiranjem na HLVd viroid

Za drugo testiranje smo uporabili vzorce iz 22 aklimatiziranih rastlin, pri katerih smo v prvem testiranju ugotovili, da so brezviroidne. Zraven smo testirali še 2 (označena z *) *in vitro* regeneranta, ki sta imela ob prvem testiranju premalo listne mase in ju takrat nismo testirali (preglednica 4).

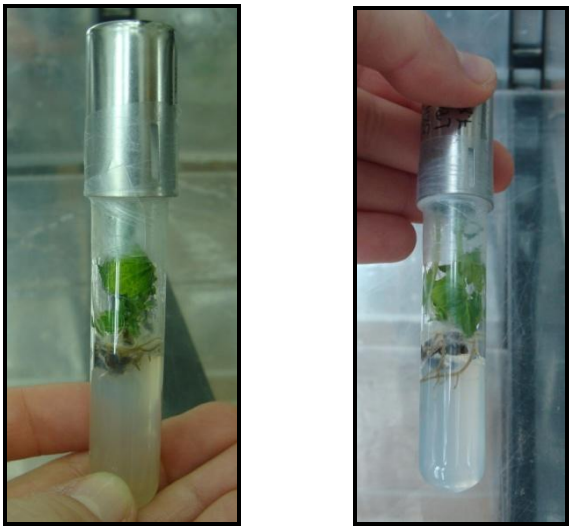
Preglednica 4: Število *in vivo* in *in vitro* rastlin hmelja sorte Cicero drugega testiranja na HLV d viroid, glede na izvor poganjkov

OZNAKA MERISTEMOV	DRUGO TESTIRANJE *IN VIVO* RASTLIN	PRVO TESTIRANJE *IN VITRO* RASTLIN
TP	3	0
LP1	11	1*
LP2	8	1*
TS	0	0
LS1	0	0
LS2	0	0
SKUPAJ	22	2

Dva regeneranta, ki sta bila v prvem testiranju negativna, v drugem testiranju nista imela sledi, zato smo ju zavrgli. Pri ostalih 20 negativnih rastlinah na HLVd viroid iz prvega testiranja smo v drugem testiranju prav tako potrdili, da pri njih ni prisoten viroid.

Dva regeneranta (označena z *), ki ju sploh nismo dali na aklimatizacijo, sta izstopala po obliki rasti, bila sta slabotna, s kratkimi internodiji, rasla sta mnogo počasneje od ostalih in

pri testiranju na HLVd po agaroznem gelu nista potovala oz. nista imela sledi, zato smo ju zavrgli. Na osnovi dobljenih rezultatov predvidevamo, da je pri teh dveh regenerantih, prišlo do somaklonske variabilnosti (slika 21).



Slika 21: Primera somaklonske variabilnosti mikropropagiranih regenerantov iz meristemov hmelja sorte Cicero

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, ki so se sposobni v rastlinski celici sami razmnoževati. Pri hmelju je pogost viroid HLVd, ki ga sestavlja enoverižna RNA z 256 baznimi pari (Puctha in sod., 1988). Že opravljene raziskave so pokazale, da okužba z viroidom HLVd vpliva na zmanjšanje količine pridelka in njegovo kvaliteto (Knapič in Javornik, 1999).

Namen raziskave je bil, vzgojiti brezviroidne sadike hmelja sorte Cicero, ki bi se uporabile za certificirano pridelavo brezviroidnih sadik. Cicero je triploidni križanec med Auroro in autotetraploidnim sejančkom Savinjskega goldinga in ga uvrščamo med pozne sorte, je dobro skladiščno obstojen in z dobro organoleptično oceno hmeljevega piva (Čerenak in sod., 2002). Ker hmelj razmnožujemo vegetativno je pomembno, da so brezviroidne že matične rastline, tako zagotovimo pridelavo brezviroidnih sadik, kar poveča kvaliteto sadilnega materiala in pridelka. Leta 2009 so Leskovšek in sod. vzgojili prve breviroidne rastline osmih slovenskih sort hmelja s pomočjo izolacije meristemov, ki služijo kot izvorni sadilni material.

V poskusu smo za rastlinski material uporabili poganjke sorte Cicero s tremi internodiji. Meristeme smo izolirali v brezprašni komori v sterilnih razmerah iz terminalnih in stranskih brstov hmelja. S preparirno iglo smo odstranili ovršne liste, do središča z meristemom in dveh primordialnih listov. Po izolaciji, smo meristeme inokulirali na MSB gojišče za regeneracijo (Murashige in Skoog, 1962). Ko so oblikovali dva do tri internodije, smo regenerante prestavili na gojišče MSK za koreninjenje. Brste in kasneje regenerante smo subkultivirali najmanj enkrat mesečno. Če je bilo potrebno smo odstranili kalus in regenerante prestavili v gojilno posodo s svežim gojiščem. Vsak regenerant smo tudi mikropropagirali. Po štiri do petkratnem subkultiviranju smo regenerante z RT-PCR metodo testirali na prisotnost HLVd viroida. Metodo so za sekvenciranje viroidov uporabili Goldbach in sod. (1992), za testiranje viroida v hmelju so jo istega leta uporabili Hataya in sod..

Po končani RT-PCR, smo produkte še analizirali z elektroforezo v agaroznem gelu.

Največ regenerantov, ki smo jih uporabili za prvo testiranje, je bilo izoliranih iz lateralnih primarnih meristemov na nodiju 1 (LP1) in najmanj iz terminalnih primarnih meristemov (TP).

Po večkratnem subkultiviranju in testiranju hmeljnih rastlin na okužbo s HLVd viroidom, smo regenerante, ki niso vsebovali viroida, pripravili na aklimatizacijo. Posadili smo jih v šotne lončke v mini rastlinjake in jih prestavili v rastno komoro s kontroliranimi pogoji. Po enajstih tednih aklimatizacije, smo jih prestavili v neogrevan rastlinjak.

V času aklimatizacije se je na rastlinah pojavila hmeljeva pepelovka (*Sphaerotheca humuli*), zato smo rastline tretirali s kemičnima pripravkoma Zato in Merpan.

Po uspešni 91,7 % aklimatizaciji v rastlinjaku (2 regeneranta sta propadla), smo ponovno izvedli testiranje, aklimatiziranih brezviroidnih rastlin. Največ rastlin, ki smo jih uporabili za drugo testiranju, je bilo izoliranih iz laterarnih primarnih meristemov na nodiju 1 in najmanj iz terminalnih primarnih meristemov.

Iz glavnih in stranskih poganjkov hmelja, smo izolirali 292 meristemov. Med poskusom smo spremljali njihov rast in razvoj. Ugotovili smo, da se jih 46,6 % ni regeneriralo in pri 40,4 % je prišlo do okužb. 36 regenerantov, vzgojenih iz meristemov, smo testirali na HLVd. Pri prvem testiranju, smo za 24 oz. 66,7 % regenerantov, z analizo RT-PCR in elektroforezo potrdili, da ni prisoten viroid. Dva regeneranta (označena z *), zaradi slabe rasti nismo aklimatizirali, pri testiranju na HLVd po agaroznem gelu nista potovala oz. nista imela sledi, zato smo ju zavrgli. Zavrgli smo tudi dva regeneranta, ki sta propadla med aklimatizacijo.

V drugem testiranju smo uporabili 24 regenerantov in pri 20 potrdili, da ni prisotnosti viroida. Dva regeneranta, ki sta bila ob prvem testiranju negativna, nista imela sledljivosti, zato smo ju zavrgli.

Za ostalih 20 vzorcev brezviroidnih rastlin, ki smo jih drugič testirali, smo ugotovili, da ne vsebujejo viroida. Največ brezviroidnih rastlin je bilo izoliranih iz lateralnega primarnega meristema LP1, medtem ko se meristemi izolirani iz stranskih poganjkov sploh niso regenerirali.

Iz že opravljenih raziskav, Barbara in Adams (2003) navajata, da je v spodnjem delu rastline večja stopnja okuženosti z viroidom, kot v bližini vrha rastline, kar je lahko bil vzrok, da se meristemi iz stranskih poganjkov niso regenerirali. Drugi vzrok je lahko v tem, ker imajo stranski poganjki manjše meristeme in med izolacijo lahko utrpijo večje mehanske poškodbe.

5.2 SKLEPI

Rezultati našega testiranja so potrdili prisotnost viroida HLVd pri sorti Cicero. Nižjo stopnjo viroidnosti, smo opazili pri regenerantih izoliranih iz lateralnih primarnih meristemov, medtem ko je bila pri regenerantih izoliranih iz terminalnih primarnih meristemov stopnja viroidnosti višja.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je s postopki in metodo ki smo jo uporabili, možno vzgojiti brezviroidne sadike hmelja. Potrebno je, da je okolje kjer izoliramo meristeme in inokuliramo na gojišče popolnoma sterilno.

Pri izolaciji in kasnejšemu subkultiviranju je prišlo do okužb, zaradi česar smo izgubili 40,4 % vseh meristemov.

Pomembno je tudi, da smo pri izolaciji natančni in hitri, saj se mehansko in termično poškodovani meristemi ne regenerirajo. 46,6 % meristemov se ni regeneriralo na MSB gojišču za regeneracijo brstov.

Na higieno prostora, je potrebno paziti tudi v času aklimatizacije v rastni komori in rastlinjaku, da ne prihaja do pojava bolezni in škodljivcev ter izgube rastlin.

Po aklimatizaciji in drugem testiranju na prisotnost HLVd viroida smo dobili 20 oz. 52,6 % brezviroidnih rastlin od 38 nastalih regenerantov.

Smotrno bi bilo, da bi testiranje na HLVd viroid ponovili čez nekaj časa, po presaditvi aklimatiziranih brezviroidnih rastlin na polje in ugotoviti, kakšna je verjetnost, da se v brezviroidnem nasadu ponovno pojavi prisotnost viroida in kakšni bi bili vzroki za to.

Ob morebitnem ponovnem pojavu okužbe z viroidom bi lahko vzorčili na različnih višinah in testiranje bi lahko izvedli v različnih časovnih obdobjih. Tako bi lahko ocenili sistemičnost viroida, glede na fenofaze razvoja.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo pri hmelju (*Humulus lupulus* L.) sorte Cicero, eliminirali hmeljev latentni viroid (HLVd), ker smo želeli vzgojiti brezviroidne sadike.

V brezprašni komori, smo izolirali 292 meristemov (preglednica 2). Po izolaciji, smo meristeme inokulirali na MSB gojišče za regeneracijo brstov, kasneje smo regenerante prestavili na MSK gojišče za koreninjenje. Če je bilo potrebno, smo odstranili kalus in regenerante prestavili v gojilno posodo s svežim MSK gojiščem. Vsak regenerant, smo tudi mikropropagirali. Po štiri do petkratnem subkultiviranju, smo jih testirali na prisotnost HLVd viroida.

Nekaj dni po inokulaciji meristemov na MSB gojišču smo ugotovili, da se jih 136 oz. 46,6 % ni regeneriralo. Od tega se največ ni regeneriralo 17,1 % LP2 meristemov in najmanj TS 0,7 % meristemov (slika 14).

Med postopkom dela je prišlo do okužbe zaradi česar smo izgubili 118 oz. 40,4 % meristemov in regenerantov. Od tega je bilo največ 14,7 % LP2 okuženih meristemov ter regenerantov in najmanj, po 1 % je bilo okuženih TS, LS1 in LS2 meristemov ter nastalih regenerantov (slika 13).

Več avtorjev navaja, da so določali hmeljev viroid z RT-PCR metodo (Erlich in sod., 1991). V Sloveniji sta bili v obdobju 1997 - 2001 za določevanje HLVd uvedeni dve diagnostični tehniki R-PAGE in RT-PCR. V letu 2004 je sledil razvoj Dot-blot metode (Radišek in sod. 2007)

Z metodo RT-PCR in agarozno elektroforezo smo ugotovili, da je 24 oz. 66,7 % rastlin brezviroidnih in smo jih dali na aklimatizacijo. Največ brezviroidnih regenerantov je bilo izoliranih iz LP1. 11 regenerantov je bilo viroidnih, 1 po agaroznem gelu ni potoval oz. ni imel sledi, torej 33,4 % regenerantov smo zavrgli (slika 15, 16, 17 in 18).

Med aklimatizacijo, sta propadla 2 regeneranta.

V drugem testiranju smo uporabili 22 uspešno aklimatiziranim rastlin in 2 (označena z *) regeneranta, ki pri prvem testiranju nista imela dovolj listne mase (preglednica 4). Dva regeneranta, ki sta bila v prvem testiranju negativna in 2 regeneranta (označena z *), ki ju sploh nismo dali na aklimatizacijo, v drugem testiranju na agaroznem gelu nista imela sledi, zato smo jih zavrgli.

Pri 20 oz. 52,6 % rastlinah smo potrdili, da ni prisoten viroid.

Iz dobljenih podatkov lahko zaključimo da:

- sorta Cicero vsebuje viroid HLVd,
- je uporabljena metoda dela primerna, za ugotavljanje viroidnosti pri hmelju sorte Cicero,
- je potrebno biti pozoren na sterilnost in higieno, da med inokulacijo in *in vitro* gojenjem ter med aklimatizacijo, ne pride zaradi visoke vlage do glivični okužb in obolenj,
- je potrebno biti pri izolaciji natančen in hiter, da ne pride do mehanskih ali termičnih poškodb (termične poškodbe nastanejo zaradi osvetlitve z stereomikroskopom).

Verjetno je glavni način vnosa HLVd v brezviroidne nasade okužen rastlinski material in mehanski prenos s kontaminiranim orodjem pri oskrbi nasada (Krajačić in sod., 1995). Dotik med rastlinami, ni pomemben dejavnik širjenja (Barbara in Adams, 2003).

7 VIRI

Barbara D.J., Adams A.N. 2003. Hop latent viroid. V: Viroids. Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik S.S. (ur.). CSIRO, Collingwod: 213-217

Barbara D.J., Adams A.N., Morton A., Ridout M.S. 1992. The distribution of hop latent viroid within a commercial planting of hop (*Humulus lupulus*) cultivar wye challenger. Acta Horticulturae, 308: 87- 94

Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zagronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje: 168 str.

Brown T. A. 1992. Genetics - a molecular approach. London, Chapman & Hall: 367 str.

Čerenak A., Dolinar M., Ferant N., Friškovec I., Knapič M., Knapič V., Košir I., Kovačevič M., Majer D., Pavlovič M., Rode J., Šuštar - Vozlič J., Virant M., Zmrzlak M., Žolnir M. 2002. Priročnik za hmeljarje. Žalec. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 248 str.

Diener T. O., Owens R. A., Hammond R. W. 1993. Viroids: The smallest and simplest agents of infectious disease. How do they make plants sick? Intervirology, 35: 186-195

Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science, 252: 1643-1650

Goldbach R., Haan P., Veruin B.J.M. 1992. Gene sequences in viruses, viroids and prokaryotes and development of diagnostic tools. V: Biotehnology and crop improvement in Asia. India, Patancheru: 265-279

Hataya T., Hikage K., Suda N., Nagata T., Li S., Itoga Y., Tanikoshi T., in Shikata E. 1992. Detection of hop letent viroid (HLVd) using reverse transcriotion and polymerase chain reaction (RT-PCR). Annals of the Phytopathological Society of Japan, 58: 677-684

Holland J. J. 1990. Defective viral genomes. Virology, 1: 151-165

Jakše J., Radišek S. 2005. Vzpostavitev identifikacijskega sistema za določevanje hmeljevega latentnega viroida. Hmeljarski bilten, 12: 49-57

Knapič V. 1997. Analiza okuženosti hmelja (*Humulus lupulus* L.) z viroidi z molekularnimi tehnikami določanja. Seminar na podiplomskem študiju agronomije. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (neobjavljeno interno gradivo)

Knapič V., Javornik B. 1998. Viroidi - povzročitelji rastlinskih bolezni. Sodobno kmetijstvo, 31, 10: 462-465

Knapič V., Javornik B. 1999. Viroidi v slovenskih kultivarjih hmelja (*Humulus lupulus* L.). V: Zbornik predavanj in referatov s 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Portorož, 3.-4. marec 1999. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 311-318

Knapič V. 2003. Vpliv okužbe z viroidno latentno boleznijo in stresnih vremenskih razmer na hmelj. Hmeljarski bilten, 10:39-53

Kolander A. 2001. Detekcija hmeljevega latentnega viroida (HLVd) z metodo reverzne transkripcije in polimerazne verižne reakcije (RT-PCR). Dipl. delo. Ljublana, Univ. v Ljublani, Biotehniška fakulteta: 44 str.

Komel R. 1997. Gensko inženirstvo. Proteus 60, 1: 18-21

Krajačić M., Šarič A., Škorič D. 1995. Subviralne infektivne molekule - značajni patogeni poljoprivednih kultura. Glasnik zaštite bilja, 4: 169 - 193

Leskovšek L., Radišek S., Ferant N., Čerenak A., Knapič V. 2009. Prve brezviroidne rastline hmelja (*Humulus lupulus* L.) v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo. Nova Gorica, 4.-5. marec 2009. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 130-131

Morton A., Barbara D. J., Adams A. 1993. The distribution of hop latent viroid within plants of *Humulus lupulus* and attempts to obtain viroid-free plants. Annals of Applied Biology, 123, 1: 47-53

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 3: 473-497

Pallas V., Gomez G., Duran - Vila N. 2003. Viroids in Europe. V: Viroids. Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik S.S. (ur.). CSIRO, Collingwod: 268-274

Pepelnjak M. 1992. Viroidi. Sodobno kmetijstvo, 25: 214-216

Puchta H., Ramm K., Sanger L.H. 1988. The molecular structure of hop latent viroid (HLV) a new viroid occurring worldwide in hops. Nucleic Acid Research, 16, 10: 149-168

Radišek S., Jakše J., Leskovšek L., Knapič V., Javornik B. 2007. Hmeljev latentni viroid: diagnostične tehnike in obvladovanje. V: 8. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin. Radenci, 6.-7. marec 2007. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 66-67

Robertson H. D. 1992. Replication and evolution of viroid-like pathogens. V: Current topics in microbiology and imunology Holland J. J. (ur.). Genetic Diversita of RNA Viruses, 176: 213-219

Statističnih letopis RS, 2009. SURS http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=1987 (5.8.2009)

Singh R.P., Ready K.F.M., Nie X. 2003. Biology. V: Viroids. Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik S.S. (ur.). CSIRO, Collingwod: 30-48

Viršček-Marn M., Mavrič-Pleško I., Knapič V., Žežlina I. 2007. Pomen, določanje in razširjenost viroidov v Sloveniji. V: 8. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin. Radenci, 6.-7. marec 2007. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: str. 65

ZAHVALA

Hvala mentorici izr. prof. dr. Zlati Luthar za strokovne nasvete, vsestransko pomoč in temeljit pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se dr. Sebastjanu Radišku, ki mi je omogočil opravljanje poskusa ter mi s koristnimi napotki pomagal pri izvedbi in pisanju diplomske naloge. Hvala za podarjen čas in znanje.

Iskrena hvala doc. dr. Jerneju Jakšetu in akad. prof. dr. Ivanu Kreftu za popravke in strokovno mnenje.

Za pomoč pri zasnovi in izvedbi poskusa se zahvaljujem Luciji Leskovšek in Mariji Grašinar. Marija, hvala za tvoje pozitivne besede.

Hvala Darji Zupanc in Sabini Steiner za prijetno delo v laboratoriju in vsem zaposlenim na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, še posebej hvala vsem iz Oddelka za varstvo rastlin.

Hvala mojemu Maretu, ki me je spodbujal in mi s svojim znanjem ter nasveti ogromno pomagal.

Hvala mojima staršema, ki sta mi med študijem stala ob strani, me spodbujala in mi pomagala v življenju.