



Chmelářský institut s. r. o.

METODIKA DIAGNOSTIKY LATENTNÍHO VIROIDU CHMELE-HLVd (HOP LATENT VIROID)

Ing. Petr Svoboda, CSc.,
Ing. Josef Patzak, Ph.D.,
RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA



METODIKA PRO PRAXI

04/09



Chmelařský institut s. r. o.



Chmelařský institut s. r. o.

METODIKA DIAGNOSTIKY LATENTNÍHO VIROIDU CHMELE-HLVd (HOP LATENT VIROID)

Ing. Petr Svoboda, CSc., Ing. Josef Patzak, Ph.D., RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy
a je výstupem řešení výzkumného záměru MSM 1486434701
„Studium a regulace stresových faktorů chmele“



ABSTRAKT:

Viroidy náleží ke skupině patogenů chmele, které působí významné hospodářské ztráty na kvantitě a kvalitě výnosu hlávek. Chmel jako vytrvalá plodina, pěstovaná až 20 let na jednom stanovišti, je infekcí viroidy velmi vážně ohrožován.

Výsledky dosažené v průběhu řešení výzkumného záměru MSM 1486434701 jsou základem pro tuto metodiku. Rychlá a spolehlivá diagnostika viroidní infekce je nezbytná pro hodnocení zdravotního stavu. Metody molekulární hybridizace (dot-blot) a RT-PCR umožňují spolehlivě stanovit přítomnost latentního viroidu chmele (HLVd). Metodika řeší problematiku vlastní diagnózy a uplatnění této metody při hodnocení zdravotního stavu chmele.

KLÍČOVÁ SLOVA: chmel, *Humulus lupulus* L., latentní viroid chmele, HLVd, viroid zakrslosti chmele, HSVd, diagnostika, dot-blot, PCR

AUTOŘI: Ing. Petr Svoboda, CSc., Ing. Josef Patzak, Ph.D.,
Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec
RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc., BC AV ČR, ÚMBR,
Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice

OPONENTI: Mgr. Hana Orságová, Státní rostlinolékařská správa, Olomouc
Ing. Petr Dědič, CSc., VÚB Havlíčkův Brod


JAZYKOVÁ ÚPRAVA: Patricie Buchtová

Metodika je určena pro pěstitele chmele, pracovníky výzkumu, diagnostických laboratoří, SRS a ÚKZÚZ.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR - odborem rostlinných komodit pod č.j. 41597/2009-18020.

Ministerstvo zemědělství ČR doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

© Chmelařský institut s. r. o., 2009

 Petr Stuna

ISBN: 978-80-87357-02-6



OBSAH

METODIKA DIAGNOSTIKY LATENTNÍHO VIROIDU CHMELE-HLVd (HOP LATENT VIROID)

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	4
2.1. Viroidy	4
2.2. Viroidy chmele	6
2.2.1. Viroid zakrslosti chmele-HSVd	6
2.2.1.1. Rozšíření HSVd	6
2.2.1.2. Přenos a prostorový model šíření HSVd	8
2.2.1.3. Vliv HSVd na výnos a obsah pivovarsky účinných látek	8
2.2.2. Latentní viroid chmele-HLVd	8
2.2.2.1. Rozšíření HLVd	10
2.2.2.2. Přenos a šíření HLVd	11
2.2.2.3. Vliv HLVd na kvalitu a výnos chmele	12
2.3. Diagnostika viroidů	13
2.3.1. Pracovní postup metody dot-blot molekulární hybridizace	13
2.3.1.1. Potřebné vybavení a chemikálie pro metodu dot-blot	13
2.3.1.2. Extrakce nukleových kyselin	14
2.3.1.3. Nanášení na membránu	15
2.3.1.4. Molekulární hybridizace	15
2.3.1.4.1. Radioaktivní molekulární hybridizace	15
2.3.1.4.2. Neradioaktivní molekulární hybridizace	16
2.3.1.5. Vyhodnocení dot-blot hybridizace	17
2.3.2. Pracovní postup metody RT-PCR	18
2.3.2.1. Potřebné vybavení a chemikálie pro metodu RT-PCR	18
2.3.2.2. Extrakce RNA	19
2.3.2.2.1. Concert™ Plant RNA reagent (Invitrogen, USA)	19
2.3.2.2.2. RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, SRN) Total RNA kit	20
2.3.2.3. RT-PCR	20
2.3.2.4. Elektroforéza	21
2.3.2.5. Vyhodnocení RT-PCR analýzy	21
3. Srovnání novosti postupů	23
4. Popis uplatnění certifikované metodiky	23
5. Seznam použité související literatury	24
6. Seznam publikací, které předcházejí metodice	27



1. CÍL METODIKY

Dobrá zdravotní stav má rozhodující význam pro uplatnění produkčního potenciálu rostlin chmele. Prakticky všechny šlechtitelské a množiteléské porosty chmele jsou infikovány latentním viroidem chmele-HLVd. Jeho eliminaci se řeší ozdravovací proces českého chmele. Rychlá a spolehlivá diagnostika viroidních infekcí má v tomto procesu nezastupitelnou úlohu a je nezbytná pro hodnocení zdravotního stavu. Použité metody molekulární hybridizace (dot-blot) a PCR s reverzní transkripcí jsou prověřenými a respektovanými metodami. Byly modifikovány pro chmel a diagnózu viroidních patogenů chmele spolehlivě umožňují. Nově nacházejí široké uplatnění v hodnocení zdravotního stavu chmele, především u množiteléských materiálů získaných v rámci ozdravovacího procesu českého chmele, které mají zásadní význam pro další existenci českého chmelářství. Hodnocení probíhá na všech úrovních, tj. kultury *in vitro*, materiály v technickém a prostorovém izolátu, matečnice ve sklenicích, kořenáčové školky. Současné jsou metody uplatňovány při hodnocení zdravotního stavu chmele v rámci řešení vědecko-výzkumných úkolů a při hodnocení šlechtiteléských materiálů a genových zdrojů chmele.

Hlavním cílem této metodiky je rychlá a spolehlivá diagnostika viroidních patogenů chmele pomocí metod molekulární hybridizace (dot-blot) a polymerázové řetězové reakce – PCR. Vznikla na základě výsledků řešení výzkumného záměru MSM 1486434701 „Studium a regulace stresových faktorů chmele“.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. VIROIDY

Viroidy jsou nezávislou třídou rostlinných patogenů, která je prezentována speciální skupinou autonomně se replikujících molekul RNA, bez proteinového pláště. Kruhová infekční RNA je plně závislá a adaptovaná na metabolismus určité hostiteléské rostliny, to znamená, že pravděpodobně nekóduje žádné bílkoviny. Ribonukleové kyseliny tvoří vysoce stabilní, tyčince podobnou sekundární strukturu, založenou na intramolekulárním párování bází.

Bylo již popsáno 38 viroidů, jejichž velikost se pohybuje od 246 do 399 bází (Hadidi et al. 2003) a taxonomicky byly rozděleny do dvou čeledí. *Avsunviroidae*, čeleď viroidu sluneční skvrnitosti avokáda – Avocado sunblotch viroid (ASBVd), je tvořena 2 rody *Avsunviroid* a *Pelamoviroid*. Druhá, *Pospiviroidae*, čeleď viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru – Potato spindle tuber viroid (PSTVd), je výrazně větší, zahrnuje 5 rodů – *Pospiviroid*, *Cocadviroid*, *Hostuviroid*, *Apscaviroid* a *Coleviroid*, viz tabulka číslo 1. U molekul viroidů z čeledi viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru rozlišujeme 5 strukturálních domén, charakteristických pro nativní stav: centrální konzervativní oblast (CCR), oblast patogenity, oblast s vysokou sekvenční variabilitou, levou a pravou koncovou doménu.



Tabulka č. 1: Klasifikace a zařazení viroidů (Hadidi et al. 2003)

Rod	Člen	Označení	Počet variant ^a
Čeleď Pospiviroidae			
Pospiviroid	Potato spindle tuber viroid	PSTVd	45
	Chrysanthemum stunt viroid	CSVd	10
	Citrus exocortis viroid	CEVd	33
	Columnnea latent viroid	CLVd	3
	Iresine viroid	IrVd	1
	Mexican papita viroid	MPVd	9
	Tomato apical stunt viroid	TASVd	3
	Tomato chlorotic dwarf viroid	TCDVd	1
	Tomato planta macho viroid	TPMVd	1
Hostuviroid	Hop stunt viroid	HSVd	82
Cocadviroid	Coconut cadang-cadang viroid	CCCVd	7
	Citrus IV viroid	CVd-IV	1
	Coconut tinangaja viroid	CtiVd	2
	Hop latent viroid	HLVd	10
Apscaviroid	Apple scar skin viroid	ASSVd	4
	Apple dimple fruit viroid	ADFVd	1
	Australian grapevine viroid	AGVd	1
	Citrus viroid III	CVd-III	22
	Citrus bent leaf viroid	CBLVd	7
	Grapevine yellow speckle 1 viroid	GYSVd-1	35
	Grapevine yellow speckle 2 viroid	GYSVd-2	1
	Pear blister canker viroid	PBCVd	11
Coleviroid	Coleus blumei-1 viroid	CbVd-1	4
	Coleus blumei-2 viroid	CbVd-2	2
	Coleus blumei-3 viroid	CbVd-3	9
Čeleď Avsunviroidae			
Avsunviroid	Avocado sunblotch viroid	ASBVd	33
Pelamoviroid	Peach latent mosaic viroid	PLMVd	98
	Chrysanthemum chlorotic mottle viroid	CChMVd	13
Nezařazeno	8 viroidů		

Vysvětlivky: ^a počet variant uvedený v "Subviral RNA database" (Pelchat et al. 2000)

^b Varianty viroidu z různých hostitelských rostlin nebo chorob, mají odlišné názvy: chmel HSVd-h, vinná réva HSVd-g, citrus HSVd-cit, švestka, broskev HSVd-p, meruňka HSVd-apr, okurka HSVd-c, mandloň HSVd-alm.



2.2. VIROIDY CHMELE

U chmele byly zjištěny a detekovány dva viroidy (Pethybridge et al. 2008). Jedná se o viroid zakrslosti chmele – Hop stunt viroid (HSVd) – a latentní viroid chmele – Hop latent viroid (HLVd).

2.2.1. VIROID ZAKRSLOSTI CHMELE-HSVd

Zakrslost chmele byla prvně identifikována ve chmelnicích v Japonsku a byla spojována s virovou infekcí a popisována jako trpasličí chmel (Yamamoto et al. 1973), ale později bylo zjištěno, že je vyvolána infekcí viroidem (Sasaki, Shikata 1977). Viroid náleží do rodu *Hostuviroid* čeledi *Pospiviroidae*, kde je typovým členem (Regenmortel et al. 2000). Viroid se skládá z kovalentně uzavřené jednořetězcové RNA, složené z 294 až 303 nukleotidů v závislosti na hostiteli a izolátu (Ohno et al. 1983). Pět odlišných skupin HSVd sekvenčních variant bylo izolováno z rozdílných hostitelů (Lafontaine et al. 1999). HSVd izoláty z chmele mají vysokou sekvenční podobnost k izolátům z vinné révy (Sasaki et al. 1989).

2.2.1.1. ROZŠÍŘENÍ HSVd

HSVd je středně rozšířen a byl nalezen v řadě dřevinných trvalých kultur zahrnujících slivoň (*Prunus* spp.), mandloň (*Prunus dulcis*), citrus (*Citrus* sp.), vinné révy (*Vitis* spp.) a granátové jablko (*Punica granatum*) (Astruc et al. 1996). Jeho výskyt byl zaznamenán v komerčních chmelnicích v Japonsku (Sano, Shikata 1989), Korei (Lee, Lee, Sänger 1990) a v roce 2004 v USA (K. C. Eastwell, nepublikované údaje). V Itálii v oblasti Campania byl sledován planý chmel, zda nemůže být hostitelem a zdrojem šíření HSVd na okolní peckoviny. Za čtyři roky hodnocení nebyl v planém chmelu zjištěn jeho výskyt (Ragozzino, Faggioli, Cirillo 2006).

Rostliny chmele infikované HSVd mají na hlavní révě a postranních pazochách typicky zkrácená internodia a dochází k redukci výšky rostlin přibližně na 3 m. Horní listy se svinují, jsou menší a chlorotické. Příznaky na listech mohou kolísat. V Japonsku infikované listy odpadají z báze a tvoří charakteristickou X formaci s postranními listy. Listové příznaky spojené s HSVd infekcí jsou žlutozelená barva na bazálním listoví počátkem vegetačního období, také žluté tečkování podél hlavních cév může být přítomné, viz obrázek číslo 1. Bohužel, diagnóza na základě symptomů může být obtížná vzhledem k jejich proměnlivosti v závislosti na odrůdě a klimatu. Všeobecně, krnění je silnější v teplejších oblastech (Sano 2003, Sano, Shikata 1989).



*Obr. č. 1:
Příznaky na listech
vyvolané infekcí HSVd
na šlechtitelském
materiálu chmele.
(Foto D. H. Gent)*



*Obr. č. 2:
Příznaky na rostlinách
chmele vyvolané
infekcí HSVd
na americké odrůdě
Willamette.
(Foto D. H. Gent)*



2.2.1.2. PŘENOS A PROSTOROVÝ MODEL ŠÍŘENÍ HSVd

Přenos HSVd uvnitř chmelnic je výhradně mechanicky, pravděpodobně usnadněný při sklizni nebo kultivačních operacích, jako je zavádění nebo mechanické omezení růstu – jarní nebo podzimní řez chmele. Uvnitř chmelnic se HSVd šíří podél řad, což odpovídá úloze kultivačních operací v přenosu patogenů (Sasaki et al. 1989, Yamamoto et al. 1973). Výsledky experimentální infekce chmele HSVd z několika dřevitých hostitelů naznačují možné riziko pro chmel v podobě přirozených hostitelských rezervoárů (Kultunow et al. 1988, Sano 2003).

Plevelné rostliny charakteristické pro bramborová pole a chmelnice nebyly v minulosti považovány za potencionální hostitele, kteří mohou přenášet a tak vést k rozšiřování potato spindle tuber viroid (PSTVd) – viroidu vrетенovitosti bramboru – a hop stunt viroid (HLVd) – latentního viroidu chmele. K pochopení tohoto problému byla provedena biologická inokulace těchto plevelů viroidními populacemi RNA nebo cDNA (Matoušek et al. 2008). Bylo zjištěno, že ze 14 plevelů charakteristických pro chmelnice byla vysoká hladina HSVd detekována v *Galinsoga ciliata* po dvou RNA a DNA přenosech. HSVd byl nalezen, ačkoliv není přenosný semenem těchto druhů. Stopy HSVd byly detekovatelné pomocí RT-PCR v *Amaranthus retroflexus* inokulovaném HSVd-cDNA. Charakteristické monomerické (+) cirkulární a lineární viroidní RNA byly přítomny v extraktech z plevelných druhů, umožňujících propagaci viroidů na vysokých hladinách, což svědčí o jejich pravidelné replikaci, zpracování a cirkulaci viroidní RNA v těchto plevelných druzích. Všechny HSVd klony z *G. Ciliata* korespondovaly s HSVd-g (grapevine) variantou, která je silně patogenní pro evropské chmele.

2.2.1.3. VLIV HSVd NA VÝNOS A OBSAH PIVOVARSKY ÚČINNÝCH LÁTEK

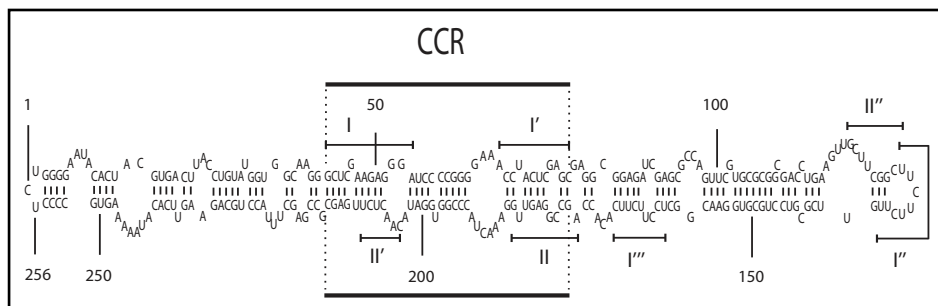
Rostliny chmele infikované HSVd produkují méně hlávek s menší velikostí a výnosem o 50 % nižším a současně obsahem alfa a beta kyselin o 50–70 % nižším než u neinfikovaných rostlin (Sasaki, Shikata 1980, Yamamoto et al. 1973). Vzájemný poměr pivovarsky účinných látek je také působením tohoto viroidu pozměněn. Nižší poměr beta : alfa kyselin než 1 : 20 je charakteristický pro zdravé rostliny, zatímco poměr větší než 1 : 44 je typický pro HSVd infekci (Sasaki, Shikata 1980). Momma a Takahashi (1984) uvádí, že počet lupulinových žlázek v hlávkách byl redukován o více jak 60 %.

2.2.2. LATENTNÍ VIROID CHMELE-HLVd

Byl popsán Puchtou et al. (1988). Molekula HLVd je složena z 256 nukleotidů, vytváří typickou tyčinkovou sekundární strukturu, viz obrázek číslo 3. Náleží do čeledi *Pospiviroidae* – vrетенosti hlíz bramboru – Potato spindle tuber viroid (PSTVd) a rodu *Cocadviroid*, viz tabulka číslo 1.



Viroidní RNA je spárovaná z 65,6 %, přičemž 63,1 % tvoří páry G:C, 27,4 % A:U a 9,5 % G:U. HLVD obsahuje horní a dolní centrální konzervované oblasti (CCR) důležité pro procesy tvorby meziproduktů a řadu sekvenčních motivů charakteristických pro všechny viroidy podskupiny PSTVd. Jeho odlišnost absencí oligo A úseku v levé části HLVD struktury a nízký stupeň sekvenční podobnosti v rozsahu 36–51 %, v porovnání s ostatními viroidy, jej řadí mimo všechny podskupiny (Puchta et al. 1988). Sekvence viroidu v přirozených podmínkách je velice stabilní (Matoušek et al. 1997 a).



Obr. č. 3: Struktura HLVD

- Vysvětlivky:
- T1 – levá terminální doména
 - T2 – pravá terminální doména
 - UCCR – horní část centrální domény
 - LCCR – dolní část centrální domény
 - P – patogenní doména
 - V – doména s vysokou sekvenční variabilitou



2.2.2.1. ROZŠÍŘENÍ HLVD

Rozšíření HLVD je celosvětové. Puchta et al. (1988) testoval vzorky z Evropy, Asie, Ameriky, Afriky a Oceánie, přičemž 92 % jich bylo infikováno. Vysoký výskyt patogena dokládají práce Barbary et al. (1990 a) referující o 11% až 100% infekci anglických porostů chmele. Matoušek et al. (1994) referuje o 100% infekci českých porostů chmele, Solarová et al. (1995) uvádí 92% infekci polských porostů chmele, Knabel et al. (1999) uvádí 60% infekci německých porostů.

Barbara et al. (1990 a) sledovali rovněž infekci viroidu u různých odrůd chmele. Míra infekce se pohybovala od 0 % do 89 %. Adams et al. (1992) sledovali infekci v porostech odrůd Omega a Way Northdown, kde byla infekce 75 % a 7,9 %. Z obou prací vyplývá, že infekce chmele viroidem je vysoce genotypově závislá. Matoušek et al. (1997 a, b) referovali, že lze najít genotypy chmele, které jsou méně citlivé na HLVD infekci (např. odrůdy Yeoman a Galena). Dokonce ani velice razantní metoda agroinfekce, vypracovaná Oriniakovou a Matouškem (1996), nebyla účinná pro infekci odrůdy Yeoman.

Infekce HLVD v rostlině chmele je ovlivněna nejen genotypem, ale rovněž ontogenetickým vývojem rostliny. Morton et al. (1993) popsali, že dochází během vegetace k výkyvům úrovně infekce v jednotlivých částech rostliny. Kolísání obsahu viroidu se týkalo především listových čepelí a řapíků. Gradient viroidu v rostlině byl přibližně stálý a obsah viroidu stoupal u mladých rostlin od vrcholu k dolním partiím. Matoušek et al. (1994) ve své práci potvrdili tento gradient, ale u senescentní rostliny se gradient rapidně měnil a obsah viroidu naopak rostl od dolních partií rostliny k vrcholu, kdy nejvyšší zjištěná infekce byla v hlávkách. Matoušek et al. (1995) v dalších svých experimentech prokázali, že gradient viroidu byl v nepřímé korelaci s aktivitou dsRNÁzy. Patzak, Matoušek (1999) dospěli k podobným závěrům o distribuci viroidu během ontogeneze rostliny chmele, bylo však nalezeno výrazné snížení infekce ve fázi dlouhivého růstu rostliny. Knabel et al. (1999) rovněž sledovali míru infekce během ontogeneze rostliny. Jejich výsledky byly podobné, pouze u senescentní rostliny nebyl pozorován tak výrazný gradient obsahu viroidu pomocí PCR-ELISA metody.

Latentní viroid je výrazně přizpůsoben rostlině chmele, neboť umělá infekce rostlin okurek, rajčete, chryzantém, *Benincasa hisida*, *Gynura aurantica* a tabáku (*N. glutinosa*) nevedly k jeho replikaci (Puchta et al. 1988). Knabel et al. (1999) prokázali infekci HLVD u kopřivy dvoudomé pomocí RT-PCR, zatímco rostliny hluchavky bílé, pampelišky lékařské, petouře srstnatého, bodláku obecného a řepky olejné byly neinfikované. Aklimatizace HLVD v jiné rostlině může být spojena s mutačním cyklem a selekcí mutovaných sekvencí, jež jsou schopny se i nadále replikovat (Matoušek et al. 1999). Určité mutované sekvence HLVD byly schopny se replikovat v uměle infikovaných rostlinách rajčete a tabáku (*N. benthamiana*), kde ještě nadále docházelo k tvorbě komplexních populací „quazispecies“ (Matoušek J., personální sdělení).



2.2.2.2. PŘENOS A ŠÍŘENÍ HLVD

Všeobecně jsou viroidy velice infekční a k jejich přenosu dochází mechanickým kontaktem mezi rostlinami nebo rostlinami a nářadím, též pylem a semeny (Diener 1987). Adams et al. (1992) sledovali šíření HLVD v porostech dvou odrůd chmele během dvou let. Z jejich výsledků bylo zřejmé, že nárůst infekce v porostu chmele nebyl nahodilý a k přenosu docházelo jednak kultivačními operacemi, ale i přímým kontaktem mezi jednotlivými rostlinami a jejich zjištění se shodovalo s výsledky Yaguchiho a Takahashiho (1984) o šíření HSVd. Některé nalezené ojedinělé infekce svědčily o tom, že by mohl existovat mobilní vektor. Adams et al. (1996) pokračovali ve svých experimentech a prokázali, že mechanický přenos kultivačním nářadím, především při řezu, byl efektivnější než přenos kontaktem mezi rostlinami. Testovali též možný přenos viroidu mšiči chmelovou (*Phorodon humuli*), ale k přenosu nedošlo ani v jednom případě. Knabel et al. (1999) též vyvrátili možnost přenosu viroidu hmyzími škůdci, a to mšiči chmelovou (*Phorodon humuli*) a sviluškou chmelovou (*Tetranychus urticae*). Otázkou přenosu semeny se zabývali Matoušek a Patzak (2000). I když docházelo k nepatrnému přenosu (0,5 %), patří tento viroid, stejně jako HSVd (Yaguchi a Takahashi 1984), k viroidům nepřenositelným semenem. Též hladina viroidu v pylových zrnech (6 %) a semenech (24 %) byla velice nízká ve srovnání s úrovní v listech (Matoušek et al. 1997 a, Matoušek a Patzak 2000).

Bylo prokázáno, že tepelné ošetření chmelových rostlin infikovaných HLVD snižuje jeho úroveň. Toto ošetření také vede k akumulaci sekvenční variability u HLVD (Matoušek et al. 2001). Současně zaznamenali zanedbatelnou úroveň mutovaných variant HLVD při standardních kultivačních podmínkách. Tepelné ošetření chmele vedlo k HLVD degradaci a současně k průkaznému zvýšení sekvenčních variací, jak potvrdila teplotně gradientová gelová elektroforetická analýza a screening cDNA knihovny pomocí DNA heteroduplexní analýzy. Třicet jedna cDNA klonů (9,8 %) bylo určeno jako deviantní (odchylné) formy. Sekvenování ukázalo nejčastěji přítomnost čtyřnásobných a trojnásobných mutantů, jako důsledek akumulace mutací v HLVD, během po sobě jdoucích replikačních cyklů. Celkem 69 % základních změn bylo nalezeno v levé polovině a 31 % v pravé polovině sekundární struktury navržené pro tento viroid, viz obrázek číslo 3. V centrální části horní konzervované oblasti nebyly nalezeny žádné mutace. Oblast "hot spot" byla určena v doméně známé jako „patogenní doména“, ve skupinu reprezentujícím potato spindle tuber viroid (PSTVd) - viroidu vřetenovitosti bramboru. Většina mutací je předurčena k destabilizaci HLVD sekundární struktury. Všechny mutované cDNA, ačkoliv byly infekční a přecházely komplexně do následných populací, byly zachovány na nízké úrovni.



Latentní viroid chmele (HLVd) není přenosný pomocí chmelové generativní tkáně ani semenem. Matoušek et al. (2008) popisuje proces HLVd eliminace během vývoje chmelového pylu. HLVd se množí v pylu, ale je eliminován ve fázích následné první pylové mitosy během vakuolizace pylu a jeho dozrávání. Pouze stopy HLVd byly detekovány pomocí RT-PCR ve zralém pylu po adrogenезi a žádný viroid nebyl detekovatelný v *in vitro* klíčícím pylu, což předpokládá kompletní degradaci cirkulárních a lineárních HLVd forem. Většina degradovaných HLVd RNA v nezralém pylu byla včetně individuálních produktů v rozmezí 100–230 nukleotidů, a proto nekorespondovaly s siRNA. HLVd odstranění z pylu korelovalo s vývojovou expresí pylových nukleáz a specifických RNáz. Aktivita pylové nukleázy HBN1 byla maximální během vakuolizačního kroku a klesala ve zralém pylu. Celková RNázová aktivita se zvyšovala plynule až do konečného kroku pylového zrání. HBN1 mRNA, které je nadbytek v nejaderné mikrosórové etapě, enkóduje protein z 300 aminokyselin (34.1 kDa, isoelektrický bod 5,1). Sekvenční porovnání odhalilo, že HBN1 je homolog S – 1 k bifunkčním rostlinným endonuleázám. Vývojově aktivovaná HBN1 a pylové ribonukleázy se mohou účastnit na mechanismu HLVd rozpoznání a degradaci.

2.2.2.3. VLIV HLVd NA KVALITU A VÝNOS CHMELE

Puchta et al. (1988) nazvali tento viroid latentním, protože jeho infekce se neprojevuje žádnými viditelnými příznaky. Barbara et al. (1990 b) sledovali efekt infekce na dvou anglických odrůdách chmele, Omega a Wye Challenger. U infikovaných rostlin pozorovali nižší vitalitu a světlejší zbarvení listů. Velikost hlávek a výnos byly o 35 % nižší u infikovaných rostlin odrůdy Omega a o 8 % u odrůdy Wye Challenger. Obsah α -hořkých kyselin se snížil u obou odrůd o 30 %, respektive o 15 %. Obsah β -hořkých kyselin se naopak mírně zvýšil u infikovaných rostlin. Adams et al. (1991) pokračovali ve studiu odrůdy Wye Challenger. Výsledky byly obdobné, hlávky byly o 11 % menší, obsah α -hořkých kyselin o 11 % nižší, obsah β -hořkých kyselin o 8 % vyšší a myrcenu o 38 % vyšší u infikovaných rostlin. Adams et al. (1992) referovali, že snížení obsahu α -hořkých kyselin v důsledku infekce viroidem je genotypově závislé a pohybuje se od 20 % do 50 %. Podobných výsledků bylo dosaženo v pokusech s Žateckým poloraným červeňákem (Patzak et al. 2001). U infikovaných Osvaldových meriklonů 31, 72, 114 docházelo ke snížení obsahu α -hořkých kyselin o 40 %, zvýšení obsahu myrcenu o 29 %, α -pinenu o 37,4 % a β -pinenu o 41,6 %, snížení obsahu všech sesquiterpenů o 4,4 % až 29 % a akumulaci terpenických alkoholů geraniolu a methylgeranátu.



2.3. DIAGNOSTIKA VIROIDŮ

K detekci viroidů nelze využít imunoenzymatické metody, neboť jsou tvořeny pouze molekulou RNA bez proteinového pláště. Puchta et al. (1988) použili k detekci HLVD i HSVd zpětnou polyakrylamidovou elektroforézu (R-PAGE), doplněnou Northern blot molekulární hybridizací. Barbara et al. (1990 a) použili k detekci viroidu dot-blot hybridizaci s radioaktivně (^{35}P dUTP) značenou sondou. Dot-blot hybridizace byla prvně využita k detekci viroidů Palukaitisem et al. (1985). Tato metoda byla nejlépe modifikována Matouškem et al. (1994). K hybridizaci je používána HLVD sonda značená radioaktivně nebo neradioaktivně (digoxigenin-dUTP). Na adrese <http://www.umbr.cas.cz/depts/molecular-genetics/> je dostupná cDNA knihovna pro přípravu sond k diagnostice HLVD a HSVd. Hataya et al. (1992) první využili k přesnější detekci HLVD metodu RT-PCR. Modifikované RT-PCR protokoly, především využití různých sekvencí primerů, publikovali Cajza et al. (1996), Matoušek et al. (1997 a, b), Knabel et al. (1999) a Matoušek a Patzak (2000). Knabel et al. (1999) doplnili RT-PCR detekci viroidu ještě kvantifikací pomocí PCR-ELISA. Morton et al. (1993) využili též k detekci viroidu ve vrcholových částech stonku *in situ* hybridizace. K nejmodernějším diagnostickým metodám náleží uplatnění diagnostických mikroarrays (čipů), které umožňují paralelní detekci několika viroidů během jedné analýzy (Tomlinson et al. 2007).

2.3.1. PRACOVNÍ POSTUP METODY DOT-BLOT MOLEKULÁRNÍ HYBRIDIZACE

2.3.1.1. POTŘEBNÉ VYBAVENÍ A CHEMIKÁLIE PRO METODU DOT-BLOT (viz příloha č. 1)

1. Chladnička s mrazicím boxem
2. pH metr
3. Mikropipety, vícekanálové mikropipety a špičky
4. Chemikálie a připravené pufrы
5. Eppendorf zkumavky (1,5ml sterilní)
6. Permanentní fixy na popis zkumavek
7. Vychlazené třecí misky s tloučky
8. Laboratorní váhy
9. Centrifuga
10. Vortex
11. Vodní lázeň
12. Nylonové membrány



13. Blotovací aparatura
14. Vývěva
15. Cross linker
16. Horkovzdušný sterilizátor
17. Hybridizér
18. PhosphorImager STORM
19. Vyhodnocovací software síly signálu
20. Tmavá komora a fotomisky
21. Rentgenové filmy, vývojka a ustalovač
22. Laboratorní minutka

2.3.1.2. EXTRAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Izolace celkových nukleových kyselin pro dot-blot hybridizaci provádíme podle modifikace pro chmel (Matoušek et al. 1994). Vzorky rostlinného materiálu lze odebírat po celou dobu vegetace ze všech nadzemních částí rostliny. Nejvýhodnější je ovšem odebírat vzorky květů a hlávek, kde je koncentrace viroidu nejvyšší. Pro analýzu odebíráme kolem 0,5 až 1 g čerstvé hmoty z jednotlivých rostlin. Existuje možnost tvorby kompozitních vzorků až z deseti rostlin, ale pro vysokou infikovanost rostlin tyto analýzy nedoporučujeme. Odebrané vzorky lze zamrazit do zpracování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 roku. Ze zamrazených nebo čerstvých vzorků navážíme 0,4 g rostlinné hmoty a přeneseme do vychlazené třecí misky. K naváženému vzorku přidáme trochu písku a 0,6 ml AMESS (Laulhere a Rozier 1976) pufru (0,5 M octan sodný $\text{pH}=6,0$, 10 mM MgCl_2 , 3% SDS, 20% ethanol, 1 M NaCl). Po důkladné homogenizaci vzorku přidáme 0,8 ml chloroformu a celou směs znovu tloučkem zhomogenizujeme. Směs poté přeneseme do označené 1,5ml Eppendorfky a do centrifugace držíme na ledu. Vzorky centrifugujeme při 14 000 rpm po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci odebereme ze supernatantu 100 μl do nové označené 1,5ml Eppendorfky. K 100 μl vzorku přidáme shodné množství (100 μl) roztoku směsi 37% formaldehyd + 20xSSC (0,3 M citronan sodný, 3 M NaCl) v poměru 2 : 3 a celkovou směs důkladně promícháme vortexováním. V této fázi lze vzorky skladovat v mrazicím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro dot-blot hybridizaci vzorky denaturujeme ve vodní lázni při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut a poté prudce zchladíme na ledu. Takto připravené vzorky nanášíme na membránu nebo uchováváme v mrazicím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, maximálně 2 roky.



2.3.1.3. NANÁŠENÍ NA MEMBRÁNU

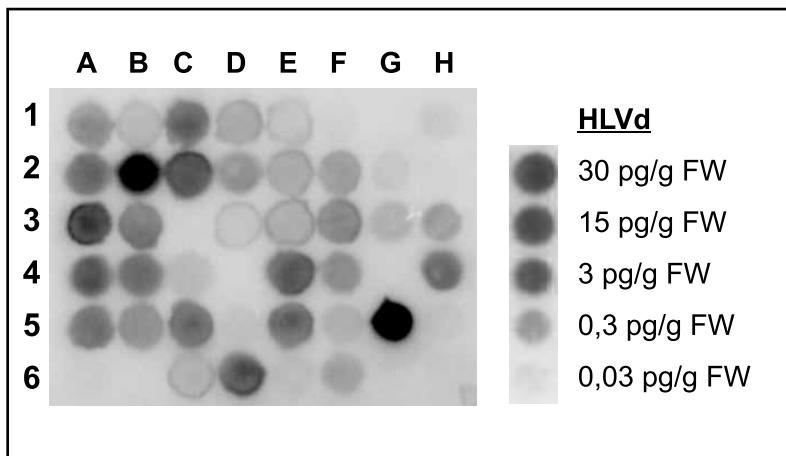
Dot-blot molekulární hybridizace vychází z metodiky popsané Palukaitisem et al. (1985) a modifikované Matouškem et al. (1994) pro HLVD. Do jednotlivých komůrek dot-blotovací aparatury (OMNI-BIO, Brno, Česká republika) nanese 40 μ l vyzolovaných vzorků celkových nukleových kyselin, které poté vakuově nablótujeme na označenou, pozitivně nabitou nylonovou membránu saturovanou v 2xSSC pufru (0,03 M citronan sodný, 0,3 M NaCl). Nablótovanou membránu poté vyjmeme z aparatury a vysušíme na vzduchu při pokojové teplotě. Membránu crosslinkujeme 0,12 J/cm² UV zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 1 minuty a následně inkubujeme v horkovzdušné peci při 80 °C po dobu 20 minut. Membránu lze skladovat zatavenou v mikrotenové fólii v lednici po dobu několika let.

2.3.1.4. MOLEKULÁRNÍ HYBRIDIZACE

2.3.1.4.1. Radioaktivní molekulární hybridizace

Radioaktivní sondu připravíme značením náhodně replikovaných úseků (Random Primed DNA Labeling kit, Roche Molecular Biochemicals, SRN) molekuly HLVD, získané pomocí PCR ze sekvenací ověřeného inzertu klonovaného plazmidu (pCR/Script SK(+), Stratagene, USA). Jelikož jsou oba chmelové viroidy vysoce sekvenčně příbuzné, nelze vyloučit křížovou reakci s HSVd, jehož výskyt v ČR je ovšem v současnosti nulový. Reakční směs (20 μ l) se skládá z 25 ng denaturovaného templátu (10 min při 100 °C), 1x reakčního pufru (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM dithioerythritol, 0,2 mg/ml BSA, hexanukleotidy 6,25 A₂₆₀ units/ml, pH=7,2), 50 mM dATP, dTTP a dGTP, 50 μ Ci [α -³²P]dCTP o specifické aktivitě 3000 μ Ci/mmol (Amersham Life Science, UK) a 2 U Klenowova fragmentu DNA polymerázy I. Reakce probíhá 30 minut ve vodní lázni při 37 °C a je zastavena působením teploty 65 °C po dobu 10 minut. Membrány nejprve pre-prehybridizujeme v prehybridizačním pufru (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) v hybridizační peci (HB-2D, Techne, UK) při 55 °C po dobu 30 minut. Dále membrány prehybridizujeme v hybridizačním pufru (50 mM fosforečnan sodný pH=7,4, 5 mM EDTA, 0,75 M NaCl, 0,1% SDS, 0,3% PVP, 0,3% BSA, 0,3% Ficoll, 200 μ g/ml tRNA) po dobu 2 hodin při 68 °C. Poté hybridizační pufr vyměníme za nový již s 20 μ l radioaktivně značené sondy a vlastní hybridizace probíhá přes noc (14 hod.) při 68 °C. Po hybridizaci membránu jednou promyjeme v roztoku 2xSSC + 0,1% SDS po dobu 10 minut při 68 °C a dvakrát v roztoku 0,1xSSC + 0,1% SDS po dobu 10 minut při 75 °C. Takto opracované membrány naskenujeme a kvantifikujeme pomocí PhosphorImageru STORM (Molecular Dynamics, USA), detekujícího autoradiografické a fluorescenční signály, viz obrázek číslo 4.



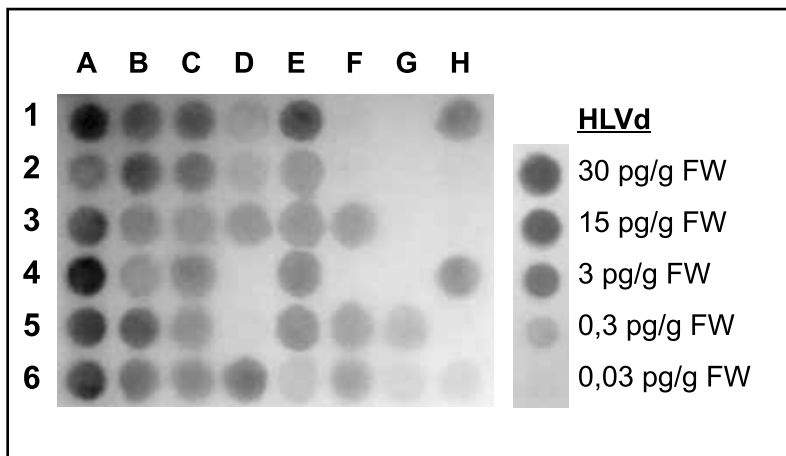


Obr. č. 4: Nylonová membrána po hybridizaci s radioizotopem značenou sondou a kalibrační sadou vzorků s označenými hodnotami míry infekce. FW – fresh weight (hmotnost čerstvého vzorku).

2.3.1.4.2. Neradioaktivní molekulární hybridizace

Molekulární hybridizaci provádíme neradioaktivním systémem AlkPhos Direct (Amersham Life Science, UK). Neradioaktivní sondy připravíme značením PCR amplifikovaných fragmentů ze sekvenací ověřených inzertů HLVd. Reakční směs (32 μ l) se skládá ze 100 ng denaturovaného templátu (5 min při 100 °C), 1x reakčního pufru s cross-linkerem a se značící sloučeninou alkalické fosfatázy. Reakce probíhají 30 minut v ohřívacím bloku při 37 °C a jsou zastaveny zchlazením na ledu, kde je držíme až do samotného použití. Membrány nejprve prehybridizujeme v hybridizačním pufru v hybridizační peci při teplotě 55 °C po dobu 30 minut. Poté do hybridizačního pufru přidáme neradioaktivně značenou sondu (32 μ l) a membrány hybridizujeme přes noc (14 hod.) při 55 °C. Po hybridizaci membrány promýváme dvakrát v primárním promývacím pufru (2 M močovina, 0,1% SDS, 50 mM fosforečnan sodný pH=7,0, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,2% blocking reagent) po dobu 10 minut při 55 °C a dvakrát v sekundárním promývacím pufru (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH=10,0) po dobu 5 minut při pokojové teplotě. K detekci generovaných signálů využijeme chemiluminiscenčního substrátu CDP-Star™ (Amersham Life Science, UK) a 3hodinovou expozici membrán na rentgenový film, viz obrázek číslo 5.





Obr. č. 5: Nylonová membrána po hybridizaci neradioaktivně značenou sondou (chemiluminiscence) a kalibrační sadou vzorků s označenými hodnotami míry infekce. FW – fresh weight (hmotnost čerstvého vzorku).

2.3.1.5. VYHODNOCENÍ DOT-BLOT HYBRIDIZACE

Výhodou dot-blot hybridizace je, že lze kvantifikovat úroveň viroidní infekce. Pro kvantifikaci a odečet infekce je nutné připravit kalibrační sadu vzorků. Tu si připravíme naředěním známého množství molekuly HLVd. Nejvýhodnější je použít templát HLVd získaný pomocí RT-PCR z pozitivního vzorku nebo PCR z klonovaného produktu (viz kapitola 2.3.2.3.). Koncentraci získaného produktu je možné odečíst z elektroforetických gelů s hmotnostním standardem (např. Low DNA Mass Ladder, Gibco BRL, USA). HLVd produkt naředíme na koncentraci 7,5 pg/μl (7,5 ng DNA do 1 ml RNase-free vody). Do 49 μl RNase-free vody přidáme 1 μl takto naředěného HLVd a pak přidáme shodné množství (50 μl) roztoku směsi 37% formaldehyd + 20xSSC (0,3 M citronan sodný, 3 M NaCl) v poměru 2 : 3, celkovou směs důkladně promícháme vortexováním a denaturujeme ve vodní lázni při 60 °C po dobu 15 minut. Postupně vytvoříme ředící řadu 1 : 10, 1 : 100 a 1 : 1000 roztokem směsi 37% formaldehyd + 20xSSC (0,3 M citronan sodný, 3 M NaCl) v poměru 2 : 3 do objemu 50 μl. Následně vzorky nanášíme na membránu dle metodiky bodu 2.3.1.3. po 40 μl za sebou do jednotlivých slotů. Dále postupujeme podle bodů metodiky 2.3.1.4.1. nebo 2.3.1.4.2.



Pro kvantifikaci viroidní infekce z radioaktivní hybridizace lze použít software ImageQuant™ (Molecular Dynamics, USA), jež je schopen kvantifikovat intenzitu signálu z plochy spotu a vyjádřit ji číselnou hodnotou. Z ředící řady kalibračních vzorků je potom možné vypočítat kalibrační křivku pro intenzity jednotlivých analyzovaných vzorků. Závislost intenzity signálu a množství molekul je nelineární, proto je nutné využít k výpočtu kalibrační křivky rovnici regresní hyperboly $y=B_{\max} * x/(K_d+x)$, kde y je intenzita signálu, x je množství HLVD, B_{\max} je maximální možná intenzita signálu a K_d je koncentrace HLVD, při níž je intenzita signálu poloviční. Pro kvantifikaci viroidní infekce z neradioaktivní hybridizace lze použít kalibrační sadu vzorků pouze k orientačnímu odečtu síly signálu odpovídajícímu pouze řádovým výsledkům. Jelikož i množství HLVD molekul není v celé rostlině konstantní a zpracování vzorků s sebou nese určitou chybu, je nutné brát naměřené hodnoty s rezervou. Negativní vzorky je vždy při vysoké citlivosti možné bezpečně identifikovat. U pozitivních vzorků označujeme míru infekce pouze pojmy slabá pod 10 pg/g FW (čerstvé hmotnosti) a silná nad 10 pg/g FW.

2.3.2. PRACOVNÍ POSTUP METODY RT-PCR

2.3.2.1. POTŘEBNÉ VYBAVENÍ A CHEMIKÁLIE PRO METODU RT-PCR

1. Eppendorf zkumavky (0,5ml sterilní)
2. Permanentní fixy
3. Pipety a špičky s filtrem
4. Rukavice
5. Sterilní ddH₂O
6. Primery
7. Stojan na zkumavky
8. Termocykler
9. Analytická váha
10. Váženky
11. Agaróza
12. Barvivo (Loading dye)
13. Délkový standard DNA (DNA ladder)
14. Erlenmayerovy baňky
15. Chlazená centrifuga
16. Vortex
17. Ohřívací blok
18. Zařízení na snímání gelů a příslušný software
19. Horizontální elektroforetický aparát
20. Hřebeny do elektroforetické vany



21. SYBR greene nebo ethidium bromid
22. Odměrný válec
23. Nádoba s ledem nebo chladič blok
24. Výrobník ledu
25. Tepelná plotýnka
26. TBE pufr
27. Transiluminátor
28. Vanička na agarózu
29. Zdroj k elektroforéze
30. Laboratorní minutka

2.3.2.2. EXTRAKCE RNA

Izolaci RNA provádíme pomocí komerčních kitů, které se pro tyto účely nejvíce osvědčily (Patzak, 2003). Vyzolovanou RNA lze použít i pro dot-blot molekulární hybridizaci a především pro neradioaktivní molekulární hybridizaci takto získanou RNA přímo doporučujeme. K objemu vzorku RNA přidáme shodné množství (50 µl) roztoku směsi 37% formaldehyd + 20xSSC (0,3 M citronan sodný, 3 M NaCl) v poměru 2 : 3, celkovou směs důkladně promícháme vortexováním a denaturujeme ve vodní lázni při 60 °C po dobu 15 minut podle bodu 2.3.1.2. Následně vzorky nanášíme na membránu dle bodu 2.3.1.3.

2.3.2.2.1. Concert™ Plant RNA reagent (Invitrogen, USA)

Z čerstvých nebo zamrazených vzorků (viz bod 2.3.1.2.) navážíme 100 mg rostlinné hmoty a přeneseme do vychlazené třecí misky. Vzorky přelijeme kapalným dusíkem (-196 °C) a rozdrtíme tloučkem na jemný prášek. Po odpaření dusíku k prášku přidáme 500 µl Plant RNA reagent a vzorky přeneseme do označené 1,5ml Eppendorfky. Vzorky poté zhomogenizujeme vortexováním a inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po inkubaci vzorky centrifugujeme při 14 000 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Supernatant poté přeneseme do nové označené Eppendorfky a přidáme k němu 100 µl 5M NaCl a 300 µl chloroformu. Vzorky zhomogenizujeme převrácením a centrifugujeme při 14 000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C. Horní vodní fázi supernatantu poté přeneseme do nové označené Eppendorfky, k ní přidáme shodné množství isopropanolu (500 µl). Vzorky opět zhomogenizujeme vortexováním a inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Poté vzorky centrifugujeme při 14 000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C. Zbýlý supernatant vylijeme a RNA „pellet“ promyjeme 200 µl 75% etanolu (vychlazeného na -20 °C). Vzorky opět centrifugujeme 1 minutu při 14 000 rpm a 4 °C. Supernatant odpipetujeme, vzorky krátce vysušíme na vzduchu při pokojové teplotě a vyzolovanou RNA rozpustíme v 50 µl RNase-free vody. Vyzolovanou rozpuštěnou RNA využijeme v návazné RT-PCR nebo můžeme skladovat v mrazicím boxu při -80 °C po dobu několika let.



2.3.2.2.2. RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, SRN) Total RNA kit

Z čerstvých vzorků navážíme 100 mg rostlinné hmoty a přeneseme do vychlazené třetí misky. Vzorky přelijeme kapalným dusíkem ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) a rozdrtíme tlučkem na jemný prášek. Po odpaření dusíku prášek přeneseme do označené 1,5ml Eppendorfy se 450 μl extrakčního pufru RLT se 4,5 μl β -merkaptoetanolu, modifikovaného přidáním 0,1% PEG 20000. Vzorky poté zhomogenizujeme vortexováním a inkubujeme při $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ v ohřívacím bloku po dobu 3 minut. Po inkubaci vzorky přeneseme do QIAshredder kolonek a centrifugujeme při 14 000 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Proteklý supernatant poté přeneseme do nové označené Eppendorfy a přidáme k němu poloviční množství (225 μl) 96% etanolu. Vzorek zhomogenizujeme pipetováním a nanese na RNeasy kolonku. Vzorky poté centrifugujeme při 10 000 rpm 1 minutu při pokojové teplotě. Kolonku vyjmeme ze sběrné 2ml zkumavky, ze které vylijeme proteklý supernatant a kolonku vrátíme zpět. Do kolony napipetujeme 700 μl promývacího pufru RW1 a opět vzorky centrifugujeme při 10 000 rpm 1 minutu při pokojové teplotě. Po centrifugaci kolonku přeneseme do nové sběrné 2ml zkumavky a napipetujeme do ní 500 μl promývacího pufru RPE. Vzorky centrifugujeme při 14 000 rpm 1 minutu při pokojové teplotě, aby došlo k důkladnému vysušení vazebné membrány. Kolonku poté přeneseme do nové označené 1,5ml Eppendorfy a na střed membrány napipetujeme 50 μl RNase-free vody. Kolonku nejprve inkubujeme 1 minutu pro kvalitní rozpuštění RNA a poté centrifugujeme při 10 000 rpm 1 minutu při pokojové teplotě. Proteklou vyzolovanou a rozpuštěnou RNA využijeme v návazné RT-PCR nebo skladujeme v mrazicím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2.3. RT-PCR

RT-PCR vychází z postupu popsaného Matouškem a Patzakem (2000). Pro reakci byly využity Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche Molecular Biochemicals, SRN) a Qiagen® OneStep RT-PCR kit (Qiagen, SRN), umožňující provádět reverzní transkripci a PCR v jedné reakční směsi a mikrozkuhavce. Reakční směs (25 μl) se skládá z 2 μl celkové RNA (vyzolované podle bodu 2.3.2.2.1. nebo 2.3.2.2.2.), 1x reakčního pufru, 0,2 mM dNTPs, 0,4 μM reverzního primeru sekvence HLVD (5'200CCACCGGGTAGTTTCCAACCT1813') a primeru sekvence HLVD (5'201ATACAACCTCTTGAGCGCCGA2203'), 5 U RNase inhibitoru a 1 μl enzymové směsi. RT-PCR probíhá v termocykleru v 200 μl mikrozkuhavkách. Reverzní transkripce probíhá po dobu 30 minut při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté vzorky denaturujeme 2 nebo 15minutovou inkubací při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Polymerázová řetězová reakce má následující časový a teplotní profil pro Titan™ One Tube RT-PCR System: 10 cyklů – denaturace 30 s při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, „annealing“ primerů 30 s při $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ a elongace 45 s při $68\text{ }^{\circ}\text{C}$; 25 cyklů – denaturace 30 s při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, „annealing“ primerů 30 s při $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ a elongace 45 s + 5 s v každém dalším cyklu při $68\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pro Qiagen® OneStep RT-PCR kit: 35 cyklů – denaturace 30 s $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, annealing 30 s $54\text{ }^{\circ}\text{C}$, elongace 1 min $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.



PCR je ukončena závěrečnou 7 nebo 10minutovou elongací při 68 °C nebo 72 °C a zchlazením na 4 °C. Jelikož je vysoká sekvenční příbuznost obou chmelových viroidů, jsou primery reakce navrženy v nejvíce odlišné oblasti od molekuly HSVd. Výsledný produkt reakce tak má velikost 276 pb, a pokud by došlo k náhodné křížové reakci s HSVd, byl by produkt velký okolo 300 pb. Pro ověření reakce je nutné používat pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrolu používáme klonovaný inert HLVD či již dříve ověřený pozitivní vzorek. Jako negativní kontrola slouží reakce pouze s RNase-free vodou. Jako interní kontrolu kvality RNA jednotlivých vzorků pro RT-PCR lze použít amplifikaci ribozonálními RNA primery uvedenými v publikaci Patzak (2005).

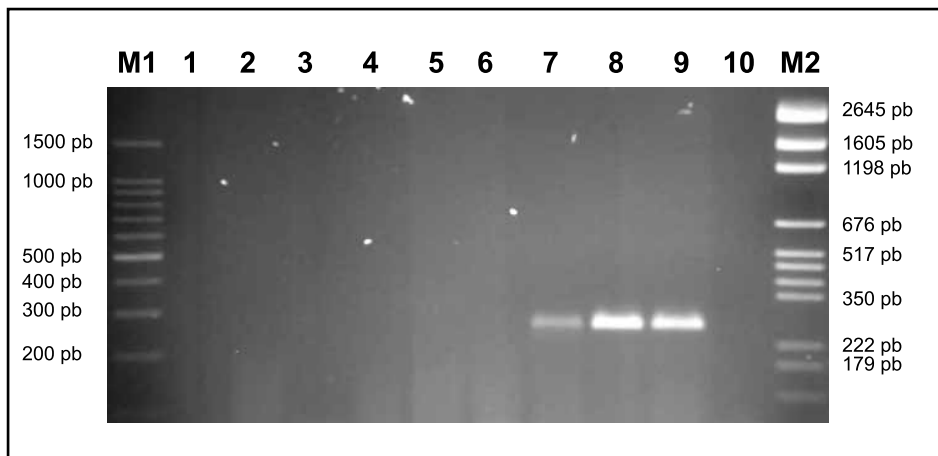
2.3.2.4. ELEKTROFORÉZA

K elektroforetickým analýzám používáme horizontální agarózovou elektroforézu. RT-PCR produkty smísíme s 6x nanášecím pufrem (10 mM trisHCl pH=8,0, 50 mM EDTA, 50% glycerin, 0,25% bromfenolová modř) a separujeme na 2% agarózovém gelu v TBE pufru (90 mM Tris-borát, 2 mM EDTA pH=8,0) při napětí 2 V/cm. Dobře rozdělené produkty barvíme v gelu 1x roztokem SYBR Greene I (FMC Bioproducts, UK, 10 000x koncentrát), v 50 ml 0,5xTBE pufru, nebo 100 µg ethidium bromidu rozpuštěného v 50 ml redestilované vody, po dobu 15 minut na rotační třepačce při pokojové teplotě. Obarvené cDNA produkty vizualizujeme UV zářením vlnové délky 302 nm na UV transiluminátoru a fotografujeme CCD kamerou přes hardwarové a softwarové rozhraní do paměti osobního počítače (v TIFF formátu).

2.3.2.5. VYHODNOCENÍ RT-PCR ANALÝZY

Nevýhodou RT-PCR je, že nelze kvantifikovat viroidní infekci. Její předností je podstatně vyšší senzitivita, a tak je možné identifikovat infekci HLVD také ve vzorcích, které jsou na hranici detekovatelnosti pomocí molekulární hybridizace. Výsledkem reakce je tak pouze negativní nebo pozitivní vzorek. Největší uplatnění nachází u mladých rostlin, zejména bezviroidních meriklonů, kde nejsou vyvinuty produkční orgány a míra infekce v listech je velmi nízká. Citlivost metody je vysoká, a tak je nutné dbát se zvýšenou opatrností na čistotu pracovního postupu a všech použitých roztoků, abychom se vyvarovali falešně pozitivních výsledků, protože molekula HLVD je velice stabilní a přežívá bez problémů ve volném prostředí. HLVD je možné takto detekovat i ze směsných vzorků (viz bod 2.3.1.2.).





Obr. č. 6: Gel s amplifikačními produkty z RT-PCR pro stanovení HLVd. 1-6 negativní vzorky, 7-8 pozitivní vzorky, 9-plasmid s klonovaným inzertem HLVd, 10-negativní kontrola (voda), M1-100 bp Ladder, M2-pGEM DNA marker (Promega, USA).



3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V předložené metodice jsou optimalizovány postupy molekulární diagnostiky latentního viroidu chmele HLVd pomocí spolehlivé, specifické a selektivní hybridizace dot-blot a metody PCR s reverzní transkripcí za účelem rychlé identifikace ve srovnání s obtížnou, časově náročnou a méně spolehlivou metodou pomocí bylinných indikátorů nebo velmi nespolehlivého posouzení zdravotního stavu na základě vizuálních příznaků. Metody umožňují stanovit objektivní zdravotní stav chmele. Již dnes nachází široké uplatnění při hodnocení zdravotního stavu chmele v rámci ozdravovacího procesu českého chmele, hodnocení zdravotního stavu produkované sadby v rámci množitelského cyklu chmele a kontrole šlechtitelských materiálů a genových zdrojů chmele.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika je určena jak pro pracovníky diagnostických pracovišť SRS a ÚKZÚZ, tak pro pracoviště zabývající se fytopatologickou problematikou, jako jsou vědecká a výzkumná pracoviště, univerzity, vysoké školy, dále fytopatologům a pracovníkům rostlinolékařské a zemědělské praxe. Zde všude může být uplatněna pro rychlou a spolehlivou diagnózu viroidů.

PODĚKOVÁNÍ:

Autoři děkují Ing. Ivaně Malířové a Bc. Aleně Henychové za výbornou technickou pomoc a Dr. D. H. Gentovi (Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA) za poskytnutí fotografie příznaků HSVd na listech chmele.



5. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Adams, A. N., Morton, A., Barbara, D. J., Green, C. P., 1991. Effects of hop latent viroid on weight and quality of cones of the hop cultivar Wye Challenger. TAC Annals of Applied Biology 118 (Suplement): 126–127

Adams, A. N., Morton, A., Barbara, D. J., Ridout, M. S., 1992. The distribution and spread of hop latent viroid within two commercial plantings of hop (*Humulus lupulus*). Annals of Applied Biology 121: 585–592

Adams, A. N., Barbara, D. J., Morton, A., Darby, P., 1996. The experimental transmission of hop latent viroid and its elimination by low temperature treatment and meristem culture. Annals of Applied Biology 128: 37–44

Astruc, N., Marcos, J. F., Macquaire, G., Candresse, T. and Pallás, V., 1996. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. Eur. J. Plant Pathol. 102: 837–846

Barbara, D. J., Morton, A., Adams, A. N., 1990 a. Assesment of UK hops for occurence of hop latent and hop stunt viroids. Annals of Applied Biology 116: 265–272

Barbara, D. J., Morton, A., Adams, A. N., 1990 b. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the UK. Annals of Applied Biology 117: 359–366

Cajza, M., Wypijewski, K., Pospieszny, H., 1996. The use of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hop latent viroid (HLVd). Journal of Plant Protection Research 37: 52–58

Diener, T. O., 1989. Subviral pathogens of plants: The viroids, International Journal of Clinical & Laboratory Research, Vol. 19, No 1, 1989: 105–128

Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., Semancik, J. S., 2003. Viroids, SCIRO Publishing, Collingwood, Australia: 1–370

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

Knabel, S., Seigner, L., Wallnöfer, P. R., 1999. Nachweis des Hop Latent Viroids (HLVd) mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Gesunde Pflanzen 51: 234–239



- Koltunow, A. M., Krake, L. R. and Rezaian, M. A., 1988. Hop stunt viroid in Australia grapevine cultivars: Potential for hop infection. *Aust. Plant Pathol.* 17: 7–9
- Lafontaine, D. A., Deschenes, P., Bussiere, F., Poisson, V. and Perreault, J. P., 1999. The viroid and viroid - like RNA database. *Nucleic Acids Res.* 27: 186–187
- Laulhere, J. P., Rozier, C., 1976. One step extraction of plant nucleic acid. *Plant Science Letters* 6: 237–242
- Lee, J. Y., Lee, S. H., and Sanger, H. L., 1990. Viroid diseases occurring on Korean hop plants. *Korean J. Plant Pathol.* 6: 256–260
- Momma, T. and Takahashi, T., 1984. Developmental morphology of hop stunt viroid-infected hop plants and analysis of their cone yield. *Phytopathol. Z.* 110: 1–14
- Morton, A., Barbara, D. J., Adams, N., 1993. The distribution of hop latent viroid within plants *Humulus lupulus* L. and attempts to obtain viroid-free plants. *Annals of Applied Biology* 123: 47–53
- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T. and Okada, Y., 1983. Hop stunt viroid: Molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res.* 11: 6185–6197
- Palukaitis, P., Coutts, S., Zaitlin, M., 1985. Detection and identification of viroids and viral nucleic acids by „dot blot“ hybridization. *Acta Horticulturae* 164: 109–117
- Pelchat, M., Deschenes, P., Perreault, J. P., 2000: The database of the smallest known auto-replicable RNA species: viroids and viroid-like RNAs. *Nucleic Acid Res.* 28: 179–180
- Pethybridge, S. J., Hay, F. S., Barbara, D. J., Eastwell, K. C., Wilson, C. R. 2008. Viruses and Viroids Infecting Hop: Significance, Epidemiology and Management. *Plant Disease*, vol. 92 No. 3: 324–338
- Puchta, H., Ramm, K., Sanger, H., 1988. The molecular structure of hop latent viroid (HLVd), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acid Research* 16: 4197–4216
- Ragozzino, E., Faggioli, F., Cirillo, A., 2006. Wild hop (*Humulus lupulus* L.) in Campaia Region (Southern Italy) is Free of Stunt Viroid. *Proceedings of the Eleventh International Symposium on Small Frut virus Diseases, Antalya, Turkey, May 22–26, 2006, Acta Horticulturae No. 780: 71–72*



van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle C. R., Wickner, R. B., 2000. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press: 1009–1024

Sano, T., 2003. Hop stunt viroid. Pages 207–212 in: *Viroids*. A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik, eds. SCIRO Publishing, Collingwood, Australia

Sano, T. and Shikata, E., 1989. Hop stunt disease. *Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen*: 159–164

Sasaki, M., Fukamizu, K., Yamamoto, K., Ozawa, T., Kurokawa, M. and Kagami, Y., 1989. Epidemiology and control of hop stunt disease.: *Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen*: 165–178

Sasaki, M. and Shikata, E., 1977. On some properties of hop stunt disease agent a viroid. *Proc. Japn. Acad. Ser. B*: 53: 109–112

Sasaki, M. and Shikata, E., 1980. Hop stunt disease, a new viroid disease occurring in Japan. *Rev. Plant Prot. Res.* 13: 97–109

Solarska, E., Skomra, U., Kitlińska, J., Wojcierowski, J., 1995: The occurrence of hop latent viroid (HLVd) in hop plants in Poland. *Phytopathologica Polonica* 10: 55–59

Tomlinson, J., Mumford, R., Lopez, R., Boonham, N., 2007. Microarray detection of viroids. FinalCost Action 853 and ARRAY meeting, 22–24 May 2007, Sant Feliu de Guixols, Spain: p. 34

Yaguchi, S., Takahashi, T., 1984. Survival of hop stunt viroid in hop garden. *Phytopathologische Zeitschrift* 109: 32–44

Yamamoto, H., Kagami, Y., Kurokawa, M., Nishimura, S., Ukawa, S. and Kubo, S., 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.* 16: 49–62



6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Matoušek, J., Trněná, L., Svoboda, P., Růžková, P., 1994. Analysis of hop latent viroid (HLVd) in commercial hop clones in Czech Republic. *Rostlinná výroba* 40: 973–983

Matoušek, J., Trněná, L., Svoboda, P., Růžková, P., Lichtenstein, C. P., 1995. The gradual reduction of viroid levels in hop mericlones following heat therapy: a possible role for a nuklease degrading dsRNA. *Biology and Chemistry Hoppe-Seyler* 376: 715–721

Matoušek, J., Patzak, J., Oriniaková, P., Chrástková, V., Svoboda, P., 1997 a. Genotype – dependant sensitivity of hop (*Humulus lupulus* L.) to HLVd infection, HLVd sequence stability and its field distribution within Žatec hop collection garden. *Proceeding of Scientific Commission of IHGC, Žatec Česká Republika, July 29 – August 1*: 87–94

Matoušek, J., Patzak, J., Oriniaková, P., Chrástková, V., Svoboda, P., 1997 b. Genotype dependent sensitivity of hop (*Humulus lupulus* L.) to HLVd infection. *Proceedings of Symposium „Recent Advances in Plant Biotechnology – Molecular biology for Agriculture“ České Budějovice, Česká republika, August 22–29, 1997*: 28

Matoušek, J., Patzak, J., Orctová, L., Svoboda, P., Shubert, J., Riesner, D., 1999. The sequence variation of hop latent viroid increases upon conditions of thermotherapy. *Proceedings of Symposium „New Aspects of Resistance research on Cultivated Plants-Virus Disease“, Aschersleben, Germany, November 17–18, 1999*: 53–57

Matoušek, J., Patzak, J., 2000. A low transmissibility of hop latent viroid through a generative phase of *Humulus lupulus* L. *Biologia Plantarum* 43: 145–148

Matoušek, J., Patzak, J., Orctová, L., Schubert J, Vrba, L., Steger, G., Riesner, D., 2001. The variability of Hop Viroids as Induced upon Heat Treatment. *Virology* 287: 349–358

Matoušek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Krofta, K., 2004. Study of infection and sequence variability of viroids in CR. *Proceedings of the 1st ISHS International Humulus Symposium, 1–7 August, 2004, Corvallis, USA, Eds. K. E. Hummer and J. A. Henning. Acta Horticulturae No. 668*: 157–164

Matoušek, J., Orctová, L., Ptáček, J., Patzak, J., Dědič, P., Steger, G. and Riesner, D., 2007. Experimental Transmission of Pospiviroid Population to Weed Species Characteristics of Potato and Hop Fields. *Journal of Virology, Vol. 81, No. 21*: 11891–11899



- Matoušek, J., Orctová, L., Škopek, J., Steger, G., 2008. Elimination of hop latent viroid upon development activation of pollen nucleases. *Biol.Chem.*, Vol. 389: 905–918
- Oriniaková, P., Matoušek, J., 1996. Viroid infection of hop (*Humulus lupulus* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and condition for hop transformation. *Rostlinná výroba* 42: 233–239
- Patzak, J., 2005. PCR detection of *Pseudoperonospora humuli* and *Podosphaera macularis* in *Humulus lupulus*. *Plant Protection Science* 41: 141–149
- Patzak, J., Matoušek, J., 1999. The elimination of hop latent viroid (HLVd) infection by meristem *in vitro* culture of hop (*Humulus lupulus* L.). *Proceeding of Scientific Commission of IHGC, Pulawy, Poland, July 27–30: 124–129*
- Patzak, J., Matoušek, J., Krofta, K., Svoboda, P., 2001. Hop latent viroid (HLVd) – caused pathogenesis: effects of HLVd infection on Lupulin composition of meristem culture – derived hop (*Humulus lupulus* L.). *Biologia Plantarum* 44: 579–585
- Patzak, J., 2003: Porovnání metod izolace RNA pro detekci latentního viroidu chmele (HLVd) pomocí *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR u chmele (*Humulus lupulus*). *Biologické listy* 68: 219–226
- Svoboda, P., Matoušek J., Patzak, J., Krofta, K., 2004. HLVd in hop gardens in Czech Republic. 7th Conference of the European Foundation for Plant Pathology and British Society for Plant Pathology – Presidential Meeting, University of Aberdeen, UK, 5th–10th September 2004, Abstracts: 72
- Svoboda P., Matoušek J., Patzak J., Krofta, K., 2005. Infection of HLVd in hop gardens in Czech Republic. In: Seigner E. (ed.): International Hop Growers' Convention I.H.G.C. - Proceedings of the Scientific Commission I.H.G.C., George, South Africa, February 20–25, 2005: 70



ABSTRACT

Methodology of hop latent viroid (HLVd) diagnostics

Viroids belong to the pathogens, which cause important economic losses in quality and quantity of hop cones. Hop (*Humulus lupulus* L.) as a perennial crop generally grown for nearly twenty years at the same site is seriously endangered by viroid infection.

The results reached during the research work supported by Czech Ministry of Education within the Research project no. 1486434701: “Research and Regulation of Stress Factors in Hops” create the base for this methodology. A foolproof diagnostics of viroid infection is necessary for the assessment of healthy state in hop plants. Molecular hybridization (dot-blot) and RT-PCR methods enable a reliable determination of latent hop viroid (HLVd). The methodology consists of the diagnostics as well as its utilization within the evaluation of hop healthy state.

KEY WORDS: hop, *Humulus lupulus* L., hop latent viroid, HLVd, hop stunt viroid, HSVd, diagnostics, dot-blot, PCR





PŘÍLOHA č. 1: LABORATORNÍ POTŘEBY A POMŮCKY PRO DIAGNOSTIKU HLVd

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1 mikropipety | 8 zásobník na mikrozkušavky Eppendorf |
| 2 odměrný válec | 9 písek na homogenizaci vzorků |
| 3 chemikálie (extrakční pufr atd.) | 10 blotovací aparatura s nylonovou membránou |
| 4 vortex | 11 chlazená porcelánová miska na homogenizaci vzorků |
| 5 stojánek a mikrozkušavky Eppendorf | 12 laboratorní sklo, pinzeta a nůžky na úpravu nylonové membrány |
| 6 laboratorní minutka | |
| 7 špičky na mikropipety | |

(Foto: Ing. Petr Svoboda, CSc.)



CHMELAŘSKÝ INSTITUT s.r.o.

HOP RESEARCH INSTITUTE Co., Ltd.



Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

Tel.: +420 415 732 111

Jednatel: Ing. Jiří Kořen, Ph.D.

Fax: +420 415 732 150

Tel.: +420 415 732 133

Internet: www.chizatec.cz

E-mail: jiri.koren@telecom.cz

Vědeckovýzkumná činnost

- Šlechtění chmele
- Chemie chmele
- Agrotechnika chmele
- Ochrana chmele
- Biotechnologie
- Pokusný pivovárek

Poradenská a školicí činnost

Výroba chmele

Výroba chmelové sadby

- Žatecký poloraný červeňák
- Hybridní odrůdy

Zemědělská výroba

Obchodní činnost



Chmelařský institut s. r. o.

Certifikace dle ČSN EN ISO 9001:2001

Účelové hospodářství Stekník

Tel.: +420 415 735 861

Fax: +420 415 725 334

Výzkumná stanice Tršice

Tel.: +420 585 957 237



Výstup z projektu řešení výzkumného záměru MSM 1486434701
„Studium a regulace stresových faktorů chmele“

