

VIROIDI V SLOVENSKIH KULTIVARJIH HMELJA (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Vlasta KNAPIČ¹, Branka JAVORNIK²

¹Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec.

²Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, ki so se sposobni v rastlinski celici sami razmnoževati in s tem zniževati pridelek različnih rastlin. Sestavlja jih 246 - 375 nukleotidov dolga RNK, ki je hkrati genom in sekundarna struktura viroida. Nukleotidi se znotraj RNK privlačijo v bazne pare. Viroide določamo s pomočjo molekularnih tehnik, saj so premajhni, da bi jih videli z elektronskim mikroskopom in ker nimajo beljakovin, tudi serološki testi niso mogoči. V slovenskih kultivarjih hmelja smo z metodo povratne elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE) dokazali okuženost vseh vzorcev s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd), medtem ko drugega viroida, ki okužuje hmelj, hmeljevega stunt viroida (HSVd), nismo mogli najti. Pregledali smo vzorce cv. savinjski golding, cv. aurora in cv. apolon, ki so slovenskega porekla ter cv. magnum, ki je k nam introducirana iz Nemčije. HLVd smo določili po ekstrakciji v 2 M raztopini LiCl iz posušenega in zamrznjenega hmeljevega listja in storžkov. Analizo vzorcev na zastopanost HSVd v slovenskem hmelju, ki je kazal simptome zakrnela rasti in defomacij listov, so opravili na Univerzi Hiroasaki na Japonskem. Uporabili so različne metode elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (sekvenčno in dvodimenzionalno 2D-PAGE) in metode hibridizacije (Northern blot in dot-blot) z DIG označeno cRNK sondo. Vse metode določevanja so pokazale, da slovenski kultivarji hmelja niso okuženi s HSVd ali drugim viroidom podobnim organizmom, bili pa so okuženi s HLVd. Zdi se, da HLVd lahko povzroča simptome, kot so kodranje listov, zakrnela rast in rumenenje v stresnih razmerah kot so globoka rez korenike hmelja v aprilu ter spomladanska suša in velike temperaturne razlike.

Ključne besede: *Humulus lupulus*, viroid, elektroforeza, PAGE

ABSTRACT

VIROIDS IN SLOVENIAN HOP VARIETIES (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Viroids - the smallest infectious agents which could replicate itself - are capable to cause serious damage in different plants and yield loose. Viroids have very small RNA genomes which are 246 - 375 nucleotides in length. Their secondary structure looks like single stranded covalent rod-like shape with intramolecular base pairing. They are too small to be visible by electron microscopy. They do not encode any proteins, so serological tests are not useful, as well. Therefore using molecular methods is the only way to detect viroid in plant. Knowledge of the complete sequence of the viroids genome enables designing different probes and primers used at molecular detecting of viroids. In our research Slovenian hop varieties were examined on the presence of Hop latent viroid (HLVD), which has been detected as widely spread pathogen in European hops. We tested our varieties on the presence of Hop stunt viroid (HSVD) as well, although it had been proven only in Asian hops. HLVD was detected after specific extraction of 2M LiCl soluble nucleic acids from dried or frozen hop leaves or cones by return polyacrylamid gel electrophoresis (R-PAGE). Hop varieties Aurora, Apolon, Savinjski Golding and Magnum were HLVD positive and HSVD negative. Further tests (sequential PAGE, 2D-PAGE, Northern blot and dot-blot with DIG labelled HSVD cRNA probe)

¹ dipl. ing. kmet., SI-3310 Žalec, Žalskega tabora 2

² red. prof., dr., SI-1111 Ljubljana, pp. 2995

on presence of HSVd and other viroid like RNAs of hop samples which showed symptoms of stunting and curling were done at the Hirosaki University in Japan. HSVd and other viroid-like RNAs were not detected but all samples were HLVd positive. It seems that HLVd can cause symptoms as leaf curling, stunting and yellowing in stress conditions as strict cutting of root-stock in April, draught and high temperatures in spring.

Key words: *Humulus lupulus*, viroid, electrophoresis, PAGE

1 UVOD

Viroide zaradi njihove zgradbe in velikosti primerjamo z drugimi mikroorganizmi. Bakterije so najmanjši enocelični organizmi, saj virusi in manjši mikroorganizmi nimajo celične membrane, citoplazme ali celičnega jedra. Viruse sestavlja nukleinska kislina in proteinski plašč. Subviralni patogeni, ki pa še proteinskega plašča nimajo, so: viroidi, sateliti in majhne RNK. Viroidi so najmanjši rastlinski patogeni, ki se lahko samostojno razmnožujejo. Njihov RNK genom je dolg le 246 - 375 nukleotidov. Lahko povzročijo resne simptome na rastlinah in zmanjšajo pridelek. V naših razmerah lahko okužujejo hmelj, krompir, paradižnik in sadne vrste.

Viroidi so premajhni, da bi jih zaznali z elektronsko mikroskopijo. Ker ne kodirajo beljakovin, jih tudi s serološkimi testi ne moremo zaznati in so molekularne metode edini mogoči način detekcije. Molekularne tehnike za določanje subviralnih patogenov, ki jih v Sloveniji uvajamo, so: povratna elektroforeza na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE), hibridizacijske metode z obeleženo sondo in verižna polimerazna reakcija (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR).

Evropski hmelj je vsesplošno okužen s Hop latent viroidom - HLVd, ki povzroča latentno bolezen hmelja in simptomov ne kaže, slabi pa rastline na celični ravni in s tem vpliva na pridelek alfa kislin in eteričnih olj. V Angliji so v primerjavi z viroidi okuženih in neokuženih rastlin ugotovili pri različnih kultivarjih od 20 do 50% znižanje pridelka alfa kislin in imajo utečeno pridelavo brezvirusnih in brezviroidnih sadik hmelja (Morton *et al.*, 1993). Preliminarna testiranja, ki so jih opravili na Hmeljarskem inštitutu v Huellu in na Max-Planck inštitutu za biokemijo v Nemčiji (Dolinar, 1993) so pokazala, da je tudi slovenski hmelj okužen s hmeljevim latentnim viroidom.

V nekaj nasadih hmelja pa smo v letih 1996, 1997 in 1998 opazili simptome zaostajanja v rasti v juniju (aurora), deformacije polnorazvitih listov (aurora, magnum), odklanjanje rastnih vršičkov od opore (apolon, aurora) in razbarvanje mlajših listov (aurora). Rastline s simptomi so rastle v skupinah v vrstah ali v krogih, imele so močno znižan pridelek, simptomi pa so se pojavili v stresnih razmerah (suša, nihanje temperature, pregloboka rez korenike). Opisani simptomi ustrezajo tistim, ki jih povzroča hmeljev stunt viroid (HSVd), ki je karantenski organizem na Japonskem.

S povratno elektroforezo viroidne RNK na poliakridnem gelu (R-PAGE - return polyacrylamid gel electrophoresis) je mogoče ločiti ribonukleinski kislini obeh viroidov od rastlinske RNK in DNK. Ker je R-PAGE metoda dovolj zanesljiva za določanje viroidov, ustreza tudi za serijsko testiranje in hkrati najcenejša molekularna metoda, smo jo prilagodili in z njo preverili zastopnost HLVd in HSVd v slovenskih kultivarjih hmelja.

2 MATERIALI IN METODE

Z metodo povratne elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (R-PAGE) smo analizirali vzorce cv. savinjski golding, cv. aurora in cv. apolon, ki so slovenskega porekla ter cv. magnum, ki je k nam introduciran iz Nemčije. Julija 1997 smo nabrali mlade, polnorazvite liste s petiolami in avgusta še dozorele storžke posameznih kultivarjev. Polovico vsakega rastlinskega vzorca smo posušili na 60°C, drugo polovico pa zamrznili na -20°C. Vzorčenje smo ponovili v letu 1998.

Ekstrakcija in določanje viroidne RNK je težavno, saj je v rastlinskem materialu v nizkih koncentracijah in je v primerjavi z rastlinsko RNK neprimerno manj, zlahka pa se tudi kontaminira z ribonukleazami (RNAze), ki jo razgradijo. Zato moramo posebej razkuževati delovne površine, steklovino, uporabljati "RNase free" reagente in nositi rokavice. Vse postopke hladimo, vso vodo za reagente pa tretiramo z dietil pirokarbonatom (DEPC), terilnice temeljito operemo in namočimo za 10 min v 10 % KOH ali NaOCl (5 g/600 ml), speremo z avtoklavirano DEPC tretirano vodo in posušimo v sušilniku. Elektroforetske posode napolnimo s 3% H₂O₂ in jih po 10 minutah speremo z avtoklavirano DEPC vodo. Zaradi rabe organskih topil in hlajenja delamo ekstrakcijo v digestoriju.

2.1 Ekstrakcija celokupnih nukleinskih kislin

Za ekstrakcijo viroidne RNK iz hmelja smo uporabili modificiran postopek, ki ga opisujeta Sano in Shikata (1988). Preizkusili smo več načinov čiščenja nizkomolekularnih RNK, kot predlagajo avtorji Schumacher (1986), Puchta (1988), Schroedter (1989), Hataya (1992) ter Wah in Yang (1996). Preizkušali smo ekstrakcijo iz različne količine izhodiščnega rastlinskega materiala. Zatehte rastlinskega tkiva (posušeni zreli celih storžkov in listov) so bile: 0,3 g, 0,5 g, 1,0 g in 1,5 g. Proporcionalno zatehti smo izbirali tudi centrifugirke (1,5 ml, 2,5 ml in 30 ml) in količino dodanega ekstrakcijskega pufra (0,5 ml, 1 ml in 10 ml).

Za serijsko testiranje je ustrezna raba 2,5 ml mikrocentrifugirk, v katere damo 0,3 g homogeniziranega vzorca. Na 4 °C ohlajenemu ekstrakcijskemu pufuru (0,1 M Tris HCl pH 8,0; 0,01M EDTA pH 7,5; 0,1 M NaCl; 2 % SDS-sodium dodecil sulfat) tik pred uporabo dodamo 5 % 2-merkaptoetanol. V sterilne (mikro)centrifugirke na ledu pripravimo po 500 – 700 µl TESSM pufra, vanje prenesemo po 0,15 g vzorca. Po 5 min mešanju (vortex) homogenizatu dodamo enak volumen (500 µl) mešanice topil fenol:kloroform:izoamilalkohol (pH 7,8-8) v razmerju 25:24:1 in stresamo 10-15 minut (vortex), da se raztopi preostala listna masa. Sledi centrifugiranje pri 8.000 obratih/min za 8 minut, da se oborijo beljakovine in se ločijo od vodne faze. Supernatant pazljivo odpipetiramo in prenesemo v novo epruveto. Organsko fazo zavržemo. Vodni fazi ponovno dodamo enak volumen topila fenol:kloroform:izoamilalkohol in stresamo, nato centrifugiramo pri 12.000 obratih/min za 12 minut. Fenolno ekstrakcijo še dvakrat ponovimo.

Iz zadnjega supernatanta precipitiramo nukleinske kisline z dodatkom 0,2 volumna 3 M natrijevega acetata (120 µl) in 1 volumna (700 µl) ledeno hladnega izopropanola. Precipitacija poteka čez noč na -20°C. Nato centrifugiramo 15 minut pri 15.000 obratih/min. Supernatant odlijemo in usedlino še enkrat tretiramo z dodatkom 400 µl ledenega izopropanola in 80 µl 3 M natrijevega acetata. Postavimo v zamrzovalnik na -20 °C za 2 uri, centrifugiramo 15 minut pri 14.000 obratih/min. Supernatant odlijemo in usedlino speremo z 1 ml 75 %-ega ohlajenega etanola. Etanol odlijemo in usedlino posušimo na zraku ali s sušilnikom.

Ko je mikrocentrifugirka suha, raztopimo nukleinske kisline z dodatkom majhnega volumna (100 µl) TE pufra (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) in 1 vol (100 µl) 4M raztopine LiCl in inkubiramo na ledu za 4 ure, da odstranimo večje molekule RNK.

Supernatant, ki vsebuje 2M LiCl topno nizkomolekularno RNK in DNK, zberemo s centrifugiranjem. Skupek, kjer je pretežno ribosomalna in mRNK smo raztopili v formamidu in analizirali na R-PAGE. Supernatant, kjer je poleg DNK tudi viroidna RNK, pa smo tudi analizirali na R-PAGE.

2.2 Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu

Za določevanje hmeljevega latentnega viroida (256 nukleotidov) smo uporabili različne koncentracije poliakrila-amida (PAA): od 5% (Singh, 1994a) do 15 % (Shikata, 1985). Najpogosteje

smo uporabili nedenaturacijski 6% in 7% PAA gel (AA:bisAA=30:0,75), v katerem se uspešno ločijo nukleinske kisline s 75 do 470 baznimi pari (Sambrook, 1989).

Za R-PAGE smo pripravili ploščni gel debeline 1,5 mm in velikosti 15x16 cm. Za 6% nedenaturacijski gel z razmerjem akrilamid:bisakrilamid 29:1 potrebujemo 8 ml 30% akrilamida, 4 ml TBE 10x pufra, 27,72 ml bidestilirane DEPC vode, 0,28 ml 10% amonpersulfata in 16 μ l TEMEDA. Gel je treba takoj po dodatku amonpersulfata s pomočjo pipete vliti med vertikalni stekleni plošči v modelu, ker začne polimerizirati. Na vrhu plošče v gel vstavimo glavnik, ki oblikuje žepke v gelu, v katere kasneje nanašamo vzorce. Gel pripravimo dve uri pred začetkom elektroforeze, lahko pa ga pred rabo hranimo en dan v hladilniku.

Vzorcem je potrebno pred nanašanjem dodati barvilo in glicerol, ki omogoči usedanje vzorca na dno žepka v gelu in s tem enakomeren začetek potovanja. Električni tok steče skozi gel s pomočjo pufra, ki ga obdaja. Elektroforeza je potekala prvo smer (od - k +; negativno nabite nukleinske kisline potujejo navzdol) v pufri s 5% raztopino koncentrirane TBE (TRIS-trizma base, borova kislina - H_3BO_3 in 0,5 M EDTA pH 8) ob hlajenju pri konstantnem toku 88 - 91 mA za dve vertikalni plošči velikosti 15 x 16 cm in 15 mm debel gel. Na vsak gel lahko nanesemo 14 ali 22 vzorcev. Pri tem 15 μ l vzorca redčimo s 15 μ l nanašalnega pufra (glicerol, ksilencianol, bromfenol modro in TBE). Ko barvilo bromfenol modro pripotuje do roba plošče, ustvarimo denaturacijske razmere s segrevanjem gela. Za povratno elektroforezo obrnemo električni tok, gel pa vstavimo v pufri z 1,25% raztopino 10x koncentrirane TBE, segret na 95 °C. Povratna elektroforeza je potekala pri 68 °C polovični čas prve elektroforeze.

2.3 Barvanje gelov

V prozornem gelu razvrščene nukleinske kisline postanejo vidne šele po barvanju. Pasove nukleinskih kislin smo pobarvali s srebrom in ob presvetlevanju slikali elektroforegram. Barvanje s srebrom je modificiran Promega protokol (Promega Silver Sequence): fiksiranje gela s 7,5% ledeno hladno očetno kislino za 2 minuti, čemur sledi trikratno spiranje gela z destilirano vodo in nato 30 min. barvanje s srebrom (5 ml 20% $AgNO_3$ in 1,5 ml 37% formaldehida na liter raztopine). Razvijanje gela poteka v ohlajeni raztopini natrijevega karbonata (dodamo 0,15% raztopino 37% formaldehida in 2 mg/l Na tiosulfata) dokler ne dobimo zelene intenzivnosti črt v gelu. Razvijanje ustavimo z očetno kislino.

2.4 Dodatne analize HSVd

Z R-PAGE smo detektirali elektroforetsko črto s hmeljevim latentnim viroidom (HLVd), medtem ko drugega viroida, ki okužuje hmelj, hmeljevega stunt viroida (HSVd), nismo določili. Analizo istih vzorcev hmelja na zastopanost HSVd v slovenskem hmelju so opravili na Univerzi Hirosaki na Japonskem. Za vzorce iz hmeljišč, ki so kazali simptome, podobne stunt viroidu, so uporabili tri metode elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (povratno - R-PAGE, sekvenčno - S-PAGE in dvodimenzionalno - 2D-PAGE), kontrolno Northern hibridizacijo in še dot-blot hibridizacijo s cRNK sondo, označeno z dioksigeninom.

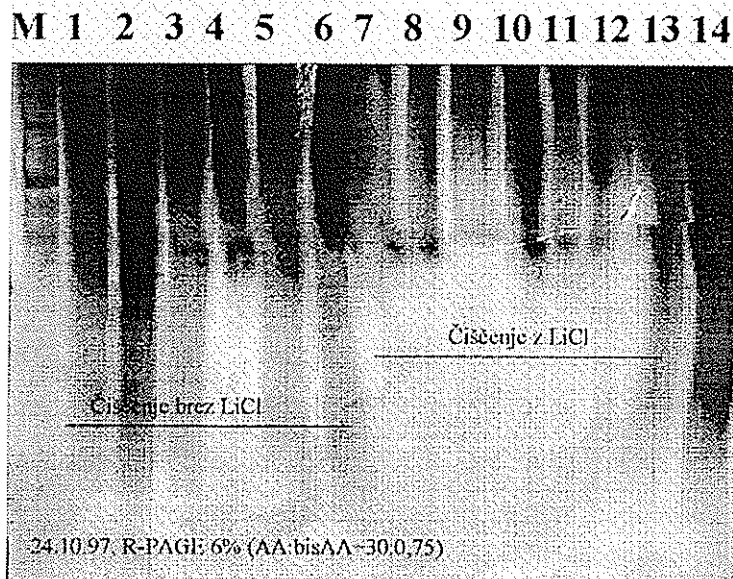
3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Prva diagnostika viroidov je temeljila na simptomih gostiteljskih in testnih rastlin ter na analizi primarnih metabolitov gostiteljskih rastlin. Oboje je pri HLVd nezanesljivo, saj značilnih vidnih simptomov v običajnih rastihih razmerah ne povzroča. Nato so poskusili izolirati povzročitelja z ekstrakcijo s fenolom in različnimi pufrji ter s sedimentacijo (Shikata, 1985), kar je podlaga določanja še sedaj. Pri ekstrakciji je ključni korak odstranitev beljakovin in inaktivacija encimov, kar dosežemo z ekstrakcijo vodne raztopine nukleinskih kislin z organskimi topili (fenol : kloroform : izoamilalkohol). Vendar pa fenolna ekstrakcija ne zadošča za odstranitev encimov ribonukleaz (RNAaze), ki lahko hitro razgradijo viroidno ssRNK. Ribonukleaze lahko obnovijo aktivnost po mnogih

oblikah tretiranja (kot je npr. kuhanje). Reducent kot je beta-merkaptetanol jih inaktivira, pomaga razbiti celico, hkrati je antioksidant, ki prepreči oksidacijo fenolov in s tem rjavenje vzorcev. Dodatek natrijevega dodecil sulfata (SDS - sodium dodecyl sulfat) služi za separacijo lipidov in proteinov, hkrati je tudi reverzibilni inhibitor ribonukleaz.

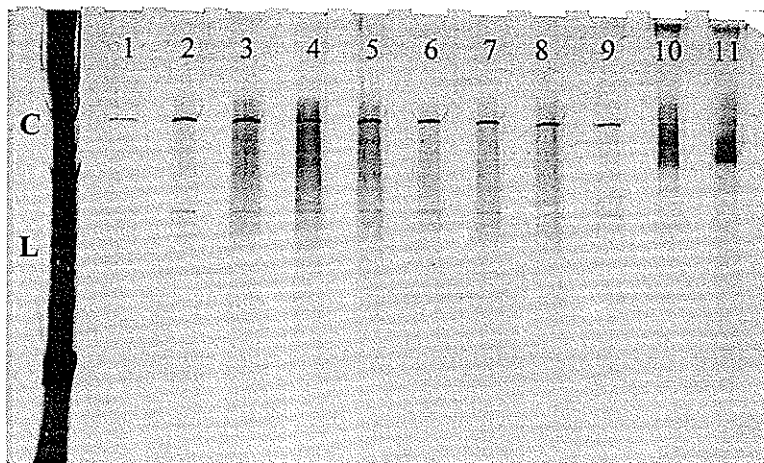
Viroidna RNK je v rastlinskem materialu v zelo nizkih koncentracijah, zato je razvoj učinkovite metode ekstrakcije viroidne RNK bistvenega pomena za njihovo nadaljnje določevanje. Na Češkem je bila koncentracija HLVD 4,3 pg/mg lista hmelja iz nasada in 25 pg/mg lista iz meristema vzgojene rastline v rastlinjaku (Matoušek, 1994). Ker je viroidna RNK v rastlinskem materialu v zelo nizkih koncentracijah, jo tudi po ekstrakciji dobimo v majhnih količinah. Pri metodi, kot je R-PAGE pa je od količine viroidne RNK odvisna intenzivnost pasu v gelu - več ko je viroida, laže ga zaznamo kot viroidno črto v gelu. Delno lahko rešimo ta problem s povečevanjem začetne količine vzorca. V prvih objavah o določanju hmeljevega stunta viroida so ekstrakcijo opravili iz 200 g zmrznjenih hmeljevih listov (Shikata, 1985), danes pa jo delamo iz 0,5 g do 1,5 g vzorca. Velika začetna količina vzorca namreč zahteva velike epruvete, ki jih je po uporabi potrebno prati, in veliko porabo hlapljivih organskih topil, ki so zdravju zelo škodljiva. Da se temu izognemo, opravljamo fenolno ekstrakcijo v mikrocentrifugirkah za enkratno uporabo, ki vsaka sprejme le 0,15 - 0,3 g vzorca.

Ekstrakcija RNK iz tkiva hmelja ali vinske trte, ki je bogato s polifenoli in polisaharidi, je še težja, saj vzorci ob oksidaciji porjavijo in to se kasneje opazi tudi na gelih. Moteče spojine med barvanjem še potemnjijo in zakrijejo pasove nukleinskih kislin, ki jih v gelu določamo vizualno. Vzorce je s ponavljanjem korakov čiščenja in precipitacije sicer mogoče očistiti, vendar pri tem večamo možnost, da se vzorci kontaminirajo z RNAsami in se količina RNK spet zmanjša.



Slika 1: Hitra ekstrakcija nukleinskih kislin iz hmelja, prirejena iz originalne ekstrakcije iz krompirjevih gomoljev po Schroedterju ne kaže lepe in jasne slike, daje pa dovolj zanesljivo viden viroidni pas.

Modificirali smo tudi skrajšan postopek čiščenja po Schroedterju (1989), ki bi bil ustrezen za rutinsko testiranje viroidov v hmelju (Slika 1). Pri ekstrakciji viroidne RNK nastane tudi ta težava, da po precipitaciji z LiCl analiziramo supernatant - tisti del, ki ga drugi raziskovalci običajno zavržejo in obdržijo čist skupek visokomolekularnih nukleinskih kislin.



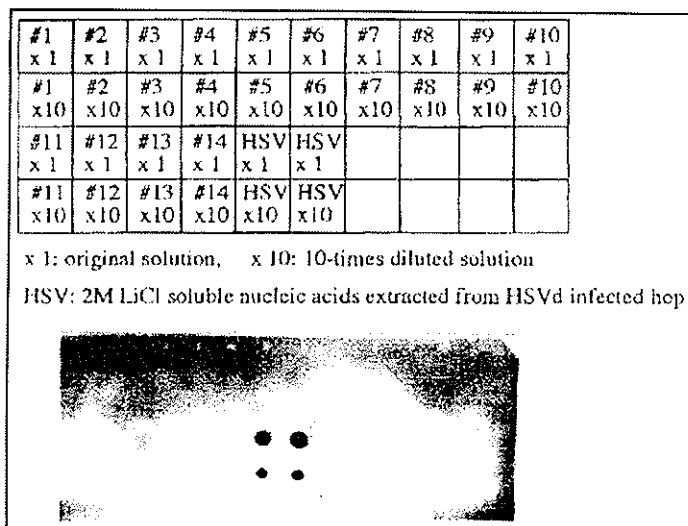
Slika 2: Pri dobro čiščenih vzorcih lahko vidimo tako krožno obliko viroida (C - cirkularno), kot linearno obliko (L), ki v gelu pripotuje dlje. M - Marker; 1, 2 - aurora '93 list; 3 - brezvirusna aurora '96/list; 4 - 7 aurora '89/storžki; 8 - savinjski golding; 9 - apolon '93; 10, 11 - magnum 97. Magnum ima v primerjavi z ostalimi kultivarji tudi veliko sekundarnih metabolitov, ki motijo detekcijo viroida - zato krožno in linearno obliko zaznamo kot enoten pas (Sano, 1998).

4 SKLEPI

Za analizo na R-PAGE smo uporabljali fenolno ekstrakcijo celokupnih RNK, ki so ustrezne za metodo dot blot hibridizacije in R-PAGE. Opravili smo tudi dodatno čiščenje z LiCl, ki odstrani visokomolekularne RNK. Predvsem zaradi velike aktivnosti ribonukleaz, ki se sprostijo pri razgradnji celice in ki so vsepovsod v okolici ter lahko kontaminirajo vzorce, je ekstrakcija RNK mnogo težja kot DNK. Skrbeti moramo za čim bolj sterilno, hladno okolje in uporabljati inhibitorje ribonukleaz.

Ugotovili smo, da so za analizo najustrenejši posušeni celi, zreli storžki hmelja. Listi vsebujejo namreč preveč sekundarnih metabolitov, ki motijo detekcijo viroidne RNK. Teh je v listnih pecljih sicer manj, vendar je vsebnost viroidov v njih nestabilna in manjša kot v listih in storžkih (Solarska, 1997).

Pri povratni elektroforezi na poliakrilamidnem gelu je primerna 7% koncentracija gela z razmerjem akrilamid : bisakrilamid = 30 : 0,75, da še dovolj dobro in hitro ločimo viroidno RNK od rastlinskih. S hmeljevim latentnim viroidom so okuženi pregledani kultivarji: aurora, apolon, savinjski golding in magnum.



Slika 3: Vzorce hmelja, ki so kazali simptome, kot bi jih povzročal stunt viroid, so analizirali tudi na Univerzi Hirosaki na Japonskem. Uporabili so dot-blot metodo, ki jo uporabljajo za serijsko testiranje. Vseh 14 vzorcev iz Slovenije je bilo HSVD negativnih.

Različne elektroforetske metode so ovrgle sum, da je hmelj okužen s HSVd. Pravilno določitev sta potrdili Northern-blot in dot blot metoda hibridizacije, ki so jih opravili na Univerzi Hirosaki na Japonskem (Slika 3). Pregledani kultivarji, ki so kazali simptome zakrnele rasti, vendar niso okuženi s HSVd ali z drugimi znanimi subviralnimi povzročitelji: so aurora, apołon in magnum. Vsi ti vzorci pa so bili okuženi s HLVd. Zastavlja se nam torej vprašanje, ali hmeljev latentni viroid vendarle povzroča tudi vidne simptome, če so hmeljne rastline v stresu?

Acknowledgement

We are very grateful to Prof. D. Sc. Teruo Sano and his research team from Hirosaki University in Japan for all help and voluntary testing of our samples.

5 LITERATURA

- 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*).- *Ann-Appl-Biol.* 121 (1992)3, p. 585-592.
- Adams, A. N. / Barbara, D. J. / Morton, A. / Darby, P. / Green, C. P. (1995). The control of hop latent viroid in UK hops.- *Acta Horticulturae* 385 (1995) p. 91-97.
- Dolinar, M. (1993). Virusi in viroidi.- Poročilo o delu, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, s. 18.

- Hanold, D. (1993). Diagnostic methods applicable to viroids.- In: Diagnosis of plant virus diseases (ed. R. E. F. Matthews), CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, (1993), p. 295-314.
- Hataya, T. / Katsuyuki, H. / Suda, N. / Nagata, T. / Shifang, L. / Itoga, Y. / Tanikoshi, T. / Shikata, E. (1992). Detection of Hop latent viroid (HLVd) using Reverse Transcription and Polymerase chain Reaction (RT-PCR).- *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58 (1992), s. 677-684.
- Solarska, E. (1997). The detection of hop latent viroid in hops by dot-blot hybridisation.- *Proceedings of the Scientific commission International Hop growers' Convention of the XLVth International Hop Congress, 29th July - 1st August 1997, Žatec*, p. 47-48.
- Matoušek, J. / Trüena, L. / Svoboda, P. / Ružkova, A. (1994). Analysis of hop latent viroid (HLVd) in commercial hop clones in the Czech Republic.- *Rostlinna. Vyroba* 40 (1994)10, p. 973-893.
- Puchta, H. / Ramm, K. / Saenger, H. L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLVd), a new viroid occurring worldwide in hops.- *Nucleic acids Research* 16(1988)10, s. 149-158.
- Sambrook, J. / Fritsch, E. F. / Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning.- A laboratory manual*, second edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989, s. 5.33-5.87, 6.3-6.48, 7.30-7.87
- Sano, T. / Shikata, E. (1988). Hop stunt viroid disease.- *Proceedings Int. Workshop on Hop Virus Diseases Rautschholzhausen 1988*, A. Eppler Ed., Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft. (1989), p. 159-164.
- Schroeder, M. / Weidemann, H. L. (1989). Simplified application of return gel electrophoresis for the routine detection of potato spindle tuber viroid.- *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 19(1989), p. 661-665.
- Schumacher, J. / Meyer, N. / Riesner, D. / Weidemann, H. L. (1986). Diagnostic Procedure for Detection of Viroids and Viruses with Circular RNAs by return-Gel Electrophoresis.- *J. Phytopathology* 155(1986) p. 332-343.
- Shikata, E. (1985). Hop stunt viroid and hop viroid disease.- in *Subiral pathogens of Plants and Animals, viroids and prions*, Academic Press, Inc. (1985) p. 101-121.
- Singh, R. P. / Singh, M. (1994). *Polyacrylamid Gel Electrophoresis and Mechanism of Viroid Strain Separation.- Virology in the Tropics*, Malhotra Publishing House, New Delhi (1994) p. 186-198.
- Wah, Y. F. W. C. / Symons, R. H. (1997). A High-Sensitivity RT-PCR Assay for the Diagnosis of Grapevine Viroids in-Field and Tissue-Culture Samples.- *Journal of Virological Methods* 63(1997)1-2, pp 57-69