

UPORABA IZOTERMNIH METOD POMNOŽEVANJA NUKLEINSKIH KISLIN ZA DOLOČANJE VIROIDOV NA TERENU

Tanja GUČEK¹ in Sebastjan RADIŠEK²

Pregledni članek / Review paper

Prispelo / Received: 1. 11. 2022

Sprejeto / Accepted: 2. 12. 2022

Izvleček

Intenzivna monokulturna pridelava kmetijskih rastlin, podnebne spremembe, globalno trgovanje in evolucijska sposobnost patogenov prilagajanju na spremembe so glavni dejavniki pojava rastlinskih epidemij. Neozdravljive bolezni rastlin, ki jih povzročajo viroidi, lahko omejijo količino in kvaliteto pridelka in povzročijo velike izgube. Pri tem pomemben dejavnik preprečevanja širjenja predstavljajo diagnostične metode s katerimi lahko hitro in zanesljivo odkrivamo viroidne okužbe. Zaradi narave viroidov, ki so gola RNA brez kodirajočega potenciala, njihovo določanje na podlagi prepoznavanja antigen-protitelo ni mogoče. Zato se lahko uporabljajo le metode na osnovi določanja nukleinskih kislin. Nekatere med njimi so lahko zamudne, zahtevajo uporabo drage opreme in izkušeno osebje, kar je ovira za izvajanje detekcije na terenu. Alternativni način je uporaba testov pri konstantni temperaturi, kot sta metoda izotermnega pomnoževanja, posredovanega z zanko (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) in pomnoževanje z rekombinazno polimerazo (recombinase polymerase amplification, RPA). Izotermni testi so preprosti, enostavni za izvedbo in zanesljivi ter se jih lahko izvede s hitrimi testi. Uporaba hitrih testov ima prednost pri testiranju na terenu, ker zahtevajo minimalno pripravo vzorcev in se izvajajo pri konstantni nizki temperaturi (37–42 °C) brez uporabe zahtevne opreme. V preglednem članku so predstavljeni izotermni testi (LAMP in RPA), ki so primerni za detekcijo na terenu in njihov potencial za določanje viroidov.

Ključne besede: LAMP, RPA, detekcija na terenu, viroid

ON SITE DETECTION OF VIROIDS USING METHODS FOR ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS

Abstract

Intensive monoculture production of agricultural plants, climate change, global trade and the evolutionary ability of pathogens to adapt rapidly are main source of current emergences. Incurable plant diseases caused by viroids can limit crop production and

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

² Dr., IHPS, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

quality and can result in significant losses. An important factor in preventing the spread is represented by diagnostic methods that can rapidly and reliably detect viroid infections. The nature of viroids, which are naked RNA without any coding potential, restricts its detection based on antigen-antibody recognition. Therefore, only nucleic acid detection methods can be applied. Some of them can be time-consuming, require the use of expensive equipment and technical skills, which may be an obstacle for field detection. An alternative way is the use of isothermal tests, such as the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and recombinase polymerase amplification (RPA). Isothermal tests are simple, easy to perform, and reliable and can be performed using lateral flow devices. This technology has the advantage to be implemented in field-based scenarios because tests require a minimal sample preparation, and are performed at constant low temperature (37–42°C) without the use of sophisticated equipment. Here we briefly describe isothermal assays (LAMP and RPA), that are suitable for onsite detection and their potential for viroid detection.

Key words: LAMP, RPA, field detection, viroid

1 UVOD

Rastline so občutljive na številne patogene, kot so virusi in viroidi, ki lahko povzročijo velike izgube pridelka. Za hitro odkritje povzročiteljev je potrebno razviti zanesljive diagnostične metode, da se te izgube zmanjša. Najenostavnejši način detekcije predstavlja določitev bolezenskih znamenj in kroga gostiteljev. Težavo predstavlja dejstvo, da virusi in viroidi ne povzročajo samo enega tipičnega bolezenskega znamenja, kot to da je lahko pri eni bolezni prisotnih več povzročiteljev (Bhat in sod., 2022). Zato obstaja potreba po metodah, ki omogočajo hitro, zanesljivo in hkrati specifično določanje rastlinskih patogenov.

In vitro pomnoževanje nukleinskih kislin, oziroma umetna replikacija genetskega materiala, se je z razvojem PCR metode (Mullins in sod., 1986) vključilo v vsa področja znanosti o življenju, od detekcije patogenov, raziskav raka, kloniranja, sekvenciranja, genskega inženiringa, sintezne biologije, forenzike, do razvoja zdravil in številnih drugih (Li in sod., 2019). Ne glede na široke možnosti uporabe je PCR metoda, ki za svoje delovanje potrebuje izkušeno osebje in sofisticirano opremo. Posledično se jo lahko uporablja le znotraj zidov laboratorija. Hkrati je izvedba PCR metod zahtevna, saj je najprej potrebno izvesti izolacijo nukleinskih kislin, ki ji nato sledi pomnoževanje in na koncu analiza rezultatov na agaroznem gelu (Bhat in sod., 2022).

Po drugi strani za pomnoževanje nukleinskih kislin pri stalni temperaturi z uporabo izotermnih metod ne potrebujemo termocikličnih inštrumentov (Li in sod., 2019). Ker nenehno segrevanje in ohlajanje ni več potrebno se skrajša čas analize. Prav tako

so rezultati vidni že s spremembo obarvanosti produkta, ko se reakcijski mešanici doda fluorescentno barvilo (npr. etidijev bromid, SYBR Green I, Picogreen, propidijev jodid) in je sprememba barve vidna že s prostim očesom, zato agarozna gelska elektroforeza ni več potrebna (Panno in sod., 2020). Te metode se lahko izvajajo na terenu in v laboratorijih, ki so slabše finančno preskrbljeni, vzamejo manj časa, proizvedejo pa rezultate primerljive PCR metodam (Bhat in sod., 2022). Zaradi enostavne uporabe, cene in hitrosti so se tako razvile številne metode izotermnega pomnoževanja. Med največkrat uporabljene sodijo: NASBA (nag. nucleic acid sequence-based amplification), SMART (ang. signal-mediated amplification of RNA technology), HDA (ang. helicase-dependent amplification), RPA (ang. recombinase polymerase amplification), RCA (ang. rolling circle amplification), MDA (ang. multiple displacement amplification), LAMP (ang. loop-mediated isothermal amplification), SDA (ang. strand displacement amplification) in druge (Li in Macdonald, 2015; Craw in Balachandran, 2012, Li in sod., 2019) (preglednica 1). LAMP in RPA sta metodi, ki se pogosto uporabljata za detekcijo in diagnostiko rastlinskih povzročiteljev bolezni, med njimi tudi virusov in viroidov, zato jih bomo obravnavali v nadaljevanju.

Preglednica 1: Seznam izotermnih metod in njihovih značilnosti

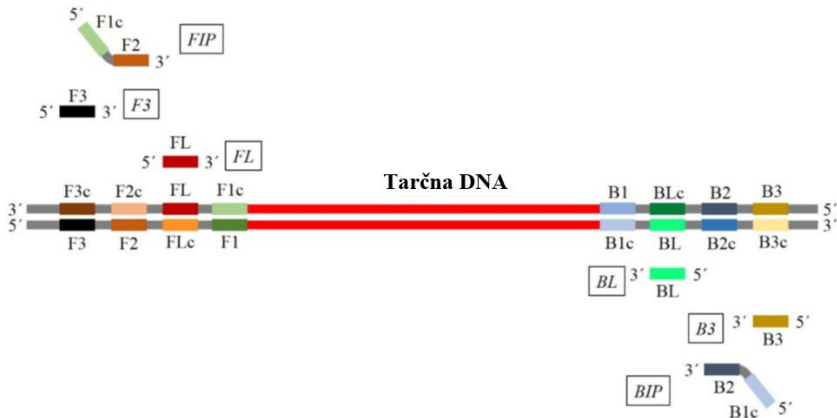
Izotermna metoda	Tarča	Začetni oligonukleotidi	T [°C]	Čas [min]	LOD* [kopije]	Sočasno pomnoževanje	Liofilizirani reagenti
NASBA	RNA	2	41	60-180	1	DA	DA
SDA	RNA	4	30-55	60-120	10	DA	NE
RCA	DNA/RNA	1	30-65	60-240	10	NE	NE
HDA	DNA	2	65	30-120	1	DA	NE
LAMP	DNA/RNA	4-6	60-65	20-60	5	DA	NE
RPA	DNA/RNA	2	37-42	20-40	1	DA	DA

*LOD, meja detekcije (ang. limit of detection)

2 LAMP

Metoda izotermnega pomnoževanja, posredovanega z zanko (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) je metoda pomnoževanja nukleinskih kislin pri konstantni temperaturi, ki se uporablja kot alternativa PCR metodam. Uporaba LAMP je razširjena v medicini, kmetijstvu in živilski industriji s postopki, ki vključujejo analizo mutacij, mikro RNA, identifikacije vektorjev rastlinskih patogenov, odkrivanje gensko spremenjenih organizmov in številne druge aplikacije (Notomi in sod., 2000; Panno in sod., 2020). Razlog za razvoj LAMP metodologije je temeljil na poskusu premagovanja nekaterih pomanjkljivosti PCR metod, ki med drugim zahtevajo uporabo dragih inštrumentov. Zaradi potrebe po visoki natančnosti temperatur ogrevanja in hlajenja PCR reakcije lahko pri določanju izbranih tarč prihaja do izgube specifičnosti. Prav tako je encim polimeraza zelo občutljiv na inhibitorje, ki so lahko prisotni v rastlinskih ekstraktih. Nasprotno uporaba LAMP ne zahteva drage opreme, hkrati pa zagotavlja visoko specifičnost, zaradi uporabe

štiri do šest začetnih oligonukleotidov in robustnosti encima, ki je veliko bolj odporen na inhibitorje. Zaradi omenjenih razlogov, visoke robustnosti, enostavnosti in uporabnosti v kontekstu omejenih finančnih virov se LAMP pogosto uporablja kot diagnostična metoda, ki se lahko uporablja tudi na terenu (Panno in sod., 2020).



Slika 1: Prikaz začetnih oligonukleotidov (ZO) za LAMP. Položaji lokacije naleganja začetnih oligonukleotidov so označeni z ustreznimi barvami (FIP: smerni notranji ZO; F3: smerni zunanji ZO; FL: ZO zanke F-Loop; BL: ZO zanke B-Loop; B3: protismerni zunanji ZO; BIP: protismerni notranji ZO) (povzeto po Panno in sod., 2020).

Metoda LAMP je osnovana na aktivnosti *Bst* DNA polimeraze iz *Geobacillus stearothermophilus*, ki omogoča samo-pomnoževanje in izpodrivanje DNA pri stalni temperaturi (Notomi in sod., 2000). Reakcija je sestavljena iz dveh korakov: začetni korak in kombinacija cikličnega pomnoževanja s podaljševanjem oziroma recikliranjem (Mori in Notomi, 2009). Med pomnoževanjem se temperatura giblje od 60 do 65 °C, kar je optimalno za delovanje *Bst* DNA polimeraze. V začetni korak so vključeni štirje glavni začetni oligonukleotidi, dva para zunanjih (F3 in B3) in dva para notranjih (FIP in BIP) (slika 1). Slednja sta sestavljena iz dveh različnih zaporedij, ki prepoznata smerno in protismerno verigo tarčne DNA, in sta odgovorna za iniciacijo reakcije (Notomi in sod., 2000). F3 in B3 sodelujeta v koraku sinteze in izpodrivanju DNA. Za večjo občutljivost in hitrost reakcije se uporabljata še dva dodatna začetna oligonukleotida zanke (F-Loop in B-Loop) (slika 1), ki se specifično vežeta na zanke in sta del koraka elongacije. Načrtovanje LAMP začetnih oligonukleotidov je zelo zahtevno in ročno praktično nemogoče, zato so na voljo številni programi kot na primer Primer Explorer version 5. Če reakciji dodamo encim reverzno transkriptazo (navadno je to AMV oziroma »avian myeloblastosis virus«), dobimo RT-LAMP, ki nam omogoča detekcijo RNA patogenov (Panno in sod., 2020).

Med LAMP reakcijo nastane velika količina ciljne DNA in stranskega produkta. Obstajata dva osnovna načina vizualizacije rezultatov. Metode, ki temeljijo na odčitavanju rezultatov na koncu reakcije in metode, pri katerih rezultat spremljamo v realnem času. Ker je za LAMP značilna visoka občutljivost in omogoča preprosto vizualno analizo rezultatov (s prostim očesom), se v večini primerov uporabljajo metode na končni točki vizualizacije, kot so agarozna gelska elektroforeza (AGE), spremljanje spremembe barve ob uporabi barvil (kolorimetrija), spremembe motnosti zaradi uporabe ionskih indikatorjev ali interkalirajočih fluorescentnih barvil (npr. SYBR Green I). V realnem času se lahko meri motnost ali fluorescenco že med potekom reakcije, ne da bi čakali do konca procesa (Panno in sod., 2020).

V zadnjih 20 letih odkar je bila metoda LAMP razvita, so v uporabo stopile številne izboljšave in prilagoditve. Zaradi enostavnosti, zanesljivosti, občutljivosti, specifičnosti in dostopnosti preprostih inštrumentov so v zadnjih letih uporabo LAMP usmerili tudi v slabo opremljene laboratorije držav v razvoju (Panno in sod., 2020). Da bi še dodatno poenostavili metodo segrevanja za LAMP reakcijo so zasnovali grelnik, ki za svoje delovanje ne potrebuje električne energije (LaBarre in sod., 2011). Večje izboljšave LAMP metode ne temeljijo samo na uporabi v neznanstvenem kontekstu temveč tudi na raziskavah in razvoju, tako so bile v zadnjih letih razvite številne različice. Med drugimi so to: LAMP za sočasno določanje več tarč (Multiplex LAMP, mLAMP), mikro LAMP za manjše volumne vzorcev (micro LAMP, μ LAMP), digitalni LAMP, ki omogoča kvantifikacijo (digital LAMP, dLAMP), električni LAMP (electric LAMP, eLAMP), liofiliziran LAMP (lyophilized LAMP) in številni drugi (Panno in sod., 2020).

Ena izmed zelo uporabnih različic je povezava LAMP metode s hitrimi testi detekcije (lateral flow assay, LFA), ki je zelo primerna za uporabo na terenu, ker bistveno skrajša čas analize brez uporabe sofisticirane opreme. Ta test je po občutljivosti podoben detekciji z agarozno gelsko elektroforezo, vendar je hitrejši in preprostejši za uporabo. Ta metoda je osnovana na metodi hibridizacije in reakcije antigen-protiteleso. Uporabi se set štirih začetnih oligonukleotidov: dva zunanja (F3 in B3) in z biotinom/ DIG (digoksigenin)/ Tex Red/ FITC (fluorescein izotiocianat) na 5'-koncu označena FIP in BIP. Rezultat dobimo po petih minutah, kot obarvano črto na hitrem testu, ki vsebuje obarvane sintetične kroglice ali zlate nanodelce vezane na protitelesa proti biotinu/DIG/FITC. Kompleks LAMP reakcije potuje skozi vpojno blazinico na hitrem testu, dokler ne doseže testne črtice in se veže na protitelesa. Rezultati so vidni v nekaj minutah z vizualizacijo ploščice (Soliman in El-Matboulin, 2010; Rigano in sod., 2014). Ta metoda je zato zelo primerna za uporabo na terenu, saj je hitra in ne potrebuje sofisticirane opreme. Metoda kombinacije LAMP in LFA je bila razvita za določanje številnih rastlinskih virusov, za viroide pa po naših informacijah še ne (Bhat in sod., 2022).

Prednosti LAMP so v hitrosti, delovanju pri konstantni temperaturi, v robustnosti (določanje neposredno iz surovih rastlinskih izvlečkov), vizualizaciji s prostim

očesom, občutljivost in specifičnost je primerljiva z drugimi metodami pomnoževanja DNA/RNA (kot npr. PCR, RT-PCR, RT-qPCR) hkrati pa za delovanje potrebuje samo vodno kopel ali grelnik. Glavna omejitev metode LAMP je zahtevno načrtovanje začetnih oligonukleotidov, zato je razvitih zelo malo mLAMP. Pri vizualizaciji z elektroforezo obstaja velika verjetnost za kontaminacijo, ker je nastali LAMP produkt zelo stabilen in se ne razgradi zlahka, to pomeni možnost prenosa in kontaminacije. Za zmanjšanje verjetnosti za kontaminacijo je potrebno glavno mešanico LAMP reakcije pripraviti na ledu v manj kot 30 minutah (Panno in sod., 2020).

Preglednica 2: Seznam razvitih metod RT-LAMP za določanje viroidov (povzeto po Bhat in sod., 2022)

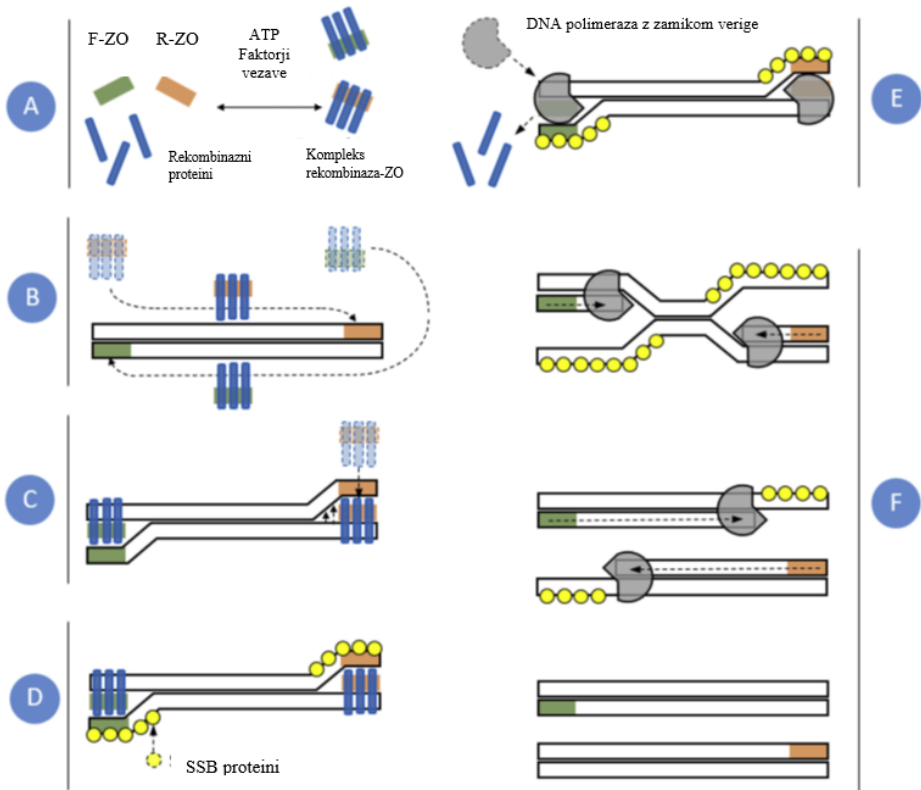
Viroid (angleško ime; rod; družina)	Gostitelj	Analiza rezultatov	Čas pomnoževanja (min)	T (°C)	Občutljivost	Reference
<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (CChMVd) (Pelamoviroid; Avsunviroidae)	krizantema	AGE, SYBR Green I	90	65	-	Park in sod., 2013
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (CSVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	krizantema	AGE	60	63	1000-krat bolj kot RT-PCR	Liu in sod., 2014
<i>Coconut cadang-cadang viroid</i> (CCCVd) (Cocadviroid; Pospiviroidae)	oljna palma	AGE	60	60	-	Thanarajoo in sod., 2014
<i>Columnnea latent viroid</i> (CLVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paradižnik	AGE, SYBR Green I	60	65	100 do 2000-krat bolj kot RT-PCR	Bhuvitarkor n in sod., 2019
<i>Peach latent mosaic viroid</i> (PLMVd) (Pelamoviroid; Avsunviroidae)	breskev, sliva, marelica, hruška, kutina	AGE	32	63	100-krat bolj kot RT-PCR	Boubourak as in sod., 2009
<i>Pepper chat fruit viroid</i> (PCFVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paprika, paradižnik	AGE, SYBR Green I, v realnem času	40	65	10-100-krat bolj kot RT-PCR	Tangkanch anapas in sod., 2018
<i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	krompir	AGE, SYBR Green I, v realnem času	20-50	65	10-krat bolj kot RT- PCR	Lenarčič in sod., 2013; Tsutsumi in sod., 2010
<i>Plum viroid I</i> (PIVd-I) (viroid like RNA)	sliva	kolorimetrično, v realnem času	60	65	enaka kot RT-PCR	Bester in Maree, 2022

Metoda RT-LAMP je bila po naših informacijah razvita za osem viroidov (preglednica 2). Med njimi so Lenarčič in sod. (2013) razvili metodo za določanje PSTVd na terenu, ki omogoča določitev v manj kot 1 uri. Pri metodi so uporabili inštrument za uporabo na terenu (Genie II), ki poleg same izvedbe testa omogoča tudi odčitavanje rezultatov v realnem času. Za metode RT-LAMP za določanje viroidov je čas detekcije skrajšan na 60 min, hkrati pa je občutljivost od 10 do 2000-krat večja kot z RT-PCR (preglednica 2). Med zadnjimi je bil razvit RT-LAMP za določanje slivovega viroida I (ang. *Plum viroid I*, PIVd-I), ki omogoča hitro detekcijo brez dolgoročne RNA izolacije (Bester in Maree, 2022). Prav tako so v omenjeni raziskavi preizkusili združevanje vzorcev, kar lahko tudi do 5-krat zmanjša stroške analize. Omenjene razvite metode RT-LAMP so hitre in specifične, hkrati pa imajo zaradi številnih hitrih testov za vizualizacijo velik potencial učinkovite detekcije viroidov in drugih patogenov kar na terenu.

3 RPA

Metoda pomnoževanja z rekombinazno polimerazo (ang. recombinase polymerase amplification, RPA) je bila razvita leta 2006 (Piepenburg in sod., 2006) in se od takrat vedno pogosteje uporablja. Razlog za uporabo na številnih diagnostičnih področjih je v ugodni ceni (~ 4,2 €/ test), preprosti uporabi, hitrosti (5–20 min) in občutljivosti (od 1 do 10 kopij tarče) (Daher in sod., 2016). RPA je zaradi minimalnih priprav vzorca, nizkih temperatur reakcije (37–42 °C) in komercialno dostopnih liofiliziranih reagentov primerna za uporabo na odročnih lokacijah in delo na terenu. Uporaba RPA je razširjena za pomnoževanje različnih tarč, ki vključujejo RNA, miRNA, ssDNA in dsDNA iz gliv, bakterij, virusov in viroidov, ki lahko okužijo živali, ljudi in rastline (Lobato in O`Sullivan, 2018).

RPA za svoje delovanje uporablja mešanico polimeraz in DNA rekombinaznih proteinov. Za razliko od koraka denaturacije pri PCR (95 °C), RPA za denaturacijo uporablja *Escherichia coli* RecA rekombinazo in protein, ki se veže na enoverižno DNA (ang. single-strand DNA binding protein, SSB). RPA reakcija se začne z vezavo rekombinaznih proteinov iz bakteriofaga T4 na začetne oligonukleotide v prisotnosti ATP (adenozin trifosfat) in faktorjev vezave (slika 2). Tvorijo kompleks rekombinaze in začetnih oligonukleotidov, ki na tarčni DNA išče homologna zaporedja. Z vezavo kompleksa na tarčno DNA se tvori struktura v obliki D-zanke, ki jo stabilizirajo SSB proteini. V naslednjem koraku se rekombinaza razstavi in pusti 3`-koncu dostopen za DNA polimerazo (iz *Staphylococcus aureus*, Sau DNA polimeraza) z aktivnostjo zamika verige, ki podaljša začetne oligonukleotide (slika 2). Eksponentno pomnoževanje je doseženo s cikličnimi ponovitvami RPA reakcije v manj kot 30 minutah (Babu in sod., 2018; Lobato in O`Sullivan, 2018; Li in sod., 2019).



Slika 2: Mehanizem delovanja RPA reakcije. Rekombinazni proteini tvorijo kompleks z vsakim začetnim oligonukleotidom (ZO; F-ZO: smerni ZO; R-ZO: protismerni ZO) (A), ki na tarčni DNA išče homologno zaporedje (B). ZO se vežejo na tarčno DNA z aktivnostjo zamika verige rekombinaze (C). SSB proteini stabilizirajo vezavo (D). Rekombinaza se nato razstavi in pusti 3`-konec prost za DNA polimerazo z zamikom verige (E), ki podaljša ZO (F). Eksponentno pomnoževanje je doseženo s cikličnimi ponovitvami reakcije (povzeto po Lobato in O`Sullivan, 2018).

Za razliko od PCR reakcij, ki za delovanje potrebujejo stroge temperaturne pogoje, RPA reakcija lahko deluje pri konstantni temperaturi okrog 37 °C, zato za svoje delovanje ne potrebuje sofisticiranih inštrumentov. Reakcija je lahko zaključena v 5 do 20 minutah, odvisno od začetne količine tarčnih zaporedij. Za pomnoževanje RNA tarč se v reakcijsko mešanico doda reverzno transkriptazo (RT-RPA) in reakcijo izvede pri 40 do 42 °C, kar omogoča določitev tarče v 20 minutah (Babu in sod., 2018). Za uspešen potek reakcije je potrebno specifično načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond, ki nimajo enakih značilnosti kot začetni oligonukleotidi za PCR. Začetni oligonukleotidi so navadno precej daljši (od 30 do 35 nukleotidov),

sonde pa so označene s fluoroforom in dušilcem med katerim je modificiran nukleotid (tetrahidrofuran (THF)/ dSpacer/ dR skupina). To je mesto kjer sondo prereže eksonukleaza (Nfo/ *E.coli*...), kar povzroči, da se fluorofor in dušilec ločita. Posledično se generira fluorescentni signal, ki ga lahko zaznamo z uporabo fluorometra (Li in sod., 2019; Bhat in sod., 2022).

Metode detekcije RPA produkta so enake kot pri LAMP metodi, in obsegajo agarozno gelsko elektroforezo (AGE), hitre teste (LFA) in v primeru detekcije v realnem času različne detektorje fluorescence (Piepenburg in sod., 2006; Lobato in O`Sullivan, 2018). V primeru uporabe agarozne gelske elektroforeze je potrebno RPA produkte pred nanosom na gel očistiti zaradi prisotnosti proteinov, ki lahko zakrijejo prisotnost produkta (Babu in sod., 2018). Z uporabo z biotinom označenih začetnih oligonukleotidov ali dNTP je možna tudi določitev RPA produkta s spremembo barve (Lobato in O`Sullivan, 2018).

Za RPA detekcijo se pogosto uporabljajo hitri testi (LFA), kar je idealno za določanje na terenu, saj lahko tako viruse in viroide določimo v 15 do 30 minutah z občutljivostjo od 1 do 10 kopij tarče (Lobato in O`Sullivan, 2018). Za določanje s hitrimi testi se navadno uporablja dva začetna oligonukleotida in sonda, ki je na 5`-koncu označena z antigensko oznako (npr. FAM) in modificirana s THF nukleotidom. Na tem mestu pride do razreza z Nfo nukleazo, kar spremeni sondo v začetni oligonukleotid. Poleg sonde mora biti na nasprotnem koncu tarče začetni oligonukleotid označen na 5`-koncu z drugo oznako (npr. biotinom). Tako nastane DNA amplikon označen z dvema oznakama, ki ga zmešamo z barvilom in nanesimo na LFA. Barvilo se veže na amplikon, ki potuje po traku in se s pomočjo protiteles veže na testno črto. Odvečno barvilo se ujame na protitelesa na kontrolni črti. Kot pozitiven rezultat dobimo obarvano testno in kontrolno črto (Lobato in O`Sullivan, 2018; Bhat in sod., 2022).

Metoda RPA v kombinaciji z LFA (RPA-LFA) je bil razvita za številne rastlinske viruse (Bhat in sod., 2022) in viroide, kot so HSVd, PSTVd in TCDVd (preglednica 3) (Hammond in Zhang, 2016; Kappagantu in sod., 2017; Ivanov in sod., 2020). Poleg omenjenih je bila RT-RPA metoda razvita tudi za ASSVd, PLMVd in TASVd viroide (preglednica 3). V omenjenih primerih so za detekcijo uporabili AGE, fluometer oziroma kombinacijo s Crispr/Cas 12a. V vseh primerih jim je uspelo viroide določiti v 5–30 minutah, kar je veliko hitreje kot pri uporabi RT-PCR. Kljub hitrejši analizi je v večini primerov občutljivost ostala primerljiva z RT-PCR, tudi v primeru uporabe hitrega testa pri TCDVd (Hammond in Zhang, 2016).

Preglednica 3: Seznam RT-RPA metod za določanje viroidov (povzeto po Bhat in sod., 2022)

Viroid (angleško ime; rod; družina)	Gostitelj	Analiza rezultatov	Čas pomnoževanja (min)	T (°C)	Občutljivost	Reference
<i>Apple scar skin viroid</i> (ASSVd) (Apscaviroid; Pospiviroidae)	jablana	AGE	10	42	10-krat bolj kot RT-PCR	Kim in sod., 2021
	jablana	Crisp/C as 12a	20	37	enaka kot RT-qPCR	Jiao in sod., 2020
<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd) (Hostuviroid; Pospoviroidae)	hmelj	LFA	20	39	manj kot RT-PCR	Kappagantu in sod., 2017
<i>Peach latent mosaic viroid</i> (PLMVd) (Pelamoviroid; Avsunviroidae)	breskev	AGE	5	42	1000-krat bolj kot RT- PCR	Lee in sod., 2020
<i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	krompir	LFA	30	39	do 10 ⁶ kopij	Ivanov in sod., 2020
<i>Tomato apical stunt viroid</i> (TASVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paradižnik	Fluoro- meter	20	39	81- kratna redčitev rastlinskega ekstrakta	Kovalskaya in Hammond, 2022
Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) (Pospiviroid; Pospiviroidae)	paradižnik	LFA	19	39	enako kot RT-PCR	Hammond in Zhang, 2016

Metoda RPA ima številne prednosti, med drugim da za razliko s PCR ni potrebe po talilni temperaturi začetnih oligonukleotidov in sond, ker le-ti niso vezani na temperaturo ampak na encime. Metoda prav tako ne potrebuje sofisticiranih termocikličnih instrumentov in je primerna za uporabo v platformah pomnoževanja nukleinskih kislin brez instrumentov (Babu in sod., 2018; Li in sod., 2019). Zato je še posebej primerna za uporabo na terenu. Dodatna prednost je tudi, da so RPA reagenti liofilizirani, zato za transport in hranjenje ni potrebno hlajenje (Babu in sod., 2018). Obstaja tudi možnost, da se RPA metoda uporabi za sočasnega določanje več tarč (multiplex RPA), kar še dodatno zmanjša stroške analize (Bhat in sod., 2022).

Z uporabo fluorescentnih sond lahko rezultate dobimo v realnem času po 5 do 15 minutah, brez nevarnosti za kontaminacijo. Prav tako prednost predstavlja direktno

določanje DNA in RNA tarč iz rastlinskih ekstraktov, brez zamudne izolacije nukleinskih kislin. Ne glede na hitrost in preprostost izvedbe RPA reakcije je občutljivost RPA in RT-RPA reakcij primerljiva PCR in RT-PCR (Babu in sod., 2018). Prednost RPA predstavlja tudi toleranca na inhibitorje, DNA iz ozadja in neujemanja (do 9 nukleotidov razlike med vezavnim mestom začetnih oligonukleotidov in sond).

Neujemanje ne predstavlja vedno prednosti, ker lahko posledično prihaja do nespecifične določitve sorodnih vrst (Li in sod., 2019). Med slabosti RPA reakcije spada detekcija z agarozno gelsko elektroforezo, ker je potrebna velika previdnost in odstranitev proteinov, kar vzame čas in predstavlja dodatne stroške. Velika težava pri RPA so aerosoli, ki ob odprtju mikrocentrifugirke s produktom predstavljajo veliko nevarnost za kontaminacijo (Babu in sod., 2018). Ne glede na omenjene slabosti metoda RPA predstavlja velik potencial za hitro in zanesljivo določanje patogenov tako v slabše opremljenih laboratorijih kot na terenu.

4 ZAKLJUČEK

Bolezni rastlin predstavljajo velike omejitve pri vzgoji kmetijskih pridelkov v vseh pridelovalnih regijah na svetu. Eden od pomembnih dejavnikov preprečevanja bolezni je zanesljiva identifikacija patogenov in razumevanje njihovih mehanizmov prenosa. Metode na osnovi določanje nukleinskih kislin so trenutno najpogosteje uporabljene diagnostične metode v rastlinski patologiji. Med njimi je zagotovo najbolj pogosto uporabljen PCR. Z razvojem izotermnih metod kot sta LAMP in RPA je določanje virusov in viroidov postalo precej enostavnejše. Omenjeni testi se lahko uporabljajo na terenu, z uporabo rastlinskih ekstraktov in brez uporabe sofisticirane opreme. Rezultati obeh testov so vidni v realnem času z uporabo prenosnih fluorometrov ali s hitrimi testi (LFA).

V prihodnosti bo potrebno usmeriti razvoj v cenovno ugodne in robustne metode, ki se bodo lahko uporabljala ne samem mestu vzorčenja. Prav tako bo potrebno razviti cenovno ugodne prenosne naprave za uporabo na terenu, hitre metode izolacije nukleinskih kislin in možnost sočasnega določanje več tarč hkrati. Z izboljšavami in prenosom tehnologije v enostavne in hkrati cenovno dostopne teste lahko izotermne metode kot sta LAMP in RPA predstavljajo revolucijo v določanju patogenov na terenu.

Zahvala. Avtorja se za finančno podporo zahvalujeta Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077).

5 LITERATURA

- Babu, Binoy, Francisco M. Ochoa-Corona, and Mathews L. Paret. 2018. "Recombinase Polymerase Amplification Applied to Plant Virus Detection and Potential Implications." *Analytical Biochemistry* 546: 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.021>.
- Bester, Rachele, and Hans J. Maree. 2022. "A Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for the Detection of Plum Viroid I (PIVd-I)." *Journal of Virological Methods* 306 (May). <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114543>.
- Bhat, Alangar I., Rashid Aman, and Magdy Mahfouz. 2022. "Onsite Detection of Plant Viruses Using Isothermal Amplification Assays." *Plant Biotechnology Journal* 20 (10): 1859–73. <https://doi.org/10.1111/pbi.13871>.
- Bhuvitarkorn, S., S. Klinkong, and K. Reanwarakorn. 2019. "Enhancing Columnea Latent Viroid Detection Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)." *International Journal of Agricultural Technology* 15 (2): 215–28.
- Boubourakas, I N, S Fukuta, and P E Kyriakopoulou. 2009. "Sensitive and Rapid Detection of Peach Latent Mosaic Viroid by the Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification." *Journal of Virological Methods* 160 (1–2): 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.021>.
- Craw P, Balachandran W. 2012. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*. 12(14):2469-2486. DOI: 10.1039/c2lc40100b. PMID: 22592150.
- Hammond, Rosemarie W., and Shulu Zhang. 2016. "Development of a Rapid Diagnostic Assay for the Detection of Tomato Chlorotic Dwarf Viroid Based on Isothermal Reverse-Transcription-Recombinase Polymerase Amplification." *Journal of Virological Methods* 236: 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.06.013>.
- Ivanov, Aleksandr V., Irina V. Shmyglya, Anatoly V. Zherdev, Boris B. Dzantiev, and Irina V. Safenkova. 2020. "The Challenge for Rapid Detection of High-Structured Circular Rna: Assay of Potato Spindle Tuber Viroid Based on Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Tests." *Plants* 9 (10): 1–11. <https://doi.org/10.3390/plants9101369>.
- Jiao, Jian, Kangkang Kong, Jinmeng Han, Shangwei Song, Tuanhui Bai, Chunhui Song, Miaomiao Wang, et al. 2020. "Field Detection of Multiple RNA Viruses/Viroids in Apple Using a CRISPR/Cas12a-Based Visual Assay." *Plant Biotechnology Journal*, 1–12. <https://doi.org/10.1111/pbi.13474>.
- Kappagantu, M, D E V Villamor, J M Bullock, and K C Eastwell. 2017. "A Rapid Isothermal Assay for the Detection of Hop Stunt Viroid in Hop Plants (*Humulus Lupulus*), and Its Application in Disease Surveys." *Journal of Virological Methods* 245: 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.002>.
- Kim, Na Kyeong, Hyo Jeong Lee, Tae Ho Ryu, In Sook Cho, Ho Jong Ju, and Rae Dong Jeong. 2021. "Detection of Apple Scar Skin Viroid by Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay." *Research in Plant Disease* 27 (2): 79–83. <https://doi.org/10.5423/RPD.2021.27.2.79>.
- Kovalskaya, Natalia, and Rosemarie W. Hammond. 2022. "Rapid Diagnostic Detection of Tomato Apical Stunt Viroid Based on Isothermal Reverse Transcription-Recombinase

- Polymerase Amplification.” *Journal of Virological Methods* 300: 114353. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114353>.
- LaBarre, Paul, Kenneth R. Hawkins, Jay Gerlach, Jared Wilmoth, Andrew Beddoe, Jered Singleton, David Boyle, and Bernhard Weigl. 2011. “A Simple, Inexpensive Device for Nucleic Acid Amplification without Electricity-toward Instrument-Free Molecular Diagnostics in Low-Resource Settings.” *PLoS ONE* 6 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019738>.
- Lee, Hyo Jeong, Hyun Ju Kim, Keumhee Lee, and Rae Dong Jeong. 2020. “Rapid Detection of Peach Latent Mosaic Viroid by Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification.” *Molecular and Cellular Probes* 53 (May): 101627. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101627>.
- Lenarcic, R, D Morisset, N Mehle, and M Ravnkar. 2013. “Fast Real-Time Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by RT-LAMP.” *Plant Pathology* 62 (5): 1147–56. <https://doi.org/10.1111/ppa.12017>.
- Li J, Macdonald J. 2015. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosens Bioelectron.* 64:196-211. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.069.
- Li, Jia, Joanne Macdonald, and Felix Von Stetten. 2019. “Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification.” *Analyst* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01621f>.
- Liu, X L, X T Zhao, I Muhammad, B B Ge, and B Hong. 2014. “Multiplex Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Simultaneous Detection of CVB and CSVd in Chrysanthemum.” *Journal of Virological Methods* 210C: 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.008>.
- Lobato, Ivan Magriñá, and Ciara K. O’Sullivan. 2018. “Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances.” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
- Lu, W X, Z X Zhang, P S Xu, S X Liu, H Q Wang, D M Jiang, and S F Li. 2012. “Simultaneous Detection of Three Viroid Species Infecting Hops in China by Multiplex RT-PCR.” *Journal of Phytopathology* 160 (6): 308–10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01898.x>.
- Mori, Yasuyoshi, and Tsugunori Notomi. 2009. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Accurate, and Cost-Effective Diagnostic Method for Infectious Diseases.” *Journal of Infection and Chemotherapy* 15 (2): 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51:263-73. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Notomi, T, H Okayama, H Masubuchi, T Yonekawa, K Watanabe, N Amino, and T Hase. 2000. “Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA.” *Nucleic Acids Research* 28 (12): E63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871386>.
- Panno, Stefano, Slavica Matić, Antonio Tiberini, Andrea Giovanni Caruso, Patrizia Bella, Livio Torta, Raffaele Stassi, and Salvatore Davino. 2020. “Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology.” *Plants* 9 (4): 1–28. <https://doi.org/10.3390/plants9040461>.
- Park, J, Y Jung, E J Kil, J Kim, D Thi Tran, S K Choi, J Y Yoon, W K Cho, and S Lee. 2013. “Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Rapid Detection of Chrysanthemum

- Chlorotic Mottle Viroid (CChMVd).” *Journal of Virological Methods* 193 (1): 232–37. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.05.016>.
- Piepenburg, Olaf, Colin H. Williams, Derek L. Stemple, and Niall A. Armes. 2006. “DNA Detection Using Recombination Proteins.” *PLoS Biology* 4 (7): 1115–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
- Rigano, Luciano A., Florencia Malamud, Ingrid G. Orce, Maria P. Filippone, Maria R. Marano, Alexandre Morais Do Amaral, Atilio P. Castagnaro, and Adrian A. Vojnov. 2014. “Rapid and Sensitive Detection of Candidatus Liberibacter Asiaticus by Loop Mediated Isothermal Amplification Combined with a Lateral Flow Dipstick.” *BMC Microbiology* 14 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-86>.
- Soliman, H. in El-Matbouli, M. 2010. “Loop mediated isothermal amplification combined with nucleic acid lateral flow strip for diagnosis of cyprinid herpes virus-3”, *Molecular and Cellular Probes*, 24: 38-43.
- Tangkanchanapas, P, M Höfte, and K De Jonghe. 2018. “Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Designed for Fast and Sensitive on-Site Detection of Pepper Chat Fruit Viroid (PCFVd).” *Journal of Virological Methods* 259: 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.003>.
- Thanarajoo, S S, L L Kong, J Kadir, W H Lau, and G Vadamalai. 2014. “Detection of Coconut Cadang-Cadang Viroid (CCCVd) in Oil Palm by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP).” *Journal of Virological Methods* 202: 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.024>.
- Tsutsumi, N, H Yanagisawa, Y Fujiwara, and T Ohara. 2010. “Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification.” *Research Bulletin Of The Plant Protection Service Japan* 46: 61–67.