

# Impiego di nuove tecniche molecolari per la diagnosi delle malattie

Sara Franco Ortega\* - Slavica Matic\* - Davide Spadaro\*\*\*

\*Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

\*\*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari DISAFA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

## Riassunto

Le perdite di produzione dovute alle malattie causate da funghi, batteri, virus e fitoplasmi rappresentano una delle più importanti sfide in agricoltura. Per ridurre i danni in campo, alla raccolta o in conservazione, è essenziale avere a disposizione tecniche diagnostiche innovative e ad elevata sensibilità. I metodi molecolari, basati sull'analisi del DNA e dell'RNA, oltre all'uso dei nanobiosensori basati sul riconoscimento di biomolecole dei microrganismi, consentono l'identificazione e la caratterizzazione degli agenti fitopatogeni in maniera precoce, sensibile, specifica, rapida e relativamente economica. La presente rassegna descrive le nuove tecniche molecolari e i nuovi sensori che stanno rivoluzionando la diagnostica in patologia vegetale.

**Parole chiave:** patogeni vegetali, tecniche immunologiche, tecniche molecolari, biosensori, next generation sequencing, diagnostica di campo.

## Summary

### *Use of new molecular techniques for plant disease diagnostics*

*Production losses due to diseases caused by fungi, bacteria, viruses and phytoplasmas are one of the most important challenges in agriculture. In order to reduce damage in the field, at harvesting or in storage, it is essential to have an innovative and highly sensitive technical functionality. Molecular methods based on DNA and RNA analysis, in addition to the use of nanobiosensors on the recognition of biomolecules of microorganisms, verify the identification and characterization of phytopathogenic agents in an early, sensitive, specific, rapid and relative way. economic. The present review illustrates the new molecular techniques and the new sensors that address the diagnostics in plant pathology.*

**Key words:** *plant pathogens, immunological techniques, molecular techniques, biosensors, next generation sequencing, field diagnostics.*

## Introduzione

Funghi, oomiceti, batteri, fitoplasmi, virus e viroidi patogeni sono agenti di malattie in una vasta gamma di piante ospiti, con importanti perdite di produzione in termini qualitativi e quantitativi. Una diagnosi specifica

e precoce degli agenti delle malattie rappresenta uno strumento essenziale per aumentare l'efficienza delle misure preventive e curative. Per realizzare questo obiettivo, sono in corso di sviluppo nuove tecniche diagnostiche molecolari che si affiancano alle tecniche tradizionali basate sull'analisi dei sintomi e della morfologia e possono sostituire quelle molecolari a minore specificità e sensibilità. Recentemente sono state sviluppate varie tecniche molecolari, sierologiche o analitiche per l'identificazione degli agenti causali delle malattie sia in laboratorio sia in campo.

I metodi tradizionali di diagnosi delle malattie solitamente iniziano con l'interpretazione visiva dei sintomi dei tessuti malati, proseguono con lo studio delle caratteristiche morfologiche dei patogeni attraverso la loro crescita su specifici terreni di coltura (se coltivabili), oppure attraverso l'osservazione al microscopio ottico ed elettronico (se non coltivabili *in vitro*). In alcuni casi, i metodi tradizionali rimangono ancora più rapidi, appropriati ed economici (Ward *et al.*, 2004). Quando i risultati della diagnosi richiedono elevata specificità e sensibilità si utilizzano tecniche molecolari basate sul rivelamento di DNA o RNA del patogeno vegetale.

I metodi basati sugli acidi nucleici permettono la diagnosi dei patogeni vegetali, inclusi quelli obbligati, in maniera rapida, precoce ed affidabile, con la possibilità di analizzare un elevato numero di campioni. Essi possono essere applicati a tutti i tessuti vegetali caratterizzati da varia sintomatologia, origine ed età, non necessitano di un elevato livello di competenza nella morfologia delle specie patogene e si possono applicare durante tutte le stagioni annuali e possono essere usati per il rilevamento contemporaneo di più microorganismi, con una concreta riduzione del costo delle analisi.

Lo sviluppo di tecniche molecolari capaci di produrre la diagnosi direttamente in campo potrebbe ridurre notevolmente il tempo necessario per prendere decisioni, evitando la trasmissione dei patogeni ad altre piante o l'introduzione in nuove aree geografiche. Inoltre, una riduzione dei tempi decisionali comporta potenzialmente una maggior efficienza delle diagnosi effettuate. In altri casi, il livello dei patogeni sono bassi e il materiale vegetale risulta asintomatico, per cui la diagnosi con tecniche molto sensibili può aiutare a ridurre la diffusione del patogeno.

In questa rassegna sono descritte le nuove tecniche analitiche sviluppate recentemente per la diagnosi di patogeni vegetali.

## Tecniche sierologiche

I primi metodi per la diagnosi del patogeno direttamente in campo sono stati concepiti negli anni 1980 per alcuni virus della patata utilizzando saggi di agglutinazione. Successivamente, sono stati sviluppati numerosi altri metodi basati sull'uso di anticorpi, tuttavia questi saggi sono poco utilizzabili in campo, soprattutto per l'utilizzo di reagenti che possono degradarsi durante i saggi di immunoassorbimento legati ad enzimi (ELISA).

I dispositivi lateral flow (LFD) sono stati sviluppati negli anni 1990 per la determinazione di alcuni virus della patata (Danks and Barker 2000) mediante l'agglutinazione di una sola banda con una più facile lettura. Alcuni LFD disegnati e commercializzati

riuscivano a rilevare la presenza del genere *Phytophthora* spp. in campo, ma erano necessarie ulteriori analisi per identificare le specie. Inoltre, la presenza di sostanze nei campioni può dare origine a falsi positivi o a falsi negativi, inibendo la reazione ed esiste un'intrinseca difficoltà a generare anticorpi, che possono avere una bassa sensibilità. Le tecniche sierologiche non possono essere utilizzate nella diagnosi dei viroidi a causa della mancata capacità immunogenica (assenza di involucro proteico – capsida). Per superare tutte le problematiche dovute ai saggi basati sull'agglutinazione e ottenere un'elevata sensibilità e specificità, i metodi basati sull'amplificazione del DNA risultano imprescindibili. Inoltre, ricerche recenti tendono a combinare le tecniche sierologiche con quelle molecolari, come nel caso della PCR-ELISA per l'identificazione simultanea di quattro tospovirus (Charoenvilaisiri *et al.*, 2014), e di LFD-LAMP per la diagnosi di *Rhizoctonia solani* (Patel *et al.*, 2015).

## Tecniche molecolari

### DNA array

Il DNA array, noto come evoluzione dell'ibridazione molecolare, può essere utilizzato per la caratterizzazione di fitopatogeni già noti. Il DNA array è basato sull'utilizzo di migliaia di sequenze di cDNA (sonde), specifiche per il fitopatogeno di interesse, immobilizzate su un supporto solido, che vengono ibridizzate con il cDNA bersaglio marcato proveniente dalle piante infette. La dimensione necessaria per la reazione di ogni sonda ha un diametro superiore ai 300 µm nel caso dei 'macroarray' o inferiore ai 300 µm nel caso dei 'microarray'. Il microarray e il macroarray sono generalmente utilizzati in studi di espressione genica, però possono essere applicati anche nella diagnostica fitopatologica e nell'identificazione di mutazioni puntiformi (Lievens *et al.*, 2006). I DNA array possono essere utilizzati per la diagnosi simultanea di più di un fitopatogeno (Boonham *et al.*, 2007; Liebe *et al.*, 2016). Il DNA array brevettato come Multiscan® è stato sviluppato dalla cooperazione di alcuni istituti di ricerca in Nord America ed Europa (<http://www.dnamultiscan.com/>) e permette la rilevazione simultanea di oltre 100 patogeni vegetali (funghi e batteri). Recentemente, è stata riportata la possibilità di identificare otto generi di virus (Zhang *et al.*, 2013), e la simultanea identificazione di un batterio, un virus ed un viroide in pomodoro infetto, mediante ibridazione molecolare con sonde (Zamora-Macorra *et al.*, 2017).

### Metodiche basate sulla PCR

La PCR rappresenta un metodo essenziale nella diagnostica molecolare dei patogeni vegetali. La PCR consiste nell'amplificazione enzimatica esponenziale di una regione specifica del genoma del patogeno innescando la reazione attraverso due brevi sequenze oligonucleotidiche (primer). La porzione genomica selezionata con i due primer viene amplificata in quantità tali da poter ottenere un amplificato visibile su gel d'agarosio. La PCR tradizionale è esclusivamente qualitativa e permette l'identificazione e la caratterizzazione di fitopatogeni senza necessità del loro isolamento. Questa tecnica ha contribuito alla riduzione di alcuni problemi nella diagnosi in patologia vegetale

(Martin *et al.*, 2000). Le tecniche basate sulla PCR sono state ampiamente descritte in precedenti pubblicazioni (Martin *et al.*, 2000; Vincelli e Tisserat, 2008; Martinelli *et al.*, 2015), per cui nella presente rassegna saranno descritte soltanto nuove tecniche ad elevata sensibilità molecolari, come la real-time PCR, la droplet digital PCR, e la LAMP, o biosensoristiche, mediante impiego di nanotecnologie.

### Real-time PCR

La PCR quantitativa 'in tempo reale' (qPCR) consente l'identificazione e la quantificazione accurata di patogeni vegetali che non possono essere coltivati o estratti facilmente dal tessuto ospite o sono presenti in bassa qualità in essi. In effetti, la quantificazione dei batteri e dei funghi basata su tecniche di coltura è considerata meno sensibile e più variabile, mentre la quantificazione utilizzando la qPCR presenta maggior specificità, affidabilità e velocità (Li *et al.*, 2008; Palacio-Bielsa *et al.*, 2011).

I prodotti di PCR possono essere monitorati mediante coloranti intercalanti del DNA come SYBRGreen ad alta affinità con il DNA a doppio filamento o sonde TaqMan con sequenze oligonucleotidiche specifiche marcate con un fluoroforo. La curva di calibrazione della PCR in tempo reale è basata su diluizioni seriali del DNA bersaglio (Capote *et al.*, 2012). Questa tecnica permette un'elevata efficienza utilizzando sistemi automatizzati basati su micropiastre che possono analizzare da 48 a 384 campioni contemporaneamente.

Diverse qPCR sono state sviluppate nella diagnosi singola o multipla dei patogeni vegetali, inclusi quelli economicamente importanti e anche quelli di quarantena come per esempio *Synchytrium endobioticum*, *Xylella fastidiosa*, Citrus Tristeza Virus, Plum Pox Virus, e *Ca. Phytoplasma vitis* (Schaad e Frederick, 2002; Schnider *et al.*, 2004; Boonham *et al.*, 2004; Hren *et al.*, 2007; Saponari *et al.*, 2008; van Gent-Pelzer *et al.*, 2009; Harper *et al.*, 2010; Mirmajlessi *et al.*, 2015).

### Digital PCR

Recentemente sono state sviluppate diverse piattaforme digitali di PCR (dPCR), basate, come la PCR o la qPCR, sull'amplificazione specifica dell'acido nucleico bersaglio. La peculiarità della dPCR consiste nella separazione della miscela di reazione in migliaia o milioni di partizioni, seguita da una rilevazione in tempo reale o end-point dell'amplificazione. La distribuzione delle sequenze bersaglio nelle partizioni è definita dalla distribuzione di Poisson e permette in questo modo una quantificazione accurata e assoluta del DNA bersaglio. In questo modo non è necessario utilizzare materiali di riferimento con le concentrazioni di bersaglio note. In alcuni casi, la tecnica può raggiungere livelli di sensibilità più elevati rispetto alla qPCR. La tecnica è stata ottimizzata nella diagnosi del Pepper mild mottle virus (Rački *et al.*, 2014), *Erwinia amylovora* (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015), *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Zhao *et al.*, 2016) e *Spiroplasma citri* (Maheshwari *et al.*, 2017).

### LAMP

La LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

inizialmente messa a punto nel 2000 da Notomi e collaboratori è stata sviluppata a partire da tecniche basate sull'amplificazione isoterma come la *Nucleic acid sequence based amplification* (NASBA), e la tecnica *self-sustained sequence replication* (3SR) che utilizzano la reazione della transcriptasi inversa per eliminare il passaggio di riscaldamento della PCR, mentre la *strand displacement amplification* (SDA) utilizza oligonucleotidi modificati assieme a digestione enzimatica in condizione isoterma.

Tuttavia queste tecniche presentano problemi di sensibilità e di costo dei reagenti, mentre la tecnica LAMP permette la realizzazione di diagnosi di routine in laboratorio con reagenti più economici e un'elevata sensibilità paragonabile ad una real time PCR. Per la LAMP si utilizza una polimerasi con alta capacità di *strand displacement* del DNA (polimerasi Bst) con temperatura ottimale a 65°C e 6 primer: due esterni (F3 e B3), due interni (FIP e BIP) e due loop (loopF e loopB) che sono facoltativi ma permettono di incrementare la sensibilità della tecnica (Notomi *et al.*, 2000) *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP).

I due primer interni sono essenziali per il normale svolgimento della reazione LAMP e la loro progettazione deve essere ottimale. I primer esterni partecipano ai primi cicli della reazione, mentre i primer loop accelerano la reazione e sono aggiunti in minore concentrazione. I prodotti finali sono una miscela di strutture a forma di cavolfiore e prodotti di diversa lunghezza a forma di uncino.

La specificità della tecnica LAMP è potenzialmente maggiore rispetto ad altre tecniche molecolari per il riconoscimento di 8 regioni nel genoma, invece delle due utilizzate per disegnare i primer per PCR, mentre che la sensibilità è paragonabile alla Real Time potendo amplificare picogrammi o anche femtogrammi di DNA, a seconda del saggio (Tomlinson *et al.*, 2007).

È possibile determinare la quantità di DNA amplificato mediante visualizzazione su gel di agarosio, impiego di reagenti colorimetrici o fluorescenti, mediante misurazione della torbidità dovuta all'elevata concentrazione di pirofosfato di magnesio, prodotto bianco insolubile derivante dall'amplificazione del DNA. Nel caso della visualizzazione su gel di agarosio, il risultato è caratterizzato da una strisciata a causa del gran numero di sottoprodotti a struttura secondaria complessa. Relativamente ai reagenti colorimetrici, diversi prodotti sono stati utilizzati come il blu di idrossinaftolo (HNB), che causa un cambiamento colorimetrico dal viola al blu. L'aggiunta di calceina e  $MnCl_2$  produce invece un cambiamento dall'arancione al verde dopo l'amplificazione. Un saggio LAMP sviluppato per *Sclerotinia sclerotiorum* su colza, utilizzando HNB, determina dopo 45 minuti un limite di 0,1 fg di DNA per microlitro, inferiore al limite di rilevamento ottenuto con la PCR convenzionale (Duan *et al.*, 2014). È stata inoltre considerata l'aggiunta di intercalanti del DNA come SYBR o PicoGreen, che produce un cambiamento di colore visibile (Tomlinson *et al.*, 2010) *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP).

Queste procedure dipendono molto dal personale tecnico e la risposta non è sempre chiara specialmente quando ci si avvicina al limite di rilevamento della tecnica. Inoltre,

l'impiego di reagenti comporta l'apertura dei tubi di reazione, operazione che può introdurre contaminazioni di DNA nel laboratorio. L'utilizzo di strumentazione portatile a batteria, sviluppato da Optigene, permette di trasferire la LAMP dal laboratorio al campo senza la necessità di utilizzare centrifughe, pipette, blocco termico, termociclatori e senza aprire i tubi dopo l'amplificazione. Optigene ha sviluppato due strumenti, Genie II e Genie III, che misurano l'amplificazione in tempo reale mediante una curva di fluorescenza che proviene dalla miscela di reazione utilizzata, e risultano di semplice e facile impiego, con l'ottenimento del risultato in 5-30 minuti a seconda del saggio.

Per la diagnostica di campo, il maggior problema è rappresentato dal numero limitato di strumenti disponibili: PCR e qPCR non possono essere realizzate per la mancanza di corrente elettrica. Anche l'estrazione del DNA diventa problematica nel passaggio dal laboratorio al campo. Per evitare questo problema, sono stati sviluppati diversi protocolli di estrazione semplificati. L'elevata resilienza nei confronti di inibitori della reazione, caratteristica della LAMP, permette di utilizzare l'estrazione del DNA da crudo, mediante un tampone molto alcalino ed una rottura meccanica delle cellule con un'agitazione da uno a tre minuti in un tubo da 5 ml contenente una biglia di tungsteno (Tomlinson *et al.*, 2010) *or conventional DNA extraction followed by TaqMan real-time PCR*. L'estrazione da crudo viene accompagnata sempre da un saggio LAMP in parallelo per determinare la presenza di DNA vegetale, come nel caso del saggio LAMP disegnato sul marcatore molecolare citocromo ossidasi I (COX) (Tomlinson *et al.*, 2010) *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP).

La LAMP può essere utilizzata per determinare *formae speciales* e razze fisiologiche in un complesso di specie come *Fusarium oxysporum*, sfruttando polimorfismi per singolo nucleotide (SNP) per disegnare i primer interni. Ayukawa *et al.* (2017) ha utilizzato una sonda (QProbe) universale con una citosina marcata con un fluoroforo, simile alla reazione TaqMan, che permette di determinare mediante il trasferimento di un elettrone dal fluoroforo alla guanina utilizzata nella regione bersaglio per disegnare il primer interno. Questa metodologia permette potenzialmente di determinare la presenza di SNP analizzando la curva di melting. Ayukawa *et al.* (2017) hanno sfruttato una sonda QProbe universale assieme al sistema LAMP per determinare SNP in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 3 differenziandolo dalle altre due razze. Un'ulteriore applicazione potrebbe essere il rilevamento di ceppi fungini resistenti a fungicidi: Duan *et al.* (2015) hanno sfruttato una mutazione per singolo nucleotide per rilevare ceppi di *Fusarium graminearum* resistenti a carbendazim, utilizzando HNB per il rilevamento delle reazioni di LAMP positive.

### Biosensori

Sono stati sviluppati sensori per l'identificazione dei patogeni vegetali. I microrganismi possono essere identificati utilizzando un sensore basato su segnali chimici, elettrici, elettrochimici, magnetici, e ottici. Il limite di rilevamento può essere incrementato impiegando matrici nanomateriali come trasduttori e la specificità può essere

migliorata mediante l'uso di elementi di riconoscimento biologico come DNA, anticorpi o enzimi (Fang e Ramasamy, 2015). L'immobilizzazione dell'elemento di riconoscimento biologico, come il DNA, può essere ottenuta utilizzando vari approcci, tra cui l'adsorbimento della biomolecola, l'incapsulamento, il legame covalente o le loro combinazioni. Le nanoparticelle fluorescenti di silice (ca. 50 nm) sono state utilizzate in combinazione con anticorpi per la diagnosi di *Xanthomonas axonopodis*, batterio patogeno sulle solanacee (Yao *et al.*, 2009). Immunosensori basati su nanoparticelle d'oro sono stati sviluppati per l'identificazione di *Tilletia indica*, patogeno da quarantena del grano usando la risonanza plasmonica di superficie (Singh *et al.*, 2010), mentre i virus del riso Rice Tungro Bacilliform Virus e Rice Tungro Spherical Virus sono stati rilevati impiegando elettrodi di carbonio (Uda *et al.*, 2014). Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi articoli che hanno applicato nanotecnologie per l'identificazione di vari patogeni vegetali, tra cui *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* (Rad *et al.*, 2012), *Cucumber mosaic virus* (James, 2013), *Aspergillus niger* (Etefagh *et al.*, 2013), *Ganoderma boninense* (Bakhori *et al.*, 2013) e *Phytophthora* spp. (Schwenkbier *et al.*, 2015).

### Sequenziamento di nuova generazione

Il Next Generation Sequencing (NGS) nato come tecnica di sequenziamento ad alto rendimento è stato ben presto utilizzato anche per la diagnostica. A differenza della tecnica di sequenziamento Sanger, le piattaforme NGS permettono il sequenziamento di milioni di piccoli frammenti di DNA o di RNA, generando genomi o trascrittomi completi in pochi giorni. Il costo di questo tipo di sequenziamento si è notevolmente ridotto dall'inizio.

L'impiego di NGS ha permesso un incremento sbalorditivo della disponibilità di genomi sequenziati e caratterizzati, che permette di disegnare nuovi saggi molecolari su regioni specie-specifiche. La genomica comparativa può servire come metodologia per scoprire nuove regioni, anche non codificanti, utili per disegnare nuovi test diagnostici, specialmente tra specie o *formae speciales* molto vicine filogeneticamente.

Le tecnologie NGS sono stati ampiamente utilizzate per la diagnosi di fitovirus aprendo le porte alla scoperta di nuove popolazioni di virus presenti in diversi campioni essendo l'unico strumento che permette di effettuare filogenesi su tutta la popolazione virale presente in un tessuto vegetale (Boonham *et al.*, 2014).

Attualmente l'utilizzo di diversi marcatori molecolari (multilocus sequencing analysis, MLSA) è molto diffuso per la caratterizzazione o l'identificazione di diversi patogeni, soprattutto quando un solo marcatore molecolare non permette l'identificazione fino al livello della specie. L'utilizzo di piattaforme di NGS potrebbe sostituire le analisi MLSA, permettendo la caratterizzazione mediante tutta l'informazione contenuta nel genoma, anziché con un numero definito di sequenze geniche (Ma *et al.*, 2010; Adhikari *et al.*, 2013). Il progetto "The 1000 Fungal Genomes" (<http://1000.fungalgenomes.org/>), finanziato dal Department of Energy degli Stati Uniti d'America, è nato con l'obiettivo di ottenere il genoma di 1000 specie fungine appartenenti ad oltre 500 famiglie.

Questo progetto permette di realizzare studi di genomica comparativa, per scoprire nuovi geni di interesse per la diagnostica, per incrementare le conoscenze sui geni coinvolti nei meccanismi di patogenicità e sui geni che conferiscono resistenza a diversi fungicidi (Guo *et al.*, 2014).

### Conclusioni

Nuove tecniche molecolari sono state sviluppate, ottimizzate e validate negli ultimi anni con diverse applicazioni alla patologia vegetale. La combinazione di tecniche tradizionali e molecolari per la diagnosi di patogeni vegetali permette di caratterizzare, rilevare, identificare e quantificare i diversi patogeni vegetali. Il limite di rilevamento dei patogeni vegetali, confrontando varie tecniche molecolari, può raggiungere le seguenti quantità del DNA di interesse: nanogrammi nel caso della PCR, picogrammi nel caso dei biosensori, e femtogrammi nel caso di real-time PCR e digital PCR. D'altra parte, l'utilizzo di tecniche di campo, come la LAMP, e di piattaforme portatili si è rilevato una strategia utile per una migliore gestione delle malattie. Infine, le tecnologie NGS hanno permesso la scoperta di nuove popolazioni virali e di nuovi marcatori molecolari utili per la diagnostica molecolare.

### Ringraziamenti

Lavoro svolto nell'ambito del programma Horizon 2020 UE, No 634179 "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species - Integrated Solutions" (EMPHASIS).

### Lavori citati

ADHIKARI B. N., HAMILTON J. P., ZERILLO M. M., TISSERAT N., LÉVESQUE C. A., BUELL C. R. (2013) – Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes – *PLoS One*, 8, e75072.

BAKHORI N. M., YUSOF N. A., ABDULLAH A. H., HUSSEIN M. Z. (2013) – Development of a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based DNA biosensor for detection of synthetic oligonucleotide of *Ganoderma boninense* – *Biosensors*, 3,419–428.

BOONHAM N., PÉREZ L. G., MENDEZ M. S., PERALTA E. L., BLOCKLEY A., WALSH K., BARKER I., MUMFORD R. A. (2004) – Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid – *J Virol Methods*, 116, 139–146.

BOONHAM N., TOMLINSON J., MUMFORD R. (2007) – Microarrays for rapid identification of plant viruses – *Annu Rev Phytopathol.* 45,307–328.

BOONHAM N., KREUZE J., WINTER S., VAN DER VLUGT R., BERGERVOET J., TOMLINSON J., MUMFORD R. (2014) – Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing – *Virus Res.* 24, 186, 20–31.

CHAROENVILAISIRI S., SEEPIBAN C., BHUNCHOTH A., WARIN N., LUXANANIL P., GAJANANDANA O. (2014) – Development of a multiplex RT-PCR-ELISA to identify four distinct species of tospovirus – *J Virol Methods*, 202, 54–63.

CAPOTE N., PASTRANA A. M., AGUADO A., SÁNCHEZ-TORRES P. (2012) – Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance, Plant Pathology, Dr. Christian Joseph Cumagun (Ed.), InTech, 151-202.

- DANKS C., BARKER I. (2000) – On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *EPP0 Bull*, 30, 421–426.
- DUAN Y., GE C., ZHANG X., WANG J., ZHOU M. (2014) – A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – *Plant Pathology*, 43, 61–66.
- DUAN Y., ZHANG X., GE C., WANG Y., CAO J., JIA X., WANG J., ZHOU M. G. (2015) – Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum* – *Scientific Reports*, 4, 7094.
- FANG Y., RAMASAMY R. P. (2015) – Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection – *Biosensors* 4, 537–561.
- GUO L., HAN L., YANG L., ZENG H., FAN D., ZHU Y., FENG Y., WANG G., PENG C., JIANG X., ZHOU D., NI P., LIANG C., LIU L., WANG J., MAO C., FANG X., PENG M., HUANG J. (2014) – Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease – *PLoS One*, 9 (4), e95543.
- GUTIÉRREZ-AGUIRRE I., RAČKI N., DREO T., RAVNIKAR M. (2015) – Droplet digital PCR for absolute quantification of pathogens – *Methods Mol Biol*. 1302, 331–347.
- HARPER S. J., WARD L. I., CLOVER G. R. (2010) – Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications – *Phytopathology*, 100, 1282–1288.
- HREN M., BOBEN J., ROTTER A., KRALJ P., GRUDEN K., RAVNIKAR M. (2007) – Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics – *Plant Pathology*, 56, 785–796.
- JAMES C. (2013) – Polypyrrole nanoribbon based chemiresistive immunosensors for viral plant pathogen detection – *Anal Methods*, 5, 3497–3502.
- LI S., HARTMAN G. L., DOMIER L. L., BOYKIN D. (2008) – Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR – *Theor Appl Genet.*, 117, 343–52.
- LIEBE S., CHRIST D. S., EHRLICH R., VARRELMANN M. (2016) – Development of a DNA Microarray-Based Assay for the Detection of Sugar Beet Root Rot Pathogens – *Phytopathology* 106, 76–86.
- LIEVENS B., CLAES L., VANACHTER A. C., CAMMUE B. P., THOMMA B. P. (2006) – Detecting single nucleotide polymorphisms using DNA arrays for plant pathogen diagnosis – *FEMS Microbiol Lett.*, 255, 129–39.
- MAHESHWARI Y., SELVARAJ V., HAJERI S., YOKOMI R. (2017) – Application of droplet digital PCR for quantitative detection of *Spiroplasma citri* in comparison with real time PCR – *PLoS One*, 12, e0184751.
- MARTIN R. R., JAMES D., LEVESQUE C. A. (2000) – Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management – *Annual Review of Phytopathology*, 38, 207–239.
- MARTINELLI F., SCALENGHE R., DAVINO S., PANNO S., SCUDERI G., RUISI P., VILLA P., STROPPIANA D., BOSCHETTI M., GOULART L. R., DAVIS C. E., DANDEKAR A. M. (2015) – Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 35, 1–25.
- MIRMAJLESSI S. M., LOIT E., MÄND M., MANSOURIPOUR S. M. (2015) – Real-Time PCR Applied to Study on Plant Pathogens: Potential Applications in Diagnosis – a Review – *Plant Protect. Sci.* 51, 4, 177–190.
- NOTOMI T., OKAYAMA H., MASUBUCHI H., YONEKAWA T., WATANABE K., AMINO N., HASE T. (2000) – Loop-mediated isothermal amplification of DNA – *Nucleic Acids Research*, 28, E63.
- PALACIO-BIELSA A., CUBERO J., CAMBRA M. A., COLLADOS R., BERRUETE I. M., LÓPEZ M. M. (2011) – Development of an Efficient Real-Time Quantitative PCR Protocol for Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* Species – *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 89–97.
- PATEL J. S., BRENNAN M. S., KHAN A., ALI G. S. (2015) – Implementation of loop-mediated isothermal amplification methods in lateral flow devices for the detection of *Rhizoctonia solani* – *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37, 118–129.
- RAČKI N., DREO T., GUTIERREZ-AGUIRRE I., BLEJEC A., RAVNIKAR M. (2014) – Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples – *Plant Methods*, 10, 42.
- RAD F., MOHSENI FAR A., TABATABAEI M., SAFARNEJAD M. R., SHAHRYARI F., SAFARPOUR H., FOROUTAN A., MARDI M., DAVOUDI D., FOTOKIAN M. (2012) – Detection of Candidatus *Phytoplasma aurantifolia* with a quantum dots FRET-based biosensor – *J Plant Pathol*, 94, 525–534.
- SAPONARI M., MANJUNATH K., YOKOMI R. K. (2008) – Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan) – *J Virol Methods.*, 147, 43–53.
- SCHAAD N. W., FREDERICK R. D. (2002) – Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics – *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 250–258.
- SCHNEIDER W. L., SHERMAN D. J., STONE A. L., DAMSTEEGT V. D., FREDERICK R. D. (2004) – Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR – *J Virol Methods.*, 120, 97–105.
- SCHWENKBIER L., POLLOK S., KÖNIG S., URBAN M., WERRES S., CIALLA-MAY D., WEBER K., JÜRGEN P. (2015) – Towards on-site testing of *Phytophthora* species – *Anal Methods*, 7, 211–217.
- SINGH S., SINGH M., AGRAWAL V. V., KUMAR A. (2010) – An attempt to develop surface plasmon resonance based immunosensor for Karnal bunt (*Tilletia indica*) diagnosis based on the experience of nano-gold based lateral flow immuno-dipstick test – *Thin Solid Films*, 519, 1156–1159.
- TOMLINSON J. A., BARKER I., BOONHAM N. (2007) – Faster, simpler, more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field – *Applied Environmental Microbiology*, 73, 4040–4047.
- TOMLINSON J. A., DICKINSON M., HOBDEN E., ROBINSON S., GILTRAP P. M., BOONHAM N. (2010) – A five-minute DNA extraction method for expedited detection of *Phytophthora ramorum* following prescreening using *Phytophthora* spp. lateral flow devices – *Journal of Microbiological Methods*, 81, 116–120.
- TOMLINSON J. A., DICKINSON M. J., BOONHAM N. (2010) – Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by Two-Minute DNA Extraction Followed

- by Isothermal Amplification and Amplicon Detection by Generic Lateral Flow Device – *Phytopathology*, 100, 143–149.
- UDA M. N. A., ADAM T., HASFALINA C. M., FARIDAH S., ZAMRI I., HASHIM U., ARIFFIN S. A. B. (2014) – Reviewed Immunosensor Format Using Nanomaterial for Tungro Virus Detection – *Advanced Materials Research*, 832, 410–414.
- VAN GENT-PELZER M. P. E., KRIJGER M., BONANTS P. J. M. (2010) – Improved real-time PCR assay for detection of the quarantine potato pathogen, *Synchytrium endobioticum*, in zonal centrifuge extracts from soil and in plants. *Eur J Plant Pathol* 126, 129-133.
- VINCELLI P., TISSERAT N. (2008) – Nucleic Acid-Based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology – *Plant Disease*, 92, 660–669.
- WARD E., FOSTER S. J., FRAAIJE B. A., MCCARTNEY H. A. (2004) – Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches – *Annals of Applied Biology*, 145, 1–16.
- YAO K. S., LI S. J., TZENG K. C., CHENG T. C., CHANG C. Y., CHIU C. Y., LIAO C. Y., HSU J. J., LIN Z. P. (2009) – Fluorescence silica nanoprobe as a biomarker for rapid detection of plant pathogens – *Adv. Mater. Res*, 79, 513–516.
- ZAMORA-MACORRA E. J., OCHOA-MARTÍNEZ D. L., VALDOVINOS-PONCE G., ROJAS-MARTÍNEZ R., RAMÍREZ-ROJAS S., SÁNCHEZ-NAVARRO J. A., PALLÁS V., APARICIO F. (2015) – Simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pepino mosaic virus* and *Mexican papita viroid* by non-radioactive molecular hybridization using a unique polyprobe – *Eur J Plant Pathol*. 143, 779–787.
- ZHAO Y., XIA Q., YIN Y., WANG Z. (2016) – Comparison of Droplet Digital PCR and Quantitative PCR Assays for Quantitative Detection of *Xanthomonas citri* Subsp. *citri* – *PLoS One*, 11, e0159004.
- ZHANG Y., YIN J., JIANG D., XIN Y., DING F., DENG Z., WANG G., MA X., LI F., LI G., LI M., LI S., ZHU S. (2013) – A Universal Oligonucleotide Microarray with a Minimal Number of Probes for the Detection and Identification of Viroids at the Genus Level – *PLoS ONE*, 8, e64474.