

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade**



**Tese**

**Amplificação isotérmica mediada por Loop: Uma técnica rápida e eficiente para a detecção de *Trialeurodes vaporariorum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja.**

**Carolina Garcia Neves**

**Pelotas, 2021**

**CAROLINA GARCIA NEVES**

**Amplificação isotérmica mediada por Loop: Uma técnica rápida e eficiente para a detecção de *Trialeourodos vaporariorum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia)

Orientador (a): Profa. Dra Danielle Ribeiro de Barros

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

N511 Neves, Carolina Garcia

Amplificação isotérmica mediada por Loop: Uma técnica rápida e eficiente para a detecção de *Trialeourodos vaporariorum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja / Carolina Garcia Neves ; Danielle Ribeiro de Barros, orientadora. — Pelotas, 2021.

79 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Mosca branca. 2. Mudança de cor. 3. Mofo branco. 4. Diagnose. I. Barros, Danielle Ribeiro de, orient. II. Título.

CDD : 633.34

**Banca examinadora:**

---

Profª Dra. Danielle Ribeiro de Barros (Orientadora)  
Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

---

Dr. Ismail Teodoro de Souza Júnior  
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profª. Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias  
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

---

Dra. Gloria Patricia Castillo Urquiza  
Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

---

Dr. César Bauer Gomes  
Doutor em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

## **Agradecimentos**

A Deus pela vida.

Aos meus pais, Victorugo e Rosaura por todo o esforço, apoio e amor. Por serem os maiores incentivadores da minha vida e dos meus estudos. Obrigada por tudo, vocês são meu alicerce!

Aos meus irmãos, Rosália e Victor, pela amizade, lealdade e companheirismo.

Ao meu namorado, amigo e colega Anderson Brunetto por todo o amor, carinho e apoio nesses anos. Obrigada por estar presente na minha vida!

À minha orientadora Danielle Barros, pela confiança e amizade. Obrigada por todos os ensinamentos e por acreditar em mim!

Ao laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas. Obrigada a todos que passaram e compartilharam dessa vitória.

À professora Renate Krause Sakate da Universidade Estadual de São Paulo Júlio Mesquita pelo fornecimento das moscas brancas para a realização do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitossanidade pela oportunidade em realizar o doutorado. Obrigada a todos os professores pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os amigos que de alguma forma me ajudaram nessa conquista.

*“Um livro, uma caneta, uma criança e um professor podem mudar o mundo.”*

*Malala Yousafzai*

## Resumo

NEVES, Carolina Garcia. **Amplificação isotérmica mediada por Loop: Uma técnica rápida e eficiente para a detecção de *Trialeurodes vaporariorum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja.** 2021. 79f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

A demanda por alimentos está cada vez maior devido às grandes transformações que o mundo vem passando. O Brasil é destaque na produção e exportação de alimentos e a cada ano que passa a produção de grãos vem batendo recorde. Porém, as perdas causadas por doenças e pragas são um grande limitante da produtividade e, para evitar estes prejuízos, precisamos realizar o controle de forma rápida e eficiente. O primeiro passo para o sucesso no controle de doenças é a detecção da praga/patógeno na área de cultivo e essa deve ser precoce e correta. A amplificação isotérmica mediada por loop é uma técnica molecular que vem sendo utilizada em diversos campos biológicos. Não necessita de equipamentos sofisticados para sua aplicação e por isso pode ser empregada no campo ou em laboratório. Além disso, a visualização dos resultados pode ser feita diretamente a olho nu através da mudança de cor da reação. Nesse estudo utilizamos a técnica para realizar a rápida identificação da mosca branca *Trialeurodes vaporariorum*, com ou sem extração de DNA. Nosso resultado demonstrou que para a identificação são necessários apenas 60 minutos de incubação, sendo dispensável a etapa de extração de DNA. Também, foi desenvolvido um teste LAMP para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. Nesse estudo, nossos resultados demonstram que com um potencial de inóculo de 48 horas, é possível detectar o patógeno quando apenas 1% das sementes de soja estão infectadas com o fungo. Ambos os trabalhos fornecem resultados valiosos para as áreas de entomologia e fitopatologia. E demonstram a versatilidade da técnica que pode ser aplicada com diferentes materiais biológicos.

**Palavras-chave:** mosca branca, mofo branco, diagnose, mudança de cor.

## Abstract

NEVES, Carolina Garcia. **Loop-mediated isothermal amplification: A fast and efficient technique for the detection of *Trialeurodes vaporariorum* and *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds.** 2021. 79f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

The demand for food is increasing due to the great changes that the world has been going through. Brazil stands out in the production and export of food and with each passing year the production of grains has been breaking a record. However, losses caused by diseases and pests are a major limitation of productivity and, to avoid these losses, we need to carry out the control quickly and efficiently. The first step towards successful control is the detection of the pest / pathogen in the cultivation area and this must be early and correct. Loop-mediated isothermal amplification is a molecular technique that has been used in several biological fields. It does not need sophisticated equipment for its application and therefore it can be used in the field or in the laboratory. In addition, the results can be visualized directly with the naked eye by changing the color of the reaction. In this study, we used the technique to quickly identify the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*, with or without DNA extraction. Our result showed that for the identification, only 60 minutes of incubation are necessary, and the DNA extraction step is unnecessary. Also, a LAMP test was developed to detect *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds. In this study, our results demonstrate that with a 48-hour inoculum potential, it is possible to detect the pathogen when only 1% of soybean seeds are infected with the fungus. Both works provide valuable results for the areas of entomology and phytopathology. And they demonstrate the versatility of the technique that can be applied with different biological materials.

**Keywords:** whitefly, white mold, diagnosis, change color



## Lista de figuras

- Figura 1.** Localização dos primers LAMP na sequência alvo. F3 e B3 são os primers externos. F2 e F1c formam o primer FIP. B2 e B1c foram o primer BIP. FL e BL representam os primers loop..... 18
- Figura 2.** Ilustração das etapas não cíclica e cíclica da reação LAMP.. 19
- Figura 3.** Número de publicações listadas na PubMed (status de 2020), pesquisa refinada para aparência no título das palavras: a) LAMP; plant pathogen; b) LAMP; plant fungus; detection; c) LAMP; plant virus; detection; d) LAMP; plant bacteria; detection; e) LAMP; phytoplasma; detection; f) LAMP; plant nematodes; detection..... 21
- Figura 4.** Resultados da otimização do teste LAMP. a) Otimização LAMP; b) Especificidade dos primers; c) Sensibilidade..... 57
- Figura 5.** Resultados do teste LAMP com ou sem extração de DNA. a) Aplicação do teste LAMP sem extração de DNA; b) Aplicação do teste LAMP com diferentes métodos de extração de DNA e sem extração de DNA..... 58
- Figura 6.** Validação do teste LAMP sem extração de DNA nas amostras coletadas em diferentes locais do Rio Grande do Sul. a) Boa Vista do Sul; b) canguçu; c) São Marcos; d) Feliz; e) Lajeado..... 59
- Figura 7.** Resultados da otimização do teste LAMP utilizando DNA micelial. a) Tempo de incubação; b) Especificidade dos primers; c) Sensibilidade do teste..... 70
- Figura 8.** Resultados da aplicação do teste LAMP em sementes de soja. a) Tempo de incubação; b) Detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja artificialmente infectadas..... 72

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de vírus.....	22
<b>Tabela 2.</b>	Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de fungos.....	27
<b>Tabela 3.</b>	Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de bactérias.....	30
<b>Tabela 4.</b>	Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de fitoplasmas.....	32
<b>Tabela 5.</b>	Teste LAMP desenvolvido para a detecção de diferentes espécies de nematoides.....	33
<b>Tabela 6.</b>	Informação das sequências do conjunto de primers LAMP usados para amplificação da sequência alvo do gene mtCOI de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> .....	54
<b>Tabela 7.</b>	Local de coleta, coordenadas e planta hospedeira dos indivíduos de mosca-branca coletados.....	56
<b>Tabela 8.</b>	Comparação entre os métodos utilizados na extração de DNA e sem extração de DNA para aplicação do teste LAMP na identificação de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> .....	58
<b>Tabela 9.</b>	Sequências dos primers LAMP utilizados para amplificação de uma porção do gene do fator de elongação 1-alfa (EF1-alpha) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	67
<b>Tabela 10.</b>	Resultado do teste LAMP aplicado em sementes de soja artificialmente infectadas em diferentes níveis de incidência (%) para detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	71

## Sumário

<b>Introdução geral</b> .....	11
<b>Artigo 1.</b> Detecção de patógenos de plantas usando a amplificação isotérmica mediada por loop.....	15
<b>Artigo 2.</b> Rapid identification of <i>Trialeurodes vaporariorum</i> by loop-mediated isothermal amplification with or without DNA extraction.....	52
<b>Artigo 3.</b> Desenvolvimento de um teste LAMP para detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja.....	64
<b>Considerações finais</b> .....	77
<b>Referências bibliográficas</b> .....	78

## Introdução geral

As projeções indicam que em 2050 a população mundial será de 10 bilhões de habitantes (ONU, 2019), o que torna a demanda por alimentos cada vez maior. Com a transformação que o mundo vem passando, a segurança alimentar está ameaçada e precisamos trabalhar para alimentar o mundo.

O Brasil é conhecido por ser um grande produtor e exportador de alimentos em todos os segmentos. Para exemplificar, na safra de grãos 2019/2020 o país bateu um recorde histórico com 257,8 milhões de toneladas produzidas, com destaque para soja, milho e algodão (CONAB, 2020). Embora a produção seja muito grande, as perdas ocasionadas tanto por fatores abióticos como bióticos (pragas e doenças) também são (EMBRAPA, 2018). Um estudo realizado por Savary et al (2019), estimou as perdas causadas por pragas e patógenos nas culturas do trigo, arroz, milho, batata e soja em todo o mundo. Os dados mostram que a média das perdas por cultura é: trigo 21,5%, arroz 30%, milho 22,5%, batata 17,2% e soja 21,4%. Ainda no mesmo trabalho, os autores destacam que as maiores perdas ocorrem em países que estão em desenvolvimento e apresentam um rápido crescimento populacional.

Diante disso, é notável a importância da diagnose de doenças para que medidas de controle sejam adotadas o mais rápido possível a fim de evitar as perdas econômicas, bem como a disseminação dos patógenos para outras plantas e até mesmo outros locais. Porém, algumas vezes a identificação correta não é realizada e dessa forma a medida de controle adotada não é suficiente para conter a doença. Outras vezes, ainda, são utilizados métodos antigos de identificação, os quais necessitam de tempo, laboratório e pessoal treinado para tal. Outra questão que muitas vezes dificulta a diagnose correta da doença é a variabilidade genética apresentada pelos patógenos, pois alguns métodos não conseguem acompanhar a evolução dos patógenos, não sendo capaz de identificar especificamente a nível de biótipo, patovar, raça, *formae speciales*.

Muitos métodos de diagnose são utilizados, principalmente aqueles baseados nos sintomas da doença, na morfologia do microrganismo, nas reações de patogenicidade, no entanto, esses exigem pessoas extremamente treinadas, equipamentos adequados e demandam tempo, o que muitas vezes dentro de um sistema de produção não se tem (HORSFALL & COWLING, 1977). Com o avanço na criação de tecnologias, principalmente nos estudos de biologia molecular, técnicas

baseadas na PCR (reação em cadeia da polimerase) têm sido amplamente difundidas e têm demonstrado resultados de grande valor para a área de taxonomia. Contudo, da mesma forma que os métodos convencionais, para realizar essa técnica é necessário mão de obra qualificada e um laboratório equipado para trabalhos com biologia molecular (DAI et al., 2012).

Diante desses entraves, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), é uma alternativa para suprir essa demanda, sendo uma técnica molecular altamente específica e sensível, pode ser utilizada diretamente no campo, pois não necessita de equipamentos específicos para execução. LAMP foi inicialmente utilizada na área médica, para detecção do vírus da hepatite B (HBV) (NOTOMI et al. 2000). Em 2020 também foi utilizado para detecção da COVID-19, como uma alternativa a técnica molecular padrão, RT-qPCR, pois essa requer equipamentos complexos, pessoal treinado, além de um período longo para obtenção do resultado (THOMPSON & LEI 2020). Além disso, por ser uma técnica molecular, LAMP é capaz de detectar as mutações que ocorrem no genoma dos organismos e dessa forma consegue acompanhar a evolução dos organismos, sendo possível identificar as espécies a nível de biótipo, patovar, raças, *formae speciales*.

Na fitopatologia, a aplicação de LAMP inicia em 2003, quando dois trabalhos foram publicados para detecção de vírus que causam doenças em plantas. Foi realizada a detecção de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) em tomate e no seu vetor, mosca branca (FUKUTA et al., 2003a) e a detecção de *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) em inhame (FUKUTA et al., 2003b). Na área de entomologia, o primeiro trabalho foi realizado em 2009 e foi aplicado para rápida identificação da mosca-da-fruta do Mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (HUANG et al., 2009).

Diante de tudo isso, o objetivo deste trabalho é apresentar as últimas atualizações sobre a aplicação de LAMP na detecção de patógenos, bem como demonstrar sua aplicação para a identificação da mosca branca *Trialeurodes vaporariorum* e na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja.

A mosca branca é uma praga agrícola de grande importância mundial que causa danos às plantas através da alimentação no floema, sugando a seiva; excreção do *honeydew*, além da transmissão de diferentes espécies de vírus (BYRNE & BELLOWS, 1991). A espécie *Trialeurodes vaporariorum* é conhecida como mosca branca de casa de vegetação. Sua identificação é difícil de ser realizada, devido a sua

semelhança com a espécie *Bemisia tabaci*. Embora sejam morfologicamente diferentes, o seu pequeno tamanho dificulta a diferenciação. Dessa forma, técnicas moleculares têm sido utilizadas para tal e LAMP vem a ser uma alternativa promissora.

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo de grande importância econômica, pois é responsável por causar a doença conhecida como mofo branco. As sementes infectadas por micélio ou contaminadas com escleródios constituem a principal forma de disseminação deste fungo (ADAMS & AYERS, 1979). Para isso, diferentes métodos para detecção do patógeno em sementes de soja são relatados, dentre eles: incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (“blotter test”); em rolo de papel e em meio ágar-bromofenol Neon (NASSER et al., 1999; MACHADO, 2002; PERES et al., 2002; TAYLOR et al., 2006; Manual de análise sanitária de sementes, 2009). No entanto, a eficiência desses métodos é variável e o tempo para execução é longo, o que acaba comprometendo a agilidade do processo. Sendo assim, LAMP também se encaixa para uso na detecção de patógenos em sementes.

Artigo 1 – Revista Anual de Patologia de Plantas

## **Detecção de patógenos de plantas usando a amplificação isotérmica mediada por loop**

Carolina Garcia Neves<sup>1</sup>; Ismail Teodoro de Souza Júnior<sup>1</sup>, Danielle Ribeiro de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brasil

Autor para correspondência: danielle.barros@ufpel.edu.br

### **Resumo**

O controle das doenças é crucial para minimizar as perdas potenciais na agricultura e com isso manter a produtividade das culturas elevada. Porém, para que o manejo seja eficaz é necessário que o patógeno seja detectado de forma precoce e correta nos campos de produção. Diferentes métodos de diagnose podem ser empregados desde os baseados na sintomatologia até os testes moleculares. A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica molecular que tem sido amplamente utilizada em diversos campos biológicos, devido à facilidade com que pode ser aplicada. A reação pode ser realizada em uma única condição térmica, devido a utilização da DNA polimerase *Bst*, isolada da bactéria *Bacillus stearothermophilus*, a qual tem alta atividade de deslocamento. LAMP é um método de amplificação altamente exponencial que produz o DNA alvo em quantidades de  $10^9$ - $10^{10}$  vezes entre 45 e 60 minutos a 60-65°C. Apresenta como vantagens a visualização dos resultados diretamente a olho nu e o fato de não precisar de equipamentos sofisticados para sua aplicação. Na fitopatologia, a técnica vem ganhando destaque sendo empregada na detecção de fungos, vírus, bactérias, nematoides e fitoplasmas, bem como no monitoramento de fungos resistentes a fungicidas. LAMP pode beneficiar a agricultura para que diagnósticos precoces, precisos e sensíveis possam ser realizados nos campos de cultivo e assim minimizar as perdas causadas por doenças.

**Palavras-chave:** Lamp, Diagnose, Fungos, Vírus, Nematoides, Bactérias, Fitoplasmas

### **Abstract**

Disease control is crucial to minimize potential losses in agriculture and thereby maintain high crop productivity. However, for the management to be effective, the pathogen must be detected early and correctly in the production fields. Different methods of diagnosis can be used, from those based on symptoms to molecular tests. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a molecular technique that has been widely used in several biological fields, due to the ease with which it can be applied. The reaction can be carried out in a single thermal condition, due to the use of *Bst* DNA polymerase, isolated from the bacterium *Bacillus stearothermophilus*,



which has high displacement activity. LAMP is a highly exponential amplification method that produces the target DNA in amounts  $10^9$ - $10^{10}$  times between 45 and 60 minutes at 60-65°C. It has as advantages the visualization of the results directly with the naked eye and the fact that it does not need sophisticated equipment for its application. In phytopathology, the technique has been gaining prominence in the detection of fungi, viruses, bacteria, nematodes and phytoplasmas, as well as in the monitoring of fungicide-resistant fungi. LAMP can benefit agriculture so that early, accurate and sensitive diagnostics can be carried out in the fields of cultivation and minimize losses caused by diseases.

**Keywords:** LAMP, Diagnosis, Fungi, Virus, Nematodes, Bacteria, Phytoplasmas

## 1. Introdução

As projeções indicam que em 2050 a população mundial será de 10 bilhões de habitantes (ONU, 2019), o que torna a demanda por alimentos cada vez maior. Com a transformação que o mundo vem passando, a segurança alimentar está ameaçada e precisamos trabalhar para alimentar o mundo (LE & VU, 2017).

O Brasil é conhecido por ser um grande produtor e exportador de alimentos em todos os segmentos. Para exemplificar, na safra de grãos 2020/2021 o país alcançou 260,8 milhões de toneladas produzidas, com destaque para soja, milho e algodão (CONAB, 2021). Embora a produção seja muito grande, as perdas ocasionadas tanto por fatores abióticos como bióticos (pragas e doenças) também são (EMBRAPA, 2018). Um estudo realizado por Savary et al (2019), estimou as perdas causadas por pragas e patógenos nas culturas do trigo, arroz, milho, batata e soja em todo o mundo. Os dados mostram que a média das perdas por cultura é: trigo 21,5%, arroz 30%, milho 22,5%, batata 17,2% e soja 21,4%. Ainda no mesmo trabalho, os autores destacam que as maiores perdas ocorrem em países que estão em desenvolvimento e apresentam um rápido crescimento populacional.

Diante disso, é notável a importância da diagnose de doenças para que medidas de controle sejam adotadas o mais rápido possível a fim de evitar as perdas econômicas, bem como a disseminação dos patógenos para outras plantas e até mesmo outros locais. Diferentes métodos diagnósticos podem ser empregados para detecção de patógenos, desde aqueles mais simples como os baseados nos sintomas da doença, até os mais sofisticados, fundamentados na amplificação de ácido nucleico.

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica rápida e eficiente que tem como objetivo amplificar uma região específica de DNA. LAMP é realizada em condições isotérmicas necessitando apenas de um banho maria ou um bloco aquecido para que

a reação ocorra (NOTOMI et al., 2000). Foi primeiramente desenvolvida para suprir uma demanda na área de saúde humana, sendo o primeiro trabalho desenvolvido para a detecção do vírus da hepatite B (HBV) (NOTOMI et al. 2000). Porém, em pouco tempo, começou a ser utilizada para detecção de patógenos em plantas. O primeiro trabalho publicado foi em 2003, para detecção de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) um vírus da família *Geminiviridae*, que infecta tomate e é transmitido por mosca branca (*Bemisia tabaci*). Além de ter sido detectado em plantas de tomate infectadas, TYLCV também foi detectado no seu vetor, a mosca branca (FUKUTA et al. 2003a). Desde os primórdios da sua utilização LAMP já demonstrava sua versatilidade, detectando patógenos em diferentes materiais. A partir daí, LAMP tornou-se uma opção rápida e robusta para detecção de fungos, vírus, bactérias, nematoides e fitoplasmas que causam doenças em plantas.

No Brasil, algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a utilização da técnica LAMP em diferentes áreas de estudo. Na detecção de patógenos de plantas alguns trabalhos podem ser citados: detecção de *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão (ROCHA et al. 2017); detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo e em tecidos vegetais de plantas de soja (GRABICOSKI et al. 2020) e a detecção de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* e *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* em folhas de feijão (PAIVA et al. 2020). Além desses, também há pesquisas na área de saúde humana: detecção de Zika virus (ZIKV) em tecidos humanos e no seu vetor (SILVA et al. 2020); detecção de *Leishmania infantum* agente causal da leishmaniose visceral (BEZERRA et al. 2020). Ainda, um trabalho de grande relevância a nível mundial foi desenvolvido no Brasil utilizando a técnica LAMP para detecção de SARS-CoV-2 a partir de amostras de saliva de pessoas sintomáticas e assintomáticas (SANTOS et al. 2021).

Nessa revisão, discutimos e resumimos uma gama de testes LAMP desenvolvidos para detecção de patógenos em plantas. Tais informações podem ser de grande valia para pesquisadores que queiram utilizar a técnica na sua área de pesquisa.

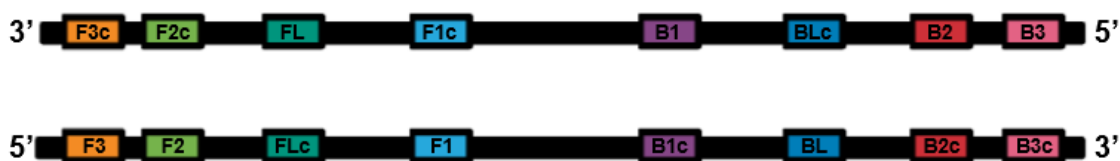
## 2. LAMP

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica de diagnóstico molecular, relatada pela primeira vez por Notomi et al. (2000) e vem sendo amplamente utilizada em diversos campos biológicos, devido a facilidade com que pode ser aplicada (NOTOMI et al. 2000).

LAMP pode ser realizada em uma única condição térmica, sem a necessidade de mudanças de temperatura durante a amplificação (CHEN et al. 2012) isso é possível devido a utilização da DNA polimerase *Bst*, isolada da bactéria *Bacillus stearothermophilus*, a qual tem

alta atividade de deslocamento. Apresenta-se como uma técnica de amplificação altamente exponencial que produz o DNA alvo em quantidades de  $10^9$ - $10^{10}$  vezes entre 45 e 60 minutos a  $60$ - $65^\circ\text{C}$  (NOTOMI et al. 2000). Dessa forma, diferentemente das técnicas baseadas na PCR, as quais necessitam de variações de temperatura para obtenção do resultado e com isso equipamentos específicos (termociclador) para ser empregada, LAMP supera essa limitação, podendo beneficiar a agricultura para que diagnósticos precisos e sensíveis sejam realizados diretamente nos campos de produção de forma rápida (DAI et al., 2012).

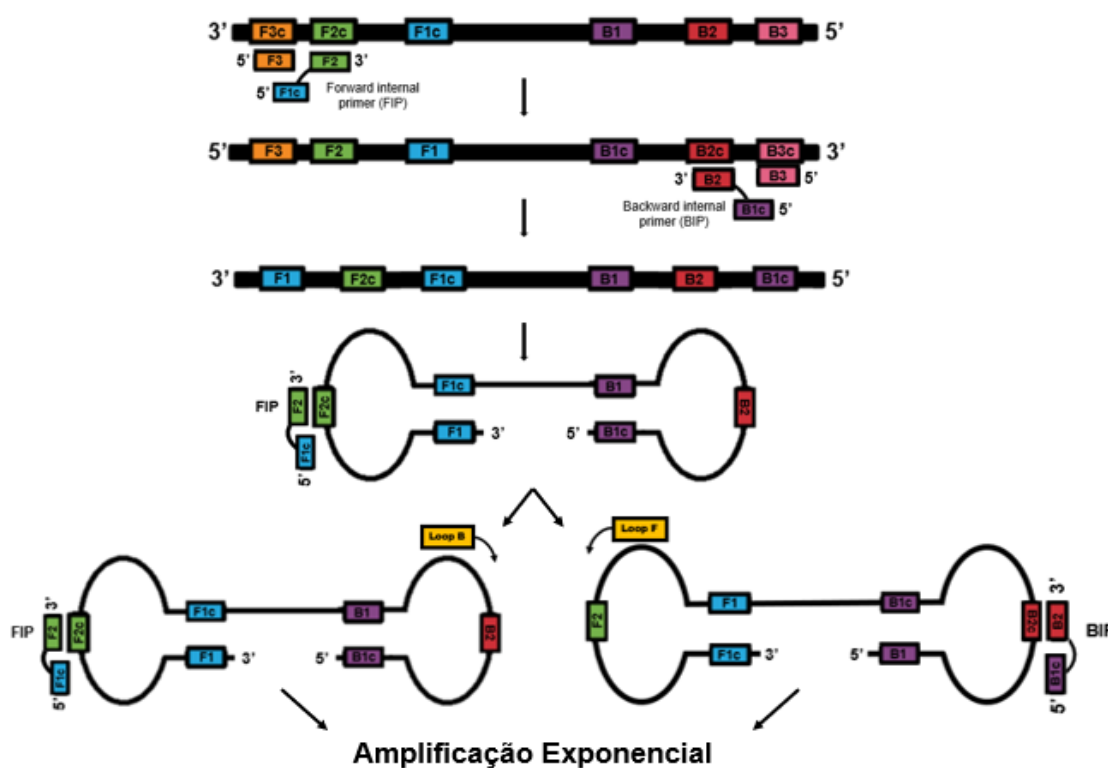
A técnica baseia-se na amplificação do ácido nucleico através da utilização de quatro ou seis primers: dois externos (F3 e B3), dois internos (FIP e BIP) e primers de loop (FL e BL), os quais vão se ligar a 6 ou 8 regiões distintas da sequência alvo, tornando-a altamente específica (NOTOMI et al. 2000; TOMITA et al., 2008) (Figura 1). LAMP tem a capacidade de amplificar mais cópias do DNA alvo em menos de uma hora e em temperatura constante quando comparado com a PCR, que necessita de um ciclo de temperatura de três etapas (NOTOMI et al. 2000). Além do mais, os primers de loop, quando utilizados, podem acelerar o processo de amplificação do loop, completando a reação em 20-30 minutos (MORI & NOTOMI 2009; NAGAMINE et al. 2002).



**Figura 1.** Localização dos primers LAMP na sequência alvo. F3 e B3 são os primers externos. F2 e F1c formam o primer FIP. B2 e B1c foram o primer BIP. FL e BL representam os primers loop.

Na figura 2, observa-se como ocorre a amplificação da sequência alvo que ocorre alternando entre duas etapas, a não cíclica e a cíclica. Na etapa não cíclica [1], a amplificação do DNA inicia após a reação atingir a temperatura em que a enzima possui atividade. Nessa, os loops são formados nas extremidades da fita de DNA, essa formação se dá pela atuação dos iniciadores internos (FIP e BIP) juntamente com o deslocamento propiciado pelos iniciadores externos (F3 e B3) (TOMITA et al., 2008). A etapa cíclica [2] ocorre após a formação dos loops. Nesta etapa somente os iniciadores internos vão atuar no anelamento e síntese das quatro regiões distintas do alvo, sendo elas as sequências, F2c, F1c, B1 e B2. Isso se dá, pois diferentemente da etapa não-cíclica, as regiões em que os iniciadores externos se anelam (F3c e B3c) estarão ausentes nessa etapa, sendo assim a fita sintetizada pelo iniciador interno não

será deslocada pelo iniciador externo e sim pelos loops formados na extremidade da fita (NOTOMI et al., 2000). Na fase cíclica, após o anelamento e formação do loop pela região B1 e B1c, a síntese é iniciada. Com a auto-ativação da síntese promovida pelo loop nessa região, a fita anteriormente sintetizada pelo iniciador FIP é liberada. A fita simples liberada é uma repetição invertida da estrutura de partida, e é nessa fita invertida que o iniciador BIP reconhece a região B2c, esse se anela e sintetiza o DNA, formando uma nova fita complementar que apresentará outros loops produzindo novas cópias invertidas da sequência alvo. Essas sequências poderão formar múltiplas estruturas devido ao deslocamento das fitas complementares sintetizadas pelos iniciadores internos (NOTOMI et al., 2000; TOMITA et al., 2008).



**Figura 2.** Ilustração das etapas não cíclica e cíclica da reação LAMP.

Ao longo do tempo, LAMP apresentou diversos avanços com relação a sua aplicação e diferentes formas foram sendo aperfeiçoadas: LAMP convencional (LAMP); LAMP de transcrição reversa (RT-LAMP); multiplex LAMP (mLAMP) e LAMP em tempo real (qLAMP). LAMP convencional é aquele comumente utilizado. No RT-LAMP uma enzima denominada transcriptase reversa é adicionada à reação para permitir a detecção de RNA (NOTOMI et al. 2000). Da mesma forma que o LAMP convencional, RT-LAMP pode ser realizado em uma única etapa, incubando todos os primers, *Bst* polimerase e transcriptase

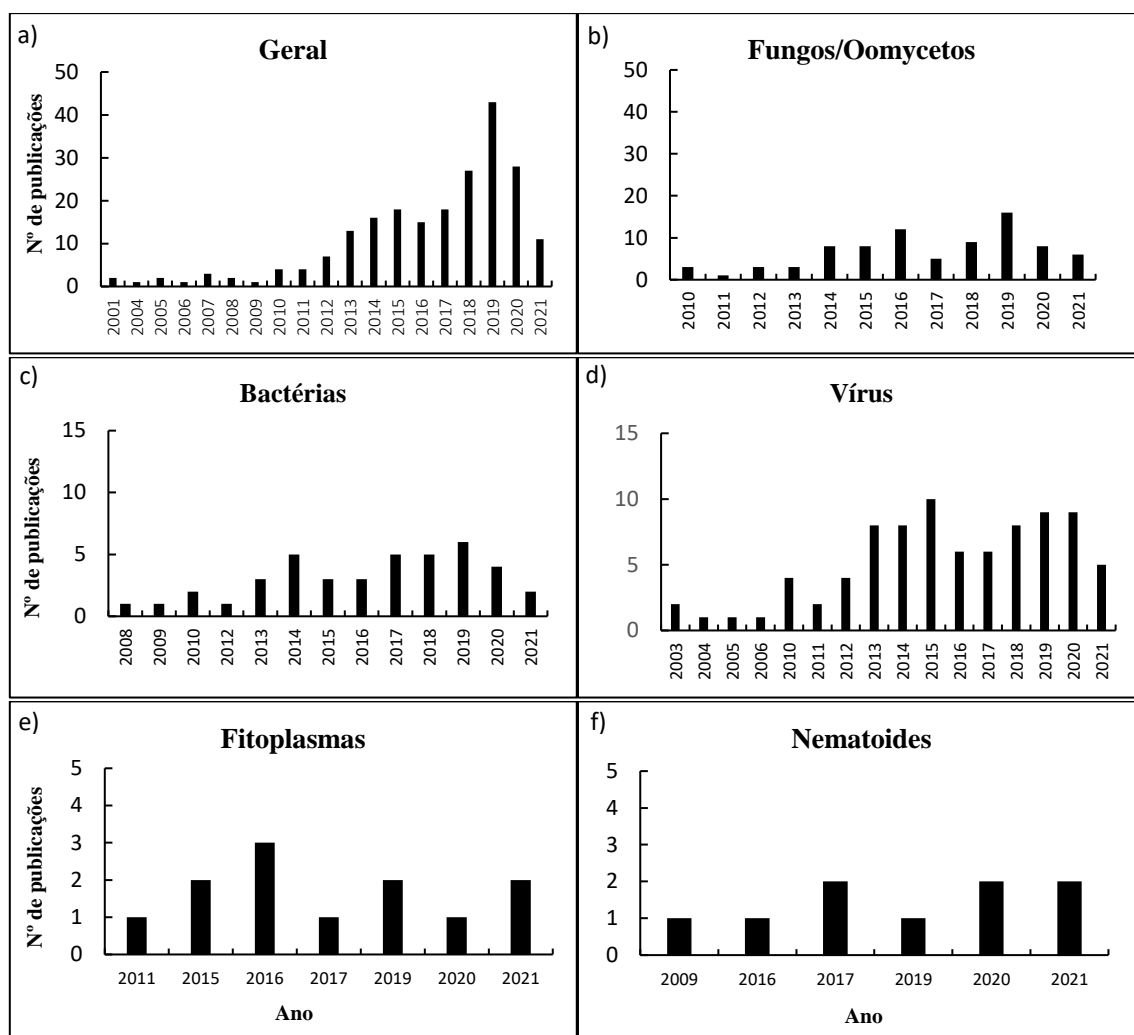
reversa em uma temperatura constante. Tal avanço na técnica deve-se principalmente para possibilitar sua utilização na detecção de vírus que possuam genoma de RNA (MORI et al. 2013). O mLAMP é uma abordagem que realiza a detecção de vários genes alvo em uma única reação (LAU et al. 2015). Já o qLAMP tem capacidade de quantificar o DNA ou RNA alvo em tempo real, através da utilização de um termociclador em tempo real ou de um turbidímetro em tempo real (NAGAMINE et al. 2002; MORI et al. 2013).

A visualização dos produtos da amplificação pode ser feita pela adição de indicadores juntamente na mistura da reação, podendo ser antes do processo, por exemplo o azul de hidroxinaftol (HNB) e calceína ou após a reação ocorrer, como o brometo de etídio, outros corantes também são utilizados, por exemplo, EvaGreen, SYBR Green e Pico Green (LE et al. 2017). Com a utilização do HNB o resultado positivo pode ser observado pela mudança da cor na reação, isso devido a alteração do pH, já a calceína e o brometo de etídio nas reações positivas vão emitir fluorescência sob luz UV. HNB e calceína são os mais utilizados em relação ao brometo de etídio devido a sua segurança. Uma outra forma de confirmar o sucesso da reação LAMP é através da turbidez do pirofosfato de magnésio no fundo do tubo. A turbidez aumentada pode ser medida em tempo real ou ao final da reação (ALMASI et al. 2013), outra forma é através de um indicador de pH visível, baseado na produção de prótons e subsequente queda do pH do meio, resultando na alteração da coloração da reação, de rosa (negativo) para amarelo (positivo) (TANNER et al. 2015). Além desses, os produtos LAMP podem ser visualizados sob luz UV após eletroforese em gel de agarose, o que vai ser observado são as várias repetições invertidas de DNA como uma escada no gel (Le ROUX et al. 2009).

Assim, LAMP representa uma técnica de detecção simples, rápida e sensível que pode ser usada com eficácia para detecção de patógenos e mutações genéticas em locais remotos e sem a necessidade de equipamentos específicos.

### **3. Detecção de patógenos de plantas**

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm sido publicados mostrando a utilização de LAMP na detecção de fungos, vírus, bactérias, nematoides e fitoplasmas. De maneira geral, observa-se na literatura um aumento nas publicações a partir do ano de 2012 (figura 3a), tendo um ápice no número de publicações em 2019 (Figura 3a). Quando observamos individualmente os patógenos, trabalhos realizados com fungos e oomycetos (figura 3b) e vírus (figura 3c) se destacam. No entanto, sua utilização vem crescendo na detecção de bactérias (figura 3d), fitoplasmas (figura 3e) e nematoides (figura 3f).



**Figura 3.** Número de publicações listadas na PubMed (status de 2021), pesquisa refinada para aparência no título das palavras: a) LAMP; plant pathogen; b) LAMP; plant fungus; detection; c) LAMP; plant virus; detection; d) LAMP; plant bacteria; detection; e) LAMP; phytoplasma; detection; f) LAMP; plant nematodes; detection.

### 3.1 Vírus

LAMP foi desenvolvido primeiramente para atender a área de saúde humana e, como descrito anteriormente, o primeiro trabalho publicado foi para detecção do HBV. A área de virologia vegetal também foi pioneira nos estudos da aplicação de LAMP para detecção de patógenos de plantas e abrange o maior número de publicações na literatura. Os vírus são parasitas obrigatórios e causam danos severos em diferentes culturas de interesse agrícola (cereais, frutas, vegetais) além de plantas ornamentais. Estima-se que mais de 900 espécies de vírus podem causar doenças em diferentes hospedeiros e suas perdas podem chegar entre 10 e 15% (ROOSSINCK 2013).

Na tabela 1, pode-se observar a gama de estudos realizados, e vale salientar que, como a maioria dos vírus de plantas apresentam genoma de RNA e para sua detecção utiliza-se RT-LAMP.

**Tabela 1.** Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de vírus.

<b>Patógeno</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Material utilizado</b>	<b>Tipo de LAMP</b>	<b>Referência</b>
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Tomate	Tecido vegetal; vetor (mosca branca)	LAMP	Fukuta et al. 2003a
<i>Japanese yam mosaic virus</i> (JYMV)	Inhame	Folha	RT-LAMP	Fukuta et al. 2003b
<i>Tomato spotted wilt orthotospovirus</i> (TSWV)	Tomate; Crisântemo	Folha	RT-LAMP	Fukuta et al. 2004; Wu et al. 2016
<i>Potato virus Y</i> (PVY)	Batata	Tubérculo; folha	RT-LAMP	Nie 2005;
<i>Plum pox virus</i> (PPV)	Pêssego	Tecido vegetal	RT-LAMP	Varga & James 2006
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	Tabaco	Folha	RT-LAMP	Liu et al. 2010
<i>Squash leaf curl virus</i> (SLCV)	Abóbora; Melão	Folha	LAMP	Kuan et al. 2010
<i>Wheat yellow mosaic virus</i> (WYMV)	Trigo	Folha	RT-LAMP	Zhang et al. 2011
<i>Cymbidium mosaic virus</i> (CymMV)	Orquídea	Folha	RT-LAMP	Lee et al. 2011
<i>Southern rice black-streaked dwarf virus</i> (SRBSDV)	Arroz	Tecido vegetal	RT-LAMP	Zhou et al. 2012
<i>Banana bunchy top virus</i> (BBTV)	Banana	Tecido vegetal	LAMP	Peng e tal. 2012
<i>Bean pod mottle virus</i> (BPMV)	Soja	Semente	RT-LAMP	Wei et al. 2012
<i>Potato Leafroll virus</i> (PLRV)	Batata	Folha	RT-LAMP	Ahmadi et al. 2012;
<i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	Tomate	Tecido vegetal	RT-LAMP	Hasiów-Jaroszewska & Borodynko 2013
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	Melancia	Plântulas; semente	RT-LAMP	Li et al. 2013
<i>Piper yellow mottle virus</i> (PYMoV)	Pimenta preta	Tecido vegetal	LAMP	Bhat et al. 2013
<i>Grapevine leafroll-associated virus type 3</i> (GLRaV-3)	Videira	Pecíolo	RT-LAMP	Walsh & Pietersen 2013

<i>Ugandan cassava brown streak virus</i> (UCBSV)	Mandioca	Folha	RT-LAMP	Tomlinson et al. 2013
<i>Cassava brown streak virus</i> (CBSV)	Mandioca	Folha	RT-LAMP	Tomlinson et al. 2013
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Banana; Pimenta preta; alface	Tecido vegetal	RT-LAMP	Peng et al. 2012; Bhat et al. 2013; Zhang et al. 2020
<i>Japanese soil-borne mosaic virus</i> (JSBWMV)	Trigo	Folha	RT-LAMP	Fukuta et al. 2013
<i>Chinese wheat mosaic virus</i> (CWMV)	Trigo	Folha	RT-LAMP	Fukuta et al. 2013
<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	Mamão	Folha	RT-LAMP	Shen et al. 2014a
<i>Citrus yellow mosaic badnavirus</i> (CMBV)	Citrus	Tecido vegetal	LAMP	Johnson et al. 2014
<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	Beterraba	Tecido vegetal	RT-LAMP	Almasi et al. 2014
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV)	Cereja	Folha	RT-LAMP	Zong et al. 2014
<i>Tomato necrotic stunt virus</i> (ToNStV)	Tomate	Tecido vegetal	RT-LAMP	Li & Ling 2014
<i>Papaya leaf distortion mosaic virus</i> (PLDMV)	Mamão	Folha	RT-LAMP	Shen et al. 2014b
<i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)	Solanáceas	Folha	RT-LAMP; RT-qLAMP	Hasiów-Jaroszewska et al. 2015
<i>Rice black-streaked dwarf virus</i> (RBSDV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice dwarf virus</i> (RDV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice gall dwarf virus</i> (RGDV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice ragged stunt virus</i> (RRSV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice grassy stunt virus</i> (RGSV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice stripe virus</i> (RSV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice tungro bacilliform virus</i> (RTBV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice tungro spherical virus</i> (RTSV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015
<i>Rice transitory yellowing virus</i> (RTYV)	Arroz	Folha	RT-LAMP	Sasaya 2015



<i>Potato virus X (PVX)</i>	Batata	Tecido vegetal	RT-LAMP; RT-qLAMP	Jeong et al. 2015
<i>Tomato chlorosis virus (ToCV)</i>	Tomate	Folha	RT-LAMP	Kil et al 2015
<i>Sugarcane mosaic virus (SCMV)</i>	Cana de açúcar	Tecido vegetal	RT-LAMP	Keizerweerd et al. 2015
<i>Sorghum mosaic virus (SrMV)</i>	Cana de açúcar	Tecido vegetal	RT-LAMP	Keizerweerd et al. 2015
<i>Wheat streak mosaic virus (WSMV)</i>	Trigo	Tecido vegetal	RT-LAMP	Lee et al. 2015
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV)</i>	Cucurbitáceas	Vetor (mosca branca); folha	RT-LAMP	Okuda et al. 2015
<i>Chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus (CSNV)</i>	Crisântemo; tomate	Tecido vegetal	RT-LAMP	Suzuki et al. 2016
<i>Tomato torrado virus (ToTV)</i>	Tomate	Folha	RT-LAMP	Budziszewska et al. 2016
<i>Chilli veinal mottle virus (ChiVMV)</i>	Pimenta	Folha	RT-LAMP	Banerjee et al. 2016
<i>Lily symptomless virus (LSV)</i>	Lírio	Tecido vegetal	RT-LAMP	He et al. 2016
<i>Maize chlorotic mottle virus (MCMV)</i>	Milho	Folha	RT-LAMP	Chen et al. 2017
<i>Mirafiori lettuce big vein virus (MiLBVV)</i>	Alface	Folha	RT-LAMP	Almasi 2017
<i>Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)</i>	Beterraba	Raiz	RT-LAMP	Almasi & Almasi 2017
<i>Bean common mosaic necrosis virus (BCMNV)</i>	Feijão	Tecido vegetal	RT-LAMP	Lee et al. 2017
<i>Southern tomato virus (STV)</i>	Tomate	Folha, fruto; semente; raiz	RT-LAMP	Elvira-González et al. 2017
<i>Lily mottle virus (LMoV)</i>	Lírio	Bulbo	RT-LAMP	Zhao et al. 2018; Zhang et al. 2020
<i>Yam mosaic virus (YMV)</i>	Inhame	Folha; tubérculo	RT-LAMP	Nkere et al. 2018
<i>Barley stripe mosaic virus (BSMV)</i>	Cevada	Semente; tecido vegetal	RT-LAMP	Zarzyńska-Nowak et al. 2018
<i>Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)</i>	Pêra; Maçã	Tecido vegetal; folha	RT-LAMP	Peng et al. 2017; Lu et al. 2018
<i>Apple stem pitting virus (ASPV)</i>	Pêra	Tecido vegetal	RT-LAMP	Lu et al. 2018
<i>Little cherry virus 1 (LChV-1)</i>	Cereja	Folha	RT-LAMP	Tahzima et al. 2019

<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	Citrus	Folha	RT-LAMP	Ghosh et al. 2019
<i>Mesta yellow vein mosaic virus</i> (MeYVMV)	Hortelã-pimenta	Folha; flor; caule	LAMP	Meena et al. 2019
<i>Onion yellow dwarf virus</i> (OYDV)	Cebola	Folha; bulbo	RT-LAMP	Tiberini et al. 2019
<i>Tobacco Streak Virus</i> (TSV)	Algodão; Soja	Folha	RT-LAMP	Gawande et al. 2019
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (ToLCNDV)	Melão; pimenta; berinjela	Folha	qLAMP	Wilisiani et al. 2019
<i>Pepper yellow leaf curl Indonesia virus</i> (PepYLCIV)	Melão; pimenta; berinjela	Folha	qLAMP	Wilisiani et al. 2019
<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus</i> (TYLCKaV)	Melão; pimenta; berinjela	Folha	qLAMP	Wilisiani et al. 2019
<i>Citrus leaf blotch virus</i> (CLBV)	Citrus	Folha	RT-LAMP	Liu et al. 2019
<i>Grapevine red blotch virus</i> (GRBV)	Videira	Folha	LAMP	Romero et al. 2019
<i>Turnip yellows virus</i> (TuYV)	Canola	Folha	RT-LAMP	Congdon et al. 2019
<i>Barley yellow mosaic virus</i> (BaYMV)	Cevada	Tecido vegetal	RT-LAMP	Chen et al. 2020
<i>Melon necrotic spot virus</i> (MNSV)	Melão; pepino	Folha	RT-LAMP	Qiao et al. 2020
<i>Maize streak virus</i> (MSV)	Milho	Tecido vegetal	LAMP	Tembo et al. 2020
<i>Indian citrus ringspot virus</i> (ICRSV)	Citrus	Tecido vegetal	RT-LAMP	Kokane et al. 2020
<i>Lettuce necrotic yellows virus</i> (LNYV)	Alface	Tecido vegetal	RT-LAMP	Zhang et al. 2020
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	Lírio	Tecido vegetal	RT-LAMP	Zhang et al. 2020
<i>Cucurbit leaf crumple virus</i> (CuLCrV)	Abóbora	Folha	qLAMP	Waliullah et al. 2020
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (ToBRFV)	Tomate; pimenta	Tecido vegetal	RT-LAMP	Sarkes et al. 2020
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (ToLCNDV)	Tomate; melancia	Tecido vegetal	LAMP	Venkataramanappa et al. 2020
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (ToBRFV)	Tomate; pimenta	Semente	RT-LAMP	Rizzo et al. 2021
<i>Cotton leaf curl disease</i> (CLCuD)	Algodão	Tecido vegetal	LAMP	Rafiq et al. 2021

<i>Wheat dwarf virus</i> (WDV)	Trigo	Tecido vegetal; vetor	qLAMP; LAMP	Hao et al. 2021
-----------------------------------	-------	--------------------------	----------------	-----------------

### 3.1 Fungos e Oomycetos

Fungos e oomycetos causam perdas econômicas significativas para as culturas agrícolas. Para que essas perdas sejam minimizadas, medidas de controle eficientes precisam ser adotadas e a detecção precoce do patógeno torna-se uma prioridade.

Em 2010, foram publicados os primeiros trabalhos com LAMP para detecção de fungos e oomycetos. Niessen & Vogel (2010), desenvolveram um teste para detectar o principal agente causador da giberela em cereais *Fusarium graminearum*. No estudo, foi utilizado LAMP convencional e o fungo foi detectado diretamente da colônia pura, bem como de grãos de cevada e trigo. No mesmo ano, um trabalho realizado por Tomlinson et al. (2010) detectou os patógenos *Phytophthora ramorum* e *P. kernoviae* agentes causais da morte súbita do carvalho e da queima das folhas. Neste estudo, material vegetal foi utilizado como molde da reação e, além da detecção individualmente de cada uma das espécies através do LAMP convencional, um mLAMP também foi desenvolvido para realizar a detecção de ambas as espécies em uma única reação.

Ao longo de 10 anos, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura utilizou LAMP convencional para a detecção de fungos e oomycetos e alguns utilizaram qLAMP. Além disso, com o avanço da sua aplicação, diferentes materiais começaram a ser empregados como molde na reação, desde a colônia pura do fungo, sementes, tecidos vegetais até mesmo solo (tabela 1).

Além de sua aplicação na detecção de fungos e oomycetos, LAMP vem sendo empregada para monitorar a resistência de fungos a fungicidas. Trabalhos monitorando a resistência de diferentes espécies de fungos a fungicidas com diferentes modos de ação vem sendo publicados. A resistência a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) vem sendo monitorada em *Corynespora cassicola* e *Botrytis cinerea* (FAN et al. 2018; ZHU et al. 2020) e os inibidores extracelulares de quinona (QoI) nas espécies *B. cinerea*, *Cercospora beticola*, *Colletotrichum gloeosporioides* (HU et al. 2017; WU et al. 2019; SHRESTHA et al. 2020). A resistência de *Monilinia fructicola* a fungicidas inibidores da desmetilação (DMI) também vem sendo monitorada com a utilização de LAMP (CHEN et al. 2020). A resistência a fungicidas que agem inibindo a síntese de DNA bem como o processo de mitose em organismos sensíveis vem sendo monitorada em *B. cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium asiaticum*, *Podosphaera xantii* e *Sclerotinia sclerotiorum* (DUAN et al. 2014; DUAN et al. 2015; DUAN et al. 2018; VIELBA-FERNÁNDEZ et al. 2019; LIU et al. 2019).

Tal aplicação é de grande importância na agricultura pois a detecção precoce da resistência de determinado fungo a determinado fungicida, permite que outros produtos e até outras medidas de controle sejam adotadas visando minimizar as perdas causadas pela doença.

**Tabela 2.** Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de fungos.

<b>Patógeno</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Material utilizado</b>	<b>Tipo de LAMP</b>	<b>Referência</b>
<i>Botrytis cinerea</i>	Roseira; Tomate; Morango	Cultura pura; pétalas	LAMP; qLAMP	Tomlinson et al. 2010; Duan et al. 2014
<i>Fusarium graminearum</i>	Trigo; cevada	Semente; grãos	LAMP	Abd-elsalam et al. 2011; Denschlag et al. 2012
<i>Fusarium culmorum</i>	Cevada	Grãos	LAMP	Denschlag et al. 2012
<i>Fusarium cerealis</i>	Cevada	Grãos	LAMP	Denschlag et al. 2012
<i>Fusarium lunulosporum</i>	Cevada	Grãos	LAMP	Denschlag et al. 2012
<i>Phytophthora sojae</i>	Soja	Colônia pura; tecido vegetal	LAMP; qLAMP	Dai et al. 2012
<i>Ophiostoma clavatum</i>	Pinus	Raiz	LAMP	Villari et al. 2013
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Banana	Solo	LAMP; qLAMP	Peng et al. 2014
<i>Pythium helicoides</i>	Poinsettia	Raiz	LAMP	Takahashi et al. 2014
<i>Rhizoctonia solani</i>	Soja; Arroz	Colônia pura; folha; tecido vegetal	LAMP	Lu et al. 2015; Choudhary et al. 2020
<i>Pythium irregulare</i>	Tomate e Eustoma	Água; solo; folha	LAMP	Feng et al. 2015; Feng et al. 2018
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Amendoim	Semente	LAMP	Sheikh 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Amendoim	Semente	LAMP	Sheikh 2015
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	Grão de bico	Colônia pura	LAMP	Ghosh et al. 2015
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Feijão; Soja	Semente; tecido vegetal	LAMP	Lu et al. 2015; Gra et al. 2017
<i>Colletotrichum falcatum</i>	Cana de açúcar	Colônia pura	LAMP	Chandra et al. 2015
<i>Plasmopara viticola</i>	Videira	Folha	LAMP	Kong et al. 2016
<i>Phytophthora infestans</i>	Batata; Tomate	Esporos; Folha	qLAMP; LAMP	Hansen et al. 2016; Lees et al. 2019

<i>Colletotrichum acutatum</i>	Morango	Colônia pura; Folha	LAMP	Zhang et al. 2016
<i>Ascochyta rabiei</i>	Grão de bico	Semente	LAMP	Chen et al. 2016
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	Caule	LAMP	Ayukawa et al. 2016
<i>Puccinia kuehnii</i>	Cana de açúcar	Colônia pura	LAMP	Chandra et al. 2016
<i>Sporisorium scitamineum</i>	Cana de açúcar	Colônia pura	LAMP	Su et al. 2016
<i>Ustilago maydis</i>	Milho	Colônia pura; solo; tecido vegetal	LAMP; qLAMP	Cao et al. 2017
<i>Rhizoctonia bataticola</i>	Grão de bico	Colônia pura; solo; tecido vegetal	LAMP	Ghosh et al. 2017
<i>Magnaporthe oryzae</i> <i>Triticum</i>	Trigo	Semente	LAMP	Yasuhara-Bell et al. 2018
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Arroz	Semente; esporos	LAMP; qLAMP	Ortega et al. 2018a; Li et al. 2019
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	Alface	Semente	LAMP	Ortega et al. 2018b
<i>Gaeumannomyces avenae</i>	Gramma	Tecido vegetal	LAMP	Karakkat et al. 2018
<i>Ophiosphaerella korrae</i>	Gramma	Tecido vegetal	LAMP	Karakkat et al. 2018
<i>Magnaportheiopsis poae</i>	Gramma	Tecido vegetal	LAMP	Karakkat et al. 2018
<i>Ustilaginoidea virens</i>	Arroz	Colônia pura; panícula; semente	LAMP	Yang et al. 2018
<i>Tilletia caries</i>	Trigo	Grãos	LAMP	Pieczul et al. 2018
<i>Tilletia laevis</i>	Trigo	Grãos	LAMP	Pieczul et al. 2018
<i>Tilletia controversa</i>	Trigo	Grãos	LAMP	Pieczul et al. 2018
<i>Puccinia triticina</i>	Trigo	Folha	LAMP	Manjunatha et al. 2018
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Tomate e Eustoma	Água; solo; folha	LAMP	Feng et al. 2018
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Arroz	Semente; Plântula	LAMP	Zhang et al. 2019
<i>Calonectria ilicicola</i>	Abacate	Raiz	LAMP	Parkinson et al. 2019
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	Abacate	Raiz	LAMP	Parkinson et al. 2019
<i>Dactylonectria</i> genus	Abacate	Raiz	LAMP	Parkinson et al. 2019

<i>Uromyces betae</i>	Beterraba	Colônia pura; esporos capturados no ar	LAMP	Kaczmarek et al. 2019
<i>Ustilago tritici</i>	Trigo	Colônia pura	LAMP	Yan et al. 2019
<i>Alternaria alternata</i>	Pêra	Colônia pura; fruto	LAMP	Yang et al. 2019
<i>Monilinia fructicola</i>	Pêssego e Nectarina	Fruto	LAMP	Ortega et al. 2019
<i>Monilinia laxa</i>	Pêssego e Nectarina	Fruto	LAMP	Ortega et al. 2019
<i>Fusarium temperatum</i>	Milho	Colmo; grão	LAMP	Shan et al. 2019
<i>Talaromyces flavus</i>	Morango	Colônia pura; fruto; solo	LAMP	Panek & Frac 2019
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Nogueira	Tronco; água; esporos capturados no ar	qLAMP	Wang & Zhang et al. 2019
<i>Aternaria solani</i>	Batata	Esporos	qLAMP	Lees et al. 2019
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Soja	Colônia pura; solo; tecido vegetal	qLAMP; LAMP	Grabicoski et al. 2020
<i>Neofabraea perennans</i>	Maçã	Colônia pura; fruto	LAMP	Enicks et al. 2020
<i>Pyricularia oryzae Triticum</i>	Trigo	Sementes	LAMP	Thierry et al. 2020
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Goiaba	Colônia pura; fruto	LAMP	Lan et al. 2020
<i>Raffaelea lauricola</i>	Louro	Colônia pura; tronco	LAMP	Hamilton et al. 2020
<i>Cercospora beticola</i>	Beterraba	Folha	LAMP	Shrestha et al. 2020
<i>Penicillium expansum</i>	Maçã e Uva	Fruto	LAMP	Frisch et al. 2021
<i>Venturia carpophila</i>	Pêssego	Fruto	LAMP	Zhou et al. 2021
<i>Valsa mali</i>	Maçã	Esporos	LAMP	Xu et al. 2021
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Morango	Tecido vegetal	LAMP	Katoh et al. 2021
<i>Pythium terrestres</i>	Soja	Colônia pura; plântulas; solo	LAMP	Feng et al 2021
<i>Pythium spinosum</i>	Soja	Colônia pura; plântulas; solo	LAMP	Feng et al 2021
“Candidatus <i>Pythium huanghuaiense</i> ”	Soja	Colônia pura; plântulas; solo	LAMP	Feng et al 2021

<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	Canola	Colônia pura	LAMP	Du et al. 2021
--------------------------------	--------	--------------	------	----------------

### 3.3 Bactérias

As bactérias causam doenças em diversas culturas de interesse agrícola e ornamentais. Estima-se que existam mais de 80 espécies de bactérias fitopatogênicas, e que cada espécie é dividida em subespécies (LE & VU 2017). Em relação a utilização de LAMP para detecção de patógenos, as bactérias se encontram no terceiro lugar quando comparamos ao número de trabalhos publicados. Em 2009, Li et al (2009) desenvolveram um teste LAMP convencional para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*. Para isso utilizou-se o DNA genômico da bactéria como molde na reação, sendo esse o trabalho pioneiro com LAMP para diagnosticar uma bactéria. O gênero *Xanthomonas* destaca-se na detecção através de LAMP, sendo utilizado na identificação de espécie, subespécie e patovar (tabela 3). Na tabela 3, estão os principais trabalhos publicados utilizando LAMP para detecção de diferentes espécies de bactérias.

**Tabela 3.** Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de bactérias.

Patógeno	Hospedeiro	Material utilizado	Tipo de LAMP	Referência
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Feijão	DNA genômico bactéria	LAMP	Li et al. 2009
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Citrus	Folha	LAMP	Rigano et al. 2010
<i>Rhodococcus fascians</i>	Flor do dia	Tecido vegetal	LAMP	Serdani et al. 2013
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Arroz	DNA genômico; semente; folha	qLAMP	Lang et al. 2014
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Arroz	DNA genômico; semente; folha	qLAMP	Lang et al. 2014
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	Arroz	Exsudato de material vegetal	LAMP	Ash et al. 2014
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>musacearum</i>	Banana	Tecido vegetal	LAMP; qLAMP	Hodgetts et al. 2015
<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	Batata	Tecido vegetal	LAMP	Ravindran et al. 2015
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Morango	Tecido vegetal	LAMP	Wang & Turechek 2016
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Milho	DNA genômico bactéria; folha	LAMP	Yasuhara-Bell et al. 2016

<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Batata	Tecido vegetal	LAMP	Yasuhara-Bell et al. 2016
<i>Xanthomonas translucens</i>	Trigo; cevada	Semente; folha	LAMP	Langlois et al. 2017
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. lachrymans</i>	Pepino	Folha	LAMP	Meng et al. 2017
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Cana de açúcar	DNA genômico bactéria; seiva do xilema; folha	LAMP	Naidoo et al. 2017
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Tomate	DNA genômico bactéria; folha	LAMP; qLAMP	Larrea-Sarmiento et al. 2018
<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	Videira	Tecido vegetal	LAMP	Burbank & Ortega 2018
<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>	Videira	Tecido vegetal	LAMP	Burbank & Ortega 2018
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	Citrus	Nervura central da folha; folha	LAMP	Rigano et al 2014; Choi et al. 2018
<i>Dickeya dianthicola</i>	Batata	DNA genômico bactéria; tecido vegetal	LAMP	Ocenar et al. 2019
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Batata	DNA genômico bactéria	LAMP	Sagcan & Kara 2019
<i>Pectobacterium aroidearum</i>	Konjak	Tecido vegetal; solo	LAMP	Sun et al. 2019
<i>Xylella fastidiosa</i>	Mirtilo	Pecíolo	LAMP	Waliullah et al. 2019
<i>Xanthomonas phaseoli</i> <i>pv. phaseoli</i>	Feijão	DNA genômico bactéria; sementes; folhas	LAMP	Paiva et al. 2020
<i>Xanthomonas citri</i> <i>pv. fuscans</i>	Feijão	DNA genômico bactéria; sementes; folhas	LAMP	Paiva et al. 2020
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	Pêssego	DNA genômico bactéria	LAMP	Goudarzi & Mortazavi 2020
<i>Erwinia amylovora</i>	Maçã	Tecido vegetal	LAMP	Singh et al. 2020
<i>Xanthomonas vasicola</i> <i>pv. vasculorum</i>	Milho	Folha	LAMP	Stulberg et al. 2020
<i>Xanthomonas vasicola</i> <i>pv. vasculorum</i>	Milho	Folha	LAMP	Stulberg et al. 2020
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Batata doce	Tecido vegetal	LAMP	Li et al. 2021



### 3.4 Fitoplasmas

Os fitoplasmas são parasitas obrigatórios, procariotos, pleiomórficos e não possuem parede celular. São associados a mais de 600 doenças de plantas em todo o mundo (BERTACCINI 2007). Durante várias décadas, a falta de métodos eficazes para identificar e caracterizar fitoplasmas dificultou sua identificação e conseqüentemente o seu manejo. O advento das ferramentas moleculares possibilitou a classificação dos fitoplasmas em grupos e subgrupos, principalmente pela análise da sequência do gene 16S rRNA (IRPCM, 2004). Embora ainda lenta, a aplicação de LAMP para detecção de fitoplasmas vem sendo feita desde 2011. Na tabela 4 encontram-se os trabalhos encontrados na literatura que utilizaram a técnica LAMP para detecção de fitoplasmas.

**Tabela 4.** Teste LAMP desenvolvido para diferentes espécies de fitoplasmas.

Nome da doença	Hospedeiro	Material utilizado	Tipo de LAMP	Referência
Napier stunt	Capim elefante	Folha	LAMP	Obura et al. 2011
Flavescence dorée	Videira	Folhas; flores; frutos	LAMP	Kogovšek et al. 2015
Arecanut yellow leaf disease (YLD)	Palmeira	Folha	LAMP; qLAMP	Nair et al. 2016
Coconut root wilt disease (RWD)	Palmeira	Folha	LAMP; qLAMP	Nair et al. 2016
Strawberry Green Petal (SbGP)	Morango; framboesa; mirtilo; amora	Tecido vegetal	LAMP	Pérez-López et al. 2017
Pear decline	Pêra	Tecido vegetal	LAMP	Siemonsmeier et al. 2019
Areca palm yellow leaf (AYL)	Palmeira	Folha	LAMP	Yu et al. 2020
Sesame phyllody	Gergelim	Folha	qLAMP	Quoc et al. 2021

### 3.5 Nematoides

Os nematoides causam danos significativos em culturas agrícolas e hortícolas. As perdas em rendimento são estimadas entre 8,8-14,6% anualmente em todo o mundo (ELLING 2013). Patógenos de difícil controle pois sobrevivem no solo sob diferentes condições de estresse e ainda a limitadas opções de manejo rápido, tornam a detecção precoce nos campos de cultivo uma ferramenta fundamental para o auxílio no controle de doenças causadas por este patógeno.

O primeiro teste LAMP desenvolvido para nematoides foi para a espécie *Bursaphelenchus xylophilus*, responsável por causar doença em pinos. Nesse estudo foi elaborado um LAMP convencional e os materiais utilizados foram amostras de madeira e DNA genômico (KIKUCHI et al. 2009).

Na tabela 5, são apresentados os trabalhos encontrados na literatura os quais utilizaram a técnica LAMP para detecção de nematoides, comparado com os outros patógenos sua utilização ainda é baixa. Em todos os trabalhos aplicou-se LAMP convencional para detecção.

**Tabela 5.** Teste LAMP desenvolvido para a detecção de diferentes espécies de nematoides.

Patógeno	Hospedeiro	Material utilizado	Tipo de LAMP	Referência
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Pinus	DNA genômico nematoide; madeira	LAMP	Kikuchi et al. 2009
<i>Meloidogyne enterolobii</i>	Tomate	DNA genômico nematoide	LAMP	Niu et al. 2012
<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Citrus	Solo	LAMP	Lin et al. 2016; Song et al. 2017
<i>Meloidogyne hapla</i>	Tomate	DNA genômico nematoide; raiz	LAMP	Peng et al. 2017
<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	Batata	Solo	LAMP	Zhang & Gleason 2019
<i>Meloidogyne fallax</i>	Batata	Solo	LAMP	Zhang & Gleason 2019
<i>Meloidogyne partityla</i>	Nogueira pecã	Raiz	LAMP	Waliullah et al. 2020
<i>Meloidogyne graminicola</i>	Arroz	Solo	LAMP	He et al. 2021
<i>Globodera rostochiensis</i>	Batata	Tecido vegetal	LAMP	Ahuja et al. 2021

#### 4. Considerações finais

LAMP é uma técnica rápida, versátil, específica e sensível que vem sendo amplamente utilizada na detecção de patógenos. Suas principais vantagens são: não necessitar de equipamentos sofisticados, nem de especialistas em biologia molecular para aplicação; além disso, a visualização do resultado pode ser feita diretamente a olho nu logo após o período de incubação. A aplicação de LAMP não se limita a detecção apenas de alvos de DNA, através da utilização de uma transcriptase reversa, RT-LAMP foi desenvolvido principalmente para detecção de vírus em plantas, que em sua maioria apresentam genoma de RNA. Por ser

altamente sensível, LAMP é capaz de detectar mutações no genoma dos organismos e com isso consegue identificar as espécies a nível de biótipo, patovar, raças e *formae speciales*. Além do mais, devido a sua sensibilidade é possível monitorar a resistência de fungos a diferentes fungicidas.

Além das suas várias vantagens, algumas limitações são observadas na aplicação da técnica. O desenho dos primers pode ser difícil, devido a necessidade de 4 a 6 primers de diferentes tamanhos. Além disso, concentrações excessivas dos indicadores (calceína, HNB, brometo de etídio) ou outros componentes da reação (formas iônicas de manganês ou cofatores da reação) podem inibir a reação da enzima ou alterar a cor do indicador, o que acaba prejudicando a eficácia da técnica (TANNER & EVANS, 2014). Como os alvos da amplificação são principalmente bactérias, vírus e outros microrganismos, estes podem estar livremente no ar e acabar contaminando as amostras gerando então falsos positivos. Dessa forma, para minimizar o risco, o manuseio das amostras deve ser feito com cuidado. E, de preferência, deve-se utilizar indicadores de cor em vez de eletroforese em gel de agarose, pois elimina uma etapa em que amostra seria manipulada. Ainda, o tempo de amplificação requerido pode afetar o resultado do teste. O tempo adequado fica entre 60 e 120 minutos, podendo ser menos caso sejam utilizados primers loop. No entanto, caso o tempo de incubação seja muito longo, as amostras negativas podem se tornar falsos positivos (FRANCOIS et al. 2011).

Ademais, LAMP tem grande potencial para ser utilizado em análises de pragas quarentenárias e para certificação de materiais livres de doenças, principalmente devido a rapidez com que o teste é aplicado. Pois, com o avanço da utilização da técnica, o tempo para obtenção do resultado vem sendo reduzido, principalmente devido alguns estudos demonstrarem que o mesmo pode ser aplicado diretamente na amostra, sem extração de DNA.

Devido sua simplicidade e facilidade de manipulação, LAMP pode ser aplicado em locais remotos, como nos campos de produção (WILISIANI et al. 2019; RAFIQ et al. 2021), beneficiando o manejo das doenças pois, com a detecção precoce do patógeno na lavoura medidas de controle podem ser adotadas de forma mais eficiente.

## 5. Referências

Abd-Elsalam, K.; Bahkali, A.; Moslem, M.; Amin, O.E.; Niessen, L (2010). An Optimized Protocol for DNA Extraction from Wheat Seeds and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) to Detect *Fusarium graminearum* Contamination of Wheat Grain. Int. J. Mol. Sci. 12:3459-3472.

Ahmadi S, Almasi MA, Fatehi F, Struik PC, Moradi A (2012). Visual Detection of *Potato leafroll virus* by One-step Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA with Hydroxynaphthol Blue Dye. *Journal of Phytopathology* 162:120-124.

Ahuja A, Joshi V, Singh G, Kundu A, Bhat CG, Kumar S, Rao U, Somvanshi VS. (2021). Rapid and sensitive detection of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by loop-mediated isothermal amplification assay. *3 Biotech*. ([https:// doi: 10.1007/s13205-021-02830-8](https://doi.org/10.1007/s13205-021-02830-8)).

Almasi MA, Ojaghkandi MA, Hemmatabadi A, Hamidi F, Aghaei S (2013). Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of the *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Pathology & Microbiology* 4:1-6.

Almasi MA, Hosseyni-Dehabadi M, Aghapour-ojaghkandi M (2014). Comparison and evaluation of three diagnostic methods for detection of *Beet curly top virus* in sugar beet using different visualizing systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 173:1836-1848.

Almasi MA (2017). Development of a colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mirafiori lettuce big-vein virus*. *Archives of Virology* 9:2775-2780.

Almasi MA & Almasi G (2017). Development and evaluation of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Archives of Virology* 162:495-500.

Al-Sheikh HM (2015). LAMP-PCR detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species collected from peanut kernel. *Genet Mol Res*. 30:634-644.

Ash GJ, Lang JM, Triplett LR, Stodart BJ, Verdier V, Vera Cruz C, Rott P, Leach JE (2014). Development of a genomics-based LAMP (loop-mediated isothermal amplification) assay for detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice. *Plant Disease* 98:909-915.

Ayukawa Y, Komatsu K, Kashiwa T, Akai K, Yamada M, Teraoka T, Arie T. (2016). Detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 using loop-mediated isothermal amplification with three primer sets. *Lett Appl Microbiol*. 63:202-209.

Banerjee A, Roy S, Sharma SK et al (2016). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid diagnosis of *Chilli veinal mottle virus*. *Archives of Virology* 161:1957–1961.

Bertaccini A (2007) Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers Bioscience* 12:673–689.

Bhat AI, Siljo A, Deeshma KP (2013). Rapid detection of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Virological Methods* 193:190-196.

Budziszewska M, Wiczorek P, Obre A, Obrepalska-Stepłowska A (2016). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of *Tomato torrado virus*. *Archives of Virology* 161:1359-1364.

Burbank LP & Ortega BC (2018). Novel amplification targets for rapid detection and differentiation of *Xylella fastidiosa* subspecies *fastidiosa* and *multiplex* in plant and insect tissues. *Journal of Microbiological Methods* 155:8-18.

Cao Y, Wang L, Duan L. et al. (2017) Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Ustilago maydis*. *Sci Rep* 7:13394.

Chandra A, Keizerweerd AT, Que Y, Grisham MP. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. *Mol Biol Rep.* 42:1309-1316.

Chandra A, Keizerweerd AT, Grisham MP. (2016). Detection of *Puccinia kuehnii* Causing Sugarcane Orange Rust with a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Assay. *Mol Biotechnol.* 58:188-196.

Chen XY, Wang XF, Jin N, Zhou Y, Huang SA, Miao QM (2012). Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification. *International Journal of. Molecular Sciences* 13:14421–14433.

Chen X, Ma L, Qiang S, Ma D. (2016). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid diagnosis of *Ascochyta rabiei* L. in chickpeas. *Sci Rep.* 6:25688.

Chen L, Jiao Z, Liu D, Liu X, Xia Z, Deng C, Zhou T, Fan Z (2017). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Maize chlorotic mottle virus in maize*. *Journal of Virological Methods* 240:49-53.

Chen Z, Mao S, Zhang W, Fan X, Wu W, Liu C, Zhao K, Lu R (2020). Rapid visual detection method for *Barley yellow mosaic virus* using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Plant Disease* (doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1216-RE).

Chen S, Schnabel G, Yuan H, Luo C (2020). LAMP detection of the genetic element ‘Mona’ associated with DMI resistance in *Monilinia fructicola*. *Pest Management Science* 75:779-786.

Choi CW, Hyun JW, Hwang RY, Powell C (2018). Loop-mediated Isothermal Amplification assay for Detection of *Candidatus Liberibacter Asiaticus*, a Causal Agent of Citrus Huanglongbing. *The Plant Pathology Journal* 34:499-505.

Choudhary, P., Rai, P., Yadav, J. et al. (2020). A rapid colorimetric LAMP assay for detection of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA causing sheath blight of rice. *Scientific Reports* 10:22022.

Congdon BS, Kehoe MA, Filardo FF, Coutts BA (2019). In-field capable loop-mediated isothermal amplification detection of *Turnip yellows virus* in plants and its principal aphid vector *Myzus persicae*. *Journal of Virological Methods* 265:15-21.

Dai TT, Lu CC, Lu J, Dong S, Ye W, Wang Y, Zheng X (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. *FEMS Microbiology Letters* 334:27–34.

Du R, Huang Y, Zhang J, Yang L, Wu M, Li G. (2021). LAMP Detection and Identification of the Blackleg Pathogen *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'. Plant Disease. ([https://doi: 10.1094/PDIS-08-20-1819-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1819-RE)).

Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J, Zhou M (2014). Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. Scientific Reports. 18:4:7094.

Duan YB, Ge CY, Zhang XK, Wang JX, Zhou MG (2014) Development and Evaluation of a Novel and Rapid Detection Assay for *Botrytis cinerea* Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification. PLoS ONE 9:e111094.

Duan Y, Yang Y, Wang J. et al. (2015). Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detecting the highly benzimidazole-resistant isolates in *Sclerotinia sclerotiorum*. Scientific Reports 5:17278.

Duan YB, Yang Y, Wang JX, Chen CJ, Steinberg G, Fraaije BA, Zhou MG (2018). Simultaneous Detection of Multiple Benzimidazole-Resistant  $\beta$ -Tubulin Variants of *Botrytis cinerea* using Loop-Mediated Isothermal Amplification Plant Disease 102:2016-2024.

Denschlag C, Vogel RF, Niessen L (2012). Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium* spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. International Journal of Food Microbiology 156:189-196.

Elling AA (2013). Major emerging problems with minor Meloidogyne species. Phytopathology 103:1092-1102.

Elvira-González L, Puchades AV, Carpino C, Alfaro-Fernandez A, Font-San-Ambrosio MI, Rubio L, Galipienso L (2017). Fast detection of *Southern tomato virus* by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Journal of Virological Methods 241:11-14.

Fan F, Yin WX, Li GQ, Luo CX (2018). Development of a LAMP Method for Detecting SDHI Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea*. Plant Disease 108:1612-1618.

Feng W, Ishiguro Y, Hotta K, Watanabe H, Suga H, Kageyama K (2015). Simple detection of *Pythium irregulare* using loop-mediated isothermal amplification assay. FEMS Microbiol Lett. 362(21):fzv174.

Feng W, Nukaya A, Satou M, Fukuta N, Ishiguro Y, Suga H, Kageyama K (2018). Use of LAMP Detection to Identify Potential Contamination Sources of Plant-Pathogenic *Pythium* Species in Hydroponic Culture Systems of Tomato and Eustoma. Plant Disease 102:1357-1364.

Feng H, Ye W, Liu Z, Wang Y, Chen JJ, Wang Y, Zheng X. (2021). Development of LAMP assays using a novel target gene for specific detection of *Pythium terrestris*, *Pythium spinosum*, and "Candidatus *Pythium huanghuaiense*". Plant Disease. ([https:// doi: 10.1094/PDIS-01-21-0068-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0068-RE)).

Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenzel J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 62:41-48.

Frisch LM, Mann, MA, Marek DN, Niessen L. (2021). Development and optimization of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the species-specific detection of *Penicillium expansum*. *Food Microbiol.* 95:103681.

Fukuta S, Kato S, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y (2003). Detection of *Tomato yellow leaf curl virus* by loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods* 122:35-40a.

Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y (2003). Detection of *Japanese yam mosaic virus* by RT-LAMP. *Archives of Virology* 148:1713-1720b.

Fukuta S, Ohishi K, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Kanbe M (2004). Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tomato spotted wilt virus* from chrysanthemum. *Journal of Virological Methods* 121:49-55.

Fukuta S, Tamura M, Maejima H, Takahashi R, Kuwayama T, Tsuji T, Yoshida T, Itoh K, Hashizume H, Nakajima Y, Uehara Y, Shirako Y (2013). Differential detection of *Wheat yellow mosaic virus*, *Japanese soil-borne wheat mosaic virus* and *Chinese wheat mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods* 189:348-354.

Gawande SP, Raghavendra KP, Monga D, Nagrale DP, Kranthi S (2019). Rapid detection of *Tobacco streak virus* (TSV) in cotton (*Gossypium hirsutum*) based on Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 270:21-25.

Ghosh R, Nagavardhini A, Sengupta A. et al. (2015). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* - wilt pathogen of chickpea. *BMC Res Notes* 8:40.

Ghosh R, Tarafdar A, Sharma M. (2017). Rapid and sensitive diagnoses of dry root rot pathogen of chickpea (*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler) using loop-mediated isothermal amplification assay. *Scientific Reports* 7:42737.

Ghosh DK, Warghane A, Biswas KK (2019) Rapid and Sensitive Detection of Citrus tristeza virus Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay. *Methods in Molecular Biology* 2015:143-150.

Goudarzi R & Mortazavi MM (2020). Loop-mediated isothermal amplification: a rapid molecular technique for early diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* of stone fruits. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18:55.

Grabicoski EMG, Jaccoud-Filho DS, Henneberg L, Pileggi M (2020) Real-Time Quantitative and Ion-Metal Indicator LAMP-Based Assays for Rapid Detection of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 104:1514-1526.

Hamilton JL, Workman JN, Nairn CJ, Fraedrich SW, Villari C. (2020). Rapid Detection of *Raffaelea lauricola* Directly from Host Plant and Beetle Vector Tissues Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* 104:3151-3158.

Hansen ZR, Knaus BJ, Tabima JF, Press CM, Judelson HS, Grünwald NJ, Smart CD. (2016). Loop-mediated isothermal amplification for detection of the tomato and potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. J Appl Microbiol. 120:1010-1020.

Hao X, Wang L, Zhang X, Zhong Q, Hajano JUD, Xu L, Wu Y. (2021). A real-time loop-mediated isothermal amplification for detection of the *Wheat dwarf virus* in wheat and the insect vector *Psammotettix alienus*. Plant Disease. ([https://doi: 10.1094/PDIS-10-20-2279-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2279-RE)).

Hasiów-Jaroszewska B & Borodynko N (2013). Detection of *Pepino mosaic virus* isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Archives of Virology 158:2153-2156.

Hasiów-Jaroszewska B, Budzyńska D, Borodynko N, Pospieszny H (2014). Rapid detection of genetically diverse *Tomato black ring virus* isolates using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Archives of Virology 160: 3075-3078.

He X, Xue F, Xu S, Wang W (2016). Rapid and sensitive detection of *Lily symptomless virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods 238:38-41.

He Q, Wang D, Tang B, Wang J, Zhang D, Liu Y, Cheng F. (2021). Rapid and Sensitive Detection of *Meloidogyne graminicola* in Soil Using Conventional PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Real-Time PCR Methods. Plant Disease. 105:456-463.

Hodgetts J, Hall J, Karamura G, Grant M, Studholme DJ, Boonham N, Karamura E, Smith JJ (2015). Rapid, specific, simple, in-field detection of *Xanthomonas campestris* pathovar *musacearum* by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Applied Microbiology 119:1651-1658.

Hu XR, Dai DJ, Wang HD et al. (2017) Rapid on-site evaluation of the development of resistance to quinone outside inhibitors in *Botrytis cinerea*. Scientific Reports 7:13861.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma working team - Phytoplasma taxonomy group (2004) 'Candidatus phytoplasma', a taxon for the wall-less, non helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. International Journal of Systematic Microbiology 54:1243-1255.

Jeong J, Cho SY, Lee WH, Ju HJ (2015). Development of a Rapid Detection Method for *Potato virus X* by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. The Plant Pathology Journal 31:219-225.

Johnson AMA, Dasgupta I, Gopal VRS (2014). Development of loop-mediated isothermal amplification and SYBR green real-time PCR methods for the detection of *Citrus yellow mosaic badnavirus* in citrus species. Journal of Virological Methods 203:9-14.

Karakkat BB, Hockemeyer K, Franchett M, Olson M, Mullenberg C, Koch PL. (2018). Detection of root-infecting fungi on cool-season turfgrasses using loop-mediated isothermal amplification and recombinase polymerase amplification. J Microbiol Methods 151:90-98.



Kaczmarek AM, King KM, West JS, Stevens M, Sparkes D, Dickinson MJ. (2019). A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid and Specific Detection of Airborne Inoculum of *Uromyces betae* (Sugar Beet Rust). *Plant Dis.* 103:417-421.

Katoh H, Yamazaki S, Fukuda T, Sonoda S, Nishigawa H, Natsuaki T. (2021). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* by Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease.* 105:1072-1079.

Keizerweerd AT, Chandra A, Grisham MP (2015). Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of *Sugarcane mosaic virus* and *Sorghum mosaic virus* in sugarcane. *Journal of Virological Methods* 212:23-29.

Kikuchi T, Aikawa T, Oeda Y, Karim N, Kanzaki N (2009) A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 99:1365-1369.

Kil EJ, Kim S, Lee YJ, Kang EH, Lee M, Cho SH, Kim MK, Lee KY, He NY, Cho HS, Kogovšek P, Hodgetts J, Hall J, Prezelj N, Nikolić P, Mehle N, Lenarčič R, Rotter A, Dickinson M, Boonham N, Dermastia M, Ravnikara M (2015). LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology* 64:286-296.

Kokane A, Kokane S, Warghane A, Gubyad MG, Sharma AK, Reddy KM, Ghosh DK (2020). A Rapid and Sensitive Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for the Detection of *Indian Citrus Ringspot Virus*. *Plant Disease* (doi: 10.1094/PDIS-06-20-1349-RE).

Kong X, Qin W, Huang X, Kong F, Schoen CD, Feng J, Wang Z, Zhang H. (2016). Development and application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Plasmopara viticola*. *Sci Rep.* 6:28935.

Kuan CP, Wu MT, Lu YL, Huang HC. (2010) Rapid detection of *Squash leaf curl virus* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 169:61–65.

Kwon ST, Lee S (2015). Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of *Tomato chlorosis virus* using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination. *Journal of Virological Methods* 213:68-74.

Lan C, Yao J, Yang X, Ruan H, Yu D, Jiang J. (2020). Specific and sensitive detection of the guava fruit anthracnose pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Can J Microbiol.* 66:17-24.

Lang JM, Langlois P, Nguyen HR, Triplett LR, Purdie L, Holton TA, Djikeng A, Vera Cruz M, Verdier V, Leach JE (2014). Sensitive Detection of *Xanthomonas oryzae* Pathovars *oryzae* and *oryzicola* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 80:4519-4530.

Larrea-Sarmiento A, Dhakal U, Boluk G. et al (2018). Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. Scientific Reports 8:14298

Langlois PA, Snelling J, Hamilton JP, Bragard C, Koebnik R, Verdier V, Triplett LR, Blom J, Tisserat NA, Leach JE (2017). Characterization of the *Xanthomonas translucens* Complex Using Draft Genomes, Comparative Genomics, Phylogenetic Analysis, and Diagnostic LAMP Assays. Phytopathology 107:519-527.

Lau YL, Lai MY, Teoh BT, Abd-Jamil J, Johari J, Sam SS, Tan KK, Abubakar S (2015). Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. PLoS One 18: e0138694.

Le DT & Vu NT (2017). Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. Applied Biological Chemistry 60: 169-180.

Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar A, Van Vuren PJ, Weyer J, Nel LH, Swanepoel R, Morita K, Paweska JT (2009). Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 47:645-651.

Lee MS, Yang MJ, Hseu YC, Lai GH, Chang WT, Hsu YH, Lin MK (2011). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Cymbidium mosaic virus*. Journal of Virological Methods 173:43-48.

Lee S, Kim JH, Choi JY, Jang WC (2015). Loop-mediated Isothermal Amplification Assay to Rapidly Detect Wheat Streak Mosaic Virus in Quarantined Plants. The Plant Pathology Journal 31:438-440.

Lees AK, Roberts DM, Lynott J, Sullivan L, Brierley JL. (2019). Real-Time PCR and LAMP Assays for the Detection of Spores of *Alternaria solani* and Sporangia of *Phytophthora infestans* to Inform Disease Risk Forecasting. Plant Dis. 103:3172-3180.

Lee S, Kim H, Lee JY, Rho JY (2017). Development of rapid and highly sensitive detection of *Bean common mosaic necrosis virus* in leguminous crops using loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of Virological Methods 249:117-120.

Li X, Nie J, Ward L, Madani M, Hsiang T, Zhao Y, De Boer SH (2009). Comparative genomics-guided loop-mediated isothermal amplification for characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Journal of Applied Microbiology 107:717-726.

Li R & Ling KS (2014). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of an emerging potyvirus: *Tomato necrotic stunt virus*. Journal of Virological Methods 200:35-40.

Li L, Zhang SY, Zhang CQ. (2019). Establishment of a Rapid Detection Method for Rice Blast Fungus Based on One-Step Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Plant Dis. 103:1967-1973.

Li H, Zhang H, Liu Z, Lin Z, Qiu Y, Tang H, Qiu S. (2021). Rapid diagnosis of *Ralstonia solanacearum* infection sweet potato in China by loop-mediated isothermal amplification. Arch Microbiol. 203:777-785.

Lin B, Wang H, Zhuo K, Liao J (2016). Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Tylenchulus semipenetrans* in Soil. Plant Disease 100:877-883.

Liu Y, Wang Z, Qian Y, Jianmin M, Shen L, Wang F, Yang J (2010). Rapid detection of *Tobacco mosaic virus* using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. Archives of Virology 155:1681-1685.

Li JY, Wei Q, Liu Y, Tan XQ, Zhang WN, Wu JY, Charimbu MK, Hu BS, Cheng ZB, Yu C, Tao XR (2013). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Cucumber green mottle mosaic virus*, Journal of Virological Methods 193:583-588.

Liu H, Wu W, Tan J, Li Y, Mi W, Jiang L, Wu Y (2019). Development and evaluation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of *Citrus leaf blotch virus*. Journal of Virological Methods 270:150-152.

Liu, Y.H., Yuan, S.K., Hu, X.R. et al. (2019). Shift of Sensitivity in *Botrytis cinerea* to Benzimidazole Fungicides in Strawberry Greenhouse Ascribing to the Rising-lowering of E198A Subpopulation and its Visual, On-site Monitoring by Loop-mediated Isothermal Amplification. Scientific Reports 9:11644.

Lu C, Song B, Zhang H, Wang Y, Zheng X (2015). Rapid Diagnosis of Soybean Seedling Blight Caused by *Rhizoctonia solani* and Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina phaseolina* Using LAMP Assays. Phytopathology. 105:1612-1617.

Lu Y, Yao B, Wang G, Hong N (2018). The detection of ACLSV and ASPV in pear plants by RT-LAMP assays. Journal of Virological Methods 252:80-85.

Manjunatha C, Sharma S, Kulshreshtha D, Gupta S, Singh K, Bhardwaj SC, Aggarwal R. (2018). Rapid detection of *Puccinia triticina* causing leaf rust of wheat by PCR and loop mediated isothermal amplification. PLoS One. 26:e0196409.

Meena PN, Kharbikar LL, Rana RS, Satpathy S, Shanware A, Sivalingam PN, Nandanwar S (2019) Detection of *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV) in field samples by a loop-mediated isothermal amplification reaction. Journal of Virological Methods 263:81-87.

Meng XL, Xie XW, Shi YX, Chai AL, Ma ZH, Li BJ (2017). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *hrpZ* gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves. Journal of Applied Microbiology 122:441-449.

Mori Y & Notomi T (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. Journal of Infection and Chemotherapy 5:62-9.

Mori Y, Kanda H, Notomi T (2013) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy* 19:404-411.

Naido N, Ghai M, Moodley K, Mkize L, Martin L, McFarlane S, Rutherford S (2017). Modified RS-LAMP assay and use of lateral flow devices for rapid detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Letters in Applied Microbiology* 65:496-503.

Nair S, Manimekalai R, Raj PG, Hegde V (2016). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of coconut root wilt disease and arecanut yellow leaf disease phytoplasma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32:108.

Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16:223–229.

Naidu RA & Hughes JD (2001). Methods for the detection of plant virus diseases. Paper presented at the Plant virology in sub-Saharan Africa, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. p. 233-253.

Enicks DA, Bomberger RA, Amiri A (2020). Development of a Portable LAMP Assay for Detection of *Neofabraea perennans* in Commercial Apple Fruit. *Plant Disease* 104:1-33.

Nie X (2005). Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA for Detection of *Potato virus Y*. *Plant Disease* 89:605-610.

Niessen L & Vogel RF (2010). Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int J Food Microbiol.* 140:183-91.

Niu JH, Jian H, Guo QX, Chen CL, Wang XY, Liu Q, Guo YD. (2012). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology.* 61:809-819.

Nkere CK, Oyekanmi JO, Silva G. et al (2018). Chromogenic detection of yam mosaic virus by closed-tube reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (CT-RT-LAMP). *Archives of Virology* 163:1057–1061.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28:1-7.

Obura E, Masiga D, Wachira F, Gurja B, Khan ZR (2011). Detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP). *Journal of Microbiological Methods* 84:312-316.

Ocenar J, Arizala D, Boluk G, Dhakal U, Gunarathne S, Paudel S, Dobhai S, Arif M (2019). Development of a robust, field-deployable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific detection of potato pathogen *Dickeya dianthicola* targeting a unique genomic region. *PloS ONE* 24:14 e0218868

Okuda M, Okuda S, Iwai W (2015). Detection of *Cucurbit chlorotic yellows virus* from *Bemisia tabaci* captured on sticky traps using reverse transcription loop-mediated isothermal

amplification (RT-LAMP) and simple template preparation. *Journal of Virological Methods* 221:9-14.

Ortega SF, Tomlinson J, Hodgetts J, Spadaro D, Gullino ML, Boonham N. (2018). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for the Detection of Seedborne Fungal Pathogens *Fusarium fujikuroi* and *Magnaporthe oryzae* in Rice Seed. *Plant Dis.* 102:1549-1558<sup>a</sup>.

Ortega SF, Tomlinson J, Gilardi G, Spadaro D, Gullino ML, Garibaldi A, Boonham N (2018). Rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on soil, lettuce seeds and plants using loop-mediated isothermal amplification. *Plant Pathology* 67:1462-1473b.

Ortega SF, Del Pilar Bustos López M, Nari L, Boonham N, Gullino ML, Spadaro D. (2019). Rapid Detection of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* on Peach and Nectarine using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* 103:2305-2314.

Paiva BAR, Wendland A, Teixeira NC, Ferreira MASV (2019). Rapid Detection of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* in Common Bean by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease* 104:198-203.

Panek, J., Fraç, M. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) approach for detection of heat-resistant *Talaromyces flavus* species. *Sci Rep* 9:5846.

Parkinson LE, Le DP, Dann EK. (2019). Development of Three Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays for the Rapid Detection of *Calonectria ilicicola*, *Dactylonectria macrodidyma*, and the *Dactylonectria* Genus in Avocado Roots. *Plant Dis.* 103:1865-1875.

Peng J, Zhang J, Xia Z, Li Y (2014). Rapid and sensitive detection of *Banana bunchy top virus* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 185:254-258.

Pieczul K, Perek A, Kubiak K. (2018). Detection of *Tilletia caries*, *Tilletia laevis* and *Tilletia controversa* wheat grain contamination using loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP). *J Microbiol Methods.* 154:141-146.

Peng J, Zhang H, Chen F, Zhang X, Xie Y, Hou X, Li G, Pu J (2014). Rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in soil by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification. *J Appl Microbiol.* 117:1740-1749.

Peng H, Long H, Huang W, Liu J, Cui J, Kong L, Hu X, Gu J, Peng D (2017). Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology. *Scientific Reports* 7:44853.

Peng D, Xie J, Wei Q, Ling KS, Guo L, Fan Z, Zhou T (2017). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of Virological Methods* 248:154-158.

Pérez-López E, Rodríguez-Martínez D, Olivier CY et al. (2017) Molecular diagnostic assays based on cpn60 UT sequences reveal the geographic distribution of subgroup 16SrXIII-(A/I) I phytoplasma in Mexico. *Scientific Reports* 7:950.

Qiao N, Dai H, Liu J, Zhu X, Li J, Zhang D, Liu Y. Detection of *Melon necrotic spot virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. PLoS One 5:15(3):e0230023.

Quoc NB, Xuan NTT, Nghiep NM, Phuong NDN, Linh TB, Chau NB, Chuong NDX, Nien NC, Dickinson M. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of sesame phyllody phytoplasmas in Vietnam. Folia Microbiologica. 66:273–283.

Rafiq A, Ali WR, Asif M, Ahmed N, Khan WS, Mansoor S, Bajwa SZ, Amin I. (2021). Development of a LAMP assay using a portable device for the real-time detection of Cotton leaf curl disease in field conditions. Bio Methods Protoc. (<https://doi:10.1093/biomethods/bpab010>).

Ravindran A, Lévy J, Pierson E, Gross DC (2015). Loop-Mediated Isothermal Amplification Procedure (LAMP) for Detection of the Potato Zebra Chip Pathogen "*Candidatus Liberibacter solanacearum*". Methods in Molecular Biology 1302:85-97.

Rigano LA, Marano MR, Castagnaro AP et al. (2010) Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. BMC Microbiology 10:1-8.

Rigano LA, Malamud F, Orce IG et al. (2014) Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. BMC Microbiology 14:1-9.

Rizzo D, Lio DD, Panattoni A, Salemi C, Cappellini G, Parella G. (2021). Rapid and Sensitive Detection of *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* in Tomato and Pepper Seeds by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays (Real Time and visual) and Comparison With RT-PCR End-Point and RT-qPCR Methods. Front Microbiol. 12:640932.

Rocha DC, Oliveira MB, de Freitas MA et al. (2017). Rapid detection of *Macrophomina phaseolina* in common bean seeds using a visual loop-mediated isothermal amplification assay. Australasian Plant Pathol. 46:205–212.

Romero Romero JL, Carver GD, Arce Johnson P, Perry KL, Thompson JR (2019). A rapid, sensitive and inexpensive method for detection of *Grapevine red blotch virus* without tissue extraction using loop-mediated isothermal amplification. Archives of Virology 164:1453-1457.

Roossinck MJ (2013) Plant virus ecology. PLoS Pathog 9:e1003304

Sagcan H & Kara NT (2019). Detection of Potato ring rot Pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Scientific Reports 31:20393.

Santos CA, Oliveira KG, Mendes GM, Silva LC, Souza Júnior MN, Estrela PFN, Guimarães RA, Silveira-Lacerda EP, Duarte GRM. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in Saliva by RT-LAMP During a Screening of Workers in Brazil, Including Pre-Symptomatic Carriers. J. Braz. Chem. Soc. (<https://doi:10.21577/0103-5053.20210098>).

Sarkes A, Fu H, Feindel D, Harding M, Feng J (2020) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). PLoS ONE 15(6): e0230403.

Sasaya T (2015). Detection Methods for Rice Viruses by a Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). *Methods in Molecular Biology* 1236:49-59

Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD, Luster DG (2003). Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annual Reviews Phytopathology* 41: 305-324.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ et al. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol.* 3:430–439.

Serdani M, Curtis M, Miller ML, Kraus J, Putnam ML (2013). Loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction methods for specific and rapid detection of *Rhodococcus fascians*. *Plant Disease* 97:517-529.

Shan L, Abdul Haseeb H, Zhang J, Zhang D, Jeffers DP, Dai X, Guo W. (2019). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of toxigenic *Fusarium temperatum* in maize stalks and kernels. *Int J Food Microbiol.* 291:72-78.

Shresta S, Neubauer J, Spanner R, Natwick M, Rios J, Metz N, Secor GA, Bolton M (2020). Rapid Detection of *Cercospora beticola* in Sugar Beet and Mutations Associated with Fungicide Resistance Using LAMP or Probe-Based qPCR. *Plant Disease* 104:1-41.

Shen W, Tuo D, Yan P, Yang Y, Li X, Zhou P (2014). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Papaya ringspot virus*. *Journal of Virological Methods* 204:93-100a.

ShenW, Tuo D, Yan P, Li X, Zhou P (2014). Detection of *Papaya leaf distortion mosaic virus* by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 195:174-179.

Siemonsmeier A, Hadersdorfer J, Neumüller M, Scwab W, Treutter D (2019). A LAMP Protocol for the Detection of ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’, the Causal Agent of Pear Decline. *Plant Disease* 103:1397-1404.

Silva SJR, Pardee K, Pena L. (2020). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review. *Viruses.* ([https:// doi:10.3390/v12010019](https://doi.org/10.3390/v12010019)).

Silva GNB, Barbosa Júnior WL, Cintra NL, Medeiros ZM. (2020). Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Detection of *Leishmania infantum* Strain from Brazil. *Iranian journal of parasitology.* 15:155–157.

Singh J, Cobb-Smith D, Higgins E, Khan A (2020). Comparative evaluation of lateral flow immunoassays, LAMP, and quantitative PCR for diagnosis of fire blight in apple orchards. *Journal of Plant Pathology* 31:1-12

Song ZQ, Cheng JE, Cheng FX, Zhang DY, Liu Y (2017). Development and Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Tylenchulus semipenetrans* Using DNA Extracted from Soil. *The Plant Pathology Journal* 33:184-192.

Stulberg MJ, Santillana G, Studholme DJ, Kasiborski B, Ortiz-Castro M, Broders K, Arias S, Block C, Munkyold G, Rascoe J (2020). Genomics-Informed Molecular Detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Strains Causing Severe Bacterial Leaf Streak of Corn. *Phytopathology* 110:1174-1179.

Su Y, Yang Y, Peng Q, Zhou D, Chen Y, Wang Z, Xu L, Que Y. (2016). Development and application of a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. *Sci Rep.* 6:23994.

Sun M, Liu H, Huang J, Peng J, Fei F, Zhang Y, Hsiang T, Zheng L (2019). A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Pectobacterium aroidearum* that Causes Soft Rot in Konjac. *International Journal of Molecular Sciences* 20:1937.

Suzuki R, Fukuta S, Matsumoto Y, Hasegawa T, Kojima H, Hotta M, Mivake N (2016). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay as a simple detection method of *Chrysanthemum stem necrosis virus* in chrysanthemum and tomato. *Journal of Virological Methods* 236:29-34

Takahashi R, Fukuta S, Kuroyanagi S, Miyake N, Nagai H, Kageyama K, Ishiguro Y (2014). Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Pythium helicoides*. *FEMS Microbiol Lett.* 355:28-35.

Tanner NA, Evans T. (2014). Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol.* 105:15.14.1-15.14.14.

Tanner NA, Zhang Y, Evans TC (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques* 58: 59-68.

Tahzima R, Foucart Y, Peusens G, Beliën T, Massart S, De Jonghe K (2019). New sensitive and fast detection of Little cherry virus 1 using loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 265:91-98.

Thierry M, Chatet A, Fournier E, Tharreau D, Ioos R. (2020). A PCR, qPCR, and LAMP Toolkit for the Detection of the Wheat Blast Pathogen in Seeds. *Plants (Basel).* 9:277.

Tiberini A, Tomlinson J, Micali G, Fontana A, Albanese G, Tomassoli L (2019). Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Onion yellow dwarf virus*. *Journal of Virological Methods.* 271:113680.

Tembo, M., Adediji, A.O., Bouvaine, S. et al (2020). A quick and sensitive diagnostic tool for detection of *Maize streak virus*. *Scientific Reports* 10:19633.

Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3:877–882.



Tomlinson JA, Dickinson MJ, 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* 100:143-9.

Tomlinson JA, Dickinson MJ, Boonham N. (2010). Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Lett Appl Microbiol.* 51:650-657.

Tomlinson JA, Ostoja-Starzewska S, Adams IP, Miano DW, Abidrabo P, Kinyua Z, Alicai T, Dickinson MJ, Peters D, Boonhan N, Smith J (2013). Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of the causal agents of cassava brown streak disease. *Journal of Virological Methods* 191:148-154.

United Nations. (2019). Department of Economic and Social Affairs, Population Division. *World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423)*.

Varga A & James D (2006). Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus* *Journal of Virological Methods* 138:184-190.

Venkataravanappa V, Ashwathappa KV, Reddy CNL, et al (2020) Characterization of *Tomato leaf curl New Delhi virus* associated with leaf curl and yellowing disease of Watermelon and development of LAMP assay for its detection. *Biotechniques* 10:282.

Vielba-Fernández A, Vicente A, Pérez-García A, Fernández-Ortuño D (2019). Monitoring Methyl Benzimidazole Carbamate-Resistant Isolates of the Cucurbit Powdery Mildew Pathogen, *Podosphaera xanthii*, Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease* 103:1515-1524.

Villari C, Tomlinson JA, Battisti A, Boonham N, Capretti P, Faccoli M (2013). Use of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Ophiostoma clavatum*, the primary blue stain fungus associated with *Ips acuminatus*. *Appl Environ Microbiol.* 79:2527-2533.

Waliullah S, Hudson O, Oliver JE, Brannen PM, Ji P, Ali ME (2019) Comparative analysis of different molecular and serological methods for detection of *Xylella fastidiosa* in blueberry. *PLoS ONE* 14(9): e0221903.

Waljullhah S, Bell J, Jagdale G, Stackhouse T, Hajihassani A, Brenneman T, Ali E (2020). Rapid detection of pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla*, in laboratory and field conditions using loop-mediated isothermal amplification. *PloS ONE* 15: e0228123.

Waliullah S, Ling KS, Cieniewicz EJ, Oliver JE, Ji P, Ali ME (2020). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Cucurbit Leaf Crumple Virus*. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1756.

Walsh HA & Pietersen G (2013). Rapid detection of *Grapevine leafroll-associated virus* type 3 using a reverse transcription loop-mediated amplification method. *Journal of Virological Methods* 194:308-316.

Wang H, Turechek WW (2016). A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Sample Preparation Procedure for Sensitive Detection of *Xanthomonas fragariae* in Strawberry. *PLoS ONE* 11:e0147122.

Wang QW, Zhang CQ. (2019). q-LAMP Assays for the Detection of *Botryosphaeria dothidea* Causing Chinese Hickory Canker in Trunk, Water, and Air Samples. *Plant Dis.* 103:3142-3149.

Wei QW, Yu C, Zhang SY, Yang CY, Miriam K, Zhang WN, Dou DL, Tao XR (2012). One-step detection of *Bean pod mottle virus* in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal* 9:187.

Wilisiani F, Tomiyama A, Katoh H, Hartono S, Neriva Y, Nishigawa H, Natsuaki T (2019). Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *Journal of Virological Methods* 265:71-76.

Wu X, Chen C, Xiao X, Deng MJ (2016). Development of Reverse Transcription Thermostable Helicase-Dependent DNA Amplification for the Detection of Tomato Spotted Wilt Virus. *Microbiological Methods* 99:1596-1599.

Wu JY, Hu XR, Zhang CQ (2019). Molecular Detection of QoI Resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Strawberry Anthracnose Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Plant Disease* 103:1319-1325.

Yan H, Zhang J, Ma D, Yin J. (2019). qPCR and loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Ustilago tritici*. *PeerJ.* 7:e7766.

Xu L, Wang Y, Zhu S, Li J, Chang Y, Huang L. (2021). Development and Application of a LAMP Assay for the Detection of the Latent Apple Tree Pathogen *Valsa mali*. *Plant Disease.* 105:1065-1071.

Yang X, Al-Attala MN, Zhang Y, Zhang AF, Zang HY, Gu CY, Gao TC, Chen Y, Al-Attala MN, Ali F, Li YF, Yao J, Zhu JG. (2018). Rapid Detection of *Ustilaginoidea virens* from Rice using Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Plant Dis.* 102:1741-1747.

Yang X, Qi YJ, Al-Attala MN, Gao ZH, Yi XK, Zhang AF, Zang HY, Gu CY, Gao TC, Chen Y. (2019). Rapid Detection of *Alternaria* Species Involved in Pear Black Spot Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* 103:3002-3008.

Yasuhara-Bell J, Marrero G, De Silva A, Alvarez AM (2016). Specific detection of *Pectobacterium carotovorum* by loop-mediated isothermal amplification. *Molecular Plant Pathology* 17:1499-1505.

Yasuhara-Bell J, Pedley KF, Farman M, Valent B, Stack JP. (2018). Specific Detection of the Wheat Blast Pathogen (*Magnaporthe oryzae Triticum*) by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* 102:2550-2559.

Yu SS, Che HY, Wang SJ, Lin CL, Lin MX, Song WW, Tang QH, Yan W, Qin WQ (2020). Rapid and Efficient Detection of 16SrI Group Areca Palm Yellow Leaf Phytoplasma in China by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *The Plant Pathology Journal* 36:459-467.

Zarzyńska-Nowak A, Hasiów-Jaroszewska B, Jeżewska M (2018). Molecular analysis of *Barley stripe mosaic virus* isolates differing in their biological properties and the development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for their detection. *Archives of Virology* 163:1163-1170.

Zhang ZY, Liu XJ, Li DW et al. (2011) Rapid detection of *Wheat yellow mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal* 8:550.

Zhang X, Harrington TC, Batzer JC, Kubota R, Peres NA, Gleason ML. (2016). Detection of *Colletotrichum acutatum* Sensu Lato on Strawberry by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* 100:1804-1812.

Zhang L & Gleason C (2019). Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Diagnostic Detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Plant Disease* 103:12-18.

Zhang SY, Dai DJ, Wang HD, Zhang CQ (2019). One-step loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Fusarium fujikuroi* in bakanae disease through NRPS31, an important gene in the gibberellic acid bio-synthesis. *Sci Rep.* 9:3726.

Zhang Y, Wang Y, Xie Z, Wang R, Guo Z, He Y (2020). Rapid Detection of *Lily mottle virus* and *Arabis mosaic virus* Infecting Lily (*Lilium* spp.) Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *The Plant Pathology Journal* 36:170-178.

Zhang Y, Xie Z, Fletcher JD, Wang Y, Guo Z, He Y (2020). Rapid and Sensitive Detection of Lettuce Necrotic Yellows Virus and Cucumber Mosaic Virus Infecting Lettuce (*Lactuca sativa* L.) by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *The Plant Pathology Journal* 36:76-86.

Zhang Y, Xie Z, Fletcher JD, Wang Y, Wang R, Guo Z, He Y (2020). Rapid and Sensitive Detection of Lettuce Necrotic Yellows Virus and Cucumber Mosaic Virus Infecting Lettuce (*Lactuca sativa* L.) by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *The Plant Pathology Journal* 36:76-86.

Zhao B, Yang D, Zhang Y. et al (2018) Rapid visual detection of lily mottle virus using a loop-mediated isothermal amplification method. *Archives of Virology* 163:545–548.

Zhou T, Du LL, Fan YJ, Zhou YJ (2012). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of RNA for sensitive and rapid detection of *Southern rice black-streaked dwarf virus*. *Journal of Virological Methods* 180:91–95.

Zhou Y, Fan F, Wang L, Chaisiri C, Yin LF, Yin WX, Luo CX. (2021). Development of a loop mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Venturia carpophila* on peach. *Pest Manag Sci.* 77:1383-1391.

Zhu J, Zhang L, Li H, Gao Y, Um W, Liu F (2020). Development of a LAMP method for detecting the N75S mutant in SDHI-resistant *Corynespora cassiicola*. *Analytical Biochemistry* 597:113687.

Zong X, Wang W, Wei H, Wang J, Chen X, Xu L, Zhu D, Liu O (2014). Rapid detection of *Prunus necrotic ringspot virus* using magnetic nanoparticle-assisted reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 208:85-89.

Artigo 2 – Neotropical entomology

**Rapid identification of *Trialeurodes vaporariorum* by loop-mediated isothermal amplification with or without DNA extraction**

Carolina Garcia Neves<sup>1</sup>, Ismail Teodoro de Souza Júnior<sup>1</sup>, Silvia Letícia da Pa Maich<sup>1</sup>, Renate Krause Sakate<sup>2</sup>,  
Danielle Ribeiro de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Departamento de Fitossandiade, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Departamento de Proteção Vegetal, Botucatu, São Paulo, Brasil

Danielle Ribeiro de Barros - [danrbarros@hotmail.com](mailto:danrbarros@hotmail.com) – (+55) 5332757384 - [orcid.org/0000-0002-9672-6089](https://orcid.org/0000-0002-9672-6089)

**Abstract**

The whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), is an economically important pest that is distributed worldwide, and its damage to plants can be direct or indirect. In this study, a rapid test based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was developed to identify *T. vaporariorum* without the need for DNA extraction from the samples. The primer group was designed based on the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene sequence. The results showed that the LAMP test is specific and sensitive for identifying whitefly species. In addition, it is rapid, requiring approximately 75 min to obtain a result. Different DNA methodologies were compared in the context of the LAMP test, and only one showed a satisfactory result. Thus, we excluded the DNA extraction step from the test, further increasing the speed of the test and avoiding the influence of inhibitors that may interfere with the LAMP reaction. It was concluded that the LAMP test to identify the whitefly *T. vaporariorum* does not require DNA extraction from the samples, facilitating its application in most locations as it does not require sophisticated equipment.

**Keywords:** LAMP, whitefly, mtCOI gene, change color

## Introduction

The greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) is a pest of great economic importance and widely distributed worldwide (Anderson *et al* 2004). The damage caused can be direct, by feeding on plant phloem, or indirect, by virus transmission and honeydew secretion (Colvin *et al* 2006). *T. vaporariorum* mainly transmits viruses belonging to the genera *Crinivirus* and *Torradovirus* (Navas-Castillo *et al* 2011).

The identification of this species has been performed through morphological studies of the wings, comparing the wings of *T. vaporariorum* with the wings of *Bemisia tabaci*. Because the wings are small, morphologically similar, and difficult to collect, morphological identification is difficult to perform, which, in addition to requiring intact organisms, is subject to errors and erroneous results (Hsieh *et al* 2012, Suzuki *et al* 2018). Currently, molecular techniques have been used as an alternative to assist in the identification of whitefly, including the amplification of mitochondrial gene cytochrome oxidase I (mtCOI). In general, these tests are highly specific but vary in terms of execution time and require sophisticated equipment, making it difficult to use them on a large scale (Boykin *et al* 2007, Dai *et al* 2012).

In the last two decades, advanced molecular techniques have emerged, with the focus being the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test based on the amplification of a specific region of the genomic DNA and carried out under isothermal conditions (Notomi *et al* 2000). The main advantage of this test is that results can be obtained within a shorter period than when using the main molecular diagnostic techniques currently available. This is mainly because the detection of amplified products can be done in such a way that the additional electrophoresis step is unnecessary and the process is, therefore, more rapid. Several methods are used to detect the amplified product, including adding indicators along with the reaction mixture, which will result in a color change of the reaction or emit fluorescence under UV light, highlighting the turbidity of the magnesium pyrophosphate at the bottom of the tube, which can be measured in real time or at the end of the reaction, or through a visible pH indicator, which will change the coloration of the mixture (Le *et al* 2012, Almasi *et al* 2013, Tanner *et al* 2015).

Thus, the objective of this study was to rapidly identify *T. vaporariorum* using the LAMP test with or without DNA extraction.

## Materials and methods

### Sampling and DNA extraction

The study was conducted at the Plant Virology Laboratory of the Federal University of Pelotas, Brasil. Pure colonies of adult whitefly species *T. vaporariorum* and *B. tabaci*, provided by the Laboratory of Vegetal Virology at Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, were used. DNA extraction of whiteflies was performed individually for each adult specimen, using the method described by Doyle & Doyle (1987). DNA quality and concentration were verified using a NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare, Life Sciences). DNA extracted was stored at -20°C until time of use.

### Primers LAMP design

The set of LAMP primers (Table 1) developed for the identification of *T. vaporariorum* based on the mtCOI gene sequence, were designed using PrimerExplorerV5 software (<http://primerexplorer.jp>). Each primer was tested in silico for similarity with other sequences available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) using the BLASTn algorithm.

Table 1. Sequence information of primer sets of LAMP used for amplification of target sequence in mtCOI gene of *Trialeurodes vaporariorum*.

Primer name	Sequence 5'–3'
TV-F3	GTTGACTTGCGACCTTGG
TV-B3	AGACCCCTATAATAGCGAA
TV-FIP (F1c-F2)	TGAGACCCCTAAAGTAAAAGAAA-CGTTTGTCATTTAATCCCT
TV-BIP (B1c-B2)	TTGGGTAATTCTTCTGTGGATGTT-CCCATAGATAAAAACATAGGAA

### Incubation time

To optimize the test and to establish the best incubation time, the reaction was performed at 65°C for the following times: 0, 30, 45, 60, 75, and 90 min. The reaction was performed in a total volume of 10 µL: 1.6 µM of each internal primer (FIP and BIP), 0.2 µM of each external primer (F3 and B3), 5 µL of WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England's BioLabs), an optimized formulation of Bst DNA polymerase, which contains a visible pH indicator. This system is based on the production of protons and a subsequent drop in the pH

of the medium, resulting in a change in the color of the reaction, from pink (negative) to yellow (positive) (Tanner *et al* 2015). As a template molecule, the DNA of *T. vaporariorum* was used at a concentration of 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  with sterile water as a negative control. Before incubation, the samples were denatured at 95°C for 10 min, and at the end of the reaction, they were kept at 80°C for 5 min for enzymatic inactivation. After amplification, the LAMP reactions were examined based on the color change from pink to yellow.

### **Specificity and sensitivity of LAMP primers**

The specificity of the primers was determined by testing the DNA of *T. vaporariorum* and the Middle East Asia Minor I (MEAMI), Mediterranean (MED), and New World (NW) species of the *B. tabaci* complex. To determine the sensitivity of the test, DNA was extracted as previously described, and serial dilutions were performed from 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  to 10<sup>-3</sup> ng  $\mu\text{L}^{-1}$  before being used in the reaction. The conditions of the LAMP reaction were performed as described above, with the samples incubated at 65°C for 60 min.

### **LAMP application without DNA extraction**

In this step, the LAMP test was applied using an adult specimen added directly to the reaction without DNA extraction. The specimen was placed in 4  $\mu\text{L}$  of sterile water, macerated, and incubated at 95°C for 10 min. The LAMP reaction mixture was then added as described above and incubated at 65°C for 60 min and at 80°C for 5 min.

### **Comparison of LAMP test using different DNA extraction methods and without DNA extraction**

Three DNA extraction methodologies were compared, which have different execution time and need for different reagents: Doyle & Doyle (1987) method, Chelex 100 (Walsh 1991), and PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™), with the application of LAMP without DNA extraction. DNA extraction was performed individually for each adult specimen, as indicated for each protocol. Incubation was performed as previously described.

### **LAMP validation without DNA extraction**

Adult whitefly specimens were collected from five sites in the state of Rio Grande do Sul and from different host plants (Table 2). Ten individuals were collected from each location, totaling 50 samples. The test was carried out directly and individually, using an adult whitefly specimen. An adult specimen of *T. vaporariorum* obtained from



the pure colony was used as a positive control, and sterile water was used as a negative control. Initially, the adult specimen was placed in 4  $\mu$ L of sterile water and macerated. The incubation was carried out at 95°C for 10 min, and then the LAMP reaction mixture was added, as described above, and incubated at 65°C for 60 min and 80°C for 5 min.

Table 2. Site of collection, coordinates, and host plant of whitefly individuals collected. Open Field (OF); Greenhouse (GH).

Site of Collection	Coordinates	Host plant
Boa Vista do Sul	29°20'04.4" S 51°40'42.4" W	<i>Solanum lycopersicum</i> (GH)
Canguçu	31°29'17.0" S 52°32'31.3" W	<i>S. lycopersicum</i> (OF)
São Marcos	28°56'10.3" S 51°08'00.2" W	<i>Ipomoea</i> sp. (GH)
Feliz	29°29'38.5" S 51°19'02.0" W	<i>S. lycopersicum</i> (GH)
Lajeado	29°27'29.6" S 52°00'59.3" W	<i>Bidens</i> sp. (GH)

## Results

### Incubation time

In this study, as a first step in applying the LAMP test, its optimization was performed. The minimum period required to verify the color change was 60 min incubation at 65°C, with no observed visual difference compared with that at 75 and 90 min (Figure 1A). Thus, to reduce the test time without loss of specificity and quality, the best incubation conditions were defined as 65°C for 60 min.

### Specificity and sensitivity of LAMP primers

The specificity test of the primer-only reaction with *T. vaporariorum* DNA showed a change in color from pink to yellow, indicating a positive outcome compared with that of samples containing DNA from the other three species of whitefly (Figure 1B). Thus, the results demonstrate that the primer set was designed for the specific

identification of *T. vaporariorum* by LAMP. Regarding the sensitivity test, the minimum detectable *T. vaporariorum* DNA concentration was 10 picograms (pg) per reaction (Figure 1C).

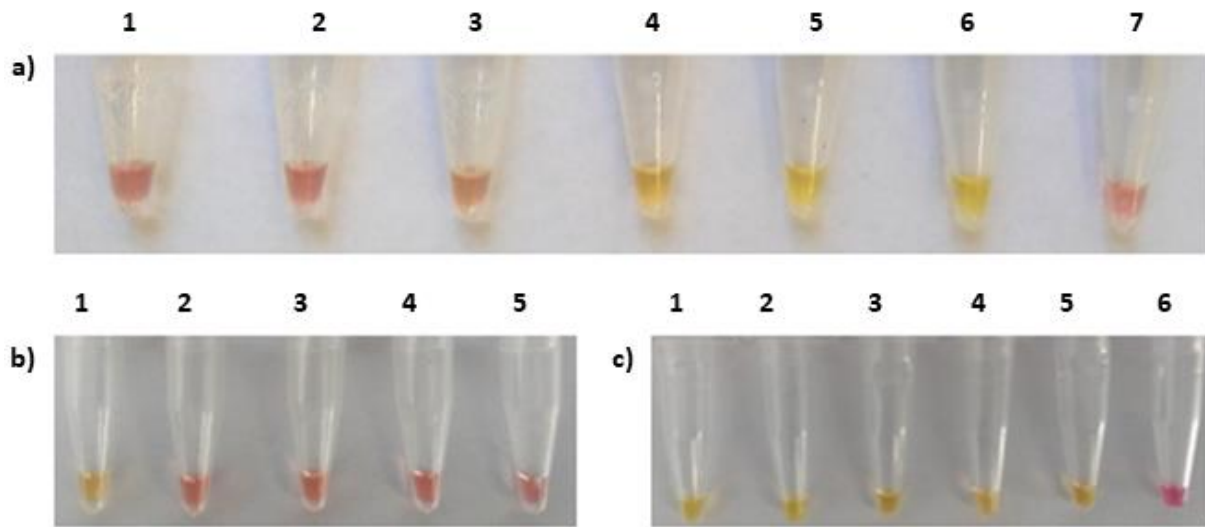


Fig 1 Results of LAMP assay optimization. (a) LAMP optimization: Lane 1: zero time; Lane 2: 30 min, Lane 3: 45 min; Lane 4: 60 min; Lane 5: 75 min; Lane 6: 90 min; Lane 7: negative control (sterile water); (b) LAMP primers specificity and (c) LAMP sensitivity (concentration of template DNA: ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ): Lane 1: 100; Lane 2: 10; Lane 3: 1; Lane 4:  $1 \cdot 10^{-1}$ ; Lane 5:  $1 \cdot 10^{-2}$ ; Lane 6:  $1 \cdot 10^{-3}$ .

### LAMP application without DNA extraction

When the test was performed without extracting the DNA from the samples, a change in the color of the reaction was observed only in the sample in which an adult specimen of *T. vaporariorum* was directly added, demonstrating that the test remains specific for identification of whitefly and the DNA extraction stage is, thus, unnecessary (Figure 2A). In the reactions in which adult specimens of other species of the *B. tabaci* complex (MEAM1, NW, and MED) were added, there was no change in the color of the reaction (Figure 2A).

### Comparison of LAMP test using different DNA extraction methods and without DNA extraction

The DNA samples extracted using the three methodologies, with different requirements regarding reagents and execution time, were subjected to the optimal incubation conditions (Table 3).

Table 3. Comparison between the methods used in DNA extraction and without DNA extraction to apply the LAMP test to identify *Trialeurodes vaporariorum*.

Method	Strategy	Running extraction (min) <sup>b</sup>	Extraction + LAMP (min)	Result
<b>Doyle &amp; Doyle</b>	CTAB	120	195	+
<b>Chelex 100</b>	Ion exchange	40	115	-
<b>DNA extraction kit<sup>a</sup></b>	Silica	20	95	-
<b>Without DNA extraction</b>	-	-	75	+

<sup>a</sup> PureLink Genomic DNA Mini Kit

<sup>b</sup> Approximate time for DNA extraction from adult specimens

A positive result was observed only in the samples where DNA extraction was performed using the Doyle and Doyle method (1987) and in the sample where DNA extraction was not performed, using a specimen of *T. vaporariorum* directly in the reaction (Figure 2B).

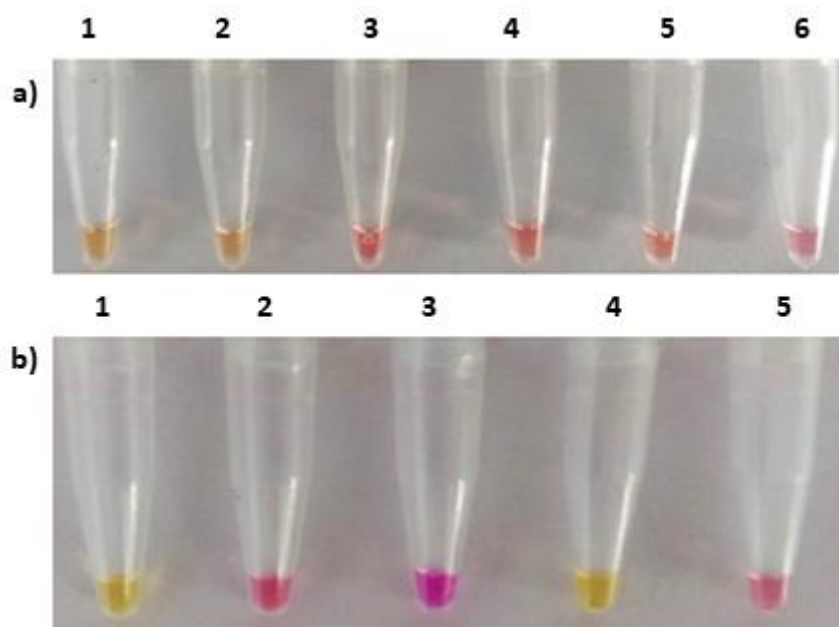


Fig 2 Results of LAMP assay with or without DNA extraction. **(a)** LAMP application without DNA extraction: Lane 1: *Trialeurodes vaporariorum*; Lane 2: *Trialeurodes vaporariorum*; Lane 3: *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor I; Lane 4: *Bemisia tabaci* New World; Lane 5: *Bemisia tabaci* Mediterranean; Lane 6: Negative control (sterile water); **(b)** LAMP application with different methods of DNA extraction and without DNA extraction. Lane 1: Doyle & Doyle (1987); Lane 2: PureLink Genomic DNA Mini Kit; Lane 3: Chelex (Walsh 1991); Lane 4: Without DNA extraction; Lane 5: Negative control (sterile water).

### LAMP validation without DNA extraction

The test validation of LAMP without DNA extraction was performed through the identification of whiteflies collected from different sites and hosts. All 10 samples collected in Boa Vista do Sul, from the host plant *S. lycopersicum*, and in Lajeado, from the host plant *Bidens* spp., were positive for *T. vaporariorum* (Figure 3A and 3E). However, of the 10 samples collected in the cities of Canguçu, from host plant *S. lycopersicum*, and São Marcos, host plant *Ipomoea* sp., 9 were identified as *T. vaporariorum* (Figure 3B and 3C). Of the 10 samples collected in the municipality of Feliz, from the host plant *S. lycopersicum*, 8 showed positive results for *T. vaporariorum*. With these results, we can observe that regardless of the host plant where the whiteflies are collected, the application of the LAMP test without DNA extraction can be used and presents a fast and safe result.

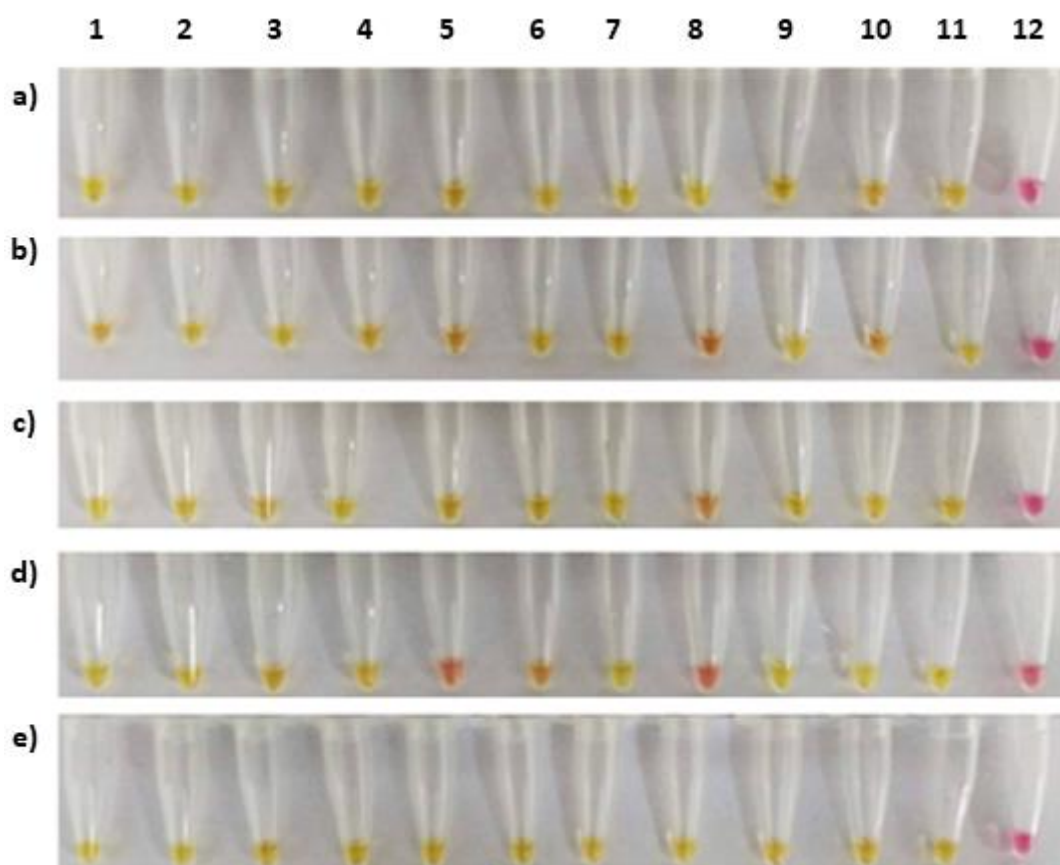


Fig 3 Validation of LAMP assay without DNA extraction in samples collected in different locations in Rio Grande do Sul. (a) Boa Vista do Sul; (b) Canguçu; (c) São Marcos; (d) Feliz; (e) Lajeado. Lanes 1–10: Samples of specimen adults collected in different locations in Rio Grande do Sul; Lane 11: Positive control (*Trialeurodes vaporariorum* obtained from the pure colony); Lane 12: Negative control (sterile water)

## Discussion

In this study, a rapid test was developed to identify the whitefly *T. vaporariorum* through LAMP with or without DNA extraction. The primers used in the rapid test were specific and sensitive for species identification, reflecting a minimum incubation time of 60 min to obtain a positive result. Thus, it is shown that LAMP is efficient for the identification of whitefly and has the advantages of speed and a minimum level of need for specific equipment.

There are different DNA extraction methodologies available, which differ in terms of execution time and cost. Of the three methodologies used in this study to extract DNA from a single adult specimen, only one was effective. To simplify the methodology, we eliminated the DNA extraction step; that is, we placed an adult specimen directly in the reaction. With the positive result, we concluded that the test would have a reduced execution time, lasting approximately 75 min, and can be performed directly in the field as long as the device used maintains a constant temperature.

Other studies have shown the use of LAMP to identify whitefly species, as in the case of Suzuki *et al* (2018) and Hsieh *et al* (2012). Although Suzuki *et al* (2018) also used the test to identify *T. vaporariorum*, their strategy was different, with specific reagents used for maceration of the whitefly and its application was through the LAMP multiplex. Thus, the application of the LAMP test without the previous extraction of DNA from the whitefly has not yet been performed. However, this approach has already been used as an example for the identification of *Thrips palmi*, another pest of great economic importance (Przybylska *et al* 2015).

The results of this study demonstrate the potential of this test to provide a fast, accurate, and sensitive molecular identification of the whitefly *T. vaporariorum*. With the LAMP identification methodology without the DNA extraction step, it was possible to decrease the execution time and cost and simplify the application of the test by eliminating the requirement of sophisticated equipment and minimizing handling of the sample to be tested. In addition, chances of potential interference with the result due to the reagents used for DNA extraction are also minimized where their use is not required. Furthermore, LAMP does not require experience in insect taxonomy and morphology and can be used as a diagnostic tool for samples in remote places under field conditions, as well as in diagnostic laboratories and extension services. LAMP can identify the potential pest species in 75 min and can assist in the adoption of early and targeted pest management to minimize losses.

**Acknowledgment:** The authors would like to thank CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - for their financial support.

**Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Authors' contributions:** All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Carolina Garcia Neves, Ismail Teodoro de Souza Júnior and Silvia Letícia da Paz Maich. The first draft of the manuscript was written by Carolina Garcia Neves and all authors commented on previous versions of the manuscript. Writing – review and editing were performed by Danielle Ribeiro de Barros and Renate Krause Sakate. Supervision: Danielle Ribeiro de Barros. All authors read and approved the final manuscript.

## References

- Almasi MA, Ojaghkandi MA, Hemmatabadi A, Hamidi F, Aghaei SJ (2013) Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of the *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 4:153. doi: 10.4172/2157-7471.1000153
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 19:535–544. doi:10.1016/j.tree.2004.07.021
- Boykin LM, Shatters RG, Rosell RC, McKenzie CL, Bagnall RA, De Barro P, Frohlich DR (2007) Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:1306–1319. doi: 10.1016/j.ympev.2007.04.020
- Colvin J, Omongo CA, Govindappa MR, Stevenson PC, Maruthi MN, Gibson G, Seal SE, Munivappa V (2006) Host-plant viral infection effects on arthropod-vector population growth, development and behaviour: management and epidemiological implications. *Advances in Virus Research* 67:419–452. doi:10.1016/S0065-3527(06)67011-5
- Dai TT, Lu CC, Lu J, Dong S, Ye W, Wang Y, Zheng X (2012) Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. *FEMS Microbiology Letters* 334:27–34. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02619.x

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Hsieh CH, Wang HY, Chen YF, Ko CC (2012) Loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of biotypes B and Q of the globally invasive pest *Bemisia tabaci*, and studying population dynamics. *Pest Management Science* 68:1206-1213. doi: 10.1002/ps.3298

Le TH, Nguyen NTB, Truong NH, De NV (2012) Development of Mitochondrial Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of the Small Liver Fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae; Trematoda; Platyhelminthes) *Journal of Clinical Microbiology* 50:1178–1184. 2012. doi: 10.1128/JCM.06277-11

Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E, Sánchez-Campos S (2011) Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49:219-248. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095235

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. doi: 10.1093/nar/28.12.e63

Przybylska A, Fiedler Ż, Kucharczyk H, Obrepalska-Stepłowska A (2015) Detection of the Quarantine Species Thrips palmi by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE* 10: e0122033. doi: 10.1371/journal.pone.0122033

Suzuki R, Tanaka H, Suzuki K, Fukuta S, Kato S, Ohno T (2018) Multiplex loop-mediated isothermal amplification assay for the identification of three major whitefly species in the greenhouse. *Journal of Applied Entomology* 142:745-754. doi: 10.1111/jen.12522

Tanner NA, Zhang Y, Evans TC (2015) Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques* 58:59-68. doi: 10.2144/000114253

### Artigo 3 – Tropical Plant Pathology



## **Desenvolvimento de um teste LAMP para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**

Carolina Garcia Neves<sup>1</sup>, Mateus Simionato Silva <sup>1</sup>, Anderson Eduardo Brunetto<sup>1</sup>, Ismail Teodoro Souza Júnior<sup>1</sup>, Cândida Jacobsen de Farias<sup>1</sup>, Danielle Ribeiro de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-610, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Danielle Ribeiro de Barros - danrbarros@hotmail.com – (+55) 5332757384 - orcid.org/0000-0002-9672-6089)

### **Resumo**

O mofo branco é uma doença que acomete a cultura da soja e causa sérias perdas na produtividade e qualidade das sementes. Sua disseminação ocorre principalmente através de sementes infectadas com micélio dormentes ou contaminadas com escleródios. Existem diferentes métodos para detecção de patógenos em sementes, porém sua eficiência varia devido a diversos fatores. A amplificação isotérmica mediada por loop é uma técnica molecular que vem sendo utilizada na detecção de patógenos em geral. Aqui desenvolvemos um teste LAMP para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. Os resultados mostram que é possível detectar o patógeno após 45 minutos de incubação quando utilizado como molde, DNA extraído de micélio da colônia pura do fungo, e para sementes artificialmente infectadas esse tempo foi de 60 minutos. Diferentes níveis de infecção foram testados com diferentes potenciais de inóculo e o resultado mostrou que quando o potencial de inóculo foi de 48 horas foi possível detectar o patógeno quando apenas 1% das sementes estavam infectadas. Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo demonstrando a utilização de LAMP para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja.

**Palavras-chave: amplification, diagnosis, white mold, inoculum potential, incidence**

## Introdução

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é considerada uma das principais culturas em nível mundial, e se destaca pela diversidade de emprego da produção. Os países com maior produção de soja atualmente são, Brasil, Estados Unidos e Argentina. No Brasil, na safra 2019/2020, foram produzidas 120 milhões de toneladas, em 36 milhões de hectares, com média de produtividade estimada em 3.250 kg ha<sup>-1</sup> (Conab 2020). Em todas as regiões onde é cultivada, a soja tem sua produção limitada por diversos fatores abióticos e bióticos que reduzem a produtividade e a qualidade das sementes (Lemes et al. 2015). Dentre os fatores bióticos, as doenças causadas por fungos são consideradas de maior importância, as quais reduzem a produtividade e a rentabilidade da cultura (Hartman et al. 2015).

O mofo branco, doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é responsável por reduzir severamente o rendimento da cultura da soja quando em condições ambientais favoráveis. Sua disseminação pode ocorrer através de ascósporos carregados pelo vento ou dispersos pela água (Adams and Ayers 1979; Kimati 1980) e, secundariamente, por meio dos escleródios em solos contaminados, água de irrigação ou implementos agrícolas. A longa distância, as sementes infectadas por micélio ou contaminadas com escleródios constituem a principal forma de disseminação deste fungo (Adams and Ayers 1979). A doença causa perdas que podem chegar até 30% em lavouras de soja e variam de acordo com diversos fatores, como tolerância da planta, fatores nutricionais e do ambiente (Nasser et al. 1999; Meyer et al. 2014).

Diferentes métodos para detecção do patógeno em sementes de soja são relatados, dentre eles: incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (“blotter test”); em rolo de papel e em meio ágar-bromofenol Neon (Nasser et al. 1999; Machado 2002; Peres et al. 2002; Taylor et al. 2006; Manual de Análise Sanitária de Sementes 2009). No entanto, a eficiência do método depende do nível de infecção do patógeno, podendo variar quando a semente é inoculada

artificialmente, onde o fungo é facilmente detectado ou quando as sementes são naturalmente infectadas, onde é observado uma diminuição na eficiência dos métodos (Hanneberg et al. 2012).

Com o avanço da biologia molecular, muitas técnicas têm surgido para facilitar no diagnóstico de doenças, principalmente aquelas baseadas na amplificação do DNA genômico. Dessa forma, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) tem sido amplamente utilizada em diversos campos biológicos. Sua reação pode ser realizada em uma única condição térmica e o resultado é observado a olho nu, através da mudança de coloração da reação (Notomi et al. 2000; Chen et al. 2012). LAMP apresenta vantagens em relação a outras técnicas moleculares, pois não necessita de equipamentos sofisticados para que possa ser empregada e o tempo para obtenção do resultado é mais rápido, já que não é necessário o passo adicional da eletroforese (Dai et al. 2012). Na patologia de sementes, LAMP já foi relatada sendo utilizada para detecção de *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão, *Fusarium fujikuroi* e *Magnaporthe oryzae* em sementes de arroz e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em sementes de alface (Rocha et al. 2017; Ortega et al. 2018a; Ortega et al. 2018b).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um teste baseado na amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja.

## **Material e métodos**

### **Isolados dos fungos e extração de DNA**

Os isolados dos fungos *S. sclerotiorum*, *Fusarium* spp e *Cercospora kikuchii* foram fornecidos pelo Laboratório de Patologia de Sementes, da Universidade Federal de Pelotas. Os fungos foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) por cinco dias, à temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento, o micélio produzido superficialmente foi raspado e utilizado para extração de DNA através do método descrito por Doyle and Doyle

(1987). A qualidade e concentração de DNA foram verificadas utilizando um espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, Life Sciences), seguida de eletroforese em gel de agarose 1% e visualização em transluminador.

### Primers LAMP

Os primers LAMP foram desenhados utilizando o software PrimerExplorer V5 (EikenChemicalCo.,Ltd.,Tóquio) disponível em <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index>. Estes foram baseados na sequência parcial do gene do fator de alongação 1-alfa (EF1-alpha). Cada primer foi testado *in silico* quanto à semelhança com outras sequências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) através do algoritmo BLASTn. Na tabela 1 são apresentadas as informações dos primers utilizados no trabalho.

**Tabela 1** Sequências dos primers LAMP utilizados para amplificação de uma porção do gene do fator de alongação 1-alfa (EF1-alpha) de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Nome do primer	Sequência 5'-3'
Sct-FIP	CAAATAAATGTCCGGTCGCAAATTTTTGGTGGGG TAAAGATTTTTCTTG
Sct-BIP	TATGACTATAAATTTGTCCGGGTGCTTTTTTCAGTTG GTGATGTGAAGC
Sct F3	TAATCTCATCGCGCTGTG
Sct B3	GTAAAAGATAGTTGGTATTGATCG

### Tempo de incubação

Para otimização do teste, a fim de estabelecer o melhor tempo de incubação, a reação foi colocada a 65°C nos seguintes tempos: 0, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. A reação foi realizada em um volume total de 10 µL: 1,6 µM de cada primer interno (FIP e BIP), 0,2 µM de cada primer externo (F3 e B3), 5 µl de WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England BioLabs), formulação otimizada da *Bst* DNA polimerase, a qual contém um indicador de pH visível. Seu sistema baseia-se na produção de prótons e subsequente queda do pH do

meio, resultando na alteração da coloração da reação, de rosa (negativo) para amarelo (positivo) (Tanner et al. 2015).

Como molécula molde foi utilizado o DNA micelial da colônia pura do fungo *S. sclerotiotum* na concentração de 50 ng/μl e água estéril como controle negativo. Antes da incubação, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos e ao final da foram mantidas a 80°C por 5 minutos para inativação enzimática. Após a amplificação, as reações LAMP foram examinadas com base na alteração de cor do rosa para o amarelo.

### **Especificidade e Sensibilidade dos primers LAMP**

A especificidade dos primers foi determinada testando-se os DNAs micelial das colônias puras dos fungos: *S. sclerotiorum*, *Fusarium sp* e *C. kikuchii*. O teste foi realizado como descrito acima com as amostras incubadas a 65°C por 60 minutos. Para determinar a sensibilidade do teste, foi utilizado DNA da colônia pura de *S. sclerotiorum*, o qual uma diluição seriada foi realizada de 100 ng. μL<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup>ng.μL<sup>-1</sup>, antes de ser usado na reação. O teste LAMP foi realizado como descrito acima e as amostras foram incubadas a 65°C por 45 minutos.

### **Inoculação das sementes com *S. sclerotiorum* e extração de DNA**

Cem sementes de soja foram artificialmente inoculadas com o isolado de *S. sclerotiorum* utilizando-se a técnica de restrição hídrica (Machado et al. 2004). Basicamente, as sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão durante 2 minutos em uma solução de NaHClO a 1%, seguido por secagem sobre papel de filtro estéril sob o fluxo laminar. O fungo foi cultivado por 5 dias em meio BDA a 25 ± 1°C em placas de petri, e então as sementes foram colocadas nas colônias fúngicas. As placas foram incubadas novamente por três diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas. Níveis de infecção artificial, isto é, de incidência de infecção de sementes, foram criados pela mistura de sementes de soja inoculadas e não infectadas, sendo

os tratamentos: 0/100 (0%), 1/100 (1%), 5/100 (5%), 10/100 (10%), 20/100 (20%) e 100/100 (100%). As amostras de sementes (100 por tratamento) foram moídas em um pó fino, utilizando um moedor de grãos. Três subamostras de 50 mg por tratamento foram usadas para extração de DNA utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

### **Aplicação do teste LAMP nas sementes de soja**

Antes de submeter as amostras ao teste LAMP, foi realizada a otimização do mesmo para amostras de sementes. Sendo assim, foi utilizado o DNA extraído do nível de infecção 100% com potencial de inóculo de 72 horas. A amostra foi submetida a incubação nos tempos 0, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos a fim de verificar o melhor tempo de trabalho.

Após, três subamostras em cada nível de infecção e potencial de inóculo foram submetidas ao teste LAMP. As reações foram realizadas conforme descrito anteriormente e incubadas a 65°C por 60 minutos.

## **Resultados**

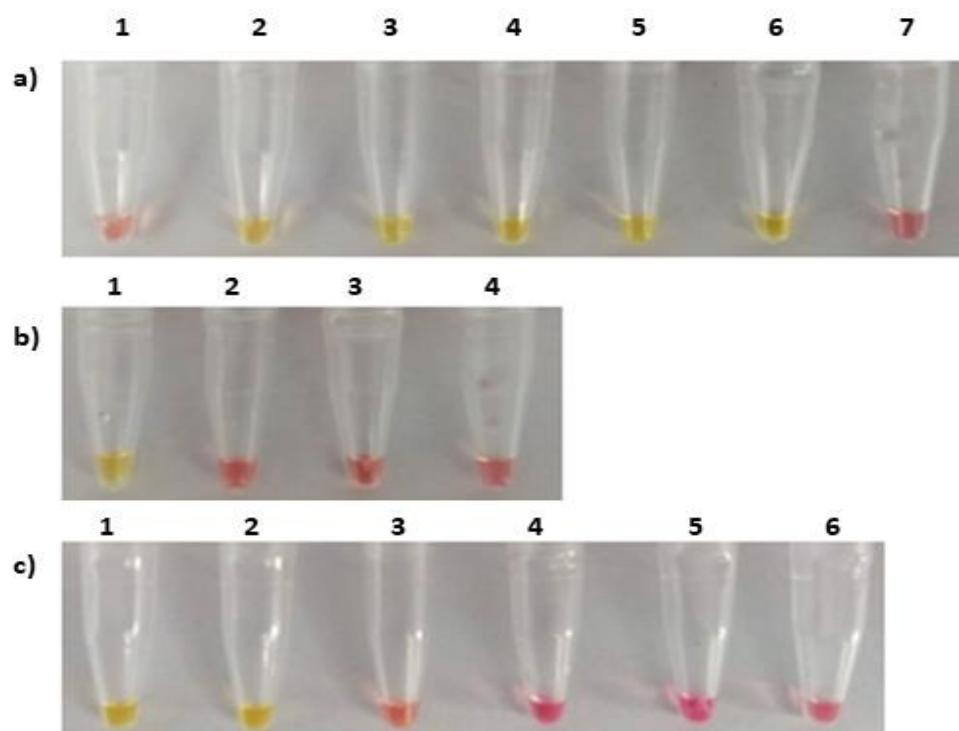
### **Tempo de incubação**

Neste estudo, primeiramente foi realizada a otimização do teste através de diferentes tempos de incubação para as amostras. Quando utilizado como molde DNA micelial de colônia pura do fungo *S. sclerotiorum*, o período mínimo necessário para verificar a mudança na coloração foi de 45 minutos de incubação a uma temperatura de 65°C. No entanto, não se observou diferença visual em relação aos tempos 60, 75 e 90 min (Figura 1A).

### **Especificidade e Sensibilidade dos primers LAMP**

No teste de especificidade dos primers, apenas a reação com DNA micelial de *S. sclerotiorum* apresentou mudança de coloração, do rosa para o amarelo, indicando resultado positivo, quando

comparada com as outras amostras com o DNA micelial de *Fusarium spp* e *C. kikuchii*, essas não apresentaram alteração na coloração (Figura 1B). Portanto, os resultados confirmam que o conjunto de primers desenhados para o trabalho foi específico para identificação do fungo *S. sclerotiorum*. No teste de sensibilidade, verificou-se que a concentração mínima de DNA micelial de *S. sclerotiorum* detectável, foi de 10 nanogramas (ng) por reação (Figura 1C).



**Fig1** Resultados da otimização do teste LAMP utilizando DNA micelial. (a) Tempo de incubação: Linha 1: tempo zero; Linha 2: 30 minutos; Linha 3: 45 minutos; Linha 4: 60 minutos; Linha 5: 75 minutos; Linha 6: 90 minutos; Linha 7: Controle negativo (água estéril); (b) Especificidade dos primers: Linha 1: *Sclerotinia sclerotiorum*; Linha 2: *Fusarium spp.*; Linha 3: *Cercospora kikuchii*; Linha 4: controle negativo (água estéril) e (c) Sensibilidade do teste (concentração do DNA molde:  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ): Linha 1: 100; Linha 2: 10; Linha 3: 1; Linha 4:  $1 \cdot 10^{-1}$ ; Linha 5:  $1 \cdot 10^{-2}$ ; Linha 6:  $1 \cdot 10^{-3}$ .

### Aplicação do teste LAMP em sementes de soja

Na otimização do teste para sementes, a amostra do nível de infecção 100% no tempo 72 horas, foi incubada em diferentes tempos (0, 30, 45, 60, 75 e 90 min) e foi verificado que o tempo mínimo necessário para obtenção do resultado positivo foi de 60 min. Não havendo diferença visual em relação aos tempos 75 e 90 min (Figura 2A).

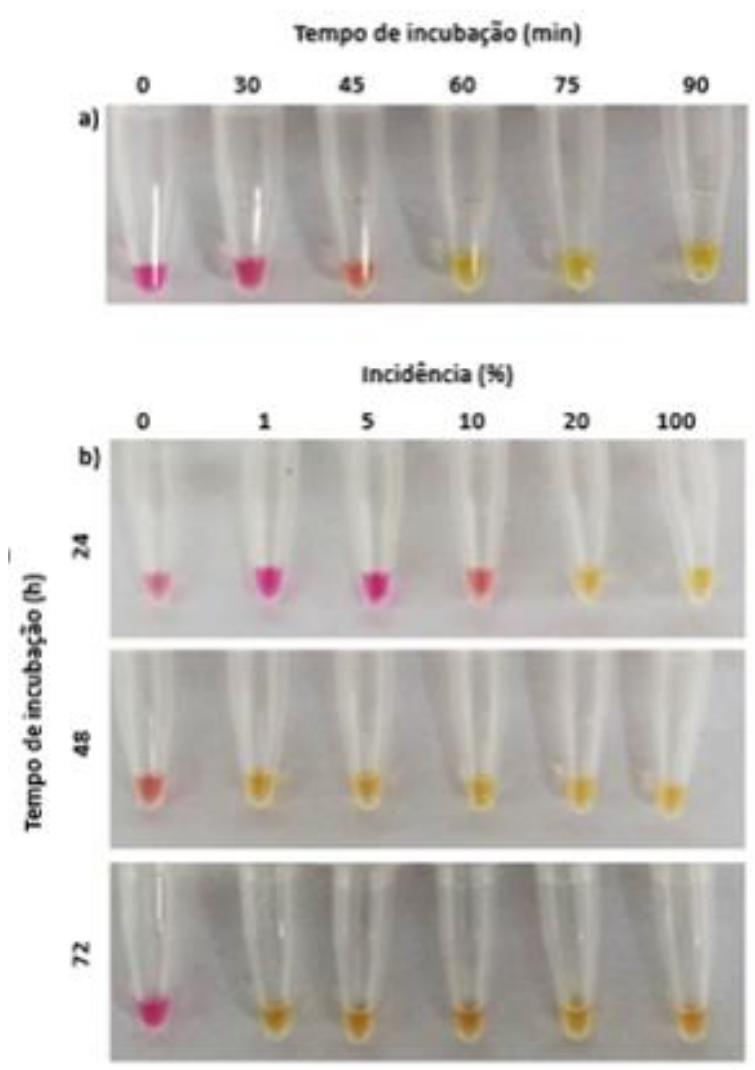
Quando avaliamos a aplicação do teste LAMP para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja artificialmente infectadas, foi observado que quando o tempo de incubação era de 24 horas, o teste não foi capaz de detectar o fungo em nenhuma das subamostras as quais o nível de infecção foi de 1, 5 e 10%, já quando o nível foi de 20% em apenas uma subamostra foi possível. Quando o tempo de incubação foi de 48 e 72 horas, foi possível detectar o fungo em todas as subamostras a partir do nível de incidência de 1% (tabela 2).

**Tabela 2** Resultado do teste LAMP aplicado em sementes de soja artificialmente infectadas em diferentes níveis de incidência (%) para detecção de *S. sclerotiorum*.

Incidência (%)	Tempo de incubação (h)	Resultados
0%	24	0/3
	48	0/3
	72	0/3
1%	24	0/3
	48	3/3
	72	3/3
5%	24	0/3
	48	3/3
	72	3/3
10%	24	0/3
	48	3/3
	72	3/3
20%	24	1/3
	48	3/3
	72	3/3
100%	24	3/3
	48	3/3
	72	3/3

Na figura 2B é possível visualizar o resultado do teste LAMP através da mudança de coloração do rosa (negativo) para o amarelo (positivo). Dessa forma, os resultados demonstram que independente do tempo de incubação ser de 48 ou 72 horas, a detecção do fungo foi possível quando apenas 1% das sementes estavam infectadas. Sendo assim, LAMP mostra-se como uma alternativa promissora para uso em patologia de sementes.





**Fig 2** Resultados da aplicação do teste LAMP em sementes de soja. **(a)** Tempo de incubação: 0, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. **(b)** Detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja artificialmente infectadas. Níveis de infecção: 0, 1, 5, 10, 20 e 100%. Tempo de incubação: 24, 48 e 72 horas.

### Discussão

Neste estudo foi desenvolvido um teste baseado na amplificação isotérmica mediada por loop para facilitar a detecção do fungo *S. sclerotiorum* em sementes de soja. O grupo de primers utilizado mostrou-se específico e sensível para a detecção do fungo, seja quando utilizado DNA extraído da colônia pura, seja quando utilizado o DNA extraído de sementes de soja artificialmente infectadas. LAMP caracteriza-se por ser um teste rápido na detecção de patógenos, onde seu resultado é visualizado diretamente após o tempo de incubação, pela mudança de cor na reação. Aqui, o tempo mínimo de incubação necessário para visualização

do resultado positivo foi de 45 minutos (colônia pura) ou de 60 minutos (sementes de soja artificialmente infectadas). Dessa forma, em relação a outras técnicas moleculares utilizadas em patologia de sementes, como PCR convencional e PCR em tempo real, LAMP mostra-se mais vantajosa devido a rapidez com que o teste é executado, além de não necessitar de equipamentos sofisticados (termocicladores).

LAMP já foi utilizado para detecção de *S. sclerotiorum* em plantas de canola, soja e no solo, além de estudos relacionados com a resistência do fungo a diferentes fungicidas (Duan et al. 2014; Duan et al. 2015; Grabicoski et al. 2020). No entanto, sua aplicação para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes ainda não foi relatada.

Os testes comumente usados para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja são: incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (“blotter test”); em rolo de papel; e em meio agar-bromofenol Neon. Esses levam em média 7 dias para obtenção do resultado. Neste estudo, quando testados diferentes níveis de infecção em diferentes potenciais de inóculo das sementes, LAMP mostrou-se eficiente para detectar a presença do fungo quando apenas 1% das sementes estavam infectadas após 48 horas de incubação. Dessa forma, LAMP mostra-se como um teste potencial que pode ser empregado em laboratórios de patologia de sementes com o intuito de agilizar o trabalho de detecção de patógenos.

Hoje em dia no Brasil, o teste de sanidade de sementes não é obrigatório para que elas sejam comercializadas, isso em função do país não estar estruturado para realizar as análises de forma eficiente, havendo necessidade de muitos laboratórios credenciados e mão de obra qualificada. Dessa forma, ficaria inviável atender a demanda de análise sanitária de toda a produção de sementes do país. Outra questão diz respeito às metodologias disponíveis para a detecção de patógenos demandarem períodos longos para execução e armazenamento das amostras. Assim, LAMP vem de encontro com essas questões trazendo vantagens, pois seu tempo de execução é

curto, não necessita equipamentos sofisticados e nem de mão obra qualificada, pois não é mandatório conhecimento específico em morfologia e taxonomia de fungos.

Patógenos transmitidos por sementes são considerados a principal fonte de inóculo para a doença no campo, além disso lotes contaminados podem introduzir patógenos em áreas isentas. Deste modo, a análise sanitária de sementes é um processo que visa evitar problemas futuros, além de agregar valor ao produto a ser comercializado garantindo a segurança do sistema produtivo.

## Referências

- Adams P B, Ayers WA (1979). Ecology of *Sclerotinia* Species. *Phytopathology*. 69:896–899. 1979.
- Chen XY, Wang XF, Jin N, Zhou Y, Huang AS, Miao QM et al. (2012). Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Mol. Sci.* 13:14421–14433.
- Conab (2020). Companhia nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos Safra 2019/20. ISSN 2318-6852. Acomp. safra bras. Grãos - Safra 2019/20 - Décimo primeiro levantamento, Brasília, 7:1-62.
- Dai TT, Lu CC, Dong S, YE W, Wang Y, Zheng X. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. *FEMS Microbiol Lett.* 334:27–34.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19:11-15.
- Duan Y, Ge C, Zhang X et al. (2014). A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathol.* 43:61–66.
- Duan Y, Yang Y, Wang J, et al. (2015). Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detecting the highly benzimidazole-resistant isolates in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Sci Rep.* 5:17278.
- Grabicoski EMG, Jaccoud-Filho DS, Henneberg L, Pileggi M (2020) Real-Time Quantitative and Ion-Metal Indicator LAMP-Based Assays for Rapid Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* 104:1514-1526.
- Hanneberg L, Grabicoski EMG, Jaccoud-Filho DS, Panobianco M (2012). Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. *Pesq. agropec. bras.* 47:763-768.
- Hartman GL, Sikora EJ, Rupe JC (2015). Rust. in: HARTMAN, G.L., RUPE, J.C., SIKORA, E.J., DOMIER, L.L., DAVIS, J.A., STEFFEY, K.L. (eds) *Compendium of soybean diseases*, 5th edn. APS Press, St. Paul Minnesota, p. 56–59.
- Kimati H. (1980). Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F. (Ed.). *Manual de fitopatologia*. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres 2:297-318.
- Lemes E, Castro L, Assis R (2015). *Doenças da soja: melhoramento genético e técnica de manejo*. Campinas, SP: Millennium Editora.
- Machado JC, Langerak CJ, Jaccoud-Filho DS (2002). Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis. Bassersdorf: International Seed Testing Association. p.138.

Manual de Análise Aanalítica de Sementes (2009). Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 200p.

Meyer MC, Campos HD, Godoy CV, Utiamada CM. (Ed.). Ensaio cooperativos de controle químico de mofo-branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100p. (Embrapa Soja. Documentos, 345).

Nasser LCB, Arancibia RC, Napoleão R. (1999). Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. Fitopatologia Brasileira 24:309.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino H, Hase T (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28:1-7.

Ortega SF, Tomlinson J, Hodgetts J, Spadaro D, Gullino ML, Boonham N. (2018). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for the Detection of Seedborne Fungal Pathogens *Fusarium fujikuroi* and *Magnaporthe oryzae* in Rice Seed. Plant Dis. 102:1549-1558a.

Ortega SF, Tomlinson J, Gilardi G, Spadaro D, Gullino ML, Garibaldi A, Boonham N (2018). Rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on soil, lettuce seeds and plants using loop-mediated isothermal amplification. Plant Pathology 67:1462-1473b.

Peres AP, Nasser LCB, Machado JC (2002). Use of semi selective medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. Fitopatologia Brasileira 27:123-127.

Tanner NA, Zhang Y, Evans TC (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. BioTechniques 58:59-68.

Taylor E, Bates J, Jaccoud D (2006). Diagnosis of seedborne pathogen. In: BASRA, A.S. (Ed.). Handbook of seed science and technology. Binghamton: Food Product. 1:649-675.

Rocha DC, Oliveira MB, de Freitas MA et al. (2017). Rapid detection of *Macrophomina phaseolina* in common bean seeds using a visual loop-mediated isothermal amplification assay. Australasian Plant Pathol. 46:205-212.

## **Considerações finais**

A amplificação isotérmica mediada por loop é uma técnica molecular que pode ser utilizada em larga escala em diferentes locais, desde laboratório até no campo, pois não necessita de equipamentos sofisticados para que seja aplicada, sendo essa uma das suas maiores vantagens. Além disso, o tempo de resposta é menor quando comparado a outras técnicas, pois a visualização dos resultados pode ser feita diretamente através da mudança de cor da reação.

A identificação da praga ou patógeno de forma precoce tem um papel crucial para o manejo correto e eficiente. Demonstramos que é possível aplicá-la para identificação de insetos, sem a necessidade de extração de DNA e na detecção de patógenos em sementes. Assim, LAMP pode ser empregada como um primeiro passo no manejo, podendo ser extrapolada para diferentes patossistemas de forma a tornar as perdas causadas por pragas e doenças cada vez menores.

## Referências bibliográficas

- ADAMS, P. B., AYERS, W. A. **Ecology of Sclerotinia Species. Phytopathology.** v. 69, p. 896–899. 1979.
- BYRNE, D.N.; BELLOWS JUNIOR, T.S. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 431-457, 1991.
- CONAB. Companhia nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos Safra 2019/20.** ISSN 2318-6852. Acomp. safra bras. grãos, v. 7 - Safra 2019/20 - Décimo primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, agosto 2020.
- DAI, T-T., LU, C-C., LU, J., DONG, S., YE, W., WANG, Y., ZHENG, X. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. **FEMS Microbiol Lett.** v.334, p.27–34. 2012.
- EMBRAPA. **Visão 2030: O futuro da Agricultura Brasileira.** 2018. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/documents/10180/9543845/Vis%C3%A3o+2030+-+o+futuro+da+agricultura+brasileira/2a9a0f27-0ead-991a-8cbfaf8e89d62829>>. Acesso em 20 de março de 2021.
- FUKUTA, S., KATO, S., YOSHIDA, K., MIZUKAMI, Y., ISHIDA, A., UEDA, J., KANBE, M., ISHIMOTO, Y. Detection of *Tomato yellow leaf curl virus* by loop-mediated isothermal amplification reaction. **Journal of Virological Methods.** v.122, p.35-40. 2003a.
- FUKUTA, S., IIDA, T., MIZUKAMI, Y., ISHIDA, A., UEDA, J., KANBE, M., ISHIMOTO, Y. Detection of *Japanese yam mosaic virus* by RT-LAMP. **Archives of Virology** v.148, p.1713-1720. 2003b.
- HORSFALL, J. G. & COWLING, E. B. **Plant Disease: An Advanced Treatise.** New York, NY: Academic Press. 1977.
- HUANG, C. G., HSU, J. C., LIN, G. C. Rapid Identification of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Journal of Economic Entomology.** v.102, p. 1239-1246. 2009.
- MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOUD-FILHO, D.S. Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis. **Bassersdorf: International Seed Testing Association.** 138p. 2002.
- MANUAL DE ANÁLISE SANITÁRIA DE SEMENTES. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 200p. 2009.
- NAIDU, R. A. & HUGHES, J. D. A. Methods for the detection of plant virus diseases. Paper presented at the Plant virology in sub-Saharan Africa, **International Institute of Tropical Agriculture**, Ibadan, Nigeria. p. 233-253. 2001.
- NASSER, L.C.B.; ARANCIBIA, R.C.; NAPOLEÃO, R. Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.309, 1999.
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.** v. 28, p. 1-7. 2000.

PERES, Â.P.; NASSER, L.C.B.; MACHADO, J. da C. Use of semi seletive media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.123-127, 2002.

SAVARY, S., WILLOCQUET, L., PETHYBRIDGE, S.J. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nat Ecol Evol**. v.3, p.430–439 2019.

TAYLOR, E.; BATES, J.; JACCOUD, D. Diagnosis of seedborne pathogen. In: BASRA, A.S. (Ed.). **Handbook of seed science and technology**. Binghamton: Food Product, p.649-675. 2006.

THOMPSON, D. & LEI, Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. **Sensors and Actuators Reports**. v.2, p.100017. 2020.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs, **Population Division**. **World Population Prospects 2019: Highlights** (ST/ESA/SER.A/423). 2019.

WU, F., ZHAO, S., YU, B. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**. v.579, p.265–269. 2020.