

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Rapid diagnosis of citrus anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* using a LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) assay

Turunçgil antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tekniği kullanılarak hızlı tanısı

Aysun UYSAL^{a*}, Şener KURT^b

^aMustafa Kemal University, Centre for Implementation and Research of Plant Health Clinic, Antakya, Hatay, Turkey

^bMustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Antakya-Hatay, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.656046](https://doi.org/10.16955/bitkorb.656046)

Received : 06.12.2019

Accepted : 18.04.2020

Keywords:

citrus, anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, LAMP, identification

* Corresponding author: Aysun UYSAL

✉ aysun.uyisal@mku.edu.tr

ABSTRACT

Anthrachnose disease in citrus occurs as dieback in shoots, spot on leaves, early leaf and fruit drop and anthracnose symptoms in fruits. *Colletotrichum gloeosporioides*, a causal agent of anthracnose, causes severe infections in many citrus species and varieties, including lemon. Fungal pathogen *C. gloeosporioides* can be diagnosed by morphological, molecular methods and protein-based spectrum analyzes. This study was conducted to perform a rapid identification of *C. gloeosporioides*, using the LAMP technique. Specific primers for the LAMP method were designed using the computer program (Primary Primer Explorer V3) (<http://primerexplorer.jp/e>), with primer sets specific to each gene region (F3 / B3 and FIP / BIP) of the gene sequences of the *C. gloeosporioides* strain. The specificity of the primers intended for use in the LAMP reaction was evaluated by using different three isolates of *C. gloeosporioides* and *Fs4* isolates of *Fusarium solani* using a total of 3 DNA samples. Genomic DNA was used in the amount of 1 ng μl^{-1} in the PCR study and 10 fg μl^{-1} in the LAMP study. As a result, *C. gloeosporioides* isolates glowed in tubes when examined with fluorescent dye. However, no glare was observed in the tube with *F. solani*. LAMP analysis showed that it successfully detected genomic DNA from *C. gloeosporioides*, but *F. solani* was unable to detect the genomic DNA obtained. After 2 hours of analysis with LAMP technique, the pathogen was detected in a short time with the successful results.

GİRİŞ

Dünyada en fazla yetiştirilen ve tüketilen meyve grubunda yer alan turunçgil üretimi, 8 milyon ha alanda 133 milyon ton olarak gerçekleştirilmiştir. Turunçgil üretiminde ülkemiz, 5 milyon tonla altıncı sırada yer almaktadır (FAO, 2017). Ülkemizdeki üretilen turunçgillerin 1 milyon tondan fazlasını limon üretimi oluşturmaktadır. Turunçgil

yetiştiriciliği yapılan alanlarda üretimini kısıtlayan birden fazla hastalıktan birisi de *Colletotrichum* türlerinin neden olduğu antraknozdur. Bu hastalık, hem olgunlaşmakta hem de olgun olan bitki dokularında ve meyvelerde derim öncesi ve derim sonrası enfeksiyonlara neden olmaktadır. Turunçgilde antraknoz hastalığı sürgünlerde geriye

doğru kuruma, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökümleri, meyvelerde antraknoz belirtileri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu belirtilere bitkilerin tüm vejetatif ve generatif organlarında rastlanmaktadır. *Colletotrichum*'a bağlı türler, konukçu dokularını enfekte ederken hücre içinde hemibiyotrof ve kütikula altında nekrotrof yaşam tarzını kullanırlar. *Colletotrichum*, son zamanlarda ekonomik ve bilimsel olarak en önemli 10 bitki patojeni arasında yer almaktadır (Dean et al. 2012). Dünya çapında birçok bitkiyi hastalandırabilen *Colletotrichum*'un, yaklaşık olarak 600 türü bulunmaktadır (O'Connell et al. 2012). *Colletotrichum* cinsi içerisinde bulunan *C. gloeosporioides*, ülkemizde limonda en yaygın olan tür olarak kaydedilmiştir (Uysal and Kurt 2018, Uysal et al. 2016).

C. gloeosporioides'in tür tanısında günümüzde kullanılan en yaygın ve hızlı yöntem konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğidir. Biyoteknolojide PCR standart bir yöntem olmasına rağmen, bu teknik, hızlı termal döngü, özgünlük ve amplifikasyon verimliliğinin düşüklüğü gibi çeşitli içsel dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajları dikkate alarak, *C. gloeosporioides*'in tanısında kullanılacak yeni bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi geliştirilmiştir. Konvansiyonel PCR'a göre hızlı, ucuz ve daha kararlı olması ile dikkat çeken LAMP tekniği, tarımsal üretimdeki bitki patojenlerinin erken tespit ve teşhisinde çok daha uygundur. Herhangi bir özel ekipmana ihtiyaç duymadan PCR'a kıyasla yüksek hassasiyet ve etkinliği ile DNA amplifikasyonu sağlamaktadır (Kandan et al. 2016).

Yeni bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan, LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) ilk kez 2000 yılında Notomi et al. (2000) tarafından bildirilmiştir. LAMP yöntemi patojenik bitki virüsleri (Fukuta et al. 2013), viroidler (Boubourakas et al. 2009), funguslar (Duan et al. 2014, Fukuta et al. 2014, Hudson et al. 2019, Lenarcic et al. 2014, Moradi et al. 2014, Takahashi et al. 2014, Tomlinson et al. 2010a, 2010b, Zhang et al. 2013), bakteriler (Dobhal et al. 2019, Rigano et al. 2014, Waliullah et al. 2019,) oomycete (Dai et al. 2012, Fukuta et al. 2013), külleme (Thiessen et al. 2018) patojenleri ve nematodları (Kikuchi et al. 2009) tespit etmek için kullanılmıştır. Bu yöntem, hedef DNA'nın sarmal yer değiştirme aktivitesine sahip bir Bst DNA ile 6 veya 8 farklı bölgesine dayanan özel tasarım 4-6 primerden oluşmaktadır. Kısaca, LAMP tekniğinde 6 adet primer, hedef DNA'nın 8 farklı noktasını tanımaktadır. Bu yöntem, kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyon riski az olup, farklı miktarlardaki yabancı DNA, yöntemin duyarlılığını etkilemez. Bu teknik, hızlı ve sabit sıcaklıkta (60-70 °C), bir saatte tek bir kopyadan 10 (2) kopya çoğaltılabilir. Dolayısı ile zaman kaybı

olmadığından, daha hızlı sonuç alınan bir yöntemdir. LAMP ürünlerine DNA eklenerek ve hidroksinaftol mavisi (HNB) gibi metal iyon göstergeleri ile ethidium bromide, SYBR Green propidium iodide, veya Quant-iT PicoGreen, CuSO₄ veya kalsein gibi boyalar aracılığı ile renk değişimleri çıplak gözle görülebilmektedir (Goto et al. 2009, Tomita et al. 2008). LAMP ürünleri ayrıca real-time yöntemleri ile de belirlenebilir (Bekele et al. 2011).

Maya ve diğer bazı fungal türler için LAMP bazlı analizlerde kullanılan primer setleri halka açık veri tabanlarından kolayca elde edilebilen standart diziler üzerinde çalışılmıştır. ac11, amy1, tef1, btub gibi housekeeping genler ile rodA, ypt1 genleri ve ayrıca universal genler fungus çalışmaları için yaygın kullanılır. Ancak, araştırmalara göre toplam LAMP çalışmalarının yaklaşık yarısı evrensel olarak bilinen ribozomal RNA (rRNA) gen kodlaması en yaygın kullanılan gen bölgesidir (Niessen 2015).

Pratik uygulamalarda hassasiyeti, hızlılığı ve özgünlüğünden dolayı LAMP tekniği, fungal patojenlerin belirlenmesinde potansiyel bir öneme sahiptir. Yakın gelecekte, LAMP tabanlı teşhis ve tanımlama klinik, gıda, çevre, tarım gibi alanlardaki fungal etmenlerin tespitinde klasik yöntemlerin yerini alması beklenmektedir. Önemli organizmaların hızlı ve kesin tespitinin yapılması ile tıbbi bakım, temizlik ve karantina uygulamalarında, deney ve gıda kalitesi kontrol uygulamalarında yapılması gerekenler hakkında karar vermeyi kolaylaştırmak adına LAMP tekniğinin kullanımının yaygınlaşması oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca, LAMP tabanlı tanı işleminin kısıtlılığı, ithalat ve ihracat sırasında bitki ve hayvanların mikroorganizma analizleri için gerekli olan bekleme süresini kısaltması açısından oldukça önemlidir (Niessen 2015).

Bağda *Botrytis cinerea*'nın ITS gen bölgelerine bağlı olarak tasarlanan primerler kullanarak yürütülen LAMP tekniği, başarılı sonuçlar göstermiştir (Niessen 2015).

Konukçu bitkiye özelleşme gösteren bitki patojeni fungusların tespitinde LAMP tekniğini kullanarak, muz bitkilerinde solgunluk oluşturan *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Panama hastalığı), hızlı bir şekilde tanımlanabilmiştir (Li et al. 2013). Yine aynı teknikle, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (domates) ve f.sp. *niveum* (karpuz) gibi önemli bitki patojenleri ve mango bitkisinde patojen *Fusarium mangiferae*'nin hassas tanısı gerçekleştirilmiştir (Pu et al. 2014). EPPO'nun karantina listesinde yer alan ve turuncgil meyvelerinde siyah leke hastalığına sebep olan *Guignardia citricarpa*'nın tespiti, LAMP tekniği ile kısa sürede, kesin ve hassas sonuçlar vermiştir (Tomlinson et al. 2013). Yine önemli karantina patojenlerinden *Phytophthora kernoviae*,

Phytophthora ramorum, *Phytophthora melonis*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora cinnamomi* ve *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*'nin belirlenmesinde LAMP tekniği, başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Dai et al. 2019, Niessen 2015). Bu sonuçlara dayanarak karantina patojenlerinin kısa sürede ve kesin olarak varlığının tespiti LAMP tekniği ile kolayca gerçekleştirilebilecektir.

Öte yandan Hindistan'ın farklı bölgelerinden toplanan enfekteli biber tohumlarından *C. capsici*'nin hızlı ve hassas tespiti için yapılan çalışmada, klasik PCR'a göre, LAMP tekniğinin güvenilir bir şekilde kullanılacağı kanıtlanmıştır (Kandan et al. 2016). Enfekteli çilek bitkilerinde *C. gloeosporioides*'in hızlı tespiti için yapılan çalışmada (Kato et al. 2016), LAMP tekniği ile *C. gloeosporioides*'in hızlı ve hassas bir şekilde tespit edildiği ve *C. acutatum*, *C. aenigma* ve *C. siamense* gibi farklı *Colletotrichum* türlerinin de ayırt edilebildiği bildirilmiştir. Ayrıca, LAMP tekniği kullanarak *C. acutatum*'un neden olduğu soya antraknozunun hızlı tespiti şeklinde çalışma yapılmıştır. Çalışma için, Rbp1 (Large subunit RNA polymerase II) hedef gen bölgesine göre LAMP tekniği için primer tasarlanmıştır. 62 °C'de 70 dk amplifikasyondan sonra SYBR green I boyası ile LAMP reaksiyon ürünleri yeşil renkte parlamasıyla *C. acutatum*'un varlığının belirlenmiştir. LAMP yönteminde 100 pg µl⁻¹ hedef genomik DNA reaksiyonun çalışması için yeterli bulunmuştur. Çin'deki soya alanlarındaki ve marketlerde satılan soya tohumlarındaki *C. acutatum* patojenini belirlemede Ppb1-Ct-LAMP tekniğinin, oldukça yararlı olduğu belirtilmiştir (Tian et al. 2017).

Ülkemizde ise laboratuvar ve saha çalışmalarında LAMP tekniğinin başta *Colletotrichum*'a bağlı türler olmak üzere bitki patojenlerinin hızlı tanı ve tespitine yönelik herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu yüzden bu çalışmada, Turunçgilde antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tekniği kullanılarak hızlı tanısının yapılması amaçlanmıştır. Bu yeni LAMP yöntemi, *C. gloeosporioides*'in neden olduğu Turunçgildeki antraknoz hastalığının kontrol edilmesi ve izlenmesi için

önemli bir referans veri ortaya koyacaktır. *Colletotrichum*, taksonomisi komplike bir cins olduğundan dolayı, türlerin teşhisinde multilokus dizi (MLS) analizi kullanılmaktadır. MLS analizleri oldukça pahalı, zaman alıcı ve pratik değildir. Bu nedenle, belirli bir bölgedeki *Colletotrichum* cinsine bağlı belli bir türün teşhisini hedef alarak yapılacak çalışmalarda LAMP tekniği oldukça ekonomik, hızlı ve yüksek özgünlüğe sahip olmasından dolayı tercih edilmektedir.

MATERYAL VE METOT

Fungal kültürler ve DNA ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan fungal kültürler, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunçgil üretim alanlarında antraknoz patojeni *Colletotrichum* türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen proje kapsamında elde edilmiştir. Bu çalışmada, *C. gloeosporioides*'in morfolojik ve moleküler yöntemlerle kesin tanıları yapılmış LC1 (Mersin-Silifke), LC3 (Adana-İmamoğlu) ve LC5 (Hatay-Erzin) izolatları kullanılmıştır. Kontrol fungus olarak ise, turunçgilde kök çürüklüğüne neden olan *Fusarium solani*'nin (Kurt et al. 2019) Fs4 izolatu kullanılmıştır. Denemede yer alan tüm fungal kültürler, patates dekstroz agar (PDA) besi yerinde 25 °C'de 5 gün boyunca geliştirilmiştir. Fungal miselyumlardan DNA izolasyonu, Qiagen DNeasy (250) Plant mini kit (Qiagen Inc., Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonları, spektrofotometre (Qubit 3.0) ile ölçülmüş ve ekstrakte edilen DNA'lar, daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de dondurucuda saklanmıştır.

LAMP primerlerin tasarlanması

LAMP yöntemi için, *C. gloeosporioides* türünün gen dizileri her gen bölgesine özgü primer setleri (F3/B3 ve FIP/BIP); 'Primer Explorer V3' adlı bilgisayar programı (<http://primerexplorer.jp/e>) kullanılarak tasarlanmış ve bu primer setleri, ilgili firmadan temin edilmiştir. Söz konusu primer setleri, Genbank'ta *Colletotrichum*'un 25 türünü yüksek olasılıkla kapsayan 5.8S ribosomal RNA-internal transcribed spacer (ITS) 2 gen bölgesinden seçilerek belirlenmiştir. LAMP metodu ile *C. gloeosporioides* DNA'sını çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri, bunların tasarlandığı gen bölgeleri ile dizilimleri Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. *Colletotrichum gloeosporioides*'i tespit etmek için kullanılan LAMP primerlerinin nükleotid dizileri

Primer	Tip	Sekans (5'-3')
CgF3	F3	ATGCCTGTTTCGAGCGTC
CgB3	B3	TCCGAGGTCAACCTTTGGAA
CgFIP	FIP (F1c + F2)	GCCACTACCTTTGAGGGCCTACTTTCAACCCTCAAGCTCTGC
CgBIP	BIP (B2 + B1c)	CGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAGGGTTTACGGCAAGAGTCC
CgLF	LF	GTAGGGCCCCAACACCA
CgLB	LB	CTTTACGTCTCGCACTGGGA

PCR ve LAMP tekniğinin uygulanması

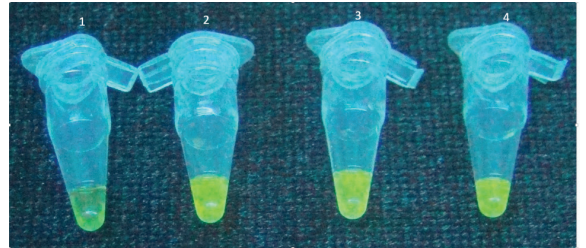
LAMP reaksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanan primerlerin özgünlükleri, *Colletotrichum gloeosporioides*'in 3 farklı izolatu ile *Fusarium solani*' nin Fs4 izolatu olmak üzere toplam 4 DNA örneği kullanılarak değerlendirilmiştir. LAMP tekniği için; distile su, primer karışımı (FIP, BIP, F3, B3), 2X reaksiyon tamponu, Bst DNA polimeraz enzimi ve DNA örneği kullanılmıştır. LAMP reaksiyonu, son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu reaksiyonda 2 µl çoğaltılacak DNA örneği, 12.5 µl LAMP tamponu, 0.9 µl primer karışımı (FIB ve BIP primerleri-F3 ve B3 primerleri), 1 µl 8 birim Bst DNA polimeraz enzimi ve 8.6 µl steril saf su eklenerek, reaksiyon hazırlık işlemi tamamlanmıştır. Daha sonra 65 °C sabit sıcaklıkta 90 dakika boyunca yürütülen reaksiyon sonrası işlem, 80 °C'de 4 dakika inkübe edilerek durdurulmuştur. LAMP tekniği uygulandıktan sonra elde edilen sonuçların görsel olarak değerlendirilmesi, QIAxcel otomatik jel görüntüleme cihazı (Qiagen, QIAxcel Advanced system, Almanya) ile yapılmıştır. Bunun yanı sıra floresan boya yöntemiyle örneklerin çıplak gözle izlenebilmesi için 1 µl Syber Green I (Invitrogen™) boya eklenmiş örnek tüpleri, bir süre gözlem altında tutulmuştur. Daha sonra pozitif örneklerin bulunduğu tüp içerisinde yeşil floresan renk oluşum durumlarına göre değerlendirme yapılmıştır. PCR amplifikasyonu için koşullar, 95 °C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C'de 1 dk denatürasyon, annealing sıcaklığı 63.4 °C ile 72 °C' de 45 sn ve son aşama olarak 72 °C'de 10 dk olarak belirlenmiştir. PCR ürünlerinin kalitesinin belirlenmesi, fungal DNA jel görüntüsü, otomatik jel elektroforez (Qiagen, QIAxcel Advanced System, Almanya) cihazında değerlendirilmesi ile yapılmıştır.

SONUÇLAR

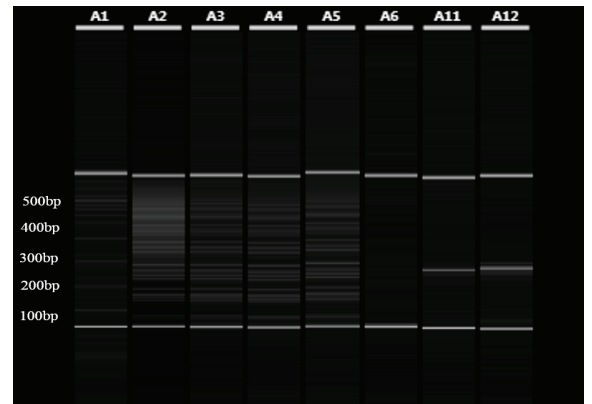
Denemeye alınan *C. gloeosporioides*'in LC1, LC3 ve LC5 izolatlarının genomik DNA'ları ACTIN ve GAPDH gen bölgeleri ile; negatif kontrol olarak kullanılan *F. solani*'nin Fs4 izolatu; ITS ve EF-1α primerleri ile dizileme işlemine tabi tutulmuş ve bu izolatlar, sırasıyla LC1; MF480745 ve MG951769, LC3; MG272475 ve MG951787, LC5; MF616514 ve MG951781 ve Fs4; MF972071 ve MF972072 şeklindeki erişim numaraları ile NCBI Genbankasına kaydedilmiştir.

Denemede, LAMP analizinin hızlı sonuç vermesi, hassasiyeti ve özgünlüğü, PDA besi yerinde geliştirilen *C. gloeosporioides* ve *F. solani*'den elde edilen genomik DNA örnekleri kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre genomik DNA klasik PCR çalışmasında 1 ng µl⁻¹ kullanılırken, LAMP tekniğinde 10 fg µl⁻¹ oranında kullanılmış ve buna rağmen denemede olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Böylece LAMP tekniğinde, PCR çalışmalarında kullanılan genomik DNA miktarından oldukça az miktarda DNA kullanılmıştır. Bu çalışma ile LAMP tekniğinin hassasiyeti de net olarak ortaya konmuştur. LAMP analiz reaksiyonu sonrasında 1 µl Syber Green I

(Invitrogen™) boya eklenen örnek tüpleri, UV ışık altında incelendiğinde; *C. gloeosporioides* izolatlarının bulunduğu tüplerde belirgin bir parlama (ışım) olduğu fakat, *F. solani*'nin bulunduğu tüpte herhangi bir parlama (ışım) olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1). Elde ettiğimiz bulgular, LAMP analiz tekniği ile sadece *C. gloeosporioides*'den elde edilen genomik DNA'nın başarıyla belirlendiğini göstermiştir. Ancak *F. solani*'den elde edilen genomik DNA, bu teknik ile tespit edilememiştir. Böylece, LAMP tekniği ile 2 saat gibi kısa bir süre içerisinde yapılan analiz sonucunda patojenin varlığı tespit edilebilmiştir. Bu durum LAMP tekniğinin, *Colletotrichum* gibi etmenlerin tespitinde hızlı bir tanı yöntemi olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, otomatik jel elektroforez cihazında yapılan görüntüleme sonucunda; LAMP reaksiyonunun pozitif olduğu yerlerdeki ürünlerde sürüntü şeklinde yoğun bantların oluştuğu ve bu tekniğin, *C. gloeosporioides* için başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak alınan *F. solani*, jel elektroforez görüntüsünde LAMP reaksiyonunda bant oluşturmayarak bu tekniğin, *C. gloeosporioides* için uygulanabilir ve pratik olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca doğrulama yapmak için, *C. gloeosporioides* için spesifik primer olan GAPDH ile yapılan PCR reaksiyonunun jel elektroforez cihazında görüntülenmesi sonucunda bantlar gözlenmiştir. Sonuç olarak LAMP tekniğinin sonuçları, PCR reaksiyonu ile doğrulanmıştır (Şekil 2).



Şekil 1. LAMP ampikonlarının floresan Syber Green I boyası UV ışık altında parlaması ile görsel incelenmesi (1: *Fusarium solani*, 2, 3, 4: *C. gloeosporioides* LC1, LC3, LC5)



Şekil 2. LAMP tekniği ve PCR *C. gloeosporioides* ve *F. solani*'nin elektroforez jel performansları (A1, size marker: LAMP tekniği, A2-A5: *C. gloeosporioides*, A6: *F. solani*, A11-A12: GAPDH primeri ile *C. gloeosporioides*'in PCR analizi)

TARTIŞMA VE KANI

Bu çalışma, LAMP tekniği kullanılarak Turunçgil antraknoz etmeni *C. gloeosporioides*'in hızlı tanısını gerçekleştirmek için yürütülmüştür. Çalışmada bu tekniği kullanarak pozitif örnek olan *C. gloeosporioides* ve negatif örnek *F. solani* patojenlerinin ayırımı net bir şekilde yapılmıştır. Bitki patojenlerinin varlığını ortaya koymak için son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlayan LAMP tekniği, *C. gloeosporioides*'i tespit etmede doğru ve hassas bir teknik olarak kullanılmıştır. LAMP tekniği, karmaşık ve profesyonel alet ve cihazlara gereksinim duyulmaksızın, floresan boya ile görsel olarak izlenebilirliğinin kolay olması gibi avantajlarının yanısıra ile hızlı ve ekonomik bir özelliğe sahiptir. LAMP, hedef olmayan DNA'nın varlığını önemli ölçüde etkilemeden izotermal koşullar altında, DNA'yı yüksek verimle çoğaltır ve hedef baz dizileri için oldukça spesifik bir yöntemdir. Uygun primerlerin hazırlanmasından sonra basit bir işlemle ibaret olan bu teknik, sadece dört primer, bir DNA polimeraz ve normal bir laboratuvardaki su banyosu veya enzim reaksiyonu için ısı bloğuna ihtiyaç duyar. Bu durumda laboratuvardaki kısıtlı imkanlarla patojenlerin varlığının belirlenmesi bu teknik ile oldukça önemli bir seçenek sunar. Yüksek duyarlılık ve özgüllük, uygulama kolaylığı, ekstraksiyon için ayrı bir cihaz gerektirmemesi, çok kısa sürede (45-70 dk), sonuç alınması personel açısından kolay uygulanabilir olması oldukça dikkat çekicidir. Özellikle karantina patojenlerinin tespitinde hızlı ve hassas bir teknik olarak kullanılması oldukça önemlidir. Gümrük kapılarında bekleyen tarımsal ürünlerden alınan örneklerin bitki patojenleri yönünden kısa sürede analiz edilmesi, LAMP tekniğinin kullanılmasını kayde değer oranda etkili kılmaktadır. Söz gelimi, halk arasında tropikal ırk 4 (TR4) olarak adlandırılan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (yeni adıyla *F. odoratissimum*) muz alanlarında gittikçe artan şiddeti ve dolayısı ile sosyo-ekonomik etkisi de hızla yayılmaktadır. Bu nedenle karantina önlemlerinin uygulanması için basit, hızlı ve güvenilir teknolojilerin uygulanması kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu amaçla hem arazide hem de laboratuvar koşullarında uygulanabilirliği açısından LAMP tekniği geliştirilmiş ve TR4 ırkına karşı geliştirilen primer setleri ile 22 adet TR4 izolatının tespiti yapılmıştır. Ayrıca, 1 (pg µl⁻¹) genomik DNA kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. LAMP tekniği sayesinde TR4 ile bulaşık muz üretim alanlarında *Fusarium* solgunluğunun izlenmesi daha kolay olmuştur. Böylece, LAMP'in oldukça başarılı ve kullanışlı bir teknik olduğu belirlenmiştir (Ordóñez et al. 2019). Bu çalışma ile, karantina patojenlerinin kontrolü ve izlenebilirliği açısından LAMP tekniğinin son derece başarılı sonuçlar ortaya koyduğu kanıtlanmıştır.

LAMP tekniğinin bir diğer üstün yönü, patojenlerde hızlı ve hassas tanı imkanı sağlamasıdır. Farklı kültür bitkilerinde son yıllarda *Colletotrichum*'a bağlı türlerin ekonomik ve hızlı tanısında LAMP tekniği, sürdürülebilir ve hassas bir yöntem olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Çilek bitkilerini enfekte eden *C. gloeosporioides* türü (Katoh et al. 2016), şeker kamışı bitkisinde kırmızı çürüklük patojeni *C. falcatum* türü (Chandra et al. 2015), biberde antraknoza neden olan *C. capsici* fungal patojeni (Kandan et al. 2016) ve soya fasulyesi bitkisinde antraknoza yol açan *C. acutatum* türünün (Tian et al. 2017) tespiti ve tanısında LAMP tekniğinin hızlı, güvenilir, ekonomik ve yararlı sonuçlar ortaya koyduğu laboratuvar ve saha çalışmaları ile açık ve net olarak görülmektedir. Bu bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu ve bunları destekler niteliktedir.

LAMP yönteminin araştırmacılara ya da çeşitli kuruluşlara olan maliyeti ele alındığında, bu testin PCR çalışmalarına göre oldukça ekonomik olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, LAMP testi çalışmanın yapıldığı aynı günde ve toplamda 2 saat içerisinde sonuçlanabilirken, PCR işlemleri ve gen sekanslaması saatler hatta günler alabilmektedir. Bu yöntem, belirli bölgelerdeki bir patojenin dağılımını, yoğunluğunu hızlı ve ekonomik bir şekilde ortaya koymakta oldukça yararlıdır. Bitkilerde önemli bir hastalığa sebep olan ve şiddetli enfeksiyonlara yol açan bir patojenin bölgedeki varlığının ve haritasının ortaya çıkarılmasında oldukça önemlidir. Turunçgillerde *C. gloeosporioides*'in bu yöntemle varlığı kısa sürede ortaya konmuştur. Bu çalışmadan sonra, farklı patojenlerin bu yöntemle tanısının belirlenmesi araştırmacılara farklı bakış açıları sunacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında yürütülmüştür.

ÖZET

Turunçgilde antraknoz hastalığı sürgünlerde geriye doğru kuruma, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökümleri, meyvelerde antraknoz belirtileri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*, ülkemizde özellikle limon başta olmak üzere birçok turunçgil tür ve çeşitlerinde şiddetli enfeksiyonlara yol açmaktadır. *C. gloeosporioides* fungal patojeninin tanısı, morfolojik, moleküler yöntemler ve proteine dayalı spektrum analizleri ile yapılabilmektedir. Bu çalışma, LAMP tekniğini kullanarak Turunçgil antraknoz etmeni *C. gloeosporioides*'in hızlı tanısını gerçekleştirmek için yürütülmüştür. LAMP yöntemi için spesifik primerler, *C. gloeosporioides* türünün gen dizileri her gen bölgesine özgü primer setleri (F3/B3 ve FIP/BIP) 'Primer Explorer V3' adlı bilgisayar programı (<http://primerexplorer.jp/e>) kullanılarak tasarlanmıştır. LAMP reaksiyonunda

kullanılmak üzere tasarlanan primerlerin özgüllükleri *C. gloeosporioides*'in 3 farklı izolatları ile *Fusarium solani*'nin F54 izolatu olmak üzere toplam 3 DNA örneği kullanılarak değerlendirilmiştir. PCR çalışmasında genomik DNA 1 ng μl^{-1} , LAMP çalışmasında 10 fg μl^{-1} miktarda kullanılmıştır. Sonuç olarak, floresan boya ile incelendiğinde, *C. gloeosporioides* izolatlarının bulunduğu tüplerde parlama olmuştur. Ancak, *F. solani*'nin bulunduğu tüpte parlama gözlenmemiştir. LAMP analizinin *C. gloeosporioides*'den elde edilen genomik DNA'yı başarıyla tespit ettiğini göstermiş, fakat *F. solani*'den elde edilen genomik DNA'yı tespit edememiştir. LAMP tekniği ile 2 saat süren bir analiz sonucunda elde edilen başarılı sonuçlarla kısa süre içerisinde patojenin varlığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: turunçgil, antraknoz, *Colletotrichum gloeosporioides*, LAMP, teşhis

KAYNAKLAR

- Bekele B., Hodgetts J., Tomlinson J., Boonham N., Nikolić P., Swarbrick P., Dickinson M., 2011. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and 16SrXII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology*, 60 (2), 345–355.
- Boubourakas I.N., Fukuta S., Kyriakopoulou P.E., 2009. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 160 (1-2), 63–68.
- Chandra A., Keizerweerd A.T., Que Y., Grisham M.P., 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. *Molecular Biology Reports*, 42 (8), 1309–1316.
- Dai T., Lu C.C., Lu J., Dong S.M., Ye W.W., Wang Y.C., Zheng X.B., 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. *FEMS Microbiology Letters*, 334 (1), 27–34.
- Dai T., Yang X., Hu T., Zhangyan L., Yue X., Chenchen L., 2019. A novel LAMP assay for the detection of the *Phytophthora cinnamomi* utilizing a new target gene identified from genome sequences. *Plant Diseases*, 103 (12), 3101–3107.
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13 (4), 414–430.
- Dobhal S., Boluk G., Babler B., Stulberg M.J., Rascoe J., Nakhla M.K., Chapman T., Crockford A., Melzer M.J., Alvarez A.M., Arif M., 2019. Comparative genomics approach to develop a highly reliable duplex TaqMan QPCR assay for sensitive detection of genus *Dickeya* and *Dickeya dianthicola*. APS Annual Meeting, August 3-7, Cleveland, Ohio, USA, 135 p.
- Duan Y., Ge C., Zhang X., Wang J., Zhou M., 2014. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathology*, 43, 61–66.
- FAOSTAT, 2017. World production data. Statistics of Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.fao.org> (erişim tarihi: 28.11.2017).
- Fukuta S., Takahashi R., Kuroyanagi S., Miyake N., Nagai H., Suzuki H., Hashizume F., Tsuji T., Taguchi H., Watanabe H., Kageyama K., 2013. Detection of *Pythium aphanidermatum* in tomato using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with species-specific primers. *European Journal of Plant Pathology*, 136 (4), 689–701.
- Fukuta S., Takahashi R., Kuroyanagi S., Ishiguru Y., Miyake N., Nagai H., Suzuki H., Tsuji T., Hashizume F., Watanabe H., Kageyama K., 2014. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Pythium myriotylum*. *Letters in Applied Microbiology*, 59 (1), 49–57.
- Goto M., Hond E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K.I., 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46 (3), 167–172.
- Hudson O., Waliullah S., Wang L., Ji P., Ali E., 2019. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* causing fusarium wilt of watermelon. APS Annual Meeting, August 3-7, Cleveland, Ohio, USA, p.125.
- Kandan A., Akhtar J., Singh B., Pal D., Chan D., Agarwal P.C., Dubey S.C., 2016. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and sensitive detection of fungal pathogen, *Colletotrichum capsici* in *Capsicum annum*. *Journal of Environmental Biology*, 37 (6), 1355–1360.
- Katoh H., Fukuda T., Nishigawa H., Natsuaki T., 2016. Rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in infected strawberry plants using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of General Plant Pathology*, 82, 190–198.
- 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 (12), 1365–1369.

- Kurt Ş., Uysal A., Soylu E.M., Kara M., Soylu S., 2020. Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root of citrus in Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Journal of General Plant Pathology*, 86, 326–332.
- Lenarcic R., Morisset D., Pirc M., Llop P., Ravnikar M., Dreo T., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One*, 9 (4), e96027. doi:10.1371/journal.pone.0096027
- Li B., Du J., Lan C., Liu P., Weng Q., Chen Q., 2013. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 135 (4), 903–911.
- Moradi A., Almasi M.A., Jafary H., Mercado-Blanco J., 2014. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (4), 942–954.
- Niessen L., 2015. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (2), 553–574.
- 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 (12), e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
- O'Connell R.J., Thon M.R., Hacquard S., Amyotte S.G., Kleemann J., Torres M.F., 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44 (9), 1060–1065.
- Ordóñez N., Salacinas M., Mendes O., Seidl M.F., Meijer H.J.G., Schoen C.D., Kema G.H.J., 2019. A loop-mediated isothermal amplification assay based on unique markers derived from genotyping by sequencing data for rapid in-plant diagnosis of Panama disease caused by tropical race 4 in banana. *Plant Pathology*, 68, 1682–1693.
- Pu J., Xie Y., Zhang H., Zhang X., Qi Y., Peng J., 2014. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 86, 81–88.
- 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 Microbiology Letters*, 355 (1), 28–35.
- Thiessen L.D., Neill T.M., Mahaffee W.F., 2018. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the field detection of *Erysiphe necator*. *PeerJ*, 6:e4639, DOI 10.7717/peerj.4639.
- Tian Q., Lu C., Wang S., Xiong Q., Zhang H., Wang Y., Zheng X., 2017. Rapid diagnosis of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *European Journal of Plant Pathology*, 148 (4), 785–793.
- Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N., 2010a. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology*, 51 (6), 650–657.
- Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N., 2010b. 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 (2), 143–149.
- Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N., Ostoj-Starzewska S., Webb K., Cole J., Barnes A., Dickinson M., Boonham N., 2013. A loop-mediated isothermal amplification-based method for confirmation of *Guignardia citricarpa* in citrus black spot lesions. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 217–224.
- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection products. *Nature Protocols*, 3, 877–882.
- Rigano L.A., Malamud F., Orce I.G., Filippone M.P., Marano M.R., do Amaral A.M., Castagnaro A.P., Vojnov A.A., 2014. Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BMC Microbiology*, 14, 86.
- Uysal A., Kurt Ş., 2018. An important fungal disease on citrus orchards in Erdemli: Anthracnose. *International Erdemli Symposium*, Mersin University, 19-21 April 2018 Mersin, Turkey, 670 p.
- Uysal A., Kurt Ş., Akgül D.S., 2016. Akdeniz Bölgesi limon bahçelerinde antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'in patojenik ve moleküler karakterizasyonu. *Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi*, 5-8 Eylül, Konya, s. 597.
- Waliullah S., Hudson O., Oliver J.E., Ji P., Ali E., 2019. Comparative study of methods for detecting *Xylella fastidiosa* causing bacterial leaf scorch in blueberry. *APS Annual Meeting*, August 3-7, Cleveland, Ohio, USA, 125 p.

Zhang X., Zhang H., Pu J., Qi Y., Yu Q., Xie Y., Peng J., 2013. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in soil. PLoS One, 8 (12), e82841. doi:10.1371/journal.pone.0082841

Cite this article: Uysal, A, Kurt, Ş. (2020). Rapid diagnosis of citrus anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* using a LAMP (Loop- Mediated Isothermal Amplification) Assay. Plant Protection Bulletin, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.656046

Atıf için: Uysal, A, Kurt, Ş. (2020). Turunçgil antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tekniği kullanılarak hızlı tanısı. Bitki Koruma Bülteni, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.656046