

Pendekatan baru pada identifikasi patogen tanaman berbasis DNA: Suatu Kajian Pustaka

New approaches in DNA-based identification of plant pathogens: A Review

Widya Esti Purwaningtyas^{1*}, Siti Sholekha², Hangga Novian Adi Putra³

¹⁾ Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Kuta Selatan, Bali 80361, Indonesia

²⁾ Program Studi Biologi Terapan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung Jl. Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1, Bandar Lampung, Lampung 35141, Indonesia

³⁾ Program Studi Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Kuta Selatan, Bali 80361, Indonesia

*Email: widya_esti@unud.ac.id

Diterima

22 Desember 2025

Disetujui

23 Januari 2026

INTISARI

Patogen tanaman merupakan salah satu faktor utama penyebab penurunan produktivitas pertanian dan kerugian ekonomi yang signifikan di berbagai sistem budidaya. Identifikasi patogen secara cepat dan akurat menjadi langkah penting dalam pengendalian penyakit tanaman, khususnya untuk mendukung kegiatan karantina, pemantauan penyakit, serta penentuan strategi pengelolaan yang tepat. Metode diagnosis konvensional yang bergantung pada pengamatan gejala, isolasi, dan kultur patogen umumnya memerlukan waktu relatif lama dan bergantung pada keahlian peneliti, sehingga berisiko menimbulkan kesalahan identifikasi, terutama pada tahap awal infeksi ketika gejala belum berkembang secara spesifik. Perkembangan teknologi molekuler mendorong penggunaan pendekatan identifikasi berbasis DNA yang menawarkan sensitivitas dan spesifisitas lebih tinggi dibandingkan metode konvensional. Tinjauan ini membahas berbagai metode identifikasi patogen tanaman berbasis DNA, meliputi teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan turunannya, seperti *nested PCR*, *multiplex PCR*, *quantitative PCR* (qPCR), *nano-PCR*, dan *droplet digital PCR* (ddPCR), serta metode amplifikasi isothermal seperti *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *recombinase polymerase amplification* (RPA), dan *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA). Teknologi lanjutan seperti *next-generation sequencing* (NGS) dan sistem CRISPR/Cas juga dikaji berdasarkan prinsip kerja dan potensi penerapannya dalam diagnosis patogen tanaman. Hasil tinjauan menunjukkan bahwa setiap metode memiliki keunggulan yang berbeda, di mana qPCR dan ddPCR unggul dalam sensitivitas dan presisi untuk deteksi target berkonsentrasi rendah, LAMP dan RPA menawarkan kecepatan analisis serta kemudahan aplikasi di lapangan, sementara NGS dan CRISPR/Cas memberikan resolusi tinggi untuk deteksi komprehensif dan diagnosis dengan spesifisitas sangat tinggi. Tinjauan ini menekankan pentingnya pengembangan metode diagnostik berbasis DNA yang efisien dan aplikatif untuk mendukung pengelolaan penyakit tanaman dan sistem pertanian berkelanjutan.

Kata kunci: amplifikasi isothermal, diagnostik berbasis DNA, identifikasi patogen tanaman, NGS, PCR

ABSTRACT

Plant pathogens are major contributors to reduced agricultural productivity and significant economic losses across various cropping systems. Rapid and accurate pathogen identification is therefore essential for effective plant disease management, particularly to support quarantine measures, disease monitoring, and the selection of appropriate management strategies.

Conventional diagnostic methods based on symptom observation, pathogen isolation, and culturing generally require long processing times and depend heavily on researcher expertise, increasing the risk of misidentification, especially during early infection stages when symptoms are not yet clearly expressed. Advances in molecular technologies have driven the adoption of DNA-based identification approaches that offer higher sensitivity and specificity than conventional methods. This review discusses a wide range of DNA-based techniques for plant pathogen identification, including polymerase chain reaction (PCR) and its derivatives, such as nested PCR, multiplex PCR, quantitative PCR (qPCR), nano-PCR, and droplet digital PCR (ddPCR), as well as isothermal amplification methods such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP), recombinase polymerase amplification (RPA), and nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Advanced technologies, including next-generation sequencing (NGS) and CRISPR/Cas systems, are also reviewed based on their principles and diagnostic potential in plant pathology. The review highlights that each method exhibits distinct strengths, with qPCR and ddPCR providing high sensitivity and precision for detecting low-abundance targets, LAMP and RPA enabling rapid analysis and field applicability, and NGS and CRISPR/Cas offering high-resolution and comprehensive detection with very high specificity. Overall, the development of efficient and applicable DNA-based diagnostic methods is crucial for strengthening plant disease management and supporting sustainable agricultural systems.

Keywords: DNA-based diagnostics, isothermal amplification, NGS, plant pathogen identification, PCR

PENDAHULUAN

Patogen tanaman merupakan salah satu penyebab utama penurunan produktivitas dan kerugian ekonomi dalam sektor pertanian. Tanaman sering diserang oleh berbagai jenis patogen yang dapat menyebabkan kerugian hasil panen secara signifikan. Sebagai contoh, *Phytophthora infestans* merupakan patogen penyebab penyakit hawar daun (*late blight*) terutama pada kentang dan tomat, *Botrytis cinerea* menyebabkan penyakit busuk abu-abu (*gray mold*), dan *Phytophthora capsici* dapat menyebabkan busuk *Phytophthora* (*Phytophthora rot*), diketahui menurunkan hasil panen baik secara kuantitatif maupun kualitatif setiap tahunnya (Fry et al., 2015; Kamoun et al., 2015; Petrasch et al., 2019; Sabbadin et al., 2021). Beberapa upaya telah dilakukan untuk menekan kerugian akibat hama dan penyakit tanaman. Strategi pengendalian penyakit mencakup tindakan pencegahan masuknya patogen ke suatu wilayah serta upaya pemberantasan atau pengelolaan patogen yang telah terdeteksi di suatu area (Spadaro & Gullino, 2019).

Identifikasi patogen secara cepat dan akurat menjadi langkah krusial dalam upaya pengendalian penyakit tanaman (Li et al., 2023). Metode diagnosis patogen secara konvensional umumnya masih mengandalkan fenotipe biologi, seperti pengamatan gejala penyakit, isolasi, dan kultur patogen. Dalam konteks tersebut, deteksi dan identifikasi patogen secara akurat menjadi sangat penting karena mampu memberikan informasi penting mengenai ekologi patogen, tingkat ancaman terhadap tanaman, serta menjadi dasar dalam penentuan metode pengendalian yang tepat dan upaya pencegahan penyebaran penyakit guna meminimalkan dampak negatif yang ditimbulkan (Koebnik et al., 2023).

Metode konvensional kurang mampu memenuhi kebutuhan identifikasi patogen secara langsung di lapangan karena memerlukan waktu yang lama, memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang terbatas, serta sangat bergantung pada pengalaman peneliti (Fang & Ramasamy, 2015). Penyakit dengan gejala yang sangat mirip, terutama pada tahap awal infeksi, sering kali sulit dibedakan secara akurat. Pengamatan gejala visual yang sering menjadi langkah awal dalam diagnosis penyakit umumnya belum cukup untuk menentukan agen penyebab penyakit secara akurat. Pengamatan gejala visual yang umumnya menjadi langkah awal dalam diagnosis penyakit sering kali belum memadai untuk

menentukan agen penyebab penyakit secara pasti. Bahkan ketika gejala terlihat jelas, proses diagnosis masih dapat mengalami kesulitan (Cubero et al., 2024). Kesalahan identifikasi juga kerap muncul, khususnya dalam penentuan penyakit yang disebabkan oleh patogen. Sebagai contoh, tumor yang disebabkan oleh *Agrobacterium* sering kali diinterpretasikan sebagai kelainan genetik tanaman atau pembengkakan akibat infeksi nematoda (Choi et al., 2019). Terkait hal tersebut, pemilihan metode diagnosis harus disesuaikan dengan kebutuhan spesifik di lapangan.

Perkembangan metode deteksi penyakit merupakan proses yang terus mengalami penyesuaian seiring dengan kemajuan teknologi pada setiap periode waktu. Pendekatan berbasis DNA merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk identifikasi patogen pada tanaman. Penggunaan pendekatan berbasis DNA telah banyak digunakan karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Li et al., 2023). Diagnosis penyakit tanaman yang cepat dan akurat menjadi tahap awal yang sangat penting dalam pengendalian penyakit, khususnya untuk mendukung karantina tanaman, pemantauan, serta mengetahui perkembangan penyakit (Martinelli et al., 2015; Calicioglu et al., 2019). Untuk mengatasi keterbatasan deteksi patogen secara spesifik, berbagai metode deteksi molekuler berbasis *polymerase chain reaction* (PCR) telah dikembangkan. Penerapan PCR dalam identifikasi patogen banyak digunakan karena telah menjadi metode standar di laboratorium, termasuk teknik *nested* PCR (nPCR), *multiplex* PCR, dan *real-time quantitative* PCR (qPCR) (Vincelli & Tisserat, 2008; Garibyan & Avashia, 2013; Keller et al., 2015; Navarro et al., 2015).

Namun demikian, penerapan teknik identifikasi patogen tanaman belum optimal untuk diagnosis secara *in situ* atau penggunaan langsung di lapangan, khususnya pada kondisi yang memerlukan respon cepat dan peralatan minimal (Lau & Botella, 2017; Noh et al., 2019). Pengembangan metode diagnosis patogen yang mudah, cepat, dan dapat diaplikasikan secara langsung di lapangan menjadi fokus penting dalam pendekatannya saat ini serta memiliki nilai aplikatif yang tinggi. Oleh karena itu, perlu pengembangan lebih lanjut terkait identifikasi patogen tanaman berbasis DNA melalui pengembangan metode ekstraksi DNA yang portabel, murah, dan mudah diaplikasikan secara langsung di lokasi pengambilan sampel, seperti lahan pertanian. Kajian ini bertujuan untuk meninjau dan membahas pendekatan-pendekatan dalam identifikasi patogen tanaman berbasis DNA, termasuk prinsip dasar, kelebihan, keterbatasan, serta potensi aplikasinya dalam sistem pertanian berkelanjutan.

METODE PENULISAN TINJAUAN

Penulisan artikel ini menggunakan pendekatan tinjauan naratif dengan mengkaji dan mensintesis literatur ilmiah yang relevan mengenai metode identifikasi patogen tanaman berbasis DNA. Penelusuran pustaka dilakukan melalui basis data ilmiah bereputasi, seperti *Google Scholar*, *Scopus*, dan *Web of Science*, dengan menggunakan kata kunci antara lain *plant pathogen*, *DNA-based identification*, *molecular diagnosis*, *PCR*, *isothermal amplification*, *NGS*, dan *CRISPR*. Literatur yang dikaji terutama berupa artikel jurnal internasional dan nasional bereputasi yang diterbitkan dalam sepuluh tahun terakhir, dengan penekanan pada publikasi terkini yang relevan dengan perkembangan metode diagnostik molekuler. Artikel yang dipilih dianalisis berdasarkan kesesuaian topik, kejelasan metode, serta kontribusinya terhadap pemahaman prinsip, keunggulan, dan keterbatasan masing-masing teknik. Informasi yang diperoleh kemudian disintesis secara deskriptif dan komparatif untuk menyoroti perbedaan

karakteristik metode, potensi aplikasinya dalam identifikasi patogen tanaman, serta tantangan yang masih dihadapi dalam penerapannya.

IDENTIFIKASI PATOGEN TAMANAN BERBASIS DNA

Analisis berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR atau *polymerase chain reaction* yang diperkenalkan pada pertengahan 1980-an telah menjadi salah satu inovasi terbesar dalam biologi molekuler karena memungkinkan penggandaan DNA secara terarah melalui mekanisme replikasi semi-konservatif. Dalam konteks diagnostik, khususnya pada deteksi patogen tanaman, teknik ini bertumpu pada penggunaan primer yang dirancang untuk mengenali segmen DNA tertentu dari organisme target sehingga hanya sekuens yang sesuai yang akan mengalami amplifikasi. Strategi ini menjadikan PCR sebagai pendekatan yang sangat penting dalam identifikasi patogen, karena terbentuknya produk amplifikasi yang berfungsi sebagai penanda molekuler sehingga dapat mengkonfirmasi keberadaan organisme patogen tersebut dalam sampel yang diuji (Martinelli et al., 2015). Namun efektivitas reaksi sangat dipengaruhi oleh kemurnian DNA atau RNA yang diekstraksi, karena keberadaan senyawa penghambat yang ikut terbawa dari matriks kompleks seperti jaringan tanaman atau tanah dapat menurunkan sensitivitas dan akurasi analisis. Tantangan ini dapat diatasi dengan berbagai prosedur ekstraksi yang dikembangkan untuk memperoleh DNA berkualitas tinggi, mulai dari perangkat molekuler komersial yang sederhana hingga yang memerlukan metode dan penanganan khusus (Kuzdraliński et al., 2017; Venbrux et al., 2023).

Keberhasilan teknik PCR sangat dipengaruhi oleh karakteristik dan desain primer yang digunakan dalam proses amplifikasi DNA. PCR memerlukan sepasang primer, yaitu primer *forward* dan *reverse*, yang dirancang komplementer terhadap kedua ujung sekuens DNA target. Primer merupakan fragmen oligonukleotida beruntai tunggal dengan panjang relatif pendek, umumnya sekitar 30 nukleotida, dan berperan sebagai komponen fundamental dalam reaksi PCR (Sasmito et al., 2014). Desain primer yang optimal memungkinkan proses amplifikasi DNA berlangsung secara akurat, presisi, dan reproduktibel. Oleh karena itu, perancangan pasangan primer PCR harus mempertimbangkan berbagai parameter penting, termasuk panjang sekuens, suhu *annealing* dan suhu leleh (*melting temperature*), komposisi basa, serta keberadaan pengulangan sekuens atau struktur sekunder yang berpotensi mengganggu efisiensi amplifikasi (Guo et al., 2020; Okulova et al., 2024). Sebagai ilustrasi mengenai penerapan primer dalam deteksi berbasis PCR, Tabel 1 menyajikan daftar primer spesifik yang umum digunakan untuk berbagai patogen tanaman, termasuk target gen, pasangan primer, dan ukuran fragmen amplifikasi yang sering digunakan dalam penelitian fitopatologi. Primer-primer tersebut sebagian besar dirancang untuk PCR konvensional, namun pada praktiknya juga dapat digunakan atau diadaptasi dalam teknik berbasis PCR lainnya, seperti *nested* PCR, *multiplex* PCR, maupun *quantitative* PCR (qPCR), dengan penyesuaian kondisi reaksi dan desain eksperimen. Keragaman penanda genetik antar patogen ini menegaskan bahwa pemilihan primer merupakan komponen kunci dalam mencapai deteksi yang sensitif dan akurat.

Nested PCR

Nested PCR merupakan variasi teknik PCR yang menggunakan dua set primer pada dua tahap amplifikasi berurutan sehingga hasil deteksinya menjadi jauh lebih spesifik dan sensitif. Penyakit *twig blight* dan *crown rot* akibat *Pilidiella granati* pada budidaya delima sering ditemukan, dan dengan

penggunaan *nested* PCR mampu meningkatkan ketepatan deteksinya hingga memungkinkan identifikasi meskipun sampel hanya mengandung sekitar 10 pg DNA (Yang et al., 2017). Teknik ini dapat meningkatkan sensitivitas deteksi hingga ratusan kali lipat. Namun, prosesnya memerlukan waktu lebih lama dan melibatkan manipulasi produk amplifikasi tahap pertama sehingga risiko kontaminasi silang lebih tinggi dan dapat menghasilkan sinyal positif palsu. (Hariharan & Prasannath, 2021).

Tabel 1. Daftar primer yang digunakan dalam deteksi berbasis PCR pada patogen tanaman penting.

Nama Patogen	Target Gen	Primer (5' – 3')	Ukuran (pb)	Referensi
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>MoT3</i>	MoT3F: GTCGTCATCAACGTGACCAG MoT3R: ACTTGACCCA AGCCTCGAAT	361	Gupta et al., 2020
<i>Alternaria solani</i>	<i>Alt a1</i>	OAsF7: CGACGAGTAAGTTGCCCTCA OAsR6: TGTAGGCGTCAGAGACACCATT	164	Ivanović et al., 2022
<i>Rhizoctonia solani</i>	ITS	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	700	Misawa et al., 2018
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	<i>SIX1</i>	SIX1F: GGGAGCCCCAGATATTTTCA SIX1R: GGATGCTGCCACCTTATCCA	300	Inami et al., 2010
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	β -Tubulin	Cc1F1: ACCTAACTGTTGCTTCGGCG Cc2R1: AAATTTGGGGGTTTACGGC	450	Neto et al., 2022
<i>Ralstonia solanacearum</i>	16s rRNA	PS-1: AGTCGAACGGCAGCGGGGG PS-2: GGGGATTTACATCGGTCTTGCA	553	Pastrik & Maiss, 2000
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Ypt1</i>	Yph1F: CGACCATKGGTGTGGACTTT Yph2R: ACGTTCTCMCAGGCGTATCT	450	Khan et al., 2017
<i>Pythium ultimum</i>	ITS	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	800	Li & Zhang, 2020
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	16s rRNA	XoF: GCGTTGATGACTGGATGTG XoR: CGAACATCCATCCAGTTC	470	Asysyuura et al., 2017
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>hrpZ</i>	MM5F: GAACGAGCTGAAGGAAGACA MM5R: CAGCCTGGTTAGTCTGGTTA	532	Zaccardelli et al., 2005
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>amsB</i>	AMSbL: GCTACCAGCAGGGTGAG AMSbR: TCATCACGATGGTGTAG	1600	Bereswill et al., 1995
Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	DNA-A	TLCV-CPI: ATGGCGAAGCGACCAG TLCV-CPT: TTAATTTGTGACCGAATCAT	700	Sidik et al., 2023
Tobacco mosaic virus (TMV)	CP	TMVF: CGATGATGATTCGGAGGC TMVR: GAGGTCCARACCAAMCCAG	512	Kimaru et al., 2020
Cucumber mosaic virus (CV)	MP	CVF: GCCACCAAAAATAGACCG CVR: ATCTGCTGGCGTGGATTCT	593	Kimaru et al., 2020
<i>Botrytis cinerea</i>	Bc108	Bc108+: ACCCGCACCTAATTCGTCAAC Bc563-: GGGTCTTCGATACGGGAGAA	760	Rigotti et al., 2006

Multiplex PCR

Multiplex PCR memberi peluang untuk menelusuri beberapa target DNA dalam satu proses amplifikasi sehingga analisis dapat dilakukan lebih cepat dan lebih efisien. Dalam bidang fitopatologi, pendekatan ini sangat membantu

karena satu tanaman sering kali menjadi inang bagi banyak jenis jamur sehingga dibutuhkan metode yang sensitif sekaligus mampu mengurangi jumlah reaksi yang harus dijalankan (Sharma & Sharma, 2016). Pendekatan *multiplex* ini telah dimanfaatkan untuk merancang uji diagnostik yang mampu mengenali dua belas jamur penyebab busuk buah pada *cranberry*, termasuk *Allantophomopsis cytispora*, *A. lycopodina*, *Phyllosticta elongata*, *Coleophoma empetri*, *Colletotrichum fiorinae*, *C. fructivorum*, *Fusicoccum putrefaciens*, *Monilinia oxycocci*, *Phomopsis vaccinii*, *Phyllosticta vaccinii*, *Physalospora vaccinii*, dan *Strasseria geniculata*, yang dapat diidentifikasi dengan gen ITS-LSU dan TEF-1 α (Conti et al., 2019). Walaupun teknik ini menawarkan proses yang cepat dan praktis, pelaksanaannya bisa lebih mahal, memerlukan lebih banyak sumber daya, dan sering menunjukkan sensitivitas yang lebih rendah dibandingkan reaksi PCR yang menargetkan satu gen (Hariharan & Prasannath, 2021).

Quantitative PCR (qPCR)

Quantitative PCR atau qPCR, yang juga dikenal sebagai *real-time PCR*, bekerja dengan prinsip yang sama seperti PCR konvensional namun memiliki keunggulan karena proses amplifikasinya dapat dipantau secara langsung selama reaksi berlangsung. Tidak seperti PCR biasa yang memerlukan tahapan lanjutan seperti elektroforesis gel, qPCR memungkinkan pengamatan akumulasi amplikon pada setiap siklus melalui sensor atau kamera yang merekam sinyal fluoresens. Jumlah DNA target kemudian dihitung menggunakan kurva kalibrasi yang menghubungkan nilai *threshold cycle* dengan konsentrasi *template* DNA. Deteksi amplikon dilakukan melalui berbagai sistem kimia berbasis emisi fluoresensi yang meningkat seiring berlangsungnya amplifikasi. Pendekatan qPCR ini telah dimanfaatkan dalam diagnosis molekuler, misalnya untuk mendeteksi *Cryphonectria parasitica* melalui sekuen rDNA ITS dengan sensitivitas mencapai 2 fg DNA genom, setara dengan satu spora patogen (Sharma & Sharma, 2016; Chandelier et al., 2021).

Nano-PCR

Nano-PCR merupakan pengembangan dari metode PCR konvensional yang memanfaatkan tambahan nanopartikel untuk meningkatkan efisiensi proses amplifikasi sekaligus mempertajam spesifisitas reaksi. Sejak konsep ini diperkenalkan, berbagai tipe nanopartikel mulai dari logam, oksida, hingga karbon *nanotube* telah diuji dalam beragam studi untuk melihat pengaruhnya terhadap performa PCR. Di antara berbagai material tersebut, nanopartikel logam seperti emas maupun titanium dioksida terbukti memberikan peningkatan paling konsisten terhadap kualitas reaksi, sehingga keduanya sering dianggap sebagai komponen yang paling menjanjikan dalam penerapan Nano-PCR (Dantas et al., 2017). Dalam studi terkini, kombinasi nanopartikel perak berukuran 20 nm dan nanopartikel magnesium oksida berukuran 50 nm ditambahkan ke campuran PCR untuk meningkatkan sensitivitas deteksi *tomato leaf curl virus*. Penggantian magnesium klorida dalam *buffer* PCR dengan magnesium oksida menghasilkan peningkatan sensitivitas PCR hingga 13 kali lipat. Selain itu, pendekatan ini memungkinkan amplikon terdeteksi hanya dengan 25 siklus PCR, sehingga durasi reaksi dapat dipersingkat sekitar 26,5 % (Devika et al., 2024).

Droplet digital PCR (ddPCR)

Droplet digital PCR (ddPCR) merupakan teknik molekuler canggih yang mempartisi sampel menjadi ribuan tetes mikro sehingga setiap tetes dapat

mengalami amplifikasi PCR secara independen. Pendekatan ini memungkinkan deteksi gen tunggal dengan tingkat akurasi yang tinggi dan memberikan kemampuan penghitungan absolut jumlah patogen, termasuk jamur, bakteri, virus, dan viroid. Keunggulan ddPCR terletak pada rendahnya sensitivitas terhadap senyawa penghambat, sehingga teknik ini tetap efektif meskipun target hadir dalam konsentrasi yang sangat rendah. Contohnya, ddPCR memungkinkan identifikasi teliospora *Tilletia controversa* di tanah pada batas deteksi serendah 2,1 salinan per mikroliter, serta mendeteksi patogen *Erwinia amylovora* penyebab *fire blight* pada tanaman apel dan pir. Sifat presisi dan konsisten pada ddPCR membuat metode diagnostik molekuler ini sangat andal dan menawarkan peningkatan signifikan dibandingkan PCR konvensional maupun *real-time* PCR (Patel et al., 2022; Cubero et al., 2024).

Amplifikasi berbasis *Isothermal*

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

LAMP merupakan metode amplifikasi DNA yang pertama kali dikembangkan oleh Notomi et al. (2000), yang memungkinkan penggandaan DNA berlangsung secara cepat, efisien, dan sangat spesifik pada suhu tetap. Sejak diperkenalkan, teknik ini banyak dimanfaatkan dalam diagnosis berbagai penyakit tanaman dan menunjukkan potensi besar dalam mendukung pengelolaan patogen. Mekanisme reaksi LAMP diawali oleh tahap inisiasi, di mana seluruh set primer berperan dalam pengenalan dan pengikatan awal terhadap sekuens DNA target untuk membentuk struktur DNA awal yang diperlukan dalam proses amplifikasi. Selanjutnya, reaksi memasuki fase amplifikasi berulang yang terutama dikendalikan oleh primer internal, yaitu *forward inner primer* (FIP) dan *backward inner primer* (BIP). Primer internal ini dirancang memiliki dua wilayah sekuens yang saling komplementer terhadap DNA target, sehingga memungkinkan terjadinya sintesis DNA melalui mekanisme *strand displacement* sekaligus mendukung proses *self-priming* pada tahap amplifikasi berikutnya. (Notomi et al., 2000; Hariharan & Prasannath, 2021). Keunggulan utama LAMP mencakup kemampuan bekerja pada suhu konstan dengan waktu reaksi singkat, amplifikasi yang sangat sensitif sehingga bisa menghasilkan jumlah produk besar meskipun DNA awal sedikit, serta biaya pelaksanaan yang rendah karena peralatan yang dibutuhkan sederhana seperti *water bath*, *heating block*, atau perangkat portabel berbasis isothermal (Lau & Botella, 2017). Berbeda dengan PCR konvensional, LAMP menggunakan satu set primer yang terdiri atas minimal empat primer utama, yaitu *forward outer primer* (F3), *backward outer primer* (B3), *forward inner primer* (FIP), dan *backward inner primer* (BIP), yang menargetkan enam wilayah berbeda pada sekuens DNA target. Selain itu, primer tambahan berupa *loop forward* (LF) dan *loop backward* (LB) sering digunakan untuk mempercepat reaksi amplifikasi. Pendekatan ini telah diterapkan secara efektif dalam deteksi *oak wilt disease* yang disebabkan oleh *Bretziella fagacearum*, patogen penting yang mengancam berbagai spesies ek (*Quercus* spp.), dengan menggunakan satu set primer LAMP lengkap yang mencakup F3, B3, FIP, BIP, LF, dan LB (Novi et al. 2024). Metode ini juga telah berhasil digunakan untuk mendeteksi *P. infestans*, penyebab hawar daun pada tomat dan kentang (Patel et al., 2022). Meskipun sangat cocok untuk diagnosis lapangan, LAMP memiliki beberapa keterbatasan, antara lain desain primer yang kompleks dan tidak intuitif bagi pengguna non-spesialis, serta produk amplifikasinya yang bervariasi dalam ukuran sehingga tidak ideal untuk kloning gen atau identifikasi target berdasarkan panjang fragmen (Lau & Botella, 2017).

Recombinase polymerase amplification (RPA)

RPA adalah metode amplifikasi DNA *isothermal* yang memanfaatkan kombinasi enzim polimerase dan protein rekombinase untuk memperbanyak fragmen target (Babu et al., 2018). Teknik ini mirip dengan LAMP yang dijalankan pada suhu konstan antara 37 hingga 42 °C, sehingga dapat diterapkan langsung di lapangan tanpa memerlukan *thermal cycler* untuk denaturasi DNA. Proses amplifikasi dilakukan dengan bantuan primer oligonukleotida dan tiga enzim utama yaitu rekombinase, protein pengikat untai tunggal, dan polimerase dengan kemampuan perpindahan untai (Donoso & Valenzuela, 2018). Kelebihan RPA adalah kemudahan penggunaan dan sensitivitas tinggi namun teknik ini terbatas hanya pada fragmen DNA pendek di bawah 500 pasangan basa, sehingga tidak ideal untuk memperbanyak gen utuh. Selain itu, primer yang relatif panjang (30–35 nukleotida) dapat menyebabkan amplifikasi non-spesifik jika suhu terlalu rendah (Lau & Botella, 2017). RPA telah digunakan untuk mendeteksi *Xylella fastidiosa* pada tanaman blueberry yang menunjukkan kemampuan mendeteksi DNA dalam jumlah sangat rendah, setara dengan sensitivitas PCR konvensional. Hal ini menegaskan bahwa RPA dapat menjadi alternatif yang praktis untuk identifikasi patogen tanaman di lapangan, meskipun teknik ini lebih cocok untuk fragmen DNA pendek dan memerlukan perancangan primer yang cermat untuk menghindari amplifikasi non-spesifik (Venbrux et al., 2023).

Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

NASBA merupakan metode amplifikasi asam nukleat yang berlangsung pada suhu tetap dan banyak digunakan untuk RNA (Hariharan & Prasannath, 2021). Dalam metode ini, RNA untai tunggal dikonversi menjadi DNA komplementer melalui aktivitas *reverse transcriptase*, kemudian amplifikasi dilakukan menggunakan kombinasi enzim, termasuk RNase H dan T7 RNA *polymerase*, pada suhu sekitar 41°C (Hariharan & Prasannath, 2021). NASBA telah diaplikasikan untuk mendeteksi berbagai virus tanaman, contohnya pada *Apple stem pitting virus*, *Plum pox virus*, *Potato virus Y*, dan *Arabidopsis mosaic virus*, serta bakteri patogen tanaman yaitu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* dan *Ralstonia solanacearum* (Sharma & Sharma, 2016). Keunggulan NASBA adalah kemampuannya untuk menarget RNA yang cepat terdegradasi setelah sel mati, sehingga metode ini dapat secara efektif membedakan organisme yang masih hidup dari yang sudah tidak aktif (Preethi & Umesha, 2025).

Next-generation Sequencing (NGS)

Pendekatan *DNA sequencing* menyediakan informasi penting mengenai keragaman organisme yang memiliki relevansi biologis. Kemajuan *next-generation sequencing* (NGS) atau *high-throughput sequencing*, kini dimungkinkan untuk memperoleh jutaan *short reads*, sehingga diagnosis patogen tanaman menjadi lebih rinci dan karakterisasi genom dapat dilakukan secara menyeluruh. Teknologi ini memungkinkan pengurutan DNA berskala besar menjadi lebih efisien, cepat, dan hemat biaya, serta diterapkan untuk berbagai tujuan, termasuk deteksi dan penemuan patogen, pengurutan genom penuh atau parsial, studi ekologi dan epidemiologi, analisis ekspresi gen, serta pemetaan keragaman komunitas mikroba di lingkungan. Namun, karena kemampuan membaca nukleotida secara langsung pada untai tunggal masih terbatas, NGS tetap memerlukan tahap amplifikasi fragmen DNA untuk

menghasilkan sinyal yang cukup agar dapat dianalisis (Hamim et al., 2022; Withers et al., 2016). NGS termasuk metode berbasis RNA-Seq, memungkinkan identifikasi cepat terhadap patogen jamur tanaman yang menyebabkan penyakit baru. Sebagai contoh, pengurutan genom lengkap menggunakan platform Illumina MiSeq telah diterapkan untuk mendeteksi patogen jamur baru penyebab *Sarcococca blight* pada tanaman hias yang disebabkan oleh *Calonectria pseudonaviculata* (Hariharan & Prasannath, 2021). Teknologi NGS juga telah digunakan untuk mempelajari penyakit batang anggur (*grapevine trunk diseases*), termasuk klaster *Eutypa*, *Esca*, *Botryosphaeria*, *Phomopsis dieback*, dan *Black foot*, di mana karakterisasi patogen yang akurat menjadi langkah penting dalam menentukan strategi pengendalian yang efektif (Aragona et al., 2022).

Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)

Sistem CRISPR/Cas, atau *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, melibatkan sejumlah protein terkait seperti Cas9, Cas12, dan Cas13, dan telah diterapkan secara luas dalam deteksi patogen tanaman melalui pengeditan genom. Metode ini biasanya dimulai dengan memperbanyak sekuens target, kemudian mendeteksi aktivitas protein Cas untuk memastikan keberadaan patogen. Dikombinasikan dengan teknik amplifikasi DNA *isothermal*, CRISPR/Cas memungkinkan pengembangan diagnostik *point-of-care* yang mampu mendeteksi patogen dalam jumlah kecil dengan tingkat spesifisitas dan sensitivitas tinggi (Patel et al., 2022). Sistem ini menawarkan keuntungan berupa biaya operasional yang rendah, sensitivitas tinggi, dan tidak membutuhkan peralatan laboratorium canggih, sehingga cocok untuk penggunaan lapangan. Meski demikian, penerapan CRISPR-Cas masih menghadapi beberapa keterbatasan. Kapasitas untuk mendeteksi beberapa patogen sekaligus (*multiplexing*) masih terbatas, dan persiapan sampel sering kali memerlukan prosedur yang kompleks dan memakan waktu (Venbrux et al., 2023; Kalinina et al., 2020). Penerapan CRISPR/Cas9 pada jamur filamen telah berhasil dikembangkan pada berbagai spesies *ascomycete* filamen, termasuk *Neurospora crassa*, *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma reesei*, dan beberapa spesies *Aspergillus*. Sistem ini menggunakan gen Cas9 yang telah disesuaikan kodonnya untuk jamur filamen, promotor endogen untuk ekspresi sgRNA, serta marker seleksi umum pada jamur. Selanjutnya, teknologi CRISPR/Cas9 diterapkan pada sejumlah jamur patogen tanaman penting, seperti *Ustilago maydis* (corn smut), *Fusarium graminearum* (*Fusarium head blight* pada biji-bijian), *F. oxysporum* (*Fusarium wilt*), dan *Sclerotinia sclerotiorum* (*white mold*), memungkinkan manipulasi genetik yang presisi untuk studi patogen dan potensi pengembangan strategi pengendalian (Dort et al., 2020).

IKHTISAR METODE IDENTIFIKASI PATOGEN TANAMAN BERBASIS DNA

Metode identifikasi patogen tanaman berbasis DNA telah berkembang pesat dan memberikan peningkatan signifikan dalam hal kecepatan, sensitivitas, serta akurasi diagnosis dibandingkan metode konvensional yang bergantung pada pengamatan gejala dan kultur patogen. Berbagai pendekatan, mulai dari *polymerase chain reaction* (PCR) dan turunannya, metode amplifikasi isothermal, hingga teknologi lanjutan seperti *next-generation sequencing* (NGS) dan sistem CRISPR/Cas, menunjukkan karakteristik yang beragam dengan keunggulan dan keterbatasan masing-masing. Ringkasan karakteristik utama, keunggulan, dan keterbatasan dari berbagai metode identifikasi patogen tanaman berbasis DNA

tersebut disajikan pada Tabel 2. Secara umum, tidak terdapat satu metode tunggal yang sepenuhnya unggul untuk seluruh kebutuhan diagnostik, sehingga pemilihan teknik identifikasi patogen tanaman perlu disesuaikan dengan tujuan analisis, jenis patogen target, serta ketersediaan sumber daya dan fasilitas pendukung. Sebagai pelengkap ikhtisar tersebut, Tabel 3 menyajikan ringkasan contoh keberhasilan penerapan berbagai teknik identifikasi patogen tanaman berbasis DNA.

Tabel 2. Perbandingan berbagai metode deteksi patogen berbasis DNA

Metode	Kelebihan	Kekurangan
PCR Konvensional	• Prosedur sederhana • Biaya rendah • Spesifik terhadap target • Prosedur sederhana • Cocok untuk laboratorium dasar	• Rentan inhibitor • Perlu DNA murni • Tidak kuantitatif • Risiko <i>false negative</i> jika DNA sangat sedikit
<i>Nested PCR</i>	• Spesifisitas meningkat • Sensitivitas sangat tinggi • Deteksi DNA sangat rendah • Mengurangi amplifikasi non-spesifik • Baik untuk sampel terdegradasi	• Waktu lebih lama • Risiko kontaminasi tinggi • Membutuhkan dua pasang primer • Biaya reaksi meningkat • Tahapan <i>pipetting</i> lebih banyak → <i>error prone</i>
<i>Multiplex PCR</i>	• Hemat waktu dan reagen • Multi-target dalam satu reaksi • Efisien untuk <i>surveilans</i> patogen kompleks • Cocok untuk panel patogen serupa	• Optimasi rumit • Kompetisi antar primer • Sensitivitas menurun dibanding <i>singleplex</i> • Desain primer sulit (<i>cross-dimer risk</i>) • Tidak ideal untuk target dengan konsentrasi sangat berbeda
<i>qPCR</i>	• Sensitivitas tinggi • Kuantitatif • <i>Real-time monitoring</i> • <i>Reproducible</i> • Spesifik dengan <i>probe</i> • <i>Throughput</i> tinggi	• Instrumen mahal • Perlu kurva standar • Rentan inhibitor • Reagen lebih mahal • Desain <i>probe</i> kompleks
Nano-PCR	• Sensitivitas lebih tinggi dibandingkan PCR konvensional • Peningkatan efisiensi amplifikasi • Waktu reaksi lebih cepat • Stabilitas termal lebih baik • Dapat dipakai pada DNA rendah	• Optimasi nanopartikel sulit • Variabilitas antar bahan nano • Biaya lebih tinggi • Potensi interferensi jika nano berlebihan
ddPCR	• Kuantifikasi absolut • Sangat sensitif • Minim efek inhibitor • Deteksi target rendah stabil • Presisi tinggi • Ideal untuk titer rendah	• Instrumen sangat mahal • <i>Throughput</i> rendah • Persiapan lebih kompleks • Waktu analisis lebih panjang • Biaya per sampel tinggi
LAMP	• Cepat (≤ 30 menit) • <i>Isothermal</i>, tanpa mesin PCR • Sensitivitas tinggi • Deteksi lapangan memungkinkan • Visualisasi mudah (<i>colorimetric</i>)	• Desain primer kompleks ($\geq 4-6$ primer) • Risiko amplifikasi non-spesifik tinggi • Sulit untuk <i>multiplex</i> • Produk ampikon besar & heterogen
RPA	• Suhu rendah (37–42 °C) • Cepat (≤ 20 menit) • Ideal untuk lapangan • Toleran terhadap inhibitor • Reaksi sederhana	• Tidak stabil untuk ampikon panjang (< 500 pb) • Primer panjang → risiko dimer • Sensitivitas kadang fluktuatif • Reagen relatif mahal
NASBA	• Ideal untuk RNA patogen • Dapat deteksi organisme hidup • <i>Isothermal</i> (41 °C) • Spesifik untuk RNA virus	• Kompleks karena butuh banyak enzim • RNA mudah terdegradasi • Biaya tinggi • Tidak cocok untuk DNA target

Metode	Kelebihan	Kekurangan
NGS	• Deteksi komprehensif	• Biaya sangat tinggi
	• Temukan patogen baru	• Analisis bioinformatika berat
	• Profil komunitas mikroba lengkap	• Perlu infrastruktur komputasi
	• <i>High-resolution genomic</i>	• Waktu analisis lama
	• Data cocok untuk epidemiologi	• Sensitif terhadap kontaminasi
CRISPR/Cas	• Spesifisitas sangat tinggi	• <i>Multiplex</i> terbatas
	• Sensitivitas sangat tinggi (<i>attomolar</i>)	• Perlu optimasi Cas & <i>guide</i> RNA
	• Dapat dikombinasi LAMP/RPA	• Reagen masih mahal
	• Potensial untuk deteksi <i>portable</i>	• Beberapa sistem butuh pre-amplifikasi
	• Waktu cepat	• Stabilitas komponen sensitif

Tabel 3. Keberhasilan penerapan metode identifikasi patogen tanaman berbasis DNA

Metode	Nama Patogen	Inang	Matriks Sampel	Referensi
PCR Konvensional	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Kentang (<i>Solanum tuberosum</i>)	Jaringan umbi kentang	Pastrik & Maiss, 2000
<i>Nested</i> PCR	<i>Pilidiella granati</i>	Delima (<i>Punica granatum</i>)	Jaringan tanaman yang terinfeksi	Yang et al., 2017
<i>Multiplex</i> PCR	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Kastanye (<i>Castanea spp.</i>)	Jaringan batang	Sharma & Sharma, 2016; Chandelier et al., 2021
Nano-PCR	Tomato leaf curl virus	Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Daun	Devika et al., 2024
ddPCR	<i>Tilletia controversa</i>	Gandum (<i>Triticum aestivum</i>)	Tanah (teliospora)	Patel et al., 2022
LAMP	<i>Bretziella fagacearum</i>	Pohon Ek (<i>Quercus spp.</i>)	Jaringan xilem	Novi et al., 2024
RPA	<i>Xylella fastidiosa</i>	Blueberry (<i>Vaccinium spp.</i>)	Jaringan tanaman	Venbrux et al., 2023
NASBA	Potato virus Y	Kentang (<i>Solanum tuberosum</i>)	Daun	Sharma & Sharma, 2016
NGS	<i>Calonectria pseudonaviculata</i>	Tanaman hias (<i>Sarcococca spp.</i>)	Jaringan daun	Hariharan & Prasannath, 2021
CRISPR/Cas	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Jaringan akar	Dort et al., 2020

SIMPULAN DAN PROSPEK PENGEMBANGAN

Berdasarkan telaah terhadap berbagai pendekatan molekuler yang dibahas dalam tinjauan ini, dapat disimpulkan bahwa teknik identifikasi patogen tanaman berbasis DNA telah menjadi komponen kunci dalam sistem diagnosis penyakit tanaman modern. Beragam metode yang tersedia menunjukkan tingkat kinerja yang berbeda dalam mendeteksi patogen dari berbagai kelompok organisme dan jenis sampel, sehingga penggunaannya harus disesuaikan dengan konteks diagnostik yang spesifik. Tidak adanya satu metode yang bersifat universal menegaskan pentingnya pemilihan strategi diagnostik yang mempertimbangkan tujuan analisis, karakter patogen target, serta kondisi operasional di laboratorium maupun di lapangan.

Pengembangan metode identifikasi patogen tanaman berbasis DNA diharapkan semakin mengarah pada peningkatan efisiensi, kemudahan penggunaan, dan ketahanan terhadap senyawa penghambat dari matriks sampel tanaman. Perkembangan perangkat diagnostik portabel yang mengintegrasikan sistem ekstraksi DNA sederhana, metode amplifikasi isothermal, serta pembacaan hasil berbasis sensor atau visual membuka peluang penerapan diagnosis molekuler secara lebih luas dan praktis. Integrasi teknologi nanopartikel dan sistem CRISPR/Cas juga berpotensi mendukung pengembangan perangkat diagnostik yang ringkas dan mudah dioperasikan. Selain itu, pemanfaatan data

genomik dari teknologi NGS diharapkan dapat memperkaya basis informasi untuk pengembangan primer dan sistem deteksi yang lebih spesifik serta adaptif terhadap keragaman patogen. Secara keseluruhan, pengembangan dan integrasi berbagai pendekatan molekuler tersebut diharapkan dapat memperkuat sistem diagnosis penyakit tanaman dan mendukung pengelolaan pertanian yang berkelanjutan.

KEPUSTAKAAN

- Aragona M, Haegi A, Valente MT, Riccioni L, Orzali L, Vitale S, Luongo L, Infantino A. 2022. New-generation sequencing technology in diagnosis of fungal plant pathogens: a dream comes true? *Journal of Fungi* **8**(7): 737-758.
- Asysyuura A, Nawangsih AA, Mutaqin KH, Sudir S. 2017. Identifikasi patotipe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dari tanaman padi di Sulawesi Selatan. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* **13**(3): 73-80.
- Babu B, Ochoa-Corona FM, Paret ML. 2018. Recombinase polymerase amplification applied to plant virus detection and potential implications. *Analytical Biochemistry* **546**: 72-77.
- Bereswill S, Bugert P, Bruchm Iler I, Geider K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied Environmental Microbiology* **61**(7): 2636-2642.
- Calicioglu O, Flammini A, Bracco S, Bellù L, Sims R. 2019. The future challenges of food and agriculture: an integrated analysis of trends and solutions. *Sustainability* **11**(1): 222-243.
- Chandelier A, Hulin J, San Martin G, Debode F, Massart S. 2021. Comparison of qPCR and metabarcoding methods as tools for the detection of airborne inoculum of forest fungal pathogens. *Phytopathology* **111**(3): 570-581.
- Choi O, Bae J, Kang B, Lee Y, Kim S., Fuqua C, Kim J. 2019. Simple and economical biosensors for distinguishing *Agrobacterium*-mediated plant galls from nematode-mediated root knots. *Scientific Reports* (2019) **9**: 17961.
- Conti M, Cinget B, Vivancos J, Oudemans P, Bélanger RR. 2019. A molecular assay allows the simultaneous detection of 12 fungi causing fruit rot in cranberry. *Plant Disease* **103**(11): 2843-2850.
- Cubero J, Zarco-Tejada PJ, Cuesta-Morondo S, Palacio-Bielsa A, Navas-Cortés JA, Sabuquillo P, Poblete T, Landa BB, Garita-Cambronero J. 2024. New approaches to plant pathogen detection and disease diagnosis. *Phytopathology* **114**(9): 1989-2006.
- Dantas PV, Melo CF, Houllou LM, Machado G. 2017. Nanoparticle-assisted Polymerase Chain Reaction (NanoPCR): Optimization of PCR detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by the addition of nanoparticles. *Journal of Advanced Research* **2**(1): 13-20.
- Devika PP, Alex S, Soni KB, Sindura KP, Ayisha R, Manju RV. 2024. Nano-PCR for the early detection of tomato leaf curl virus. *Biotech* **14**(1): 5.
- Donoso A, Valenzuela S. 2018. In-field molecular diagnosis of plant pathogens: recent trends and future perspectives. *Plant Pathology* **67**(7): 1451-1461.
- Dort EN, Tanguay P, Hamelin RC. 2020. CRISPR/Cas9 gene editing: an unexplored frontier for forest pathology. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1126.
- Fang Y, Ramasamy R.P. 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* **5**: 537-561.
- Fry WE, Birch PRJ, Judelson HS, Grünwald NJ, Danies G, Everts KL, Gevens AJ, Gugino BK, Johnson DA, Johnson SB, McGrath MT, Myers KL, Ristaino JB, Roberts PD, Secor G, Smart CD. 2015. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. *Phytopathology* **105**(7): 966-981.
- Garibyan L, Avashia N. 2013. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology* **133**(3): 1-4.
- Guo J, Starr D, Guo H. 2020. Classification and review of free PCR primer design software. *Bioinformatics* **36**(23): 5263-5268.
- Gupta DR, Surovy MZ, Mahmud NU, Chakraborty M, Paul SK, Hossain MS, Bhattacharjee P, Mehebbub MS, Rani K, Yeasmin R, Rahman M. 2020. Suitable methods for isolation, culture, storage and identification of wheat blast fungus *Magnaporthe oryzae* Triticum pathotype. *Phytopathology Research* **2**(1): 30.
- Hamim I, Sekine KT, Komatsu K. 2022. How do emerging long-read sequencing technologies function in transforming the plant pathology research landscape? *Plant Molecular Biology* **110**(6): 469-84.
- Hariharan G, Prasannath K. 2021. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: a mini review. *Frontiers in Cell and Infection Microbiology* **10**: 600234.

- Inami K, Yoshioka C, Hirano Y, Kawabe M, Tsushima S, Teraoka T, Arie T. 2010. Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its races. *Journal of General Plant Pathology* **76(2)**: 116-121.
- Ivanović Ž, Blagojević J, Jovanović G, Ivanović B, Žeželj D. 2022. New insight in the occurrence of early blight disease on potato reveals high distribution of *Alternaria solani* and *Alternaria protenta* in Serbia. *Frontiers in Microbiology* **13**: 856898.
- Kalinina NO, Khromov A, Love AJ, Taliansky ME. 2020. CRISPR applications in plant virology: virus resistance and beyond. *Phytopathology* **110(1)**: 18-28.
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, Cahill D, Ruocco M, Figueiredo A, Chen XR, Hulvey J, Stam R, Lamour K, Gijzen M, Tyler BM, Grünwald NJ, Mukhtar MS, Tomé DFA., Tör M, Van Den Ackerveken G, McDowell J, Daayf F, Fry WE, Lindqvist-Kreuzer H, Meijer HJG, Petre B, Ristaino J, Yoshida K, Birch PRJ, Govers F. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **16(4)**: 413-34.
- Keller M, Naue J, Zengerle R, von Stetten F, Schmidt U. 2015. Automated forensic animal family identification by nested PCR and melt curve analysis on an off-the-shelf thermocycler augmented with a centrifugal microfluidic disk segment. *PLoS One* **10(7)**: e0131845.
- Khan M, Li B, Jiang Y, Weng Q, Chen Q. 2017. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the Ypt1 gene. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1920.
- Kimaru SL, Kilalo DC, Muiru WM, Kimenju JW, Thuku CR. 2020. Molecular detection of cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus infecting African Nightshades (*Solanum scabrum* Miller). *International Journal of Agronomy* **2020(1)**: 8864499.
- Koebnik R, Cesbron S, Chen NWG, Fischer-Le Saux, M, Hutin M, Jacques MA, Hutin M, Jacques MA, Noël LD, Perez-Quintero A, Portier P, Pruvost O, Rieux A, Szurek B. 2023. Celebrating the 20th anniversary of the first *Xanthomonas* genome sequences – How genomics revolutionized taxonomy, provided insight into the emergence of pathogenic bacteria, enabled new fundamental discoveries and helped developing novel control measures A perspective from the French network on *Xanthomonads*. *Peer Community Journal* **4**: e19.
- Kuzdraliński A, Kot A, Szczerba H, Nowak M, Muszyńska M. 2017. A review of conventional PCR assays for the detection of selected phytopathogens of wheat. *J Mol Microbiol Biotechnol* **27(3)**:175-89.
- Lau HY, Botella JR. 2017. Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1-14.
- Li J, Du J, Li S, Dong J, Ying J, Gu Y, Lu J, Zeng X, Kear P, Dou D, Wang X. 2023. Development of a portable DNA extraction and cross-priming amplification (CPA) tool for rapid in-situ visual diagnosis of plant diseases. *Phytopathology Research* **5(23)**: 1-15.
- Li J, Zhang Y. 2020. Biological characteristics and isolation of *Pythium ultimum* causing rot of Chinese cabbage. *Australasian Plant Pathology* **49(2)**: 201-7.
- Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, Villa P, Stroppiana D, Boschetti M, Goulart LR, Davis CE, Dandekar AM. 2015. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy or Sustainable Development* **35**: 1-25.
- Misawa T, Kurose D, Mori M, Toda T. 2018. Characterization of Japanese *Rhizoctonia solani* AG-2-1 isolates using rDNA-ITS sequences, culture morphology, and growth temperature. *Journal of General Plant Pathology* **84(6)**: 387-94.
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* **439**: 231-250.
- Neto JAS, Ambrósio MM, Araújo MB, Silva R, Maia D, Pinto PS, Holanda IS. 2022. Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango. *Revista Caatinga* **35**: 514-27.
- Noh CS, Kim SS, Park SY, Moon HS, Hong Y, Ryu JS. 2019. Comparison of two PCR assays for *Trichomonas vaginalis*. *Korean Journal of Parasitology* **57(1)**: 27-31.
- 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.
- Novi VT, Aboubakr HA, Moore MJ, Zarouri A, Juzwik J, Abbas A. 2024. A rapid LAMP assay for the diagnosis of oak wilt with the naked eye. *Plant Methods* **20(1)**: 119.
- Okulova ES, Burlakovskiy MS, Lutova LA. 2024. PCR-based genome walking methods. *Ecological Genetics* **22(1)**: 75-104.
- Pastrik KH, Maiss E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* **148(11-12)**: 619-26.

- Patel R, Mitra B, Vinchurkar M, Adami A, Patkar R, Giacomozzi F, Lorenzelli L, Baghini MS. 2022. A review of recent advances in plant-pathogen detection systems. *Heliyon* **8(12)**: e11855.
- Petrasch S, Knapp SJ, van Kan JAL, Blanco-Ulate B. 2019. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* **20(6)**: 877–92.
- Preethi S, Umesha S. 2025. A glimpse towards advanced molecular diagnostics for the detection of phytopathogens. *Journal of Mycopathological Research* **63**:1-5.
- Rigotti S, Gindro K, Viret O. 2006. Two New Primers Highly Specific for the Detection of "*Botrytis cinerea*" Pers. Fr. *Phytopathologia Mediterranea* **2006**: 1000-1008.
- Sabbadin F, Urresti S, Henrissat B, Avrova AO, Welsh LRJ, Lindley PJ, Csukai M, Squires JN, Walton PH, Davies GJ, Bruce NC, Whisson SC, McQueen-Mason SJ. 2021. Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes. *Science* **373(6556)**: 774–779.
- Sasmito DEK, Kurniawan R, Muhimmah I. 2014. Karakteristik primer pada polymerase chain reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: Mini review. *SNIMed* **2014**: 93-102.
- Sharma P, Sharma S. 2016. *Paradigm shift in plant disease diagnostics: a journey from conventional diagnostics to nano-diagnostics*. Springer International Publishing, Cham: Switzerland.
- Sidik EA, Hartono S, Sulandari S, Lukman R, Affifudin A, Wahyudin D, Santoso HB. 2023. Molecular detection of Pepper yellow leaf curl virus, Tomato leaf curl virus, Tomato yellow leaf curl virus, and Mungbean yellow mosaic virus on eggplant, tomato, and pepper at different altitudes in East Java, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **1230(1)**: 012117.
- Spadaro, D., and Gullino, M. L. 2019. *Sustainable management of plant diseases*. Springer International Publishing, Cham: Switzerland.
- Venbrux M, Crauwels S, Rediers H. 2023. Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Frontiers in Plant Science* **14**: 1120968.
- Vincelli P, Tisserat N. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Disease* **92**: 660–669.
- Withers S, Gongora-Castillo E, Gent D, Thomas A, Ojiambo PS, Quesada-Ocampo LM. 2016. Using next-generation sequencing to develop molecular diagnostics for *Pseudoperonospora cubensis*, the cucurbit downy mildew pathogen. *Phytopathology* **106(10)**:1105-16.
- Yang X, Hameed U, Zhang AF, Zang HY, Gu CY, Chen Y, Xu YL. 2017. Development of a nested-PCR assay for the rapid detection of *Pilidiella granati* in pomegranate fruit. *Scientific Reports* **7(1)**:40954.
- Zaccardelli M, Spasiano A, Bazzi C, Merighi M. 2005. Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato using PCR amplification of hrpZ Pst. *European Journal of Plant Pathology* **111(1)**:85-90.