

## INFORME DE DIFUSIÓN PROGRAMA FORMACION PARA LA PARTICIPACION

### 1 Nombre de la propuesta :

Actualización técnica y generación de redes de colaboración para el desarrollo de proyectos comunes en fitopatología.

### Modalidad

Apoyo a la participación en actividades de formación: Asistencia al Congreso Anual de la Sociedad de Fitopatología Americana (APS) y Visita Técnica a los Centros de Investigación de la Universidad de Florida- Departamento de Fitopatología

### 1.2 Lugar donde se llevo a cabo la formación

Estados Unidos, Milwaukee (Wisconsin), Gainesville, Bradenton (Florida)

### 1.3 Rubro / Area temática de la actividad de formación

Fitopatología-Biotecnología

### 1.4 Fecha en la que se efectuó la actividad de formación:

Inicio: 26 de Julio 2002; Termino: 6 Agosto 2002

### 1.5 Postulante

Inés Marlene Rosales V. Investigadora patrocinada por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

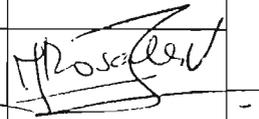
### 1.6 Entidad Responsable

Instituto de Investigaciones Agropecuarias –CRI La Platina

### 1.7 Coordinador

Inés Marlene Rosales V

## 1.8 Identificación de los participantes de la propuesta

NOMBRE	RUT	TELEFONO FAX E-MAIL	DIRECCION POSTAL	ACTIVIDAD PRINCIPAL	FIRMA
Inés Marlene Rosales V		541-7223	Santa Rosa 11610, La Pintana, Santiago, Chile	Investigador Unidad de Biotecnología	
		541- 6687			
		mrosales@platina.inia.cl			

## 2. ACTIVIDADES DE TRASFERENCIA

### 2.1. Resumen actividades de transferencia PROPUESTAS

FECHA	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR	Nº y TIPO BENEFICIARIOS
6-09-02	Seminario	Informar a los miembros de nuestro laboratorio e invitados externos de los avances más relevantes en el área de la biotecnología y la patología vegetal que hayan sido presentados durante el Congreso Anual de la Sociedad Fitopatológica Americana.	INIA-CRI I La Platina	Esta actividad será especialmente dirigida a los miembros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CRI-La Platina, así como también al resto de los miembros de este Centro de Investigación. Se extenderá la invitación a los miembros de la Sociedad Chilena de Fitopatología y público en general

3-10-02	Charla informativa	Explicar a agricultores y productores la importancia del diagnóstico de enfermedades en plantas y las ventajas del uso de tecnología de punta.	INIA-CRI La platina	Charla orientada a productores, viveristas, exportadores, público en general
Octubre 2002	Publicación de documento informativo en página web del laboratorio de Biotecnología del CRI-La Platina	Generar un documento de divulgación que explique el uso de las herramientas moleculares en el diagnóstico y detección de fitopatógenos	Sitio web laboratorio de Biotecnología del CRI-La Platina	Documento de libre disponibilidad a todos aquellos usuarios que accedan al sitio web

## 2.1. Resumen actividades de transferencia REALIZADAS

FECHA	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR	Nº y TIPO BENEFICIARIOS
Martes 10 de Septiembre de 2002	Seminario	Informar a los miembros de nuestro laboratorio e invitados externos de los avances más relevantes en el área de la biotecnología y la patología vegetal que hayan sido presentados durante el Congreso Anual de la Sociedad Fitopatológica Americana.	INIA-CRI ILa Platina	Esta actividad será especialmente dirigida a los miembros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CRI-La Platina, así como también al resto de los miembros de este Centro de Investigación. Se extenderá la invitación a los miembros de la Sociedad Chilena de Fitopatología y público

<p>11 de Octubre de 2002</p>	<p>Charla informativa "Biotecnología en la producción de plantas sanas y el diagnóstico de plagas y enfermedades".</p>	<p>Explicar a agricultores y productores la importancia del diagnóstico de enfermedades en plantas y las ventajas del uso de tecnología de punta.</p>	<p>INIA-CRI La platina</p>	<p>en general Charla orientada productores, viveristas, exportadores, público en general. Esta actividad se realizó en el contexto de las actividades organizadas por la Unidad de Capacitación y Transferencia Tecnológica del INIA- CRI La Platina</p>
<p>Entregado a la unidad encargada del sitio web de INIA 21 de Octubre 2002</p>	<p>Publicación de documento informativo en página web del laboratorio de Biotecnología del CRI- La Platina</p>	<p>Generar un documento de divulgación que explique el uso de las herramientas moleculares en el diagnóstico y detección de fitopatógenos</p>	<p>Sitio web laboratorio de Biotecnología del CRI-La Platina</p>	<p>Documento de libre disponibilidad a todos aquellos usuarios que accedan al sitio web</p>

## 2.2. Detalle por actividad de transferencia REALIZADAS

Fecha     Martes 10 de Septiembre de 2002    

Lugar (Ciudad e Institución)     Santiago, INIA- CRI La Platina    

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada) . Durante este seminario se dió a conocer al público asistente los avances más relevantes en el área de la biotecnología y la patología vegetal que hayan sido presentados durante el Congreso Anual de la Sociedad Fitopatológica Americana. Entre otros temas se expuso la posición de la Sociedad Fitopatológica Americana ante los proyectos de secuenciación de genomas microbianos, Novedades en la relación virus vector y transmisión circulativa de virus vegetales, y usos del Real time PCR en diagnóstico de fitopatógenos.

---

Fecha     11 de Octubre 2002    

Lugar (Ciudad e Institución)     Santiago- INIA CRI- La Platina    

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada) Se dictó la charla Informativa “**Bioteecnología en la producción de plantas sanas y el diagnóstico de plagas y enfermedades**”, en el marco de las actividades de difusión organizadas por la Unidad de Capacitación y Transferencia Tecnológica del INIA-CRI La Platina . En la charla participaron Marlene Rosales, Nicole Hewstone y Carlos Aguirre, Investigadores de la Unidad de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)-CRI La Platina. Se trataron temas como el usos y aplicaciones del cultivo de tejido como apoyo a un programa de mejoramiento genético, uso de herramientas moleculares en el diagnóstico de plagas y enfermedades.

---

Fecha     Octubre 2002    

Lugar (Ciudad e Institución)                      Sitio                      WEB  
INIA                     

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada) Se generó un documento de divulgación que explique el uso de las herramientas moleculares en el diagnóstico y detección de fitopatógenos. Se adjunta el material entregado a

la Unidad mantenedora del sitio web INIA para que lo incorpore a las “novedades” de la página web de Biotecnología de nuestra Institución.

---

**2.2. Especificar el grado de éxito de las actividades propuestas, dando razones de los problemas presentados y sugerencias para mejorar.**

Las actividades de seminario y Charla de difusión contaron con buena asistencia de público, aunque existió una tendencia de éstos a llegar después de la hora citada, aspecto que se aleja de las posibilidades de injerencia de la persona ejecutora de la actividad. Como principio general, se esperó un tiempo razonable (5 -10 minutos más tarde de la hora citada) y se dió inicio a la actividad. En ambas actividades existió una notable participación del público quien realizó numerosas y variadas preguntas.

---



---



---

**2.3. Listado de documentos o materiales mostrados en las actividades y entregados a los asistentes (escrito y/o visual). (Se debe adjuntar una copia del material)**

Tipo de material	Nombre o identificación	Idioma	Cantidad
Presentación Power Point	Seminario Martes 10 de Septiembre de 2002	Español	uno
Presentación Power Point	11 de Octubre de 2002 Charla informativa “Biotecnología en la producción de plantas sanas y el diagnóstico de plagas y enfermedades”.	Español	uno
Documento a publicar en sitio web	Diagnóstico de enfermedades en plantas: Uso de herramientas moleculares	Español	uno



### 3. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Indicar los problemas administrativos que surgieron en la preparación y realización de las actividades de difusión.

No se presentaron problemas administrativos considerables durante la preparación y/o realización de las actividades de difusión. Cabe destacar que el apoyo que se tuvo de la Unidad de Transferencia del INIA-CRI La Platina para la segunda actividad de formación. Esto significó en términos prácticos que ellos se encargaran de la organización, difusión y recepción de los asistentes, dejando a cargo de los presentadores sólo la responsabilidad de preparar el material a mostrar. Esta modalidad permite concentrarse sólo en la información a entregar y delegar actividades que a menudo consumen valioso tiempo. Sin embargo, ya que esta actividad estaba a cargo de esta unidad, se debió respetar la modalidad del registro de asistencia que ellos utilizan, y que se anexa al final de este documento. Esta forma contempla varios de los antecedentes requeridos por FIA, por lo que se espera sea válido como prueba de que la actividad fue realizada. Ya que INIA requiere contar con la hoja original de asistencia, se ha entregado una copia Excel con el listado de asistentes.

Fecha: octubre de 2002 \_\_\_\_\_

Firma responsable de la ejecución: \_\_\_\_\_

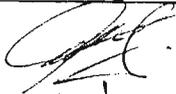
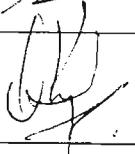
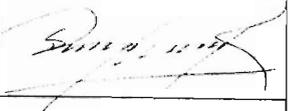
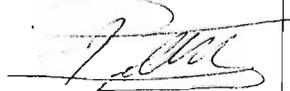
Marlene Rosales.

10.09.02.

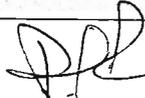
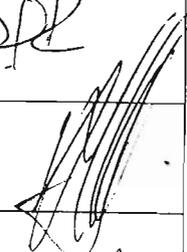
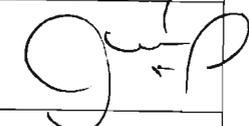
**ASISTENTES A ACTIVIDAD DE DIFUSIÓN**

Nombre	Actividad Principal	Institución o Empresa	Teléfono Fax e-mail	Firma
Polange Cea C	Ay. de Investigacion	La Platina	7575208	Polange Cea
Patricia Pabul	Ayudante de Investigación	La Platina	7575208 7575206	Pabul
Blanca Olmedo M.	Ayudante de Investigación	La Platina	7575126 7575125	Blanca Olmedo M.
Nicola Flores	Investigador	U. de Chile	Tel/Fax: 6785726 nicolaflore_2000.cl@yahoo.com	Nicola Flores
Clide Heustone	Investigador	INIA Platina	7575153	Clide Heustone
Gabriel Saavedra	Investigador	INIA - La Platina	7775154	Gabriel Saavedra
Cristóbal Avila	Estudiante Agronomo U. Chile	U. de Chile	8122271 092726782 SuperHuss@Hot401.cl	Cristóbal Avila
Andrés Gutiérrez	Ayudante de Investigación	Platina	7575126	Andrés Gutiérrez
Isela Escudero	AYUDANTE DE INVESTIGACION	La Platina	7575126 7575125	Isela Escudero

## ASISTENTES A ACTIVIDAD DE DIFUSIÓN

Nombre	Actividad Principal	Institución o Empresa	Teléfono Fax e-mail	Firma
Carlos Aguirre	Investigador	La Platina	5417223	
Victor Obregón	Investigador	La Platina	5417223 (fono) lplatin@platinia.iaic.cl 5417667 (fax)	
Matilde Jorjés	Investigador	USACH	6812575	M. Jorjés
Simona De Felice		La Platina	7575129 7575203	Simona De Felice
Alvaro Castro	Investigación	La Platina		
Sergio Diez de Medina		La Platina	2225140	
María H. López	Ay. de Investigación	INSV	7575213	M. H. López
Ximena García	Investigación	La Platina	7575129	Ximena
Luis Romero Sáez	Ay. de Investigación	La Platina	7575244	

## ASISTENTES A ACTIVIDAD DE DIFUSIÓN

Nombre	Actividad Principal	Institución o Empresa	Teléfono Fax e-mail	Firma
Paulina Sepulveda	Investigadora	INIA	7575 147	
MARCOS HUAY	Sociedad Vegetal	SAG	6983514 6966480 m. huay@unzuej. gob. cl.	
SIMONIA PRODAN	Bioquímico - Virología	Fac. Cs. Agronomicas U. de Chile	6785726	Simon Prodan
CLAUDIO MATZVAETZ	Bioquímico	✓	6785714	

<b>CHARLA TECNICA :</b>		<b>SEMINARIO BIOTECNOLOGIA : NOVEDADES TECNOLOGICAS: BIOTECNOLOGIA EN LA JPRODUCCION DE PLANTAS SANAS Y DIAGNOSTICO DE PLAGAS Y ENFERME</b>		
<b>Investigador Responsable:</b>		<b>MARLENE ROSALES; NICOLE HEWSTONE; CARLOS AGUIRRE</b>		
<b>Fecha:</b>		11,10,02		
<b>ASISTENCIA</b>		30		
<b>NOMBRE</b>	<b>APELLIDO</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>FONO /FAX</b>	<b>DIRECCION /CORREO</b>
1 ALEJANDRA	CRUZAT	ESTUDIANTE	2051107	U. DE LAS AMERICAS
2 XIMENA	LIBANO	CONSULTORA	09-8726767	xlibano@vtr.net
3 LORETO	BURGOS	SUPERV. FIA	4313024	lburgos@fia.gob.cl
4 ROSA	PIÑA	JEFA LAB. EXP PIGA	3795252	pathologi@piga.ia.cl
5 MARISOL	RICALDI	EX. PIGA	3795252	pathologi@piga.ia.cl
6 CATALINA	ALVAREZ	EX. PIGA	3795252	pathologi@piga.ia.cl
7 DANIEL	SALAS	ESTUDIANTE	6785803	U. DE CHILE
8 ALEJANDRA	RAMOS	ESTUDIANTE	9.5139895	U. DEL MAR
9 GABRIEL	SAAVEDRA	ING. AGRONOMO	5417223	LA PLATINA
10 JAVIERA	GONZALEZ	ING. AGRONOMO	6785867	U. DE CHILE LAB. BIOQUIMICA
11 MARIZTA	BERTI	ING. AGRONOMO	6785867	U. DE CHILE LAB. BIOQUIMICA
12 PAULA	PERMENTEL	ING. AGRONOMO	6785867	U. DE CHILE LAB. BIOQUIMICA
13 CAROLINA	LIZANA	ING. AGRONOMO	6785867	U. DE CHILE LAB. BIOQUIMICA
14 JUAN PABLO	MARTINEZ	ING. AGRONOMO	6785867	U. DE CHILE LAB. BIOQUIMICA
15 RENE	PARRA	EXP. ARCO VERDE	2343390	
16 CARLOS	FONG	EXP. ARCO VERDE	2343390	
17 CRISTIAN	PASTEN	T. AGRICOLA	5417223	LA PLATINA
18 GLORIA	TOBAR	T. AGRICOLA	5417223	LA PLATINA
19 JORGE	VERA	BIOQUIMICO	6812575	USACH LAB. DE FISILOGIA VEGETAL
20 SIMON	SEGOVIC	BIOQUIMICO	6812575	USACH LAB. DE FISILOGIA VEGETAL
21 MELISSA	TORRES	BIOQUIMICO	6812575	USACH LAB. DE FISILOGIA VEGETAL
22 MARIO	ALVAREZ	ING. AGRONOMO	5417223	LA PLATINA
23 MANUEL	ARAYA	ING. AGRONOMO	5417223	U. DE CHILE
24 SANDRA	ORELLANA	BIOQUIMICO	6812575	USACH LAB. DE FISILOGIA VEGETAL
25 SUSANA	RASMUSSEN	BIOQUIMICO	6812575	USACH LAB. DE FISILOGIA VEGETAL
26 MOISES	ESCAFF	ING. AGRONOMO	5417223	LA PLATINA
27 ODETTE	ULLOA	FIA	4313024	
28 CISTINA	PAEZ	ESTUDIANTE		U. CATOLICA
29 DANIELA	MORIAMEZ	ESTUDIANTE		U. DE CHILE
30 CLAUDIO	NARVAEZ	BIOQUIMICO	6785867	U. DE CHILE LAB. BIOQUIMICA



## **Anexo 1. Presentación Power Point Seminario Martes 10 de Septiembre de 2002**

## ACTUALIZACIÓN TÉCNICA Y GENERACIÓN DE REDES DE COLABORACIÓN PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS COMUNES EN FITOPATOLOGÍA

FP-V-2002-1- A - 028



## Programa de Formación para la Innovación Agraria

Apoyo financiero para:

1. Participación en cursos cortos, cursos de especialización, pasantías o entrenamientos y eventos técnicos (seminarios, congresos).
  2. Realización de actividades de formación (cursos, pasantías)
- Postulación individual, o patrocinada.
  - Postulación debe ajustarse a las condiciones establecidas en las "Bases Generales e Instructivos" y en el Formulario de Presentación de la propuesta".

[www.fla.gob.cl](http://www.fla.gob.cl)



## ACTUALIZACIÓN TÉCNICA Y GENERACIÓN DE REDES DE COLABORACIÓN PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS COMUNES EN FITOPATOLOGÍA

### Objetivo General:

Asistir a un Congreso Científico Internacional que nos permita actualizar nuestro conocimiento en los avances y tendencias de la investigación en el área de la fitopatología, y promover la interrelación y/o cooperación con grupos de investigación extranjeros.

### Actividades:

1. Congreso Anual de la Sociedad Fitopatológica Americana, (Milwaukee, Wisconsin).
2. Visita técnica a laboratorios del Departamento de Fitopatología de la Universidad de Florida



## REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE FITOPATOLOGÍA AMERICANA 27-31 JULIO, MILWAUKEE, WI

Asistentes: > 1500 (30 países)  
715 presentaciones  
24 Simposios  
152 Presentaciones Orales  
525 Posters  
11 Grupos de Discusión  
3 Reuniones de Trabajo  
3 Visitas de Campo



## CONFERENCIAS

- Bioseguridad de Cultivos
- Prioridades en la secuenciación de genomas microbianos
- Interacción entre bacterias endosimbiontes y la transmisión circulativa de virus
- Genómica funcional de la interacción planta-patógeno
- ¿Cuántos genes necesita un patógeno vegetal?
- Muerte celular programada en patologías y desarrollo
- Vectores de expresión viral
- Comparación de las técnicas de marcadores moleculares y su uso en programas de mejoramiento
- Impacto de las plagas y enfermedades en agricultores de escasos recursos en países en desarrollo. Pueden estas ser controladas con éxito?



## SECUENCIACIÓN DE GENOMAS MICROBIANOS



## NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Total proyectos: 215

### 1. Finalizados: 81

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Nereisena gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58
<i>Buchnera</i> sp. APS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Raistroria solanacearum</i>
<i>Escherichia coli</i> K12	<i>Salmorella typhi</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Stachybotrys aureus</i> N315
<i>Helicobacter pylori</i> 26895	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	<i>Xanthomonas citri</i>
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>

### 2. En marcha: 134

<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i> strain 3907
<i>Xylella fastidiosa</i> /Pierce's disease strain	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>
<i>Xylella fastidiosa</i> strain <i>paton</i>	<i>Wolbachia</i> sp.



## RECOMENDACIONES DE APS

- En los próximos 5 años financiar proyectos por ~ US\$500 millones.
- Potenciar proyectos colaborativos, bien coordinados y multinacionales
- Asociaciones públicas y privadas (requerimiento **dominio público**)
- Fuerte inversión en entrenamiento y educación
- Desarrollar herramientas bioinformáticas estandarizadas y bases de datos de acceso público.

Criterios de selección: Importancia económica, interés comunidad científica o agrícola, disponibilidad herramientas genéticas, biológicas y moleculares



## Prioridades: Hongos y Oomycetes (26)

1. *Magnaporthe oryzae* (rice blast fungus, 40 Mb)
2. *Phytophthora infestans* (potato late blight, 237 Mb)
3. *Fusarium graminearum* (wheat head scab fungus, 40 Mb)
4. *Aspergillus flavus* ~ 20 Mb
5. *Ustilago maydis* (corn smut fungus, 20 Mb)
6. *Puccinia graminis* cereali rust 67 Mb
7. *Fusarium moniliforme* (48 Mb)
8. *Cochliobolus heterostrophus* (southern corn leaf blight)
8. *Sclerotinia sclerotiorum* gray mold
10. *Colletotrichum graminicola* (Glomerella teleomorph)
11. *Mycosphaerella graminicola*
12. *Cryphonectria parasitica* (chestnut blight fungus)
12. *Epichloa sp.* grass endophyte 29-35 Mb
14. *Pythium lituim*



## Prioridades: Bacterias

- E. amylovora* (fire blight ~ 4.5 Mb)
- Streptomyces scabies* (wart/russet on potato)
- Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* (wilt on corn ~ 4.7 Mb)
- Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (soft rot disease, ~ 4.0 Mb)

## Prioridades: Moléculas

1. *Spiroplasma kunkelii* (corn stunt, 2400 kb)
2. Western X phytoplasma (870 kb)
3. *Spiroplasma citri* (1800 kb)
4. Aster yellows phytoplasma (1100 kb)
5. *S. floridica* 23-6 (2800 kb)



## Prioridades: Virus

1. Potyvirus/ Trillmovirus: Maize dwarf mosaic, Bean common mosaic, Soybean mosaic, Potato Y, Wheat streak
2. Closterovirus/ Citriviruses: Citrus tristeza, Tomato chlorosis, Pineapple mealybug wilt bug
3. Begomovirus/Curtoviruses: Varis razas, mono-bipartitos
4. Tospoviruses: Tomato spotted wilt
5. Tombusvirus: Tomato bushy stunt, Cucumber necrosis
6. Lutecovirus/Peterovirus: Barley yellow dwarf, Beet western yellows
7. Cucumovirus: Cucumber mosaic
8. Rhabdovirus: SBYV Sorghum yellow vein



## Prioridades: Nematodos

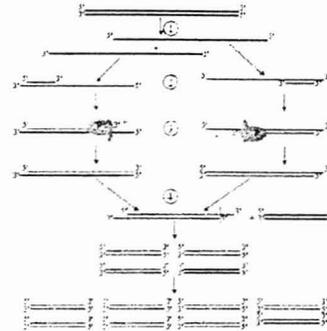
1. *Meloidogyne incognita* (Southern rootknot nematode)
2. *Pratylenchus penetrans* (Lesion nematode)
3. *Globoatera pallida* (Potato cyst nematode)
4. *Ditylenchus dipsaci* (Stem nematode)
5. *Meloidogyne hapla* (Northern root knot nematode)
6. *Heterodera glycines* (Soybean cyst nematode)
7. *Radopholus similis* (Burrowing nematode)
8. *Aphelenchoides fragariae* (Folia nematode)
9. *Nacobus albesans* (Faise root knot nematode)
10. *Polytylenchus reniformis* (Reniform nematode)



## APLICACIONES DE REAL-TIME PCR



## REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

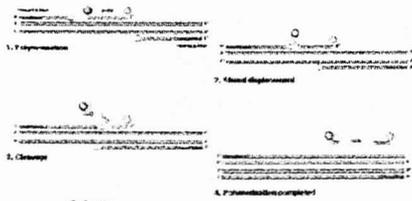


Kary B. Muis



## Actividad 5'-nucleasa

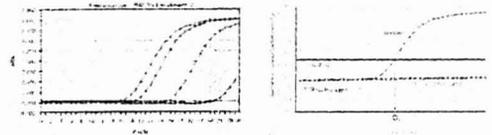
### Fluorogénte 5' nucleasa assay (TaqMan chemistry)



Fluorophore  
Quencher



## Detección automática del producto de PCR amplificado

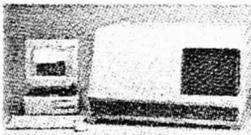


### Ventajas de la tecnología de REAL-TIME PCR

- Bajo riesgo de contaminación
- No existe procesamiento post-PCR
- Información en tiempo real que permite cuantificar DNA blanco
- Detección varios patógenos por reacción.
- Reducida influencia de los inhibidores de PCR en la reacción.



### ABI Prism 7700 Sequence Detection System for real-time fluorescent nucleic acid sequencing



Taqman 7700, PE Biosystems



Smart-Cycler, Cepheid



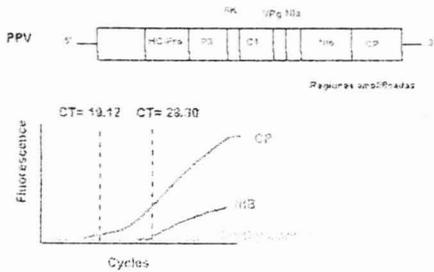
## REAL-TIME PCR AND DETECTION

1. Specific detection and quantification of plum pox potyvirus by real-time fluorescent RT-PCR.
2. Yellow dwarf virus quantification by real-time PCR during disease development in resistant and susceptible plants.
3. Sensitive, high-throughput, real-time PCR for field diagnosis of citrus canker.
4. Use of real-time PCR and high throughput detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.
5. Use of portable real-time PCR for same-day on-site field diagnosis of bacterial diseases.
6. Real-time fluorescent PCR detection of fungal plant pathogen using the Smart Cycler.



**Specific detection and quantification of plum pox polyvirus by real-time fluorescent RT-PCR**

D.J. Sherman, W.L. Schneider, A.L. Stone, V.D. Damsleigt, and R.D. Frederick, USDA Agriculture Research Service, Foreign Disease-Weed Science Research Unit, Fort Detrick, MD.



**Specific detection and quantification of plum pox polyvirus by real-time fluorescent RT-PCR**

**Características del ensayo de Real-time RT-PCR para PPV**

- Alta sensibilidad:
  - Límite de detección: 10fg PPV-RNA
  - 10X más sensible que ELISA test
- Puede utilizarse en ensayos de cuantificación de título viral
- Específico

**DETECTA (PPV)**

- Todas las razas Europeas
- Todas las razas de Pennsylvania
- En diferentes hospederos
- Mayoría tejidos de Prunus
- En años

**NO DETECTA**

- Otros virus en Prunus
- Otros potyvirus
- mRNA de la planta

**INTERACCIÓN ENTRE BACTERIAS ENDOSIMBIOTES Y LA TRANSMISIÓN CIRCULATIVA DE VIRUS**



**TRANSMISIÓN DE VIRUS**

- **Circulativa (Persistente):** Adquisición del virus a través del canal alimentario. Translocación al hemocel (sist. circulatorio abierto) y sistema secretorio salival. Período latencia (días, semanas). Transmisión por períodos largos.

**Propagativa - No Propagativa**



**TRANSMISIÓN DE VIRUS**

- **No circulativa:** Virus asociado con estilete o estructuras canal alimentario anterior. No existe período de latencia. Pérdida capacidad transmisión min-hrs.

**Semi-persistente - No persistente**



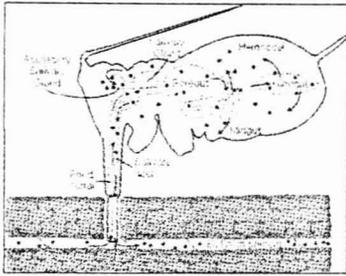
**Luteovirus; Polerovirus; Enamovirus; Begomovirus**



La degradación de las partículas virales en el hemocel del vector (áfidos o mosca blanca) es evitada por la interacción del virión con *Buchnera* - GroEL.

**GroEL**

Homólogo de HSP60 interactúa con CP del virus. Aminoácidos del dominio ecuatorial.



**Begomovirus - Geminiviridae  
TYLCV**

- Mosca Blanca (*B. tabaci*), 2 endosimbiontes (P-type: bact. coxide)
- Anti-GroEL anticuerpos reconocen proteína ~ 70 kDa (endosimbionte coxide)
- TYLCV-CP se une a GroEL homólogo
- Moscas blancas alimentadas con anticuerpos anti-GroEL antes de adquirir el virus reducen transmisión a un 20% del valor normal



**INTERESANTES**

1. APS-Group membership (US\$60)
2. Congreso APS 2003: 9-13 Agosto, Charlotte, North Caroline
3. Congreso Annual: Abril 6-11, 2003. South Padre Island, Texas  
APS-Caribbean Division  
APS-Southern Division  
Sociedad Latinoamericana de Fitopatología  
Sociedad Mexicana de Fitopatología
4. XII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología.  
1-4 de Octubre, Puerto Varas.

**GRACIAS POR SU ATENCIÓN**

**¿PREGUNTAS?**

## Diagnóstico de enfermedades en plantas: Uso de herramientas moleculares

Ingeniero Roberto Rosales V.

Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)  
CIR-La Placina

Octubre 11, 2002

## Diagnóstico ↔ Manejo

Examinación visual  
Pruebas de Laboratorio

Que se busca?

- Bajo costo
- Confiabilidad
- Resultados rápidos

## Hitos en el diagnóstico de fitopatógenos

• Diagnóstico basado en reacciones serológicas  
(antígeno-anticuerpo)

- Anticuerpos monoclonales
- ELISA

• Diagnóstico basado en la detección de ácidos nucleicos

- PCR
- Sondas DNA, RNA

➤ Próximo desafío: Detección ilimitada de múltiples patógenos en una reacción

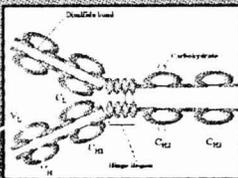
## TÉCNICAS SEROLÓGICAS

## INMUNOGLOBULINAS

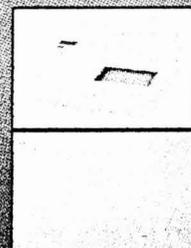
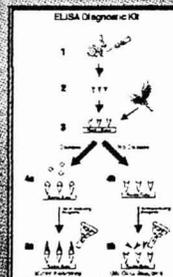
• Proteínas producidas en células especializadas del sistema inmune (anticuerpos)

• Estructura: 4 cadenas, 2 cadenas variables, 2 constantes

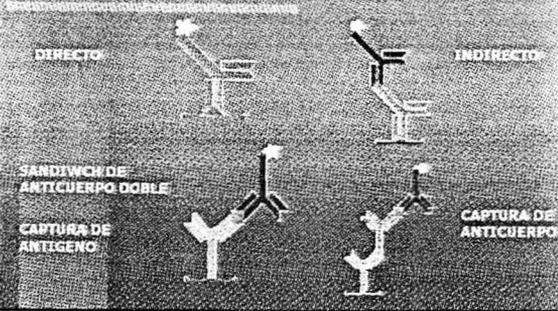
• Fab: Unión del antígeno



## TEST DE ELISA



## VARIACIONES DE ELISA

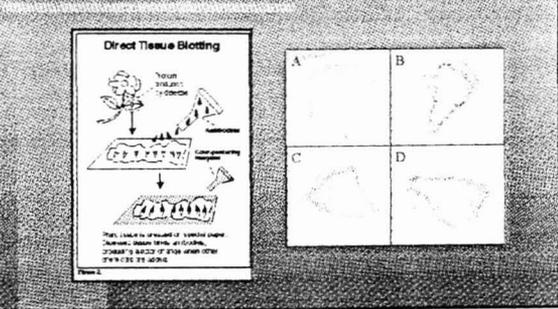


## ... ELISA

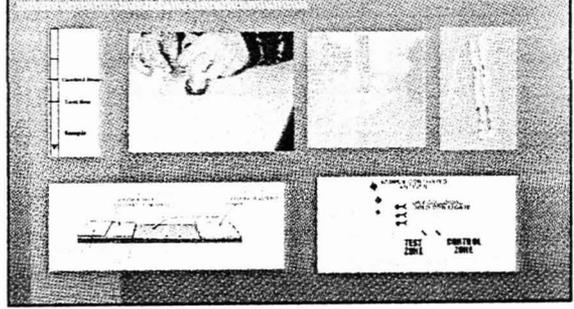
Es una prueba de diagnóstico para la detección de patógenos considerada sensible, pues detecta bajos niveles de patógenos en las plantas.

Posee tres características que la sintetizan: específica, rápida y económica.

## INMUNOPRESION DE TEJIDOS



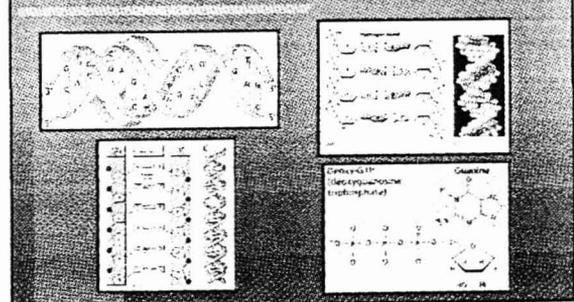
## TEST DE FLUJO LATERAL



## TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS

- ◀ Sondas RNA/DNA
- ◀ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

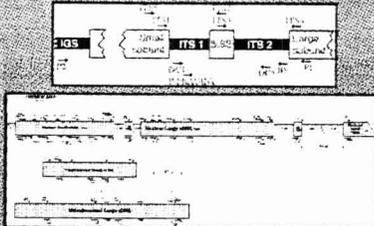
## ESTRUCTURA DEL ADN





## Secuencias Utilizadas

### HONGOS y OOMICETES



## ...PCR

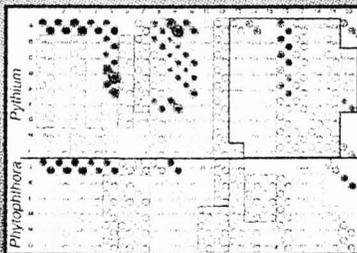
### Ventajas:

- Sensibilidad (100 a 1000X más sensible que ELISA)
- Rápidos
- Potencial para detectar varios patógenos simultáneamente
- No es necesario cultivar previamente el organismo

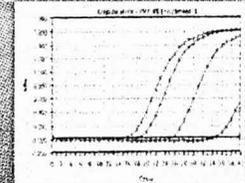
### Desventajas:

- Alto costo
- Procesamiento de muestra
- Peligro de contaminación, falsos positivos

## Lo que viene ... "Detección simultánea"



## Lo que viene ... PCR en Tiempo Real



### Ventajas:

- Bajo riesgo de contaminación; No existe procesamiento post-PCR;
- Cuantificación DNA blanco; Detección varios patógenos por reacción;
- Reducida influencia de los inhibidores de PCR en la reacción.

<http://www.inia.cl/biotecnologia/>



Grupo de Biotecnología, INIA La Plátina  
Año 2002

"ACTUALIZACIÓN TÉCNICA Y GENERACIÓN DE REDES DE COLABORACIÓN PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS COMUNES EN FITOPATOLOGÍA"

Fundación Para la Innovación Agraria (FIA)  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)



## **Documento:**

# **“Diagnóstico de enfermedades en plantas: Uso de herramientas moleculares”**

# **Diagnóstico de Enfermedades en Plantas: Uso de Herramientas Moleculares**

**Inés Marlene Rosales V.**

**Unidad de Biotecnología - INIA-CRI La Platina**

**Documento de difusión elaborado en el marco del Proyecto “ACTUALIZACIÓN TÉCNICA Y GENERACIÓN DE REDES DE COLABORACIÓN PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS COMUNES EN FITOPATOLOGÍA” (FP-V-2002-1-A -028), financiado por la Fundación Para la Innovación Agraria (FIA) y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).**

## **Diagnóstico de Enfermedades en Plantas: Uso de Herramientas Moleculares.**

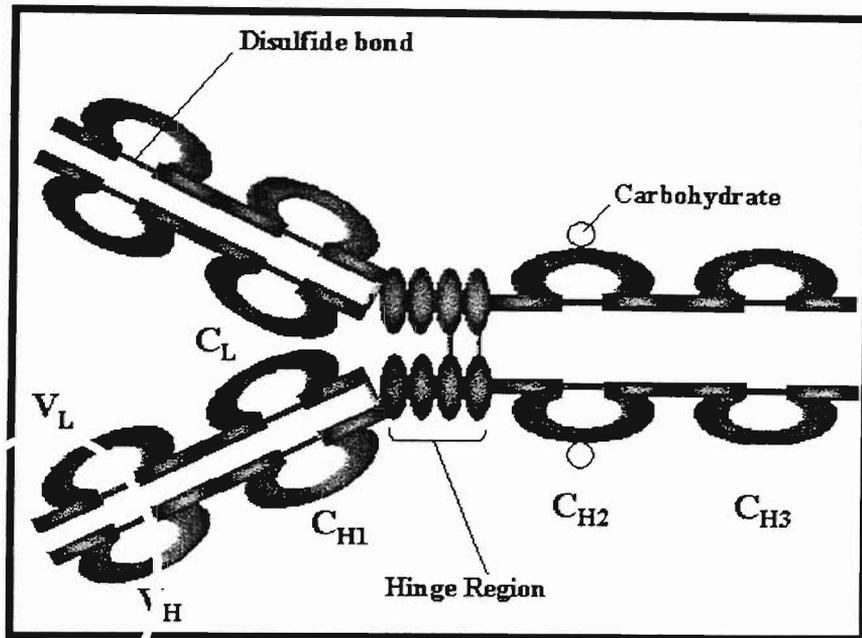
Uno de los requerimientos más importantes para el manejo adecuado de una enfermedad es la identificación correcta del agente fitopatógeno, de forma de iniciar un tratamiento adecuado lo más temprano posible. Algunas enfermedades pueden diagnosticarse fácilmente por medio de una examinación visual, pero otras requieren pruebas de laboratorio para su diagnóstico. Estos procedimientos pueden algunas veces tomar varios días o semanas, y en algunos casos poseer escasa sensibilidad. Afortunadamente, producto del avance de la biotecnología, existen hoy en día nuevos productos y técnicas que están disponibles para complementar o reemplazar los procedimientos de laboratorio, de forma de acelerar la obtención de resultados y permitir un diagnóstico más temprano. Las enfermedades causadas por microorganismos pueden ser diagnosticadas por medio de la identificación de una característica única del organismo, tales como su material genético o una proteína. Las técnicas moleculares para la detección de fitopatógenos han sido impactadas profundamente por dos grandes advenimientos en los últimos 30 años. Primero fue la detección basada en el uso de anticuerpos, con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales (2) y del test de ELISA (Enzyme Linked immunosorbent assay) (1). Estos avances impactaron especialmente a la virología y bacteriología, ya que estos agentes patógenos pudieron ser identificados y detectados mucho más rápidamente (5). Luego vinieron las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos, tales como la “reacción en cadena de la polimerasa” y su capacidad de amplificar el ADN blanco millones de veces (6). Se espera que en el futuro cercano el diagnóstico de patógenos enfrente una nueva revolución tecnológica, la que permitirá una detección ilimitada de agentes por ensayo, con gran sensibilidad, exactitud y rapidez. Estos avances serán posibles gracias a los actuales esfuerzos que se desarrollan en el área de la investigación genómica y de la bioinformática.

A continuación se detallan algunas características, limitaciones y virtudes de las principales técnicas utilizadas en el diagnóstico de fitopatógenos.

### **TÉCNICAS SEROLÓGICAS**

Los métodos inmunológicos son ampliamente utilizados en la detección de patógenos en áreas clínicas, agrícolas y ambientales. Un diagnóstico inequívoco depende de la afinidad y especificidad del anticuerpo utilizado, lo que permite realizar la detección de bajas concentraciones de un patógeno.

Las inmunoglobulinas (Ig) son una familia de glicoproteínas que se encuentran en el suero y otros fluidos de los mamíferos y otros animales. Ellas forman parte del sistema inmune, son producidas en respuesta a un inmunógeno y funcionan como anticuerpos (Figura 1). Estas Ig poseen una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas livianas y dos cadenas idénticas pesadas, arregladas en una estructura tipo “Y”. La unión del antígeno al anticuerpo ocurre en el sitio “Fab”, unión que es de tipo de reversible y mediada por enlaces no covalentes.

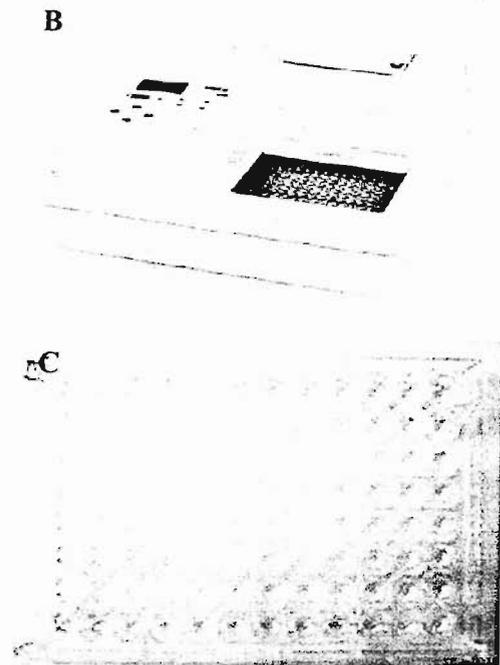
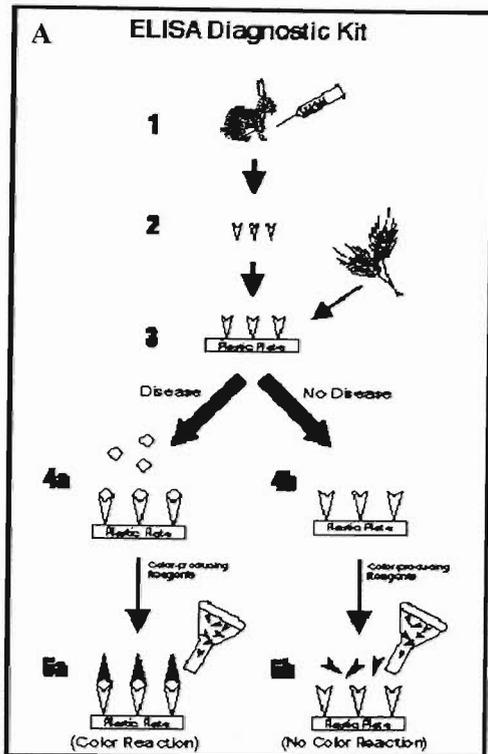


**Fab**

**Figura 1. Estructura de las inmunoglobulinas (IgG).**

El **test de ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es una técnica de laboratorio muy sensible que es usada para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos de interés en una amplia variedad de muestras biológicas. Una aplicación común del ELISA es adsorber anticuerpos a las paredes de una placa de plástico (poliestireno), a la que posteriormente se le agregará extractos de savia de la planta problema. Si el antígeno está presente en la muestra, éstos serán inmobilizados a las paredes de la placa. Un segundo anticuerpo unido covalentemente a una enzima que reconoce el antígeno inmobilizado es agregado posteriormente. La presencia en cada pocillo de la placa del complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo+enzima es revelado por el cambio de color que ocurre al aplicar un sustrato cromogénico que es utilizado por la enzima conjugada al segundo anticuerpo. El cambio de color, y por lo tanto la presencia del antígeno, es cuantificado por medio de la medición de absorbancia que es efectuado es un lector de placa de ELISA (Figura 2).

Existen numerosas variaciones de la metodología de ELISA que se han descrito desde su desarrollo inicial en los años 60s, pero el concepto es básicamente el mismo, la



**Figura 2. Test de ELISA.**

- A. Ilustración esquemática de los pasos involucrados en la ejecución del test de ELISA. Pasos 1 y 2, producción y purificación de la inmunoglobulinas desde un conejo inmunizado. 3, activación de la placa de poliestireno con el anticuerpo específico; 4a, inmovilización del antígeno, 4b, aplicación de extracto que no contiene el antígeno de interés; 5a y 5b, adición del anticuerpo conjugado a la enzima y revelado de la placa con viraje del color de sustrato en caso de presencia del antígeno de interés (5a).
- B. Fotografía de un lector de ELISA
- C. Fotografía de una placa de poliestireno revelada con el sustrato cromogénico. Los pocillos que delatan la presencia del antígeno de interés han virado a color amarillo.

detección inmunológica de un antígeno o un anticuerpo en una muestra problema. El ELISA Directo (Figura 3) es la forma más simple de este ensayo. Es usado para detectar un antígeno que se ha unido a una fase sólida (placa de poliestireno). Un anticuerpo conjugado con una enzima es incubado con el antígeno capturado y después de lavar el exceso del conjugado se agrega el sustrato cromogénico. El viraje a un color determinado indicará una interacción específica antígeno-anticuerpo. En el ELISA Indirecto (Figura 3), el antígeno es primero adsorbido a la placa, entonces actúa un anticuerpo secundario y posteriormente el anticuerpo conjugado a la enzima. Para que se desarrolle color, el anticuerpo primario que es específico para el antígeno debe estar presente en el complejo final. En el ELISA sándwich (Figura 3), un anticuerpo es

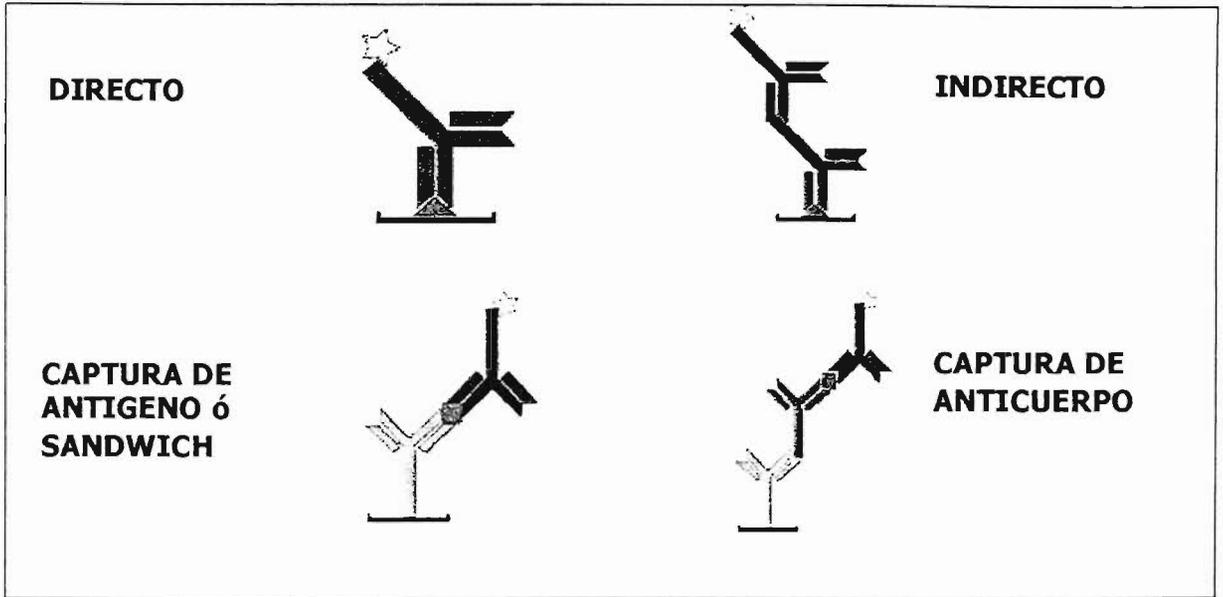


Figura 3. Esquema que ilustra las variaciones del test de ELISA.

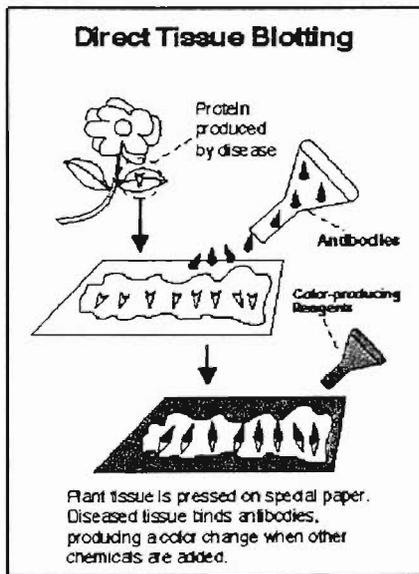


Figure 2.

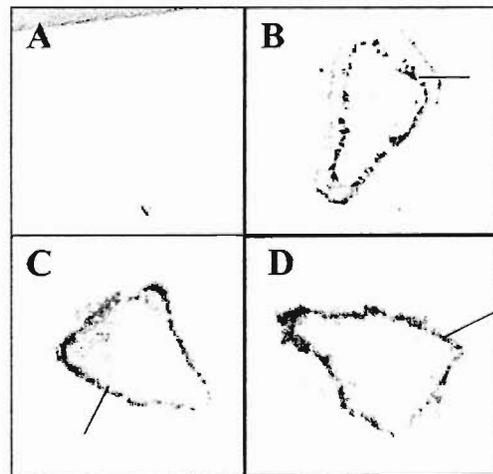
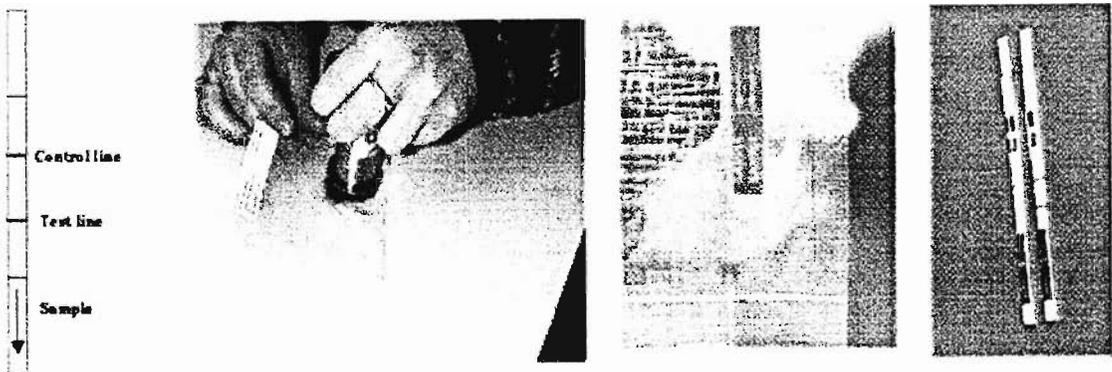


Figura 4. Inmuno-impresión de tejidos. A la izquierda se representan los pasos claves de esta metodología (ver texto). A la derecha, en A se presenta la impresión de un tallo sano de pomelo que fue incubado con un anticuerpo anti-CTV (Virus de la Tristeza de los cítricos). En B, C y D, impresiones de tejido infectado con CTV, donde se puede ver claramente la localización del virus en el tejido floemático del pomelo en las áreas teñidas de púrpura oscuro (indicadas con una flecha negra).

adsorbido a la placa con el objetivo de capturar el antígeno. Un segundo anticuerpo conjugado, es utilizado después de agregar la muestra con el antígeno de interés. De esta forma se obtiene el viraje del color del substrato que indica la presencia del antígeno en la muestra. Esta forma es considerada la más específica y sensible de las metodologías de ELISA hasta ahora descritas.

Otra técnica que es también utilizada en el diagnóstico de fitopatógenos en la inmunopresión de tejidos, técnica que también utiliza reacciones específicas antígeno-anticuerpo, y que es muy similar al test de ELISA en placas, con la excepción que en este caso la matriz sólida es una pieza especial de papel (membrana). Con esta técnica, la localización del patógeno o agente causal de la enfermedad puede ser determinada dentro del tejido del hospedero. El tejido de la planta es presionado contra una membrana (nitrocelulosa o nylon) a la que después se le unirán los anticuerpos que se unen específicamente al patógeno. Un cambio de color indicará un resultado positivo y mostrará la localización del patógeno en el tejido del hospedero (Figura 4).

Finalmente, otra de las técnicas serológicas disponibles para el diagnóstico de agentes fitopatógenos son los test de flujo lateral, que en esencia son muy similares a los test de ELISA tradicionales efectuados en placas. En estas pruebas, la forma más utilizada es el inmunoensayo en formato sandwich. Un anticuerpo específico para el antígeno blanco (patógeno) es inmovilizado en una fase sólida (membrana de nitrocelulosa). Un segundo anticuerpo conjugado a oro coloidal, que también reconoce al antígeno blanco, es depositado sobre esta membrana. Cuando la muestra que contiene el antígeno es aplicada a la membrana, ésta migra a través del conjugado solubilizándolo y formando un complejo que se mueve a través de la membrana. Este complejo es atrapado al alcanzar el anticuerpo que está inmovilizado en la matriz, formándose un “sandwich”



**Figura 5. Test de Flujo Lateral.** A la izquierda una representación de una tira de nitrocelulosa usada para este tipo de ensayo. Se describen las áreas de aplicación de la muestra, línea de prueba y línea control. Las tres fotos a la derecha muestran los pasos de preparación de la muestra, aplicación de la tira en la savia extraída y el resultado final, respectivamente.

entre los dos anticuerpos y el antígeno. Además, se desarrolla un color que refleja la concentración del antígeno en la muestra. La mayoría de los test de flujo lateral también contienen una línea control que asegura la ejecución y funcionamiento correcto de la prueba (Figura 5).

## **TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

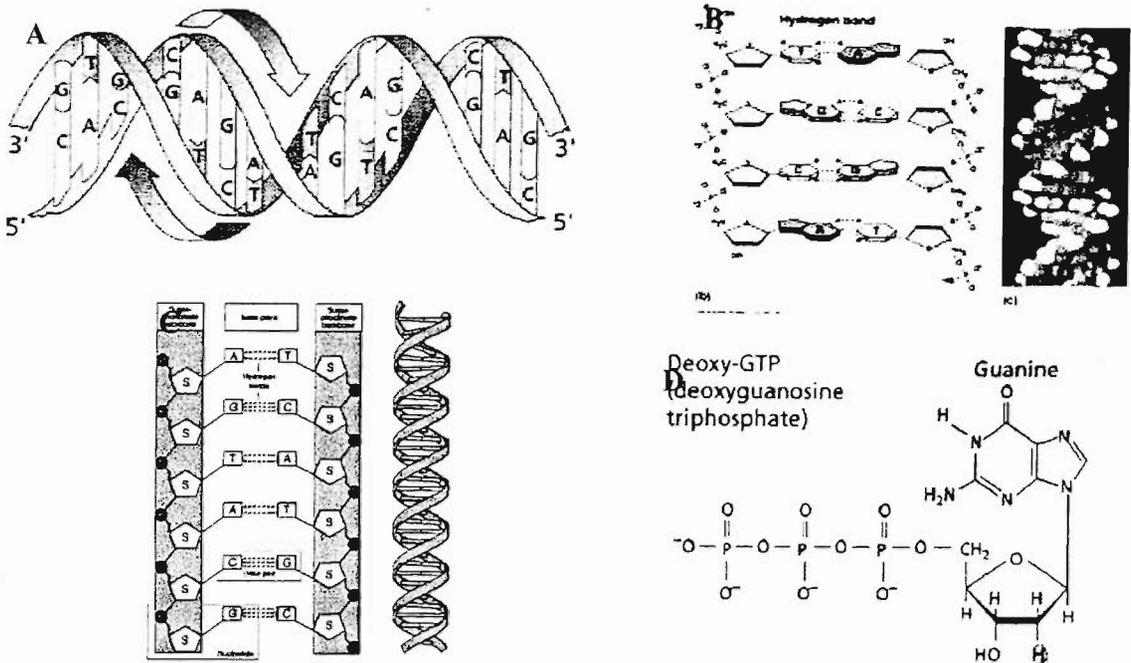
El diagnóstico de fitopatógenos por medio de la identificación sus ácidos nucleicos es un concepto que se ha desarrollado en las últimas dos décadas por lo que nuevas aplicaciones, protocolos y modificaciones de las técnicas descritas están siendo reportadas cada mes en las revistas de divulgación científica. Estas técnicas sin embargo no están siendo utilizadas masivamente en laboratorios de diagnóstico debido al alto costo de sus reactivos, el requerimiento de equipamiento especializado y alto nivel de entrenamiento para su ejecución. Se espera, sin embargo, que la tecnología de detección de ácidos nucleicos llegue a ser más accesible y simplificada en el futuro. Por ahora, el inmunodiagnóstico es una alternativa económica, rápida, sensible y con una sensibilidad satisfactoria para ser usados en forma masiva.

Los ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (RNA), son grandes moléculas formadas por la repetición de una molécula unidad que es el nucleótido. Un nucleótido está formado por una pentosa: Ribosa o desoxiribosa; una base nitrogenada: púrica o pirimidínica y ácido fosfórico.

La molécula de ADN (Figura 6) está constituida por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí porque se forman enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas. La unión de las bases se realiza mediante puentes de hidrógeno, y este apareamiento está condicionado químicamente de forma que la adenina (A) sólo se puede unir con la Timina (T) y la Guanina (G) con la Citosina (C). La estructura del ADN se asemejaría a una "escalera". El esqueleto de la "escalera" estaría formado por el azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato que haría de puente entre dos moléculas de desoxirribosa. Los peldaños de la "escalera" estarían formados por los cuatro tipos de bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y timina.

### **Hibridación de ácidos nucleicos**

Una sonda de ácidos nucleicos consiste en una hebra simple de ADN ó ARN marcada, con radioactividad ó algún método no isotópico, que ha sido construida para complementarse y unirse a hebras de ADN ó ARN blanco. Para emplear una sonda se debe fijar primero el extracto vegetal ó ácidos nucleicos parcialmente purificados a un



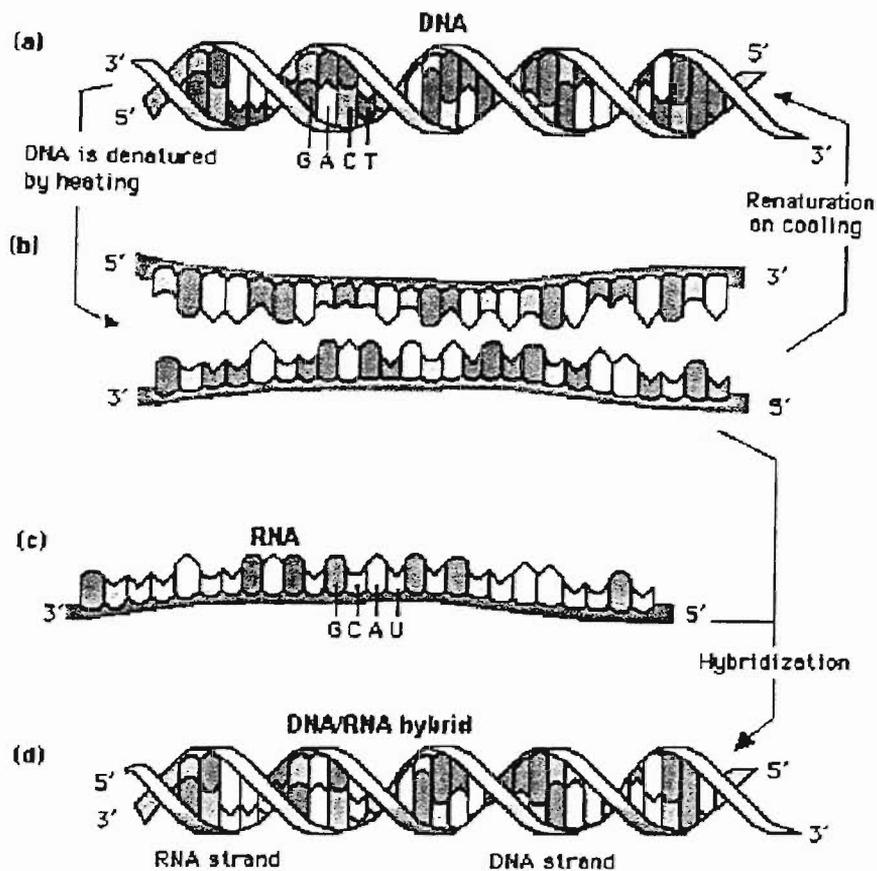
**Figura 6. Estructura del ADN.**

A. Estructura antiparalela de la doble hélice

B y C. Ilustración de las interacciones (puentes de hidrogeno) que ocurren entre ambas cadenas de nucleótidos

D. Unidad básica del ADN (pentosa, base nitrogenada y fosfato).

soporte sólido tales como una membrana de nitrocelulosa ó de nylon. Los ácidos nucleicos blancos son denaturados a hebra simple y posteriormente hibridados a la sonda marcada. Bajo condiciones apropiadas de temperatura y sales, la sonda es capaz de alinearse con el blanco de ADN ó ARN, para que después el híbrido de ácidos nucleicos de doble hebra sea detectado por medio de la visualización de la marca (Figura 7 y 8). Los ácidos nucleicos se pueden purificar parcialmente y después ser aplicados gota a gota a la membrana para un posterior hibridación, o aplicarlos directamente al presionar el tejido vegetal sobre la membrana, simplificando el proceso de ejecución de esta técnica. Todas las posibilidades de aplicación de los ácidos nucleicos a la membrana se pueden apreciar en la figura 8, donde se observa la hibridación de ácidos nucleicos obtenidos desde fracciones semipurificadas como "slot-blot" o impresión directa desde tallos y hojas a la membrana.



## Nucleic Acid Hybridization

### Figura 7. Hibridación de ácidos nucleicos.

El ADN de doble hebra (a) es denaturado por medio de la aplicación de calor (b). Una sonda ARN (c) puede hibridarse por complementariedad de bases y formar un híbrido ADN/ARN (d) al bajar la temperatura.

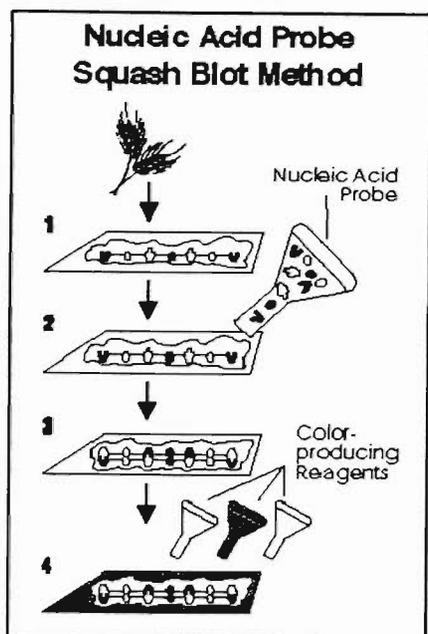
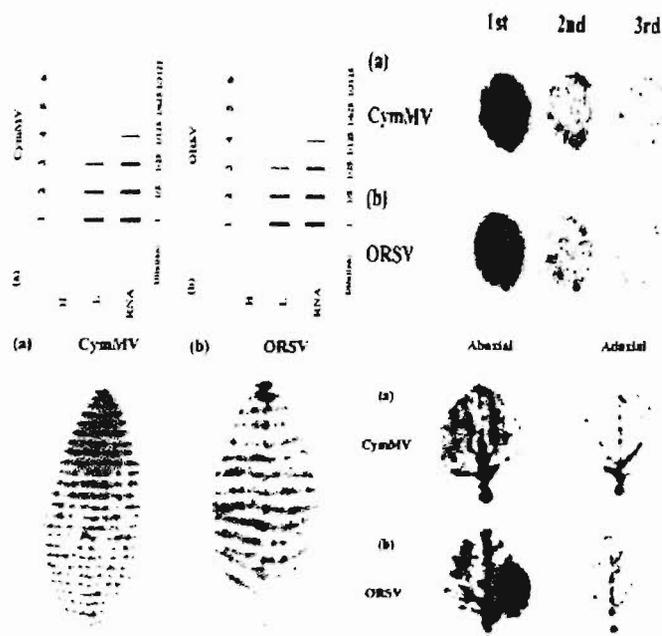


Figura 3.



**Figura 8. Aplicaciones prácticas de la hibridación de ácidos nucleicos.**

A la izquierda se muestra una representación de esta técnica: aplicación de los ácidos nucleicos a la membrana, hibridación con una sonda marcada, y visualización de la unión específica de la sonda. A la derecha se observan distintos tipos de aplicación de los ácidos nucleicos al soporte sólido (membrana): aplicación de preparaciones semipurificadas ("slot-blot") o impresión directa desde el tejido (tallos y hojas).

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa puede ser utilizada para detectar diminutas cantidades de ADN de un fitopatógeno que esté presente en el suelo, tejido, savia, etc (7). Esta técnica permite multiplicar geométricamente regiones específicas del ADN blanco por medio de ciclos sucesivos de síntesis que ocurren "in vitro". Los componentes de reacción de PCR son el ADN blanco, nucleótidos, una enzima llamada ADN polimerasa y partidores. Los partidores son pequeñas cadenas de nucleótidos que definen la secuencia de ADN que será amplificada. El proceso es ilustrado en la Figura 9, la primera etapa es la disociación de la doble hebra de ADN, luego ocurre la hibridación de los partidores y la incorporación de los nucleótidos de acuerdo a la secuencia presente en el ADN blanco por la polimerasa. El resultado son copias de hebra doble del ADN blanco. Teóricamente, una copia única de ADN puede ser amplificada millones de veces (7). Los productos de la PCR son analizados usualmente por medio de una electroforesis para así determinar si el ADN blanco fue amplificado (Figura 10).

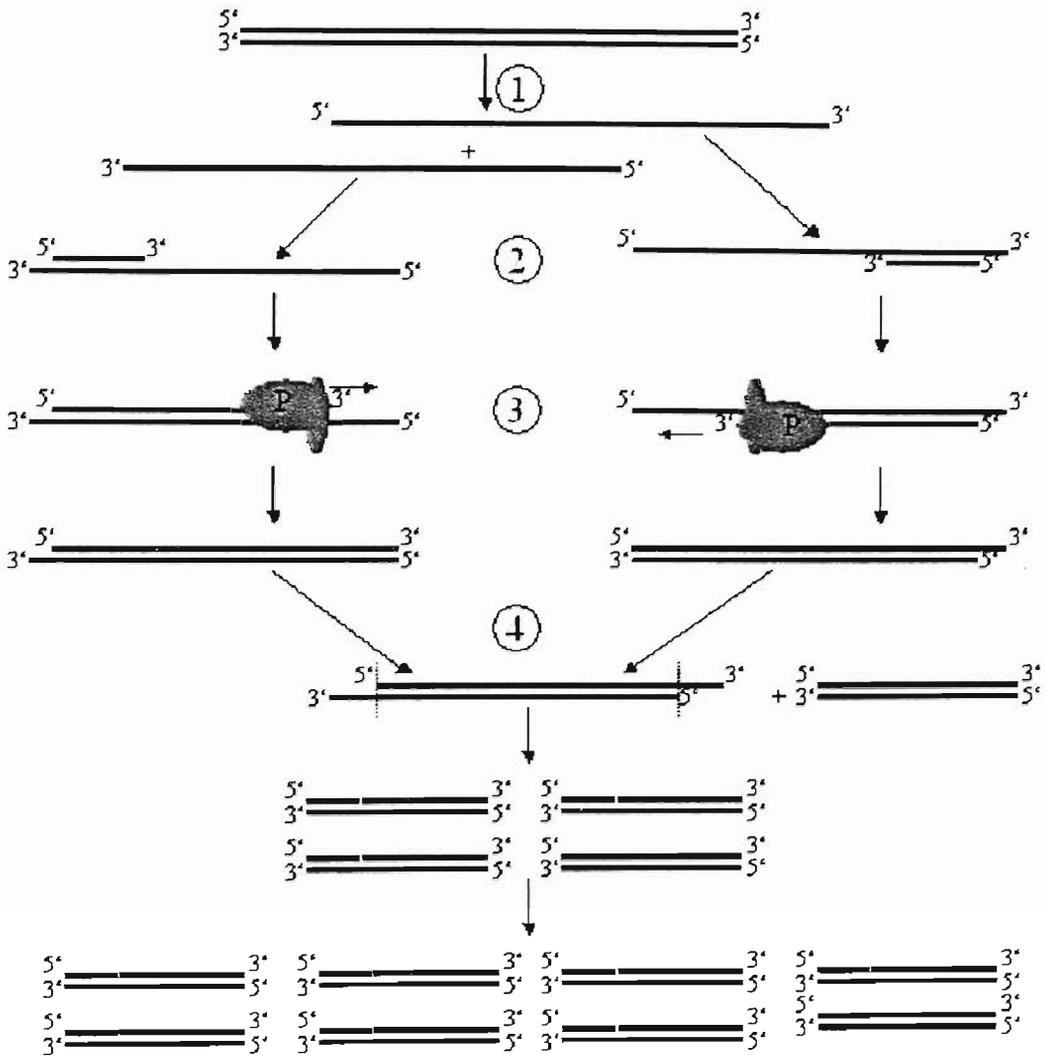
La PCR ha sido aplicada primariamente a la detección e identificación de fitoplasmas, virus y viroides. Sin embargo, hongos, bacterias y nemátodos pueden también ser detectados. En general la aplicación de esta técnica al diagnóstico de enfermedades en plantas se ha centrado en organismos que no son fácilmente detectados por medio de otros métodos o en aquellos casos en que la obtención de resultados es lenta.

Entre las ventajas que presenta esta técnica se destacan su sensibilidad (100 a 1000 veces más sensible que ELISA), la rapidez en la obtención de resultados y el potencial para detectar varios patógenos simultáneamente. Las desventajas que presenta son el alto costo de sus reactivos y equipos y la necesidad de un entrenamiento adecuado para su ejecución debido a la posibilidad de contaminación y la consecuente obtención de falsos positivos.

La posibilidad de utilizar varios partidores en una reacción de PCR que den origen a productos amplificados de diferentes tamaños abre la posibilidad de detectar varios patógenos en una misma reacción. Además, una variación interesante de esta técnica ha sido desarrollada recientemente, y ha sido llamado PCR en Tiempo Real. Esta técnica facilita un monitoreo dinámico (ciclo a ciclo) de la reacción de PCR permitiendo la cuantificación del ácido nucleico presente en la muestra y de esta forma conocer la concentración del patógeno de interés (3).

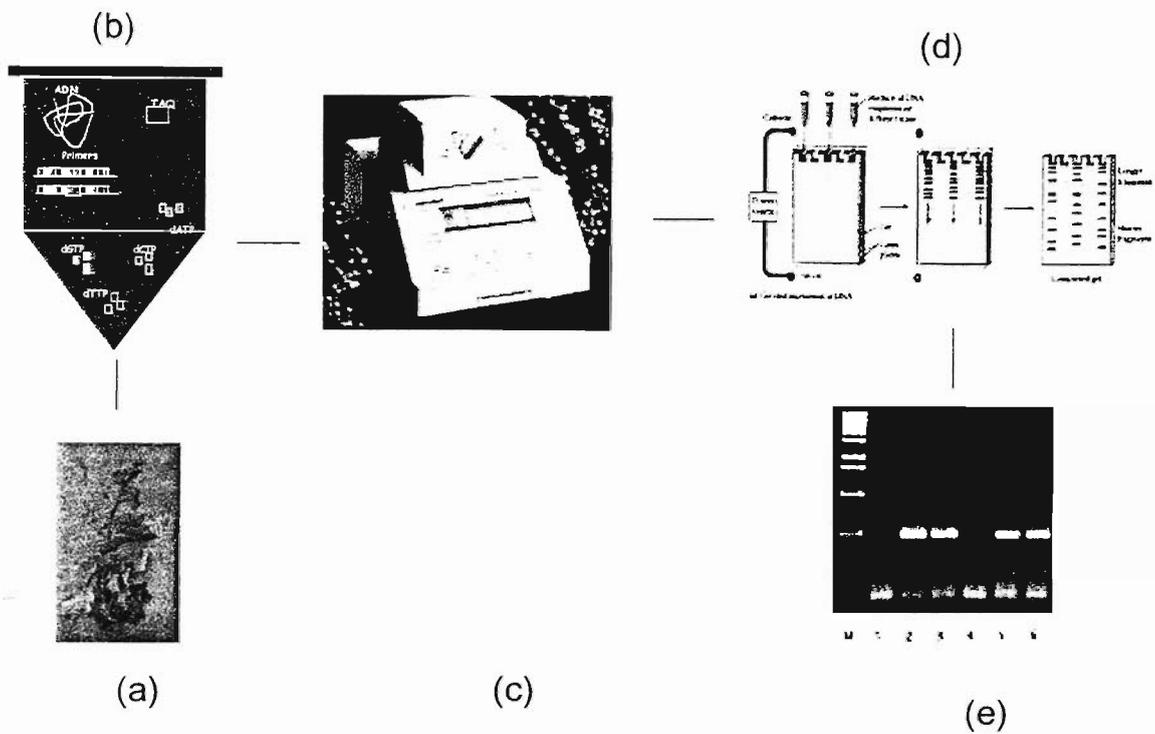
El desarrollo de la investigación en el área genómica, donde se utilizan microarreglos para establecer qué genes son sobre-expresados o silenciados después de un determinado tratamiento abre nuevas posibilidades en el área del diagnóstico de fitopatógenos. Recientemente se han desarrollado biochips compuestos de sondas de ácidos nucleicos ó anticuerpos arreglados en pequeñas áreas de vidrio. Este formato es robusto y flexible y tiene además el potencial de incrementar la capacidad del diagnóstico ya que es posible detectar múltiples patógenos simultáneamente (4).

Sin duda, el descubrimiento y descripción de nuevos genes, moléculas o secuencias son la base para el desarrollo de nuevas herramientas que permitan realizar un diagnóstico rápido y preciso de enfermedades en plantas. Estos resultados serán también de vital importancia en la comprensión de las relaciones globales e interacciones existentes entre las plantas y sus patógenos u otros microorganismos asociados.



**Figura 9. Reacción de la polimerasa en cadena.**

1. Disociación de la doble hebra de ADN.
2. Hibridación de los partidores
3. Extensión de la hebra de ADN por medio de la incorporación de nucleótidos.
4. Dobles hebras de ADN amplificadas



**Figura 10. Secuencia explicativa del uso de la PCR en el diagnóstico de fitopatógenos.**

- (a) Muestra problema desde donde se hace una extracción de ácidos nucleicos
- (b) Componentes de la reacción de PCR en un microtubo.
- (c) Termociclador donde se efectúan los ciclos térmicos de denaturación, alineamiento de partidores y extensión de la hebra de ADN.
- (d) Esquema de una electroforesis de ADN.
- (e) Visualización de un producto específico amplificado por PCR en un gel de agarosa.

## Literatura Citada

1. **Clark, M. F., ADN A. N. Adams.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**:475-483.
2. **Kohler, G., ADN C. Milstein.** 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
3. **Levesque, C. A.** 1997. Molecular detection tools in integrated disease management: Overcoming current limitations. *Phytoparasitica* **25**:3-7.
4. **Martin, R. R., D. James, ADN C. A. Levesque.** 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol* **38**:207-239.
5. **Miller, S. A., ADN R. R. Martin.** 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol* **26**:409-432.
6. **Mullis, K. B., ADN F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
7. **Putnam, M. L.** 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. *Crop protection* **14**:517-525.