

BIOTECNOLOGÍA:

Herramienta de diagnóstico de enfermedades en plantas

BIOTECHNOLOGY:

Diagnostic Tool for Plant Diseases

AUTORES



Silvia Restrepo

Ángela Vargas

Laboratorio de Micología y Fitopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia
srestrp@uniandes.edu.co

Palabras CLAVE

Biotecnología, manejo de enfermedades, plantas patógenas, diagnóstico de enfermedades, fitopatógenos.

Biotechnology, disease management, plant pathogens, disease diagnostics, phytopathogenous.

RESUMEN



El diagnóstico fitopatológico es la base del manejo de las enfermedades en plantas. Un buen sistema de diagnóstico permite tomar decisiones apropiadas para enfrentarlas; pero hacerlo de forma inadecuada puede llevar a pérdidas económicas considerables para los agricultores. En su definición más simple, el diagnóstico es la identificación de la naturaleza y causa de una enfermedad, y por lo tanto, requiere el análisis inteligente de las observaciones de campo, además de un buen sistema de detección del patógeno, cuando se trata de un problema biótico. En algunos casos el diagnóstico puede ser sencillo y basarse en un reconocimiento de síntomas en la planta, en un reconocimiento de signos del patógeno y en una confirmación de la identidad de éste si ha sido previamente reportado. Desafortunadamente no siempre se corre con tanta suerte y en la mayoría de los casos estamos en presencia de una enfermedad o patógeno desconocido. En estos casos, el diagnóstico debe tener en cuenta varios factores como observaciones de campo, estudio de los tejidos vegetales, aislamiento del patógeno, su posterior caracterización e identificación y la confirmación de los postulados de Koch (modificado de (Alvarez 2004)). Al realizar una revisión de los métodos empleados en diagnóstico fitopatológico se evidencian diferencias entre la investigación, los productos comercialmente disponibles y las metodologías tradicionalmente empleadas. La investigación en el área del diagnóstico fitopatológico ya ha alcanzado la era genómica con metodologías basadas en microarreglos de ADN desarrolladas para la mayoría de los grandes grupos de fitopatógenos (Louws, Rademaker et al. 1999; Alvarez 2004). Sin embargo, los desarrollos comercializados se basan en su gran mayoría en métodos inmunológicos (Alvarez 2004) y aún se emplean de manera común métodos de identificación a partir de aislamientos en medios selectivos o semi - selectivos . A lo largo de esta revisión veremos las razones de esta diferencia entre desarrollo tecnológico y comercial. Revisaremos la importancia



que los métodos de diagnóstico han tenido en el manejo de las enfermedades y cómo el avance en la biología molecular puede tener un impacto en el diagnóstico de fitopatógenos y este a su vez en el manejo de las enfermedades.

SUMMARY

A phytopathological diagnostic is the base for disease management in oil palm. A good diagnostic system enables an adequate decision making process so as to face diseases; however, an inadequate decision can lead into significant economic losses for producers. In a simple definition, diagnostics is the identification of the nature and cause of a disease, and therefore it requires an intelligent analysis of field observations. Moreover, it requires a good system for pathogens detection, when dealing with a biotic problem. Many times, the diagnostics could be pretty simple and could be based on recognition of the plant's symptoms or of pathogens signs and on a confirmation of its identity if it has been previously reported. Unfortunately, luck is not there at all times and in most cases we face unknown diseases or pathogens. In which case, the diagnostic must take many factors into account, such as field observations, study of vegetable tissues, pathogen isolation, its characterization and identification and the confirmation of Koch postulates (modified of (Alvarez 2004)). When reviewing the methods used for a phytopathological diagnostic, one encounters differences between research, commercial products available and methodologies traditionally used. Phytopathological diagnostics research has reached the genomic era with methodologies based on DNA micro-arrangements developed for the most of the large groups of phytopathogens (Louws, Rademaker et al. 1999; Alvarez 2004). However, most of commercial developments are based on immunological methods (Alvarez 2004) and even today, some common identification methods are used based on isolations in selective or semi-selective media. This presentation will dwell on the reasons for this difference between technological and commercial development. We will review the importance diagnostic methods have had on disease management and how the progress of molecular biology can have an impact on diagnostics of phytopathogens, and in turn the impact the latter has on disease management.



INTRODUCCIÓN

El diagnóstico fitopatológico es la base del manejo de las enfermedades en plantas. Un buen sistema de diagnóstico permite tomar decisiones apropiadas para enfrentarlas; pero hacerlo de forma inadecuada puede implicar pérdidas económicas considerables para los agricultores. En su definición más simple, el diagnóstico es la identificación de la naturaleza y de la causa de una enfermedad; por tanto, requiere del análisis inteligente de las observaciones de campo, además de un buen sistema de detección del patógeno, cuando se trata de un problema biótico. En algunos casos el diagnóstico puede ser sencillo y basarse en un reconocimiento de síntomas en la planta, en un reconocimiento de signos del patógeno y en una confirmación de la identidad de éste, si ha sido previamente reportado. Infortunadamente, no siempre se corre con tanta suerte y en la mayoría de los

casos se está en presencia de una enfermedad o patógeno desconocido. En estos casos, el diagnóstico debe tomar en cuenta varios elementos, como observaciones de campo, estudio de los tejidos vegetales, aislamiento del patógeno, su posterior caracterización e identificación y la confirmación de los postulados de Koch (modificado de Alvarez, 2004).

Al revisar los métodos empleados en diagnóstico fitopatológico se evidencian diferencias entre la investigación, los productos comercialmente disponibles y las metodologías tradicionalmente empleadas. La investigación en el área del diagnóstico fitopatológico ya ha alcanzado la era genómica, con metodologías basadas en microarreglos de ADN desarrolladas para la mayoría de los grandes grupos de fitopatógenos (Louws, Rademaker *et al.*, 1999; Alvarez 2004). Sin embargo, los desarrollos comercializados se basan en su gran mayoría en métodos inmunológicos

(Alvarez 2004) y aún se emplean de manera común métodos de identificación a partir de aislamientos en medios selectivos o semi-selectivos. A lo largo de esta revisión se verán las razones de esta diferencia entre desarrollo tecnológico y comercial. Se revisará la importancia que los métodos de diagnóstico han tenido en el manejo de las enfermedades y cómo el avance en la biología molecular puede tener un impacto en el diagnóstico de fitopatógenos y éste a su vez en el manejo de las enfermedades.

EL DIAGNÓSTICO ANTES DE LA BIOTECNOLOGÍA

Se ha visto que el diagnóstico de una enfermedad o patógeno desconocido requiere de varios pasos para establecer la causa de la enfermedad. Los desarrollos tecnológicos, biotecnológicos y de otro tipo han contribuido principalmente a la detección e identificación de los agentes causales cuando se sospecha de algún microorganismo en particular. La detección es simplemente la determinación de la presencia de un organismo en una muestra vegetal afectada por la enfermedad (Louws, Rademaker *et al.*, 1999).

Tradicionalmente, la identificación de la mayoría de los hongos y bacterias se ha basado en varios aspectos: aislamiento a partir de material vegetal afectado en medios selectivos o semi-selectivos, tomando en cuenta requerimientos nutricionales básicos de algunos patógenos que pueden ser suministrados *in vitro*; identificación fenotípica de acuerdo con su forma de crecimiento y textura, entre otros factores; identificación microscópica en el caso de los hongos en donde se observan características morfológicas en sus fases reproductivas (estructuras de reproducción sexual o asexualmente) y/o vegetativas específicas entre géneros; ensayos bioquímicos, sobre todo para bacterias que evidencian diferencias metabólicas específicas entre algunas de ellas, y finalmente ensayos de patogenicidad sobre el tejido del hospedero, fuente inicial del aislamiento donde se confirman los síntomas causados por el patógeno.

Habitualmente, el diagnóstico de nematodos fitoparásitos se realiza mediante la detección de nodulaciones en las raíces de plantas enfermas y liberación de estos de dichas nodulaciones para posteriormente llevar a cabo la identificación y clasificación taxonómica

mediante características morfológicas específicas entre géneros. Las ventajas de estos métodos son la sencillez metodológica y su bajo costo. En consecuencia, son adoptados fácilmente por los centros de diagnóstico y, a diferencia de los métodos tecnológicamente más complejos, no necesitan ser validados y certificados antes de su aceptación ni ser confirmados luego de la aparición de nuevas variantes en las poblaciones de los patógenos. Sin embargo, las desventajas son varias; entre las más importantes se encuentran la baja sensibilidad de los métodos dependientes de cultivos puros, la imposibilidad de contar con aislamientos *in vitro* de algunos fitopatógenos que son parásitos obligados y que revisten importancia para los agricultores, las dificultades en la cuantificación del patógeno en la planta enferma, y el riesgo de obtener aislamientos cruzados (para el caso de bacterias y hongos), como por ejemplo, microorganismos endófitos, saprobios o patógenos secundarios, que proliferan en estados avanzados de la enfermedad, y que pueden llegar a ser identificados como causantes de las lesiones cuando se desconocen o no se contemplan las características de los síntomas y la manera como estos se desarrollan en la planta.

En el caso de virus, históricamente los métodos de detección se han basado en la utilización de injertos con variedades vegetales susceptibles al patógeno o indexación (Louws, Rademaker *et al.*, 1999; Martin, James *et al.*, 2000). Dado que la patogénesis por los virus presenta muchos tipos de respuesta en el hospedero, es posible evaluar las alteraciones de tipo fisiológico que se evidencian por alteraciones en la pigmentación, por ejemplo en forma de mosaicos; alteraciones en el crecimiento como malformaciones, hipoplasia o hiperplasia, y presencia de estructuras, como cristales producidos por algunos virus en el interior de las células afectadas y que pueden observarse microscópicamente. También pueden evidenciarse cambios a nivel metabólico, como la superproducción de hormonas vegetales y cambios en el proceso fotosintético.

Aunque el diagnóstico de enfermedades causadas por virus puede realizarse de esta manera, debe tomarse en cuenta que muchos de los síntomas anteriormente descritos pueden estar relacionados, además, con factores abióticos, y no son determinantes en el momento de realizar un diagnóstico definitivo.



EL DIAGNÓSTICO DESPUÉS DE LA BIOTECNOLOGÍA

Al revisar los métodos de detección comerciales, se encuentra que cerca del 96% de los kits, paquetes o servicios son ensayos inmunodiagnósticos, y sólo el 4% están basados en la detección y/o secuenciación de ácidos nucleicos o en la amplificación de secuencias específicas del patógeno (Alvarez, 2004). Ahora, si se hace una revisión bibliográfica de los avances tecnológicos de los métodos de detección, se ve que los porcentajes se invierten y más del 90% de los artículos muestra el desarrollo de herramientas genómicas.

Para un fitopatólogo encargado de un servicio de diagnóstico, las superficies de las bacterias virus, nematodos y hongos no son sino una colección de moléculas antigénicas, contra las cuales se pueden desarrollar métodos inmunológicos de detección. Primero se vieron los anticuerpos policlonales, y luego los avances científicos permitieron el desarrollo de anticuerpos monoclonales, aumentando la sensibilidad y la reproducibilidad de los ensayos. El problema es que las poblaciones de patógenos sometidas a presiones de selección cambian rápidamente y frecuentemente aparecen variantes que no pueden ser detectadas por los anticuerpos monoclonales. Con el fin de evitar estos problemas, el diagnóstico debe ser acompañado de otra técnica que permita la genotipificación precisa de los individuos de una especie. En esta revisión no se ahonda en detalles sobre los métodos de estudio de la diversidad de fitopatógenos, pero se recomienda la revisión hecha por Louws y colaboradores (Louws, Rademaker *et al.*, 1999).

No se podría seguir adelante en esta revisión de métodos biotecnológicos sin mencionar la importancia del método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para el procesamiento de múltiples muestras en un solo ensayo. Igualmente, el método ELISA permitió realizar los primeros ensayos múltiples, es decir, en este caso, la detección de varios patógenos diferentes en un mismo ensayo. La sensibilidad de un ensayo ELISA ($10^5 - 10^6$ CFU/ml) se considera suficiente para ensayos de diagnóstico, incluso para la detección de microorganismos en lotes de semillas. Una ventaja de ELISA es que permite hacer el diagnóstico a partir de material vegetal sin tener que obtener un cultivo puro del microorganismo. De

esta manera, la técnica permite cuantificar el patógeno en la muestra, mientras que si se hace el ensayo a partir del patógeno aislado en un cultivo, se pierde el carácter cuantitativo de la técnica. Sin embargo, se debe aclarar que si ELISA es precedida de métodos de enriquecimiento, como por ejemplo crecimiento del microorganismo en medios selectivos o semi-selectivos, se puede aumentar la sensibilidad de la metodología en un factor de 10.000 unidades.

APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR AL DIAGNÓSTICO DE FITOPATÓGENOS

Los métodos de biología molecular empleados en diagnóstico se pueden clasificar en métodos basados en hibridación y métodos basados en amplificación de ácidos nucleicos. Los primeros consisten en el desarrollo de sondas o pequeñas (en promedio 15 pares de bases) específicas de una especie o subespecie de patógenos. La hibridación se realiza utilizando la técnica del Southern, del dot – plot o el macro y microarreglo. La amplificación de secuencias de ADN, o ARN en el caso de virus, se hace según protocolos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) o de PCR en tiempo real. Con excepción de los métodos que usan arreglos, las metodologías basadas en hibridación nunca fueron muy populares, debido a la complejidad metodológica y a la baja sensibilidad.

La incorporación de la tecnología del PCR en los protocolos de diagnóstico de fitopatógenos marcó un punto determinante en dicha área. Los aportes más determinantes fueron la rapidez y el aumento en sensibilidad. El PCR permitió alcanzar niveles de sensibilidad adecuados para la mayoría de las interacciones planta – patógeno. Su especificidad depende del diseño de iniciadores que permitan la detección de sólo el taxón que se desea encontrar. En el caso de la identificación de patógenos desconocidos, emplear iniciadores llamados universales (secuencias conservadas en las secuencias ribosomales) y la posterior secuenciación de los amplicones es la técnica más utilizada por su sencillez, rapidez (resultados en menos de 24 horas) y especificidad.

Aunque el primer reporte de la utilización de PCR para la detección de patógenos en tejidos vegetales como hojas y semillas se realizó hace más de 15 años, pocos laboratorios de diagnóstico han adoptado esta técnica

(Schaad y Frederik, 2002). La razón principal para que esto ocurra es que la aparición de una banda en un gel de agarosa no asegura que se esté detectando el organismo blanco. El tiempo y esfuerzo que deben ser invertidos para confirmar la identificación de la amplificación obtenida han actuado en contra de la difusión de esta técnica en los laboratorios de diagnóstico. Por otro lado, la sensibilidad del PCR no es mayor que la obtenida con el aislamiento en medios selectivos; y aunque sí es mayor que la sensibilidad obtenida con los protocolos de ELISA, esto no justifica los esfuerzos, tiempo y dinero invertidos en el desarrollo de la técnica y en la capacitación de personal calificado. Todas estas desventajas no aplican para la técnica de moda, el PCR en tiempo real (Schaad y Frederik, 2002).

En los últimos dos o tres años se ha visto la proliferación del desarrollo de protocolos de detección usando la tecnología del PCR en tiempo real (Schaad y Frederik 2002). Esta tecnología permite una cuantificación precisa que permite medir la biomasa del patógeno y con los formatos múltiplex, permite la detección simultánea de organismos diferentes. No es posible decir que el PCR clásico no permite hacer múltiplex, pero para lograrlo se necesita un esfuerzo muy grande en el desarrollo de iniciadores y en la estandarización de la amplificación y detección no ambigua de varios fragmentos. El principio básico del PCR en tiempo real es la amplificación específica de un fragmento o secuencia blanco de ADN y la detección por fluorescencia. El ciclo en el cual se detecta la fluorescencia por encima del ruido de fondo es proporcional a la cantidad de ADN inicial del organismo que se está detectando. Para una revisión ver (Bustin, 2000; Bustin, 2002; Schaad y Frederik, 2002). Sin embargo, esta técnica también presenta desventajas, como la inhibición de la reacción cuando se usan muestras vegetales directamente; y aunque permite realizar múltiplex de muestras, hay un límite en la cantidad de muestras que se pueden detectar, debido a que cada una se estima por medio de un fluorocromo leído a una cierta longitud de onda. Al mezclar varios fluorocromos puede existir ruido de fondo debido a la lectura cruzada de fluorocromos. La inhibición de la reacción por compuestos naturalmente presentes en la muestra vegetal o de suelo puede evitarse al usar una etapa de enriquecimiento en medio, pre-

via a la amplificación por PCR (Schaad y Frederik, 2002). Esto, aunque aumenta la sensibilidad del ensayo retarda la obtención de resultados, y aumenta los costos y los esfuerzos de manipulación (Schaad y Frederik, 2002). Igualmente, se pueden optimizar métodos de extracción de ADN de muestras de campo, pero los costos se aumentarían considerablemente.

Sin duda alguna la genómica revolucionó la biología del siglo XX y la proyectó al siglo XXI antes de que éste comenzara. El término genómica es difícil de definir, ya que su definición varía de científico a científico, pero aquí se tratará de dar un significado, definir sus alcances y describir su impacto en el diagnóstico de enfermedades. La palabra genómica deriva de genoma, que significa el contenido de ADN de una célula haploide o la mitad de este contenido en una célula diploide. Sin embargo, decir que la genómica es el estudio del genoma sería demasiado simplista. La genómica incluye secuenciar el ADN, analizar la secuencia, estudiar las variaciones del genoma dentro de una población, establecer los patrones del control transcripcional de los genes y aprovechar al máximo el gran volumen de información. La genómica maneja conjuntos enormes de datos y métodos de gran poder (en inglés se habla de 'high throughput methods') para el análisis del genoma e integra este conocimiento con otras áreas para proveer respuestas a problemas de biología, medicina e industria.

Pero la genómica no es una simple colección de nuevas tecnologías, sino que trae nuevas perspectivas, y es con nuevos métodos como surgen nuevos tipos de preguntas y nuevas posibilidades de entender la vida.

La incorporación de la tecnología del PCR en los protocolos de diagnóstico de fitopatógenos marcó un punto determinante en dicha área.





Durante muchos años, la biotecnología y los métodos moleculares fueron usados como herramientas reduccionistas que trataban de diseccionar procesos individuales. En diagnóstico, por muchos años la técnica más utilizada fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permitía la detección de uno o varios individuos o, en el mejor de los casos, de una especie. El PCR en tiempo real permitió, como se vio anteriormente, la detección de varios microorganismos en un solo ensayo, pero con un límite en el número de patógenos a detectar. La genómica permite un múltiplex ilimitado. Ilimitado, claro está, en el sentido de que una cierta especie vegetal es atacada por un número limitado de patógenos y todos ellos pueden eventualmente ser detectados (Lievens, Brouwer *et al.*, 2003).

La técnica es la de los macro o microarreglos. Consiste en depositar, manualmente o por medio de un robot, secuencias cortas de ADN en un soporte, que puede ser una membrana de nylon en el caso de los macroarreglos o una lámina de vidrio en el caso de los microarreglos. Uno de los reportes más interesantes en los cuales se muestra la utilidad de esta técnica fue publicado en 2003 y reportaba la utilización de un arreglo de secuencias de genes ribosomales para la eficiente detección de patógenos causantes de marchamientos vasculares del tomate (*Lycopersicon esculentum*), *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lievens, Brouwer *et al.*, 2003). Los patógenos pueden ser detectados a partir de tejido vegetal e inclusive de muestras de difícil manipulación como las de suelo y de aguas de irrigación. Según los autores, la sensibilidad de la técnica permite detectar patógenos en concentraciones similares a las encontradas en condiciones de campo. El mismo año se desarrolló otro arreglo para la detección de virus de papa (*Solanum tuberosum*) como PVY, PVX, PVS y PVA (Boonham, Walsh *et al.* 2003). Con este último ejemplo queda en evidencia otra gran ventaja del método: la posibilidad de detectar organismos no cultivables sin los problemas de inhibición, como se vio para los métodos basados en PCR. Adicionalmente, entre más genomas sean secuenciados, más posibilidades se abren para el desarrollo de métodos genómicos de detección e identificación. Como todas las técnicas que se han revisado anteriormente, existen desven-

tajas, y en este caso los altos costos del desarrollo de arreglos y la dificultad técnica en el desarrollo, utilización y análisis de los resultados actuarán en contra de la difusión de los arreglos en los laboratorios de diagnóstico.

EL FUTURO DEL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES (DE PALMA EN COLOMBIA)

Al hacer una revisión bibliográfica sobre la detección de enfermedades de palma sólo se encuentran reportes sobre métodos de diagnóstico de campo de la pudrición del cogollo en la palma de aceite y varias otras enfermedades de palmas ornamentales, basados en el reconocimiento de una sintomatología bien descrita (Garófalo, 1998; Garófalo, 1999). Es sin duda un aporte significativo debido a que por lo menos cinco enfermedades pueden ser fácilmente confundibles. Las enfermedades de palmas ornamentales que más frecuentemente pueden ser confundidas son, según el autor del reporte, la pudrición de la yema por *Phytophthora*, la pudrición de la base del tronco por *Ganoderma* y la pudrición de la yema por *Thielaviopsis* (Garófalo, 1999). En algunas especies la confusión puede incluir también al amarillamiento letal y a la marchitez por *Fusarium* (Garófalo, 1999).

Sólo se encuentra un desarrollo tecnológico enfocado hacia la detección de un virus asociado a la mancha anular en Tumaco, Nariño (Morales, Lozano *et al.*, 2003). El virus presente en los tejidos de la palma está genéticamente relacionado a nivel de secuencia con especies del género Foveavirus. Los autores reportan la secuencia parcial del virus, lo que abre el camino hacia el desarrollo de técnicas de detección, por ejemplo basadas en PCR (Morales, Lozano *et al.*, 2003).

En Colombia existen varias compañías que ofrecen diagnóstico de enfermedades de plantas; ni una sola de ellas ofrece servicios de identificación o detección molecular del agente causal. Las universidades y centros de investigación del país deben aceptar el reto de desarrollar métodos de alto poder para la identificación y/o detección de fitopatógenos para transferirlos a los sistemas nacionales de diagnóstico. La inclusión de Colombia en los tratados de libre comercio debería impulsar el desarrollo de estos

métodos en el caso particular de productos bien posicionados en dichos tratados.

CONCLUSIONES

El diagnóstico de una nueva enfermedad es obviamente más complejo que la confirmación de la presencia de un organismo sospechoso en una muestra vegetal. Los principios básicos del diagnóstico deben usarse: primero observación y análisis inteligente de la muestra, tomando en cuenta el hospedero y las condiciones de su entorno; luego, métodos simples como observaciones microscópicas, aislamientos en medios sintéticos y pruebas de patogenicidad para reducir las posibilidades a un solo grupo de microorganismos. Finalmente, varios métodos fenotípicos y genotípicos deben ser usados para confirmar, con robustez, la identidad del microorganismo.

El empleo de metodologías moleculares que contribuyan al diagnóstico de enfermedades de plantas sin que se haga necesaria la obtención de cultivos puros para realizarlo, podrá ser empleado como instrumento de detección de gran diversidad de microorganismos no cultivables, que posiblemente

han sido dejados a un lado empleando los métodos tradicionales de detección y que pueden ser de importancia a nivel económico.

Aunque los criterios de diagnóstico empleados comúnmente no deben dejarse a un lado, y por el momento son la manera adecuada para identificar y controlar el desarrollo de enfermedades en campo, el diagnóstico molecular puede convertirse en una herramienta adicional para conocer las variaciones en las poblaciones de microorganismos fitopatógenos. Dicho diagnóstico genotípico finalmente tendrá una repercusión positiva, pues permitirá ahondar sobre el conocimiento de las enfermedades, los agentes causales de las mismas y las posibles estrategias de manejo en campo, que es lo que se busca al realizar un diagnóstico adecuado.

No se ha dicho la última palabra en cuanto a diagnóstico de enfermedades vegetales y, como siempre en ciencia, se debe aprender a llegar a un equilibrio entre costos, rapidez, sensibilidad, especificidad y complejidad técnica, ponderando cada uno de estos factores en relación con su impacto sobre el diagnóstico final de la causa de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, AM. 2004. "Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases." *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.
- Boonham, N; Walsh, K, *et al.* 2003. "Detection of potato virus using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis." *Journal of Virological methods* 108: 181-187.
- Bustin, SA. 2000. "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.
- Bustin, SA. 2002. "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *Journal of molecular endocrinology* 29: 23-29.
- Lievens, B; Brouwer, M, *et al.* 2003. "Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens." *FEMS Microbiology Letters* 223: 113-122.
- Louws, FJ; Rademaker, JLW, *et al.* 1999. "The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis." *Annual Review of Phytopathology* 37(1): 81-125.
- Martin, RR; James, D, *et al.* 2000. "Impacts of Molecular Diagnostic Technologies on Plant Disease Management." *Ann. Rev. Phytopathol* 38: 207-239.
- Schaad, NW; Frederik, RD. 2002. "Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics." *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 250-258.

