

El diagnóstico y su papel en la fitoprotección

Resumen

El conocimiento fiable sobre la etiología de cualquier evento patológico es de singular valor, pues de ello dependerá, en gran medida, la eficacia de las prácticas de regulación que se diseñen y la sostenibilidad económica, social y ambiental de las mismas. Un sistema de manejo de enfermedades sosteniblemente funcional se sustenta en un conjunto de conocimientos, dentro de los cuales el diagnóstico de casos y la evaluación de riesgos de enfermedades juegan un peso fundamental; por tal motivo el presente trabajo persigue como propósito ofrecer información sobre las técnicas más comúnmente empleadas en el diagnóstico de enfermedades de las plantas. En el mismo se detallan la mayoría de las técnicas de diagnóstico comúnmente empleadas, así como aquellas más sofisticadas cuyo empleo proporciona información precisa y confiable sobre taxonomía de microorganismos, la fisiología de la enfermedad, la ecología de los patógenos, la amplificación de fragmentos de genes como rápida alternativa de la clonación, la modificación de fragmentos de ADN, la detección sensible de microorganismos seguido de una segura genotipificación, la transformación maligna de tejidos, el análisis de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad y para el mapeo de rasgos hereditarios y el estudio de expresión de genes, entre otras.

Palabras clave: Técnicas de inmunodetección, técnicas moleculares, diagnóstico de confirmación

Introducción

Según Miller y Martin, citados por Flores *et al* (1997), la evolución de las plantas y los organismos asociados ellas ha sido alterada por los agroecosistemas desarrollados por el hombre. Las técnicas del monocultivo, el mejoramiento genético de las plantas y el empleo intensivo de plaguicidas han conducido al desarrollo de patógenos más nocivos y que resisten a los plaguicidas. Esta variación genética ha cambiado las expectativas de los programas de mejoramiento de plantas y las alternativas para el manejo de las enfermedades.

Un diagnóstico oportuno que detecte el agente causal de un evento patológico es fundamental para el manejo del problema, y ello contribuye a: generar medidas de control efectivas, permite la optimización de los recursos, la reducción de los efectos negativos en el medio ambiente y a la vez origina información respecto a la interacción patógeno hospedante (Barnes, 1994 citado por Flores-Olivas, 1997., Vázquez, 2003).

Al realizar un diagnóstico debe asegurarse de tener un cuadro amplio del caso particular que está analizando y considerar otros factores como, la historia del lugar y el patrón de daño causado por la enfermedad o plaga. (MIP Forestales, 2006). Según Rosales 2003, citado por Malagón y Pupiro (2003), el diagnóstico de las enfermedades de forma rápida y precisa evita el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos como plaguicidas.

Hasta hace unos años la detección de patógenos dependía de métodos que requieren de mucha experiencia, habilidad y conocimiento de la taxonomía

de los microorganismos. Además son técnicas que consumen mucho tiempo, sin embargo las técnicas modernas han permitido una detección más eficiente de variedades patógenas con mayor rapidez y precisión, ejemplo de ello es el uso de técnicas serológicas (ELISA) y moleculares (PCR) (Rosales, 2003 citado por Malagón y Pupiro, 2003).

El diagnóstico por PCR resulta más rápido que los métodos tradicionales y por lo tanto se minimiza las pérdidas de los cultivos por las enfermedades y los costos para el tratamiento se reducen. (Shaad and Frederick, 2002).

A partir de la importancia y el papel que juega en la fitoprotección un diagnóstico oportuno, se elaboró el presente trabajo con el objetivo de ofrecer algunas informaciones que pudieran ser útiles para el personal que se adiestra y/o emplea estos procedimientos en el desempeño de sus actividades profesionales.

1. Tipos de diagnósticos

El diagnóstico incluye la identificación del problema, el alcance del problema, la importancia y la magnitud del problema, el método de control a emplear, y la demanda de investigación y costo-beneficio (Vázquez, 2003). En la práctica se realizan dos tipos de diagnóstico.

1.1 Diagnóstico presuntivo

Para realizar un diagnóstico presuntivo confiable se deben realizar, entre otras, las acciones siguientes:

1. Examinar el campo y los alrededores.
2. Identificación de la especie o variedad enferma.
3. Patrones de anormalidad, distribución geográfica de la enfermedad en el campo y comparación de plantas.
4. Examinar plantas individuales, posición de síntomas y signos.
5. Prácticas agrícolas del cultivo: fertilización, riego y control químico.

Antes de enviar una muestra para diagnosticar enfermedades o daño por insectos al laboratorio, examine la planta para otros problemas como daño por animales, factores nutricionales o ambientales. Además, asegúrese de que está enviando una muestra que tenga los síntomas más distintivos del problema que usted está observando (MIP Forestales, 2006).

1.2 Diagnóstico de confirmación.

1.2.1 Diagnóstico tradicional

Se pueden considerar dos fases (Flores- Olivas, et al, 1997):

- Diagnóstico macroscópico el cual se basa en la observación de síntomas. Es muy importante la experiencia del fitopatólogo y su conocimiento de las variables que inciden en la enfermedad, como el cultivo a investigar, el suelo, clima, patógeno.
- Diagnóstico microscópico, que consiste en la observación de la estructuras del microorganismo fitopatógeno. Esta observación puede ser directamente al microscopio de luz, para el caso de las bacterias, hongos, nemátodos o en el uso de microscopía electrónica para identificar a los virus.

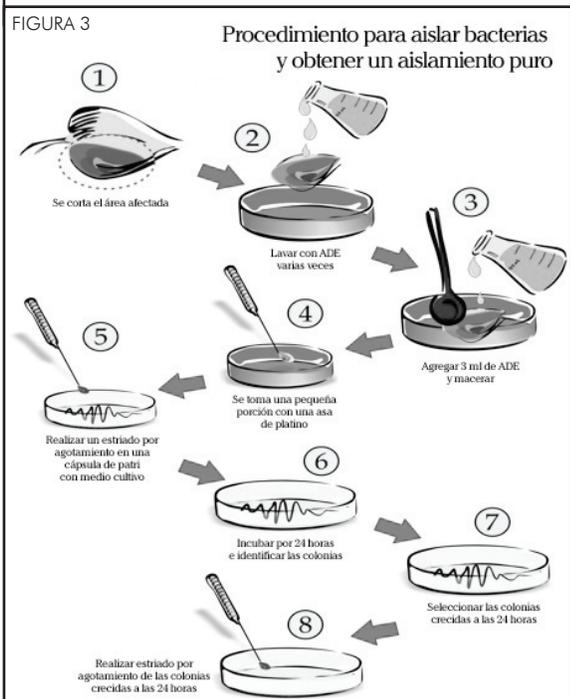
Para el diagnóstico de los hongos se necesita la formación de estructuras reproductivas, como esporas o conidios (ver figura 1 y 2) y cuando se trata de las bacterias, el proceso de identificación debe complementarse con pruebas bioquímicas (ver figura 3) (Flores- Olivas, *et al*, 1997).

Comúnmente es necesario aplicar los postulados de Koch, para determinar con exactitud la naturaleza del problema (Flores- Olivas, *et al*, 1997., Jañez, 1998).

Postulados de Koch:

- El microorganismo debe estar presente en todos los individuos enfermos.
- El microorganismo debe poder aislarse del hospedante y crecer en cultivo puro.
- La inoculación del microorganismo crecido en cultivo puro debe provocar la aparición de síntomas específicos de la enfermedad en cuestión.
- El microorganismo debe ser reaislado del hospedante infectado de forma experimental.

Estos principios de Patología Vegetal sobre los que se apoyan gran parte de las investigaciones no pueden ser cumplidos por cierto grupo de patógenos como los virus, ya que su reducido tamaño y su condición de parásitos endocelulares obligados (no pueden ser cultivados en medios de cultivo artificial). En este tipo de enfermedades, la observación de síntomas en campo y el empleo de formas alternativas de inoculación en huéspedes diferenciales, permite una discriminación clara de ciertos patógenos.



2. Técnicas clásicas para el diagnóstico

Un requisito previo para el control de cualquier enfermedad es la detección e identificación apropiada del organismo causal. La detección de patógenos en plantas con síntomas puede ser relativamente simple si se tiene extensa experiencia con el diagnóstico de la enfermedad y aislamiento del patógeno. Por otro lado la detección del patógeno en las semillas y materiales de propagación asintomática tales como: tubérculos de papa, pueden ser sumamente difíciles cuando la población de los patógenos es muy baja en los propágulos. Debido a esto se necesitan técnicas capaces de detectar un número bajo de patógenos en los propágulos. Antes del desarrollo de las técnicas serológicas el único método disponible y fiable para la identificación de hongos y bacterias fue el aislamiento en medio de cultivo y prueba de patogenicidad. Las pruebas serológicas permiten el diagnóstico presuntivo de enfermedades bacterianas (Hampton, *et al*, 1990). Sin embargo hasta que no se desarrollaron las técnicas basadas en ADN, no se pudo detectar los patógenos en plantas asintomáticas (Shaad and Frederik, 1992).

2.1 Empleo de medios selectivos

Mediante el empleo de medios selectivos se puede realizar una determinación cuantitativa de la población. Algunos medios selectivos se basan en las posibilidades de las bacterias de utilizar sustratos específicos. La presencia o ausencia de crecimiento y el color de las colonias son importantes (Disponible en <http://www.apsnet.org/Education/Mlingual/Spanish/8As.rtf>).

Ejemplo: Las especies del género *Erwinia* causantes de pudrición producen enzimas peptolíticas que sirvieron de base para la confección de un medio selectivo que contiene polipectato sódico, las cavidades que se forman en la superficie del medio indican la presencia de microorganismos peptolíticos. Estas enzimas degradan las pectinas de la lámina media, causando el colapso del tejido, una pudrición blanda y la muerte de la célula (Disponible en <http://www.apsnet.org/Education/Mlingual/Spanish/8As.rtf>).

Otros medios se basan en la tolerancia del patógeno a cierto número de antibióticos, fungicidas, bactericidas que los microorganismos saprófitos no toleran

o no soportan en determinadas concentraciones. Se emplean también diferentes colorantes que provocan un crecimiento característico y desarrollo de colonias cuyo aspecto permite distinguirlas fácilmente de otros que no se corresponde con el patógeno contaminante estudiado (Stefanova, *et al*, 1986).

No resulta fácil crear un medio selectivo o semi-selectivo para un determinado patógeno porque hay que tener en cuenta su sensibilidad o sea la capacidad de recobrar la bacteria en concentraciones bajas y suprimir en forma eficiente la flora contaminante (Stefanova, *et al*, 1986).

2.2 Técnica de microscopía óptica y electrónica

El empleo de estas técnicas se limita solamente a la observación directa de las estructuras del patógeno en cuestión (Pupiro y Malagón, 2003).

2.3 Técnicas serológicas

El uso de inmunoensayos en la detección de patógenos de plantas ha sido rutinario en los últimos años, especialmente en virus (Clark, 1981 y Millar, 1988). Entre los más usados están:

- Método por aglutinación: Consiste en hacer reaccionar cantidades equivalentes de los reactantes (Ag y Ac). La formación de gránulos aglutinados o agregados indican una reacción positiva. Las reacciones de aglutinación son menos específicas pues tienen la desventaja de depender grandemente de los factores físico químicos, tales como, concentración de electrolitos, pH, temperatura y el tiempo.
- Método por precipitación: Pueden ser en medios líquidos o en geles. Estos métodos han demostrado tener una notable eficacia para individualizar y purificar los antígenos dotados de diferencias particulares. La unión del Ag y Ac se traduce por la formación de un precipitado insoluble con la condición que los reactivos se encuentren a concentración equivalente.
- Método del látex: Está basado en la prueba de aglutinación. Los Ac son adheridos a partículas de látex. Al enfrentarse el látex sensibilizado con el Ag específico se produce la agregación entre estas esferas y los Ag. Esta prueba ha sido usada principalmente en Virología, en Bacteriología la

técnica ha sido usada con éxito para detectar *Clavibacter michiganense subsp sepedonicum* y *Ralstonia solanacearum* en papa y *Xanthomonas albilineans* en caña. El método es de 100 a 1000 veces más sensible que una aglutinación normal, la reacción aparece más rápida, generalmente no es necesario el microscopio para observar la reacción, se necesita muy poco inmuosuero, no requiere la clarificación de la savia.

- Técnica de Inmunofluorescencia: Esta técnica se basa en la conjugación de anticuerpos específicos con moléculas teñidas con productos, ejemplo, la fluoresceína, que produce un color verde amarillento. Es muy sensible para identificar bacterias fitopatógenas y útil para analizar un gran número de muestras. La técnica de inmunofluorescencia permite identificar un antígeno con la ayuda de un inmuosuero conocido, e investigar y titular un anticuerpo con la ayuda de un antígeno conocido.
- Técnica inmunoenzimática ELISA: El ensayo se basa en la interacción específica de un antígeno (patógeno) y un anticuerpo (proteínas inmunoglobulinas producidas en un vertebrado superior, usualmente conejos). La reacción se visualiza a través de la acción de un conjugado enzima-anticuerpo sobre un sustrato. Es un método rápido de gran sensibilidad, especificidad y bajo costo, que supera a muchas técnicas de diagnóstico empleadas con anterioridad. Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA, todas basadas en el mismo principio. El tipo de técnica y anticuerpo a emplear dependerá del objetivo de la aplicación (campo, laboratorio), tipo de muestra (suelo, agua tejido) y nivel de sensibilidad y rapidez requerida. La técnica ELISA con sandwich de doble anticuerpo es una de las más empleadas, en este caso el antígeno es ubicado entre dos anticuerpos específicos, el de captura y el de marcaje, este último está conjugado a una enzima y puede cuantificarse en el espectrofotómetro. Esta técnica es de gran utilidad en la detección de patógenos de mezclas complejas, tales como, suelo, extractos de plantas.

Las técnicas de inmunodetección han sido usadas en la detección de microorganismos fitopatógenos, principalmente virus y bacterias y en menor escala para hongos. Una aplicación importante se ha encontrado en los estudios de taxonomía de microorganismos.

mos, la fisiología de la enfermedad y la ecología de los patógenos. Con el empleo de estas técnicas se pueden establecer estrategias de manejo de patógenos, como la certificación de semillas o fijación de cuarentenas (Tabla 1).

Las técnicas serológicas ELISA- Inmunofluorescencia además de ser métodos muy confiables y sensibilidad moderada tiene la ventaja de poder asimilar gran cantidad de muestras en algunas horas y los resultados positivos y sospechosos se confirman mediante la prueba de patogenicidad (González, *et al*, 1999).

Agente causal	Cultivo	Técnica de diagnóstico
<i>Phytophthora citrophthora</i> ^a	Cítricos	Hibridación dot-blot
<i>Verticillium dahliae</i> ^a <i>Verticillium albo-atrum</i>	Varias especies de plantas	PCR
<i>Pseudomonas syringae pv tomato</i>	Tomate	Hibridación
<i>Pseudomonas syringae pv phaseolicola</i>	Semillas de frijol	PCR
VTC ^b	Cítricos	PCR
PVY ^b	Papa	PCR
<i>Fusarium spp</i> ^c	Papa	AFLP
<i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i> ^d	Frijol	PCR
<i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i> ^e	Cítricos	PCR IFI
<i>Xanthomonas vasculorum</i> ^f <i>Xanthomonas albilineans</i>	Caña	IFI
<i>Ralstonia solanacearum</i> ^f	Papa	IFI PCR
<i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicum</i> ^f	Papa	IFI ELISA-DAS
<i>Erwinia carotovora</i> ^g	Papa	IFI

TABLA 1

Leyenda:

a: Tomado de: Flores, A.O et al,1997. Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos.

b: Tomado de: <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsv/dett/Doc204/>. [Consulta: 2 de octubre del 2006].

c: Tomado de: <http://alerce.inia.cl/sochift/XIV.html>.Artículo92 [Consulta: 2 de octubre del 2006].

d: Tomado de: Sezione di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italy 2002 / 31: received 23 January 2002.

e: Tomado de: Phytopathol 91:June (Supplement) S46.(2001).

f: Tomado de: Programa de defensa fitosanitario para el cultivo de la papa.(2000).

g: Tomado de: Abstracts of Conference Papers Posters and Demonstration EAPR.(1996).

3. Técnicas avanzadas para el diagnóstico

Biología Molecular, es la ciencia cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos, este conocimiento nos permite cruzar las barreras naturales que existen entre las especies y “colocar” genes de un organismo a otro llamado hospedero, empleando técnicas de ingeniería genética. Gracias a este avance, se pueden producir fragmentos de ácidos nucleicos a gran escala, abriendo así las puertas a la secuenciación de los ácidos nucleicos y por ende a nuevas disciplinas como el diagnóstico molecular, la terapia génica o la obtención de organismos superiores recombinantes (Disponible en: www.monografias.com).

Según Salazar, citado por Pupiro y Malagón, 2003 el uso de marcadores moleculares es importante en la caracterización genética de las plantas, donde no solamente se identifican genotípicamente los materiales, sino que se establecen relaciones citogenéticas entre los mismos, permitiendo el diseño de mejores estrategias de selección y mejoramiento genético.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades vegetales. Es utilizada en la detección de patógenos en semillas, el cultivo de tejidos, detección de toxinas y residuos de pesticidas (Flores-Olivas, et al ,1997). La PCR es una técnica que permite determinar relaciones filogenéticas entre especies y constituye una buena herramienta de análisis de la biología de las poblaciones (Baró, 1998). Según Shaad,et al, Mutasa ,et al, citados por Flores-Olivas, et al ,1997 entre las ventajas de la PCR está la detección de moléculas simples en mezclas complejas sin usar sondas radioactivas y con alta sensibilidad. Una de las ventajas sobre los métodos tradicionales es que no se necesita cultivar los organismos antes de la detección. La PCR fue ideada por el bioquímico estadounidense Kary B. Mullis en 1983 y se generalizó a finales de la década de los 80. Es fácil de automatizar y puede copiar una sola molécula de ADN varios

millones de veces en unas pocas horas (Biblioteca Premium. Microsoft Encarta 2006).

La reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- 1ª Desnaturalización del ADN doble cadena.
- 2ª Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.
- 3ª Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.

(Disponible en: www.monografias.com).

Las aplicaciones de la PCR son múltiples y parecen estar sólo limitadas por la imaginación de los científicos. Entre ellas tenemos: la amplificación de fragmentos de genes como rápida alternativa de la clonación, la modificación de fragmentos de ADN, la detección sensible de microorganismos seguido de una segura genotipificación, si se desea, el análisis de muestras arqueológicas y estudios antropológicos, la detección de mutaciones importantes en enfermedades hereditarias, transformación maligna o tipaje de tejidos, el análisis de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad y para el mapeo de rasgos hereditarios, el estudio de expresión de genes, entre otras (Herrera & Gamba, 1996, citados por Ruíz y Menéndez, 2006).

- RFLP: Es el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción. Estos se observan por hibridación de los fragmentos como resultado de la digestión del ADN por una enzima de restricción, separados electroforéticamente con sondas de copia única (Baró, 1998). Se trata de una técnica costosa y laboriosa que precisa de una gran cantidad de ADN y una información previa sobre su secuencia, además que usualmente involucra el uso de radioisótopos, por lo que está siendo desplazada por los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa que ha contribuido a la simplificación de la tecnología y reducción de los costos (Chávez y González, 2000).
- Técnica RAPD: Polimorfismo del ADN amplificado al azar. Es una PCR que utiliza un solo iniciador, cuyo tamaño es en general de 10 bases, e hibrida a secuencias repartidas aleatoriamente sobre el ADN. Provee patrones de bandas cuyo número y tamaño permiten el análisis de variaciones mo-

leculares (Strigam y Mackay, 1993 citados por Baró, 1998).

La elección del método de análisis dependerá del organismo estudiado y sobre todo de su variabilidad genética, para delimitar especies o grupos dentro de especies se han utilizado ampliamente marcadores de tipo proteínas o isoenzimas. Las técnicas basadas en el análisis comparado del tamaño de los fragmentos de ADN permiten distinguir aislamientos específicos (Baró, 1998). **T**

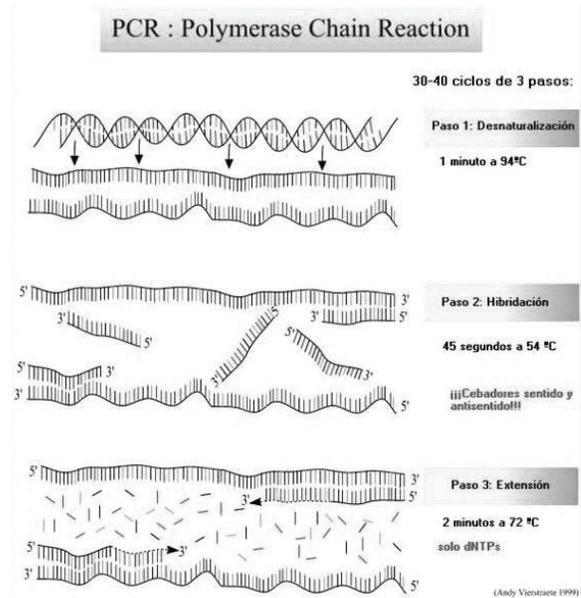


FIGURA 4. PASOS BÁSICOS DE LA PCR.

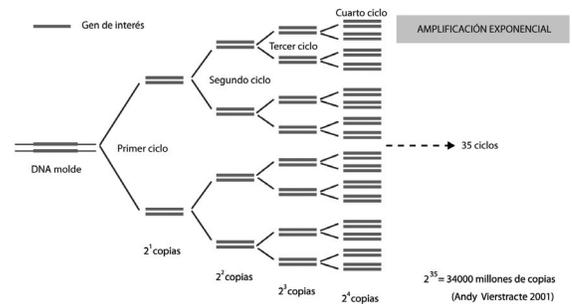


FIGURA 5. AMPLIFICACIÓN EXPONENCIAL DEL PCR.

Bibliografía

- ALBARRACIN, NELLY DE.
2006 Diagnóstico de enfermedades de plantas.
Power point.

- BARNES, L. W.
1994 The role of plant clinics in disease diagnosis and education. A North American Perspective. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:601-609 p.
- BARÓ, YAMILÉ
1998 Caracterización molecular de Hongos entomopatógenos. *Fitosanidad (CU)* 2(1): 67, Junio.
- BIBLIOTECA PREMIUM
Microsoft Encarta 2006.
Caracterización molecular de *Fusarium* spp asociadas a pudriciones secas en tubérculos de papa a través de AFLP [en línea]. [Disponible: <http://alerce.inia.cl/sochifit/XIV.htmlArticulo:92>]. [Consulta: 30 de septiembre del 2006]
- CHÁVEZ, LISET., GONZÁLEZ, L. M.
2006 Aspectos generales sobre el uso de los marcadores moleculares en la evaluación de la diversidad vegetal. *Alimentaria. Instituto de Investigaciones agropecuarias. Bayamo. Gramma. Cuba.*
- CLARK, M. F.
1981 Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 83-106.
- CLAYTON, R.C., SYMONDS. ET AL.
1996 A New Diagnostics test for the detection of *Erwinia*. *Abstracts of Conference Papers Posters and Demonstration EAPR.*
- DESARROLLO Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS
1966 The plant sciences: now and in the coming decade. Un informe de la junta sobre ciencias de la planta para el comité de ciencias y política pública de la academia nacional de ciencias-consejo nacional de investigación, Washintong D.C.
- DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VEGETALES
[en línea] Disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/prácticas.index.html>. [Consulta: 27 de septiembre del 2006]
- FLORES, OLIVAS, ALBERTO., ET AL.
1997 Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *Tomado de Fitopatología (Mex)*32 (2).
- GÓMEZ, MONTECINOS, NINETTE
Biotecnología e Ingeniería Genética [en línea]. [Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos18/biotecnología-genética/#adn>]. [Consulta:23 de septiembre del 2006]
- GONZÁLEZ, AILEEN., MIGUEL, ALEXANDER., STEFANOVA, MARUSIA
1999 Cancrosis bacteriana de los Cítricos. *Boletín Técnico* 5(2) octubre.
- HAMPTON, R.O., BALL, E. M., DE BOER
1990 Serological tests for detection of viral and bacterial pathogens *American Phytopathological Society, S. H. (Editors), St.Paul, Minn.*
- IAÑEZ, PAREJA. E
1990 [en línea] El papel de los microorganismos en las enfermedades. *Curso de Microbiología general. En el servidor. eianez@goliat.ugr.es.* [Consulta: 25 de septiembre 2006].
- MARGARITA LOZADA MÉNDEZ
Biología molecular. malito: Pinpon70@hotmail.com. [Consulta: 26 de septiembre del 2006].
- MÉTODOS SEROLÓGICOS EN FITOBACTERIOLOGÍA
1988 Cursos de Post-Grado. *INISAV. Cuba.*
- MILLAR, S.A., AND MARTIN, R.R.
1988 Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol* 26: 409-432p.
- MUTASA, E.S., D.M. CHWARSZCZYNSKA, M. J. ADAMS, EDWARD, AND M.J.C. ASHER
1995 Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots and its applications in field studies. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47:303-313p.
- NORMAN, SHAAD, W., REID D, FREDERICK
2002 Real-time and its application for rapid plant disease diagnostics. *Plant Pathol.*24: 250-258p.
- PROCARIOTES- INFORMACIÓN GENERAL
2006 [en línea]. Disponible en: <http://www.aps-net.org/Education/Mlingual/Spanish/8As.rft>. [Consulta: 2 de octubre del 2006]
- PROGRAMA DE DEFENSA FITOSANITARIA PARA EL CULTIVO DE LA PAPA
2000 CENSA. Proyecto Genoma Humano. *Biblioteca Encarta 2006.*
- PUPIRO, M. L., MALAGÓN, RODRÍGUEZ. L.
2003 Técnicas del diagnóstico de las enfermedades en las plantas. *Trabajo de patología vegetal.*

- Universidad Agraria de La Habana. La Habana.
- R.K. TAYLOR, J.L. TYSON, R.A. FULLERTON AND C.N. HALE
2006 [en línea] Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: a case study involving canker-like symptoms on citrus. En el servidor. rtaylor@hortresearch.co.nz [Consulta: 2 de octubre del 2006].
- ROSALES, V, INÉS
Diagnóstico de enfermedades en plantas: Uso de herramientas moleculares. [en línea]. Disponible en: [http://www.inia.cl/biotecnologia/nws/Biotecnologia en diagnostico de enfermedades.pdf](http://www.inia.cl/biotecnologia/nws/Biotecnologia%20en%20diagnostico%20de%20enfermedades.pdf). [Consulta: 2 de octubre del 2006]
- RUÍZ, A. V., MENENDEZ, L. R.
2006 [en línea] Métodos y aplicaciones de la Biología Molecular en la Biomedicina. Disponible en: vladimirruiz@infomed.sld.cu [Consulta: 26 de septiembre 2006].
- S. TEGLI, A. SERENI AND G. SURICO
2002 PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. Dipartimento di Biotecnologie Agrarie (DiBA) – Sezione di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italy 2002 / 31: 23, January.
- SALAZAR, G. E.
Situación actual de la Biotecnología y en el diagnóstico de las enfermedades de las plantas en Venezuela. [en línea]. [Disponible en: <http://www.redbio.org/rdominicana/inforredbio/materiales%20en%20bioseguridad/documentos%20en%20bioseguridad/Estado%20de%20la%20bioseguridad%20en%20Venezuela.pdf>]. [Consulta: 26 de septiembre del 2006].
- SOUSA SANTOS, M., CRUZ, L., NORSKOV, P. AND RASMUSSEN, O.F.
1997 Seed Science and Technology 25,3:581-584p.
- STEFANOVA, MARUSIA., AMAT, ZENAIIDA., RODRÍGUEZ, RIVERO, NÉLIDA, IDANIA
FASE NO PARASÍTICA DE LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS
1986 Curso de post-grado. Ciudad Habana. Cuba.
- STRIGMAN, D. AND MACKAY, M.
1993 Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Mycologia.85:65-70.
- SUBDIRECCIÓN DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO
[en línea]. Disponible en: <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsul/dett/Doc204/>. [Consulta: 30 de septiembre del 2006]
- VÁZQUEZ, L. L.
2003 Manejo Integrado de Plagas. INISAV. CUBA.
- **Elio Rivas Figueredo**
***Yohandra de Armas Vargas**
***Roberto R. Elías Barreto**
***Lianne Alonso Hernández**
***María V. Ramírez Medina**
***Liliana Drake Espinosa**
***Rafael Medina Salas**
- *Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Matanzas, Km 111 Carretera Central, Matanzas, Cuba.
**Universidad Agraria de la Habana, km 23 ½ Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.