

*Un buen diagnóstico es  
esencial para tener un buen  
manejo de una enfermedad en  
un cultivo agrícola*

# **BASES DEL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS: UNA GUÍA DE ESTUDIO**

Luz Adriana Pedraza Herrera

*PhD. Ciencias Agrarias - fitopatología*

Grupo de Investigación y Desarrollo en Ciencia,  
Tecnología e Innovación -BioGRID

## Pagina Legal

### *Legal Page*

Titulo Original: Bases del diagnóstico de enfermedades de plantas: una guía de estudio.

Primera edición: Enero, 2025.

Reservados todos los derechos.

© 2025, Sociedad de Doctores e Investigadores de Colombia.

Teléfono: (+57) 3204833731

[www.editorial.sophicol.org](http://www.editorial.sophicol.org)

[editorial@sophicol.org](mailto:editorial@sophicol.org)

Revisión de estilo:

Luz Adriana Pedraza Herrera

Ángel Sebastián Ortiz Chingaté

ISBN: 978-628-96119-6-0

DOI: 10.5281/zenodo.14780307

Hecho el depósito que exige la ley. Queda prohibida la reproducción parcial o total de este libro con fines comerciales, por medio de cualquier proceso reprográfico o fónico, conocido o por conocerse, sin precio permiso escrito del autor y del editor. Bogotá D.C., SoPhIC, 2025.

## Contenido

### *Content*

Introducción .....	3
1. Enfermedades de plantas: síntomas y signos claves para el diagnostico .....	6
2. El diagnóstico de enfermedades de plantas: bases esenciales.....	10
3. Cuantificación de la enfermedad en plantas.....	19
4. Aislamiento de patógenos de plantas desde el tejido vegetal.....	26
5. Identificación de patógenos de plantas .....	37
6. Identificación y detección molecular de agentes causales en plantas .....	59
6.1. Diagnóstico y detección de virus fitopatógenos. ....	60
6.2. Diagnóstico de enfermedades causadas por <i>Candidatus Liberibacter</i> ....	65
6.3. Diagnóstico de enfermedades causadas por <i>Candidatus</i> phytoplasma....	68
7. Construyendo rutas de diagnóstico de enfermedades de plantas.....	70
8. Conceptos fundamentales.....	72
9. Bibliografía.....	79



## Introducción

La fitopatología es la ciencia que estudia las enfermedades en las plantas. Una enfermedad vegetal es definida como la afectación de una o más de las funciones fisiológicas de las plantas debido a la infección por un organismo patógeno (Gonzales, 1981). Comúnmente las enfermedades son observables a través de la presencia de síntomas y signos, pero al interior de la planta ocurren una serie de procesos fisiológicos y moleculares que definen la generación de sintomatologías, la pérdida de vigor por parte de la planta que conlleva a pérdidas a nivel de rendimiento y productividad (Agrios, 2005).

De esta manera, los síntomas y signos son claves en el diagnóstico de enfermedades de plantas, pudiéndose hacer una exploración profunda desde la observación en campo hasta el aislamiento e identificación del patógeno en el laboratorio. Cabe resaltar, que los síntomas no pueden ser un caso aislado y es imposible dar diagnóstico solamente por la observación de los mismos. Por esta razón es necesario tener en cuenta además de síntomas y signos, la especie de planta, la variedad, la localización geográfica, la presencia o no de insectos vectores potenciales, la historia del cultivo y del terreno de localización (Riley et al., 2002). Con esta información, es posible remitirse a las bases de datos actualizadas y buscar las posibles enfermedades del cultivo, hacer una búsqueda de síntomas encontrados versus las enfermedades reportadas (Rahgavendran et al., 2023), esto con el fin de tener una aproximación inicial de las posibles causas de la sintomatología.

A partir de la posible o posibles hipótesis, se deben hacerse varias preguntas

- ¿Cuál es la distribución de las plantas enfermas? Está en parches, está en todo el cultivo, ¿Cuál es la incidencia y la severidad?



- ¿Qué tipo de patógeno puede estar asociado a la sintomatología? Hongos, bacterias, oomycetos, virus, viroides etc. ¿Se han observado signos en el tejido vegetal? ¿Qué características tiene ese signo?
- ¿Qué tipo de síntomas se presentan? Manchas necróticas, halos cloróticos, pudrición, cancro, tizón, marchitamiento, clorosis etc ¿En qué parte de la planta? ¿Hay síntomas de marchitamiento? Si la respuesta es sí ¿Será necesario explorar la parte radicular y el interior del tallo? ¿Hay volcamiento de las plantas? Si la respuesta es sí ¿Será necesario explorar la raíz de la planta? Así mismo si se encuentra daños a nivel del fruto ¿Será necesario hacer exploración al interior del fruto?
- ¿Cuál es la historia de la sintomatología? ¿Cuándo apareció? ¿Hubo algún evento específico antes de la aparición? ¿Cuál es la historia del terreno?
- Finalmente, y no menos importante ¿Hay presencia de posibles vectores en el cultivo? ¿Hay síntomas de patógenos transmitidos por vectores? ¿Será necesario realizar muestreo e identificación de insectos en el cultivo?

Adicional a estas preguntas, se podrían generar muchas más, sin embargo, este es un buen punto de partida para realizar el muestreo en campo y tener en cuenta muchas observaciones que no se tuvieron en cuenta desde el comienzo, como el caso de localización geográfica y condiciones climáticas. (Miller et al., 2009; Buja et al., 2021).

Una vez generada la hipótesis, se debe iniciar el proceso de diagnóstico, se recolectan las plantas de acuerdo con el muestreo más apropiado en concordancia con el tipo de cultivo y de terreno (Piedra, 2015; Schubert, et al., 1999). Se debe recolectar suficientes muestras, incluyendo algunas sin síntomas, otros con sintomatología inicial, media y final. No se deben recolectar plantas en estado de descomposición ya que pueden estar afectadas por saprofitos y esto impide la identificación del agente causal. Las muestras deben ser guardadas en bolsas

limpias, de cierre hermético y sin papel, se almacenan en nevera mientras se hace el procesamiento.

De acuerdo con la hipótesis, se pueden hacer cámaras húmedas o simplemente hacer el procesamiento de la planta por desinfección superficial de explantes y siembra en medio si son hongos u oomycetos. Si son bacterias se debe realizar la maceración del tejido, diluciones seriadas y siembra en placas de medios apropiados, mejor si son selectivos o semiselectivos. Si se trata de un organismo no cultivable, se pueden observar a partir de los signos observados (de existir), o hacer cámaras húmedas para esperar la aparición de los mismos (si se trata de hongos y/o oomycetos). Si se esperan sean bacterias no cultivables como los fitoplasmas o de virus, se debe proceder a la extracción de ADN o ARN para la identificación, usando primers universales o si se sugiere la presencia de determinado patógeno a través de la ruta de diagnóstico, se debe optar por primers específicos o pruebas serológicas, por esta razón es importante contestar las preguntas previas (Venbrux et al., 2023).

Si se observan signos de patógenos, se pueden hacer cámaras húmedas en el caso de hongos u oomycetos o simplemente, hacer improntas o toma de muestra con asa recta para la observación microscópica correspondiente, incluso, se puede tomar muestra e inocular un medio de cultivo apropiado para tener el crecimiento del microorganismo (Mancini et al., 2016). Si se encuentran exudados, se sugiere hacer una siembra por agotamiento en agar nutritivo, ya que se puede tratar de una bacteria patógena (Scala et al., 2018). Todo dependerá de los hallazgos en campo y en las muestras recolectadas.

Una vez obtenidos los microorganismos aislados, se deben realizar cultivos axénicos y desde los mismos proceder al proceso de identificación para lo cual se usa diferentes técnicas y métodos incluyendo las características morfológicas, tinciones, técnicas serológicas, métodos moleculares, dentro de otros.

## **1. Enfermedades De Plantas: Síntomas Y Signos Claves Para El Diagnostico**

Una enfermedad vegetal es definida como la afectación de una o más de las funciones fisiológicas de las plantas debido a la infección por un organismo patógeno. Un patógeno, es aquel organismo que está en la capacidad de causar enfermedad, siempre y cuando se encuentren todos los elementos del triángulo de la enfermedad, un hospedero susceptible, un patógeno virulento y unas condiciones ambientales favorables. Bajo esta premisa, se inicia un ciclo de patogénesis con llegada del inoculo del patógeno a la planta, siendo este el elemento del patógeno capaz de diseminarse o infectar y que puede tener lugar a través de diferentes medios como es el caso de las semillas, el material vegetal, los residuos de cosecha, el agua de riego, las plantas arvenses y los vectores, entre otros (Agrios, 2005).

En esta vía, los periodos de enfermedad son aquellas etapas que describen el desarrollo de esta y dentro de los cuales se encuentran el periodo de incubación, el periodo de latencia y el periodo de infección, los cuales van a ser particulares y específicos en cada patosistema (De Wolf & Isard, 2007). Así mismo, existirá una relación entre el ciclo de patogénesis y el ciclo de cultivo, existiendo patógenos monocíclicos como es el caso de los carbones y patógenos policíclicos como las royas y los mildews (Burbano – Figueroa, 2020).

La enfermedad en las plantas puede ser visualizada mediante síntomas, daños y desordenes. Dentro de los primeros se refieren a la reacción visible de la enfermedad y se incluyen los morfológicos, los fisiológicos y los histológicos e internos (Brito, 2010). Los síntomas morfológicos son aquellos que se observan a simple vista y que pueden ser necróticos, hipoplásticos e hiperplásticos (Agrios, 2005). Los necróticos son aquellos que terminan con la degradación de los tejidos



(manchas necróticas, pudriciones, marchitamiento, damping off entre otros), los hipoplásticos se refieren a reducciones en el índice de crecimiento (enanismo, clorosis, mosaico, moteado, entre otros) y los hiperplásticos al crecimiento excesivo de órganos y tejidos (agallas, tumores, callos, sarna, enrollamiento, entre otros) (Rivera, & Wright. 2020). En la siguiente figura se muestran algunos síntomas de enfermedad:



"Gomosis" por *Nectria* sp. en *Terminalia ivorensis*.



"Epinastia" de origen desconocido en *Inga* sp.



"Sarna de los cítricos" (*Elsinoe* sp.) en *Citrus* sp.



"Mancha anular" por virosis en *Cordia alliodora*.



Corona de agallas" (*Agrobacterium tumefaciens*) en *Tectona grandis*.



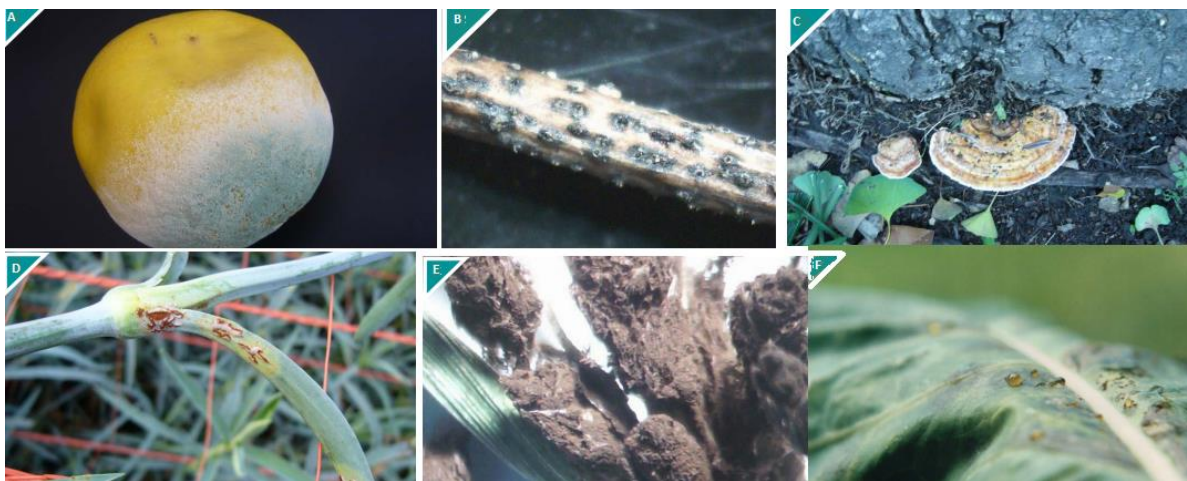
"Proliferación de ramillas" por fitoplasmas en *Erythrina poeppigiana*.

***Síntomas de enfermedades en plantas. Tomado de Arguedas (2008).***



*Síntomas asociados a enfermedades en plantas. (a) Enanismo en maíz, (b) agalla de corona en arándano, (c) torsión de las hojas en gerbera, (d) proliferación de brotes, (e) edema foliar, (f) sarna en papa, (g) fascinación de pedúnculos y flores en violeta. Tomado de Rivera & Wright, (2020).*

Por su parte los **signos** son unas estructuras, partes o productos del patógeno asociado a la sintomatología y que evidencia su presencia, como esporulación, cuerpos fructíferos, pústulas, micelio, exudados, quistes, nódulos entre otros como se indica en la siguiente figura



*Signos de patógenos de plantas. (A) Esporulación, (B) Picnidios, (C) Basidiocarpio, (D) Pústulas de roya, (E) Soros de carbón y (f) Exudado bacteriano. Tomado de Rivera & Wright, (2020).*

Las enfermedades de las plantas pueden agruparse según su naturaleza en: marchitamientos vasculares, carbones, royas, manchas foliares, pudriciones, chancros, mildeos vellosos, mildeos polvosos entre otros.



## **2. El Diagnóstico De Enfermedades De Plantas:**

### **Bases Esenciales**

El diagnostico puede definirse como el conocimiento de una enfermedad mediante de la observación de sus síntomas y signos, en tanto la detección es demostrar la existencia del patógeno mediante diferentes tipos de técnicas. A pesar de esto, la observación no es suficiente para el diagnóstico de una enfermedad, se requiere de una serie de elementos que vendrán determinados de acuerdo con los hallazgos, dentro de estos cabe mencionar la sintomatología, los signos del patógeno (de existir), el uso de métodos de detección, la inspección de la presencia de vectores, la información histórica del cultivo, entre otros.

De esta manera, se puede decir que el diagnóstico es una prueba hipotética, en la cual la hipótesis es la identidad de la enfermedad y la cual debe ser formulada tras la observación del problema, probarla y finalmente aceptarla.

Para establecer cada uno de estos pasos, puede hablarse de una ruta general donde se tienen las siguientes etapas y elementos

#### ***Muestra***

- Órgano afectado
- Síntomas y etapas
- Efecto en la producción

#### ***Campo***

- Distribución
- Clima
- Insectos plagas – Vectores

- Manejo
- Fenología
- Variedades

### ***Literatura***

- Asociación de los síntomas
- Métodos de detección (directos, indirectos, sensibilidad, etc)

### ***Confirmación de la hipótesis***

- Muestreo
- Procesamiento de las muestras
- Aplicación de métodos de detección
- Postulados de Koch

Para la observación de la sintomatología, se debe realizar una descripción completa y lo más exacta de la misma, encontrando etapas iniciales, medias y finales para lo cual se debe tener en cuenta rasgos de las plantas sin síntomas de acuerdo con las variedades o cultivares. De la misma manera, se debe tener en cuenta los órganos donde se presentan los síntomas y a partir de esta primera información realizar el muestreo de plantas. Este debe ser una buena porción de material o un número representativo, pudiendo ser plantas completas o del órgano afectado dependiendo del tipo de cultivo. Adicionalmente, se puede incluir parte del sustrato de crecimiento.

Para la realización del muestreo se debe tener en cuenta patrones de distribución de la sintomatología en campo y no olvidar muestrear plantas en diferentes estados de afectación y plantas sanas. El muestreo va a depender de las

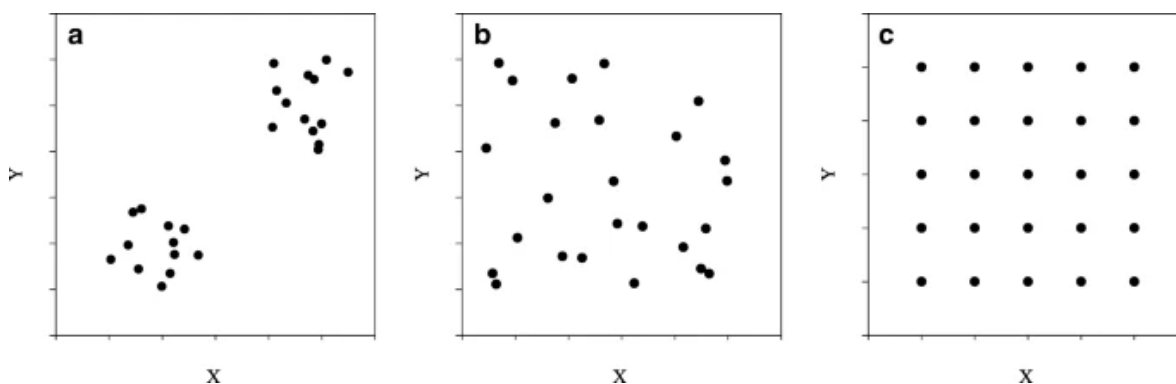
unidades a muestrear, el nivel de precisión, la intensidad, la época de muestreo, el tipo de terreno como si es homogéneo o heterogéneo en condiciones, si se trata de plantas de porte bajo o de árboles y los patrones de distribución de la sintomatología.

Los patrones de distribución pueden ser:

**Agregados:** Las plantas enfermas se agrupan en focos. Ejemplo: Enfermedades causadas por nematodos; costra de la manzana causada por *Venturia inaequalis*

**Aleatorio:** Áreas del mismo tamaño en el campo tienen la misma probabilidad de contener el mismo número de plantas enfermas. Ejemplo: Pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotium*), Mildeo polvoso del lúpulo (*Podosphaera maculari*)

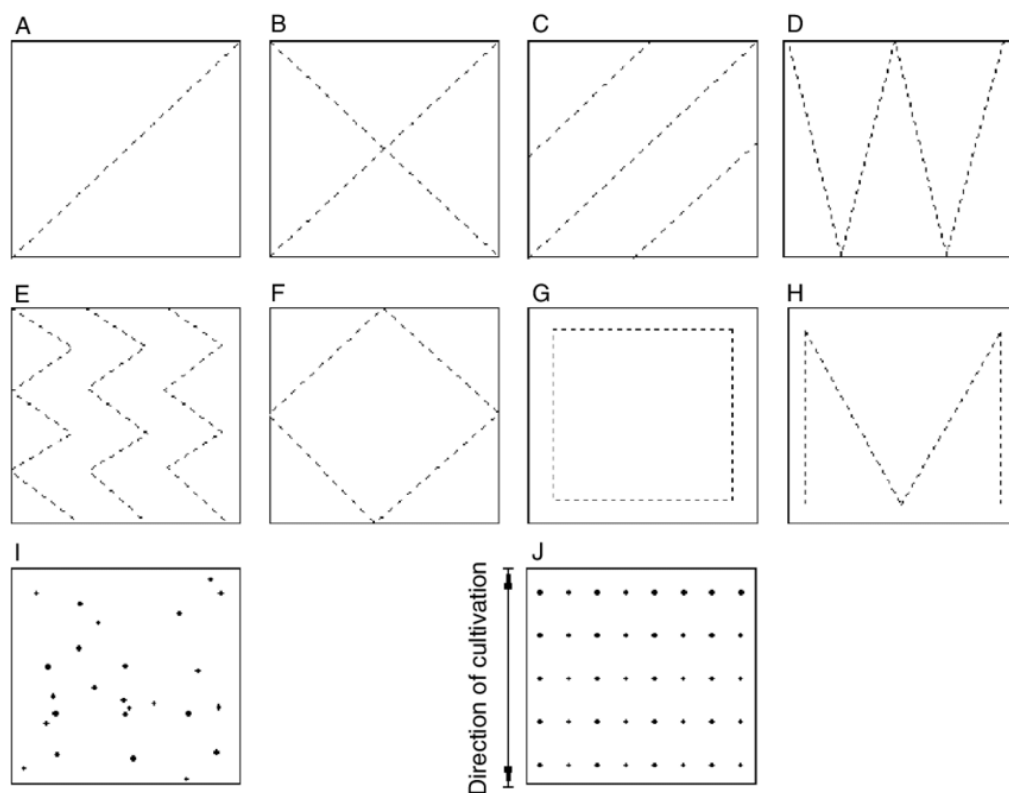
**Regular:** Las plantas enfermas se distribuyen a intervalos regulares. Ejemplo: Royas, no es muy común una distribución regular u homogénea en patógenos de plantas



*Patrones de distribución de enfermedades en plantas en campo. Tomado de Van der et al. (2021).*



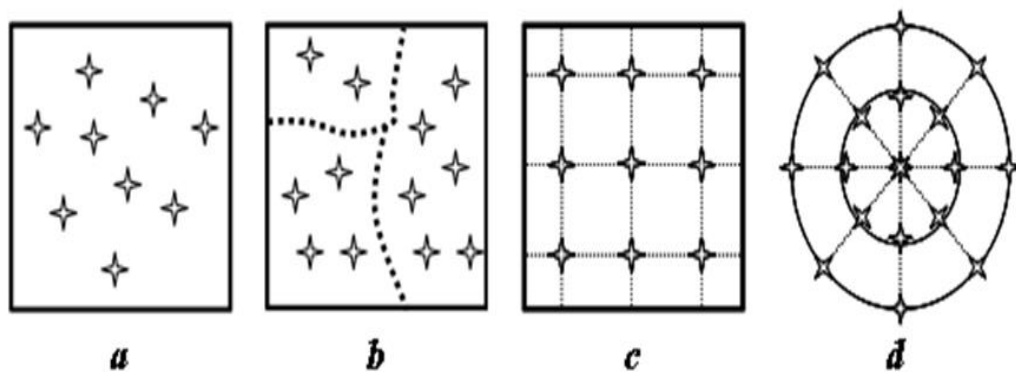
Una vez conocido el patrón de distribución, se pueden realizar los recorridos correspondientes para la toma de muestras y la observación de los síntomas tratando de cubrir la mayor área posible. Los recorridos también dependen del tipo de cultivo y de terreno, a manera de ejemplo en cultivo de gramíneas se tienden a usar patrones de recorrido en zigzag o en W, en tanto para cultivos arbóreos se usan recorridos en guarda griega. A continuación, se muestra los tipos de recorrido:



*Diferentes patrones usados para recolectar muestras de núcleos separados de un campo: A) patrón diagonal; B) patrón en diagonal cruzada; C) patrón paralelo-diagonal; D) patrón en forma de W; E) patrón en zigzag; F) patrón cuadrado inclinado; G) patrón de perímetro; H) patrón en forma de M; I) patrón aleatorio; J) patrón de cuadrícula rectangular. Tomado de Been & Schomaker. (2006).*

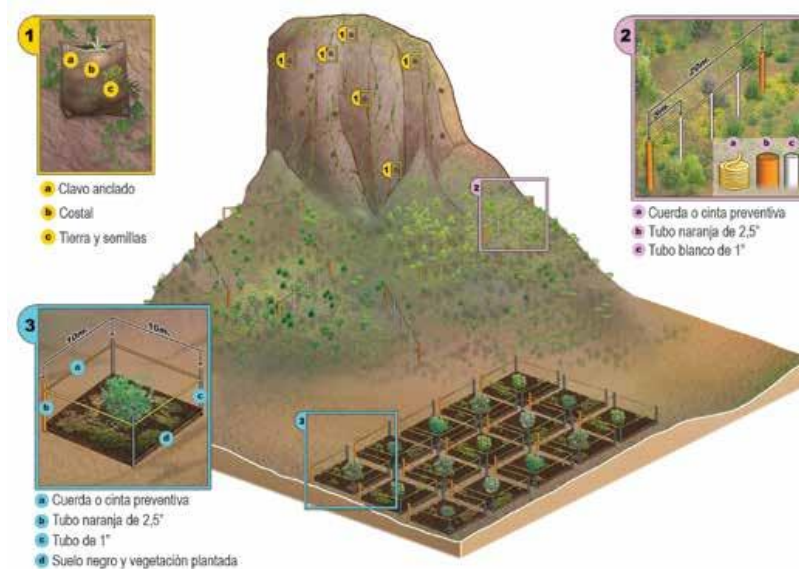
Respecto al muestreo propiamente dicho, se puede usar los siguientes tipos:

- **Muestreo aleatorio simple:** En el plano cartesiano X, Y. Para un terreno homogéneo y en plantas herbáceas.
- **Muestreo estratificado:** La población en estudio se subdivide en estratos con cierta homogeneidad y en cada estrato se realiza un muestreo aleatorio simple. Terrenos heterogéneos.
- **Muestreo en cuadrícula o sistemático:** Ubicar las muestras en un patrón regular en toda la zona de estudio a partir de un punto determinado al azar, y a distancias uniformes entre sí.



*Tipo de muestreo: (a) aleatorio simple; (b) aleatorio estratificado; (c) sistemático, rejilla rectangular; (d) sistemático rejilla polar. Tomado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/459/cap3.html>*

De esta manera, esto también se puede observar en el siguiente esquema propuesto:



**Ejemplos de los métodos de muestreo estadístico convencionales. 1) muestreo aleatorio, 2) muestreo estratificado y 3) muestreo sistemático. Tomado de González et al., (2015).**

En el caso de métodos aleatorios estratificados se usan cuando hay heterogeneidad marcada de las condiciones ambientales, edáficas, hídricas, y debido a la no factibilidad de control de estas condiciones. Definida la forma de muestreo es importante seleccionar el número de muestras y repeticiones. La mayoría de las pruebas estadísticas consideran para esta estimación se usan tres parámetros fundamentales con el fin determinar el número adecuado de muestras: normalidad, independencia y homogeneidad de la varianza (Schmidt 2005, Clifford y Taylor 2008). Las tablas estadísticas sobre las cuales se contrastan estas pruebas asumen un mínimo de 30 observaciones. Teniendo en cuenta que las unidades muestrales son parcelas permanentes de monitoreo, en ausencia de otra información el número de parcelas recomendadas por tipo de ensayo sería 30 (Goldsmith et al. 1986). Sin embargo, Mendiburu (2005) menciona que una regla útil para definir el número de réplicas (parcelas) necesarias es considerar como mínimo 10 grados de libertad (11 parcelas). No obstante, para establecer el número

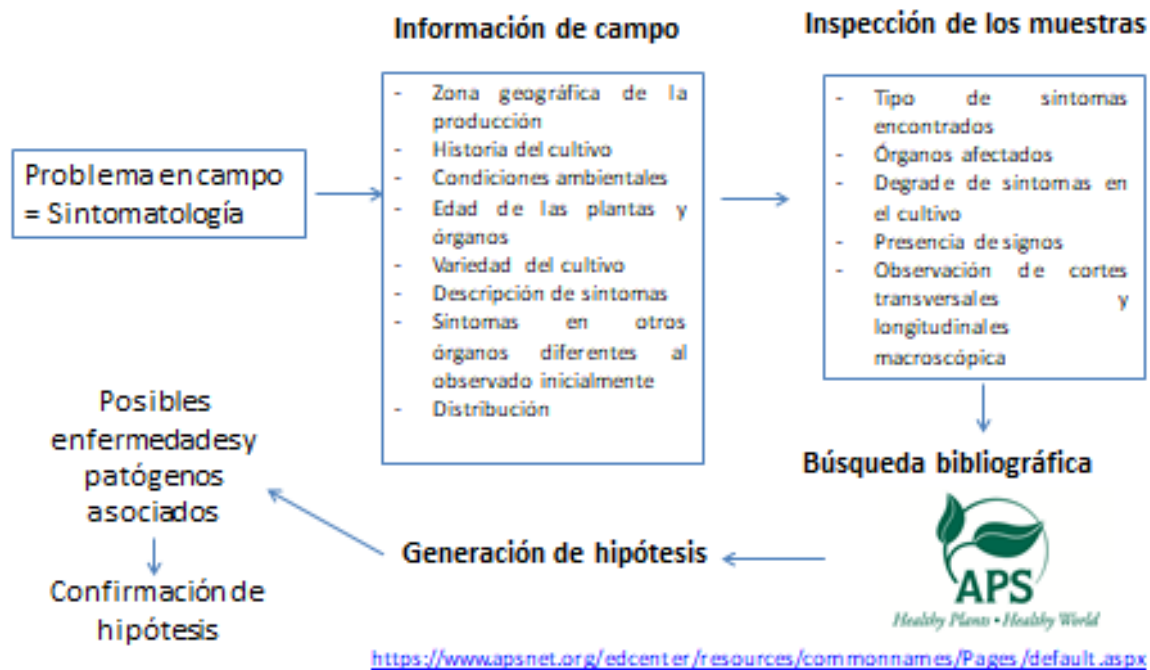


de parcelas requeridas en cada diseño a partir de métodos estadísticos, con mayor exactitud y que no implique costos elevados, se sugiere implementar la técnica de premuestreo y cálculo de una muestra, a través del error muestral, el nivel de confianza y la varianza (Mostacedo y Fredericksen 2000). Párrafo tomado de González et al., (2015).

Las muestras deben ser tomadas con cuidado, evitando tomar muestras con síntomas muy avanzados, se deben incluir plantas en diferentes estados de la sintomatología e incluir plantas sanas. Cada muestra debe ser empacada (en lo posible) en bolsa plástica de cierre hermético, marcada y rotulada incluyendo fecha, nombre del terreno, localización geográfica, ubicación dentro del terreno, entre otras. Incluso se pueden colocar características que describan adecuadamente la sintomatología en la muestra. Se deben almacenar todas las muestras en un lugar fresco y seco y llevar lo más pronto al laboratorio para el análisis correspondiente.

En el laboratorio, se deben realizar observaciones más detalladas de la sintomatología y órganos afectados, mediante el uso del estereoscopio o de lupas. En este mismo sentido, respecto a los signos se pueden realizar micropreparados y/o improntas para la observación en microscopio, se sugiere inicialmente no realizar ningún tipo de tinciones tratando de rescatar la coloración natural del patógeno. Si se tienen exudados bacterianos en las muestras, se pueden hacer observaciones microscópicas mediante la técnica de tinción de Gram, sin embargo, se sugiere el aislamiento de las bacterias para su posterior identificación. Cuando no exista signos claros se puede recurrir al montaje de cámaras húmedas si la hipótesis apunta a enfermedades causadas por hongos u oomycetos.

El tema del aislamiento e identificación será explicado posteriormente. De esta forma, se espera que una ruta de diagnostica general este dada por los elementos en el esquema



En la confirmación de la hipótesis se pueden incluir los postulados de Koch siempre, si estos son necesarios. Por ejemplo, en el caso de un primer reporte de una enfermedad en un hospedero, en una localización geográfica, etc o cuando se tengan varios organismos aislados de la muestra. Estos son:

- El agente debe estar presente en cada caso de la enfermedad y ausente en los sanos
- El agente debe ser aislado en un cultivo puro a partir de plantas enfermas
- El agente debe provocar enfermedad en una planta sana después de ser inoculado, ocasionando los mismos síntomas que presentaban las plantas de las que fue aislado inicialmente
- El agente debe ser aislado nuevamente a partir de los tejidos enfermos de las plantas inoculadas

Debe ser mencionado, que los postulados de Koch presentan ciertas limitaciones, como lo es para parásitos obligados o no cultivables en laboratorio.

Este es el caso de los virus vegetales, donde se han adoptado otros criterios incluyendo la asociación del virus específico con la enfermedad con determinada regularidad y su presencia no accidental en un individuo enfermo (Rivers, 1937). De manera más reciente se han adoptado cuatro postulados alrededor del diagnóstico de virus vegetales (Bos, 1981):

- a) la asociación o concomitancia del virus con la enfermedad
- b) su aislamiento de la planta enferma para separarlo de los contaminantes, multiplicarlo sobre una planta indicadora y conocer sus características fisicoquímicas
- c) su inoculación en plantas sanas para reproducir la enfermedad
- d) su reisolamiento de las plantas experimentales inoculadas

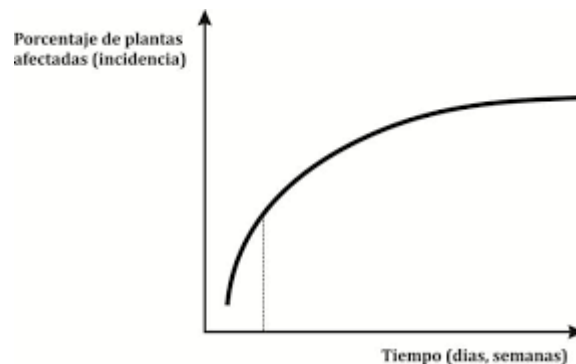
Este mismo tipo de escenarios ha propiciado cambios en los postulados, en el caso de nematodos se sigue este proceso: a) observación clínica del problema, b) identificación y multiplicación de fitonematodos sobre plantas indicadoras sembradas en suelo esterilizado, c) pruebas de bioensayo, evaluación de daños y reisolamiento del nematodo (Inglis, 2007). En el caso de otros patógenos se recurre a la infestación de suelo o de vectores para reproducir la enfermedad.

### 3. Cuantificación De La Enfermedad En Plantas

Es posible cuantificar la enfermedad a partir de las observaciones en campo, para esto se puede establecer diferentes parámetros. En este caso, se puede determinar:

- **Prevalencia:** Numero de muestras geográficas (lotes, regiones, países) con una característica particular (con plantas enfermas o presencia del patógeno) /total de unidades geográficas evaluadas x 100%
- **Severidad:** Proporción del área o cantidad de tejido afectado por la enfermedad. Por ejemplo: área afectada/área totalx100; área no verde del tejido; Número de lesiones por hoja; Numero de lesiones por cm<sup>2</sup>
- **Incidencia:** Numero de plantas enfermas/No total de plantas evaluadas; Número de hojas u órganos afectados/Total de hojas u órganos evaluados

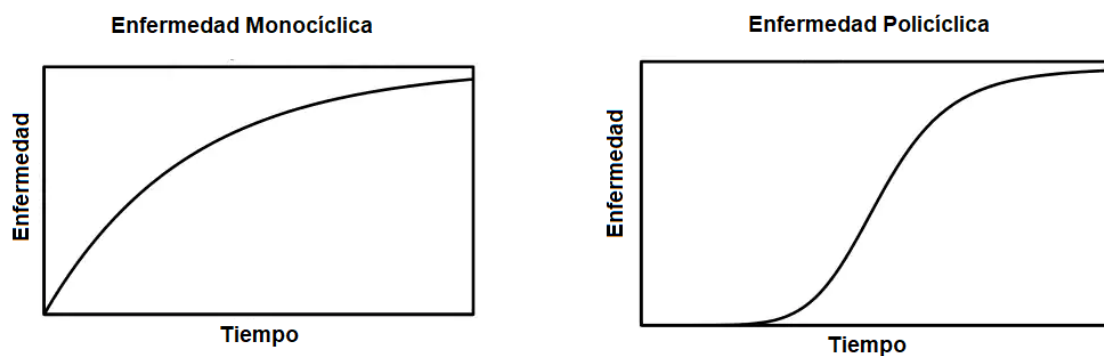
Los parámetros severidad e incidencia pueden ser usados para la construcción de curvas de progreso de la enfermedad en la cual se evalúa el porcentaje de enfermedad (severidad o incidencia) vs tiempo de evaluación.



El punto de origen y la forma de la curva proporciona información sobre el momento en que inicia la enfermedad, la tasa o velocidad de progreso, los cambios de susceptibilidad del hospedero durante el periodo de crecimiento, los eventos

climatológicos recurrentes y la efectividad de los métodos de manejo de la enfermedad.

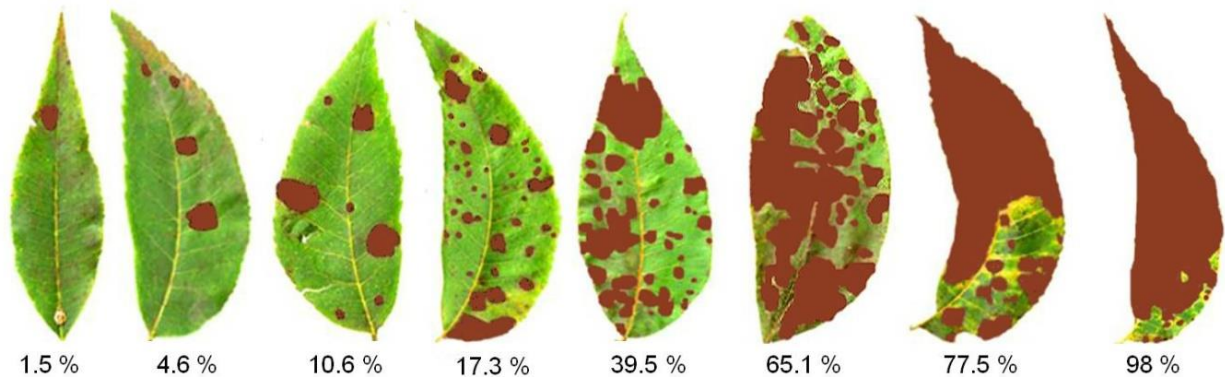
En esta situación, las enfermedades ocasionadas por patógenos monocíclicos, siguen una curva de progreso de saturación, donde la velocidad de desarrollo de la enfermedad disminuye con el número de plantas enfermas. En contraste, las enfermedades ocasionadas por patógenos policíclicos muestran una curva de progreso de la enfermedad donde el incremento de la enfermedad es directamente proporcional al número de plantas sanas (debido a la existencia de una mayor probabilidad de que el inóculo alcance un tejido al cual infectar) y el número de plantas enfermas, dado que produce mayor inóculo que participa en la continuidad de la pandemia, esto genera una curva sigmoideal como se muestra en la figura:



Para la determinación de la severidad de la enfermedad se usan escalas las cuales pueden ser:

- **Diagramáticas:** la representación ilustrada de una serie de plantas o partes de plantas mostrando los síntomas de una enfermedad en diferentes grados de severidad (Nascimento et al., 2005) y están basadas en el principio de Weber-Fechner que establece que la agudeza visual del daño es proporcional al logaritmo del estímulo hasta en un 50% de severidad y a partir de este

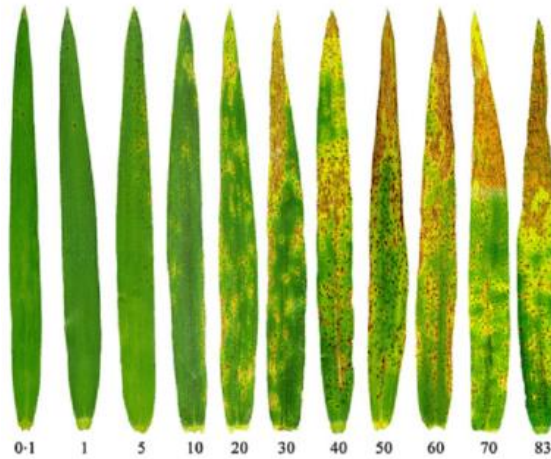
valor, la relación es inversamente proporcional al logaritmo del estímulo ocasionado por la cantidad de tejido sano restante (Mora et al., 2000).



***Escala diagramática para evaluar la severidad de la mancha foliar marrón en folíolos de Carya illinoensis. Valores porcentuales del área foliar sintomática. Poletto et al., (2020)***

- **De área estándar:** Los Diagramas de Área Estándar (DAE) son los métodos visuales más utilizados, se basan en ilustraciones de partes de plantas enfermas dentro de un rango de valores medido en proporción o porcentaje de tejido afectado, como referencia comparativa y de interpolación durante la estimación (Bock et al., 2016; Del Ponte et al., 2017).










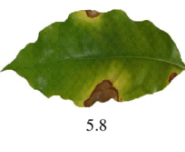
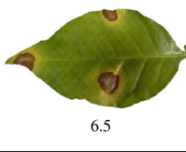
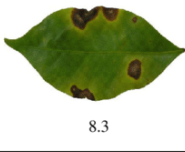




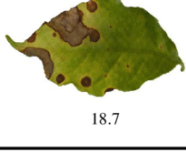


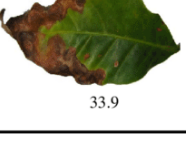
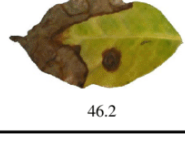
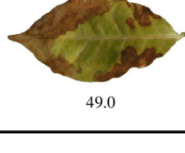
*Escala de área estándar para la estimación de la severidad de la mancha en las hojas de trigo (Domiciano et al. 2014)*

- **Descriptivas:** Se han estandarizado claves descriptivas para varias enfermedades, donde se presentan fotos o esquemas pictóricos de las plantas con diferentes cantidades de tipos de síntomas de enfermedades que están categorizados con descripciones.

	<b>Estado 0</b> Hoja sin síntoma
	<b>Estado 1</b> Hoja con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz.
	<b>Estado 2</b> Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz.
	<b>Estado 3</b> Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz.
	<b>Estado 4</b> Hoja con manchas negras (elípticas o circulares) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene áreas de tejido verde.
	<b>Estado 5</b> Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo.

**Escala descriptiva para la evaluación del desarrollo de los síntomas en hojas de *Musa spp.* inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Alvarado-Capó et al., 2003).**

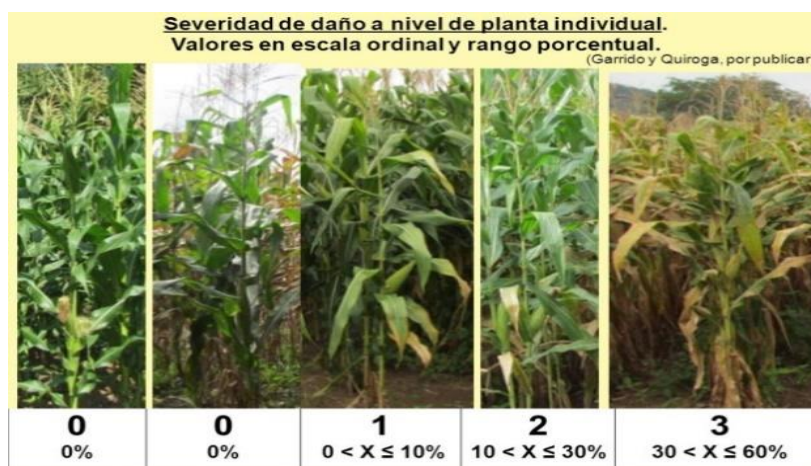
- **De intervalo:** Comprende una serie de categorías, donde se utiliza intervalos de los porcentajes de la enfermedad para establecer niveles de severidad de las plantas observadas, permitiendo de esta manera categorizar de acuerdo a dichos intervalos

Level 1 (0.1 – 3.0%)	 0.7	 2.2	 3.0
Level 2 (3.1 – 6.0%)	 3.4	 4.7	 5.8
Level 3 (6.1 – 12.0%)	 6.5	 8.3	 11.8
Level 4 (12.1 – 18.0%)	 12.1	 15.1	 17.4
Level 5 (18.1 – 30.0%)	 18.7	 20.1	 27.7
Level 6 (30.1 – 50.0%)	 33.9	 46.2	 49.0

**Escala de intervalo de la severidad de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) en hojas de cafeto (*Coffea arabica* L.). De Paiva et al., (2011)**

- **Ordinales:** Estas son escalas de enfermedad descriptivas, pero clasifican la severidad de la enfermedad en clases arbitrarias que representan una severidad creciente de los síntomas. Las escalas ordinales muy simples de este tipo son subjetivas y no es particularmente transferible entre evaluadores, ubicaciones o temporadas. Las escalas ordinales pueden basarse en, o estar acompañadas de diagramas o descripciones que indiquen la intensidad de los síntomas.

<b>Escala de severidad de daño de la mancha de asfalto del maíz a nivel de planta individual</b> (Garrido y Quiroga, por publicar)			
Valores en escala ordinal y rango porcentual.			
Valor	Índice de severidad	Rango (%)	Observaciones
0	Sin daño	0	Sin mancha alguna. Posibles pecas iniciales en hojas inferiores, menores a 0.1 mm sin confirmar presencia de hongos.
1	Daño ligero	$0 < X \leq 10$	Manchas con puntos negros brillantes y comienzo del halo necrótico alrededor del punto negro. Hasta un 10% del tejido está dañado. En hojas inferiores solamente.
2	Daño moderado	$10 < X \leq 30$	Las manchas no alcanzan la hoja del punto de inserción de la mazorca. De 10 a 30% de severidad de tejido foliar dañado.
3	Moderadamente severo	$30 < X \leq 60$	Las manchas necróticas alcanzan y superan la hoja del punto de inserción de la mazorca, pero no alcanzan las hojas superiores. De 30 a 60% de severidad de daño del tejido foliar.
4	Severo	$60 < X \leq 85$	Las manchas necróticas se generalizan en la planta, excepto en dos a cuatro hojas superiores. De 60 a 85% de severidad de daño del tejido foliar.
5	Muy severo	$85 < X \leq 100$	Necrosis generalizada de la planta. Hasta una o dos hojas superiores sin manchas o ninguna hoja (100% de daño). Dependiendo de la fenología de la planta, se observan mazorcas sin grano o muy poco grano.



*Escala ordinal y de rango porcentual de la severidad de mancha de asfalto de maíz. Tomado de <https://slideplayer.es/slide/3342466/>*

Una vez determinada el nivel de severidad de cada planta u órgano (hoja, tallo, fruto, inflorescencia etc), se determina la incidencia y el índice de severidad. Este último está determinado por la siguiente ecuación:

$$ISE = \frac{\sum(Categoría * Número de plantas en cada categoría) * 100}{Número total de plantas \times No de clases}$$

Así mismo, se podrá determinar el parámetro AREA BAJO LA CURVA DE PROGRESO DE LA ENFERMEDAD desde los datos de incidencia o índice de severidad vs tiempo de evaluación. Es un resumen cuantitativo útil de la intensidad de la enfermedad a lo largo del tiempo, para comparar años, ubicaciones o tácticas de manejo.

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Definimos  $y(0) = y_0$  como la infección inicial o el nivel de enfermedad en  $t = 0$  (es decir, la primera observación de gravedad de la enfermedad en nuestro estudio). Tomado de Simko y Piepho, (2012).

La enfermedad también puede ser cuantificada desde la observación del patógeno. En este caso, lo que se cuantifica es el patógeno. Las formas de cuantificar se sobrelapan con las maneras de detectar los patógenos, incluyendo el aislamiento, conteo de unidades formadoras de colonia, esporas, o mediante técnicas cuantitativas en biología molecular, como es el caso de PCR en tiempo real usando primers específicos. Este tema será ampliado más adelante.

## 4. Aislamiento De Patógenos De Plantas Desde El Tejido Vegetal

El aislamiento es un elemento fundamental para el diagnóstico de enfermedades en plantas, destacando que no todos los organismos son cultivables y esto impide su aislamiento, por lo cual posteriormente se ampliara el tema de detección molecular en casos particulares o el uso de otros elementos del diagnóstico como es el caso de técnicas histoquímicas en inmunológicas. En tanto, para el caso de que es posible aislar el agente causal e identificarlo posteriormente, las herramientas presentadas en este capítulo se convierten en elementos del diagnóstico.

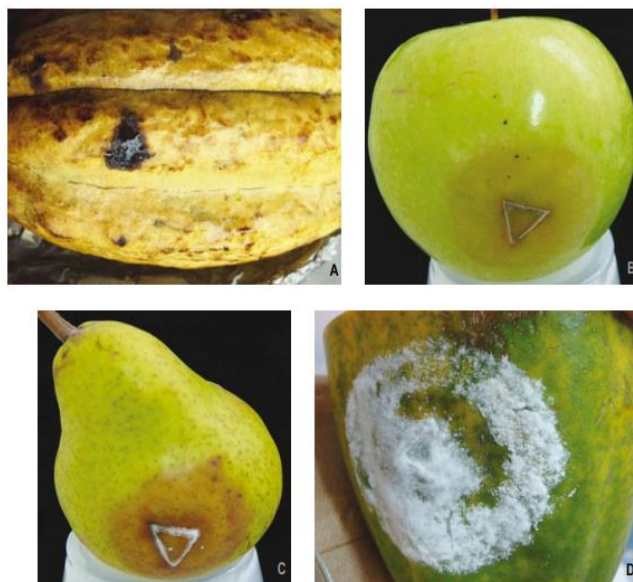
Un primer paso en el aislamiento de los patógenos de plantas está dado por la identificación de signos sobre las muestras o plantas sintomáticas. Esto, porque la presencia de micelio, esporulación, cuerpos fructíferos, estructuras de resistencia, entre otros, constituye una gran oportunidad para la observación directa o sirve como material para generar un cultivo en un medio de cultivo. No obstante, cuando no se observan signos del patógeno, pero la hipótesis apunta hacia un hongo u oomyceto se puede optar por el uso de cámaras húmedas.

Las **cámaras húmedas** son una forma rápida y directa de estimular la esporulación y ayudar a identificar las agentes causales de algunas enfermedades. Son especialmente útiles para identificar microorganismos que muestran un crecimiento rápido en el hospedador y compiten bien con los saprófitos. La mayoría de los hongos y oomycetos requieren alta humedad para esporular. Estas condiciones se pueden lograr colocando la muestra en una cámara húmeda, la cual puede ser simple, como una bolsa de plástico o un recipiente tipo tupperware. Se coloca la muestra en la bolsa o recipiente con una toalla de papel húmeda y se rocía al interior con un atomizador y se sella el recipiente. Si se usa una bolsa de plástico, es posible que desee soplar aire en ella para crear una "burbuja." La humedad dentro

de una cámara húmeda puede alcanzar el 80-100%, sin embargo, no se debe mojar demasiado porque el exceso de agua a menudo puede reducir la esporulación de algunos organismos. En condiciones ideales de cámara húmeda, algunos hongos esporularán en 24 horas, como es el caso de *Botrytis* (moho gris), *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria* y *Colletotrichum*. Pero también lo harán la mayoría de saprofitos *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* lo cual menudo puede interferir con la identificación del patógeno o agente causal, por esta razón muchas veces se sugiere hacer una desinfección superficial del material a colocar en la cámara húmeda, teniendo en cuenta que a veces se requiere dejarla incubando incluso durante varias semanas para inducir la esporulación de patógenos que esporulan lentamente como *Phomopsis*, *Mycosphaerella* y *Cercospora* (Universidad de Georgia, Krug., *et al.* 2004)..

Los oomycetos también pueden ser aislados mediante el uso con cámara húmedas o con **cultivos trampa**, donde se pretende estimular la esporulación. En este caso, se abren apertura de perforaciones en frutos manzana (también se puede usar pera, papaya, pimentón, cacao, entre otros) para inocular suelo posiblemente infectado con *Phytophthora* y/o *Pythium* o incluso pedazos de tejido vegetal afectado siempre y cuando la hipótesis apunte a un oomyceto. Se inocula el suelo y/o tejido infectado en la herida o apertura en manzana y se cierran las perforaciones con el mismo trozo de fruta que se retiró. Posteriormente, se sellan los orificios de la manzana inoculada con cinta adhesiva y se incuba a temperatura ambiente. Se espera que las manzanas inoculadas presenten síntomas de pudrición característica a la infección ocasionada por *Phytophthora* y *Pythium*. Finalmente, zonas que presente avance de enfermedad en el fruto, son partidas en piezas pequeñas y desinfectadas superficialmente, sembradas a manera de explantes en medios semiselectivos (Martínez et al., 2008).





*Frutos usados como trampa para el aislamiento de los oomycetos. A. Cacao; B. Manzana; C. Pera; D. Papaya. Martínez et al., (2008).*

Para el aislamiento de los agentes causales se pueden usar **medios de cultivo**. Exceptuando el caso de microorganismos fastidiosos y parásitos obligados. Los medios de cultivos usados para diagnóstico de enfermedades de plantas pueden clasificarse en (Kini et al., 2019):

- **Medios generales**, que tienen como propósito el aislamiento de un amplio rango de organismos
- **Medios semiselectivos**, que permiten aislar cierto grupo de organismos
- **Medios selectivos**, que se usan para aislar organismos específicos

En la siguiente tabla, se muestra algunos tipos de medios para el aislamiento de microorganismos fitopatógenos y usados de manera frecuente en diagnóstico de enfermedades de plantas. De acuerdo con la revisión realizada por Curvelo y Rojas et al., (2010), hay una gran variedad de medios selectivos y específicos incluso para géneros y especies de hongos y oomycetes fitopatógenos. Por esta razón, es bueno realizar una excelente inspección de los síntomas y cada uno de los criterios

presentados en esta guía para tener hipótesis que sean acertadas, de tal forma, que se puedan usar medios selectivos que conduzcan a un aislamiento del agente causal.

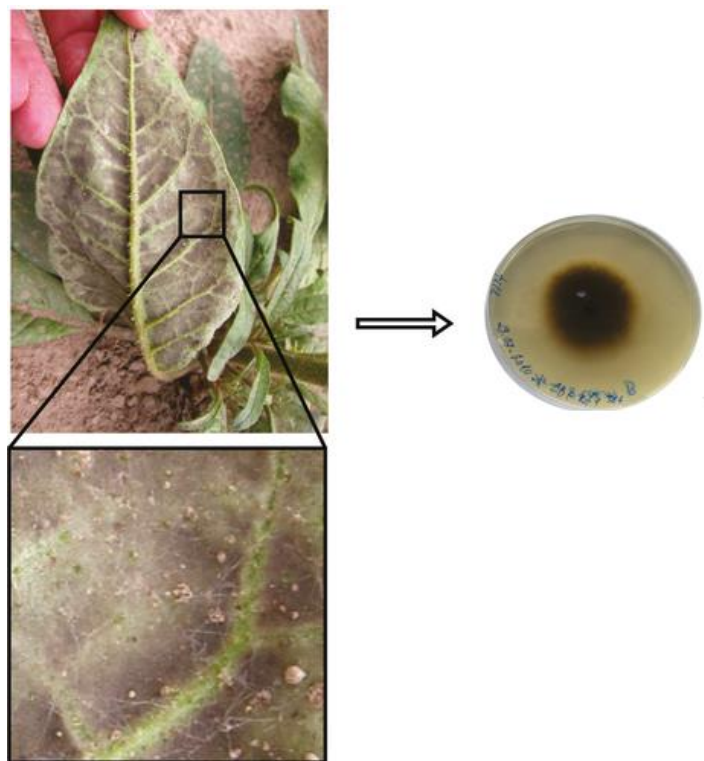
**Algunos medios de cultivo usados para el aislamiento de  
microorganismos patógenos de plantas en procesos de diagnóstico de  
enfermedades. *Modificado desde Wang, (2021)***

Nombre del medio	Abreviatura	Propósito
Agar papa dextrosa	PDA	Medio de cultivo general para hongos, pero incluso pueden crecer bacterias
Agar papa dextrosa + estreptomycin (100ug/ml)	PDA+ strep	Medio general para el cultivo de hongos
Agar extracto de malta		Medio general para el cultivo de hongos. Puede suplementarse con antibiótico para evitar crecimiento de bacterias
Agar jugo de vegetales V8	V8	Crecimiento de oomycetes y esporulación de hongos
Agar harina de maíz	CMA	Medio para el mantenimiento de oomycetes
Agar agua	WA	Medio para promover la esporulación de hongos y oomycetes o para la obtención de cultivos monosporicos. Se puede suplementar con estreptomycin para evitar la contaminación con bacterias
Agar avena	Aav	Medio para promover la esporulación de hongos y oomycetes. Se puede

		suplementar con estreptomicina para evitar la contaminación con bacterias
Medio a base de piramicina PARP	PARP	Para el aislamiento selectivo de oomycetes
Agar peptona PCNB	PPA	Medio selectivo para el aislamiento de <i>Fusarium</i>
Agar rosa bengala		Medio selectivo para el aislamiento de <i>Phytium</i>
Agar nutritivo	AN	Medio general para aislamiento de bacterias no fastidiosas
Agar Luria Bertani	LB	Medio general para aislamiento y mantenimiento de bacterias no fastidiosas
Agar King B	KB	Medio semiselectivo para Pseudomonados
Agar cloruro trifenil tetrazolium	TCZA	Medio selectivo para el aislamiento y diagnóstico de <i>Ralstonia solanacearum</i>
Agar extracto de levadura – dextrosa – carbonato de calcio	YDC	Medio para diferenciar bacterias del género <i>Xanthomonas</i>

Una vez conocida la existencia y algunos de los medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos cultivables fitopatógenos, se debe mencionar que antes de llegar al medio de cultivo se deben conocer los tipos de aislamiento, los cuales pueden ser:

- **Aislamiento directo:** A partir de los signos del patógeno siempre y cuando se trate de un organismo cultivable, en tanto que se si es un parasito obligado únicamente se pueden hacer observaciones en microscopio de las estructuras presentes en el signo, o cortes del tejido afectado que permita evidenciar dichas estructuras (Cuervo et al.).



*Aislamiento directo de Alternaria spp en agar PDA desde signos sobre hojas de tabaco coyote (Nicotiana attenuata). Modificado desde Schuck et al., (2014).*



Después de tener aislado el microorganismo, se debe obtener un cultivo axénico para proceder a su identificación.

En el caso de los nematodos de acuerdo con Piedra, (2015), el aislamiento o extracción es diferente a los microorganismos. Con este fin, el primer paso es el muestreo, que en caso de ausencia se recomienda 40 muestras por hectárea para hacer una sola muestra compuesta y en un cultivo establecido se estipula de 50 a 80 muestras por hectárea. Las muestras se deben tomar según el tipo de análisis requerido: (a) nematodos activos del suelo y de las plantas, (b) nematodos quiste, (c) nematodos endoparásitos de partes vegetales (raíz, tallo, hojas, semillas)

Se puede seguir algunas de las siguientes recomendaciones de muestreo:

- En cultivos anuales mínimo de 10 plantas/ ha.
- En cultivo de cebolla 100 plantas/ha.
- En ajo 50 plantas/ha, en las zonas afectadas al azar
- En lotes con cultivo de papa mínimo 100 tubérculos/ha, descartándose las raíces, salvo que se observen agallas en las mismas.
- Para control sanitario de las semillas, plantines y bulbos sobre 50 a 500 g de semillas, 20 g de raíces, 50 a 200 g de tallos y hojas, y 50 a 200 g de bulbos, de acuerdo con el volumen de los lotes a analizar
- En viñedos las raíces muestras entre surcos
- En plantas con mucho follaje se puede descartar la parte aérea de las mismas
- En el caso de árboles, no existe un plan único de muestreo, por la variabilidad, pero se obtiene buen resultado seleccionando 20-35 árboles al azar en 0.4-2 Ha y tomando entre 2 y 4 puntos por árbol.
- Para los nematodos en el suelo en estado filiforme (juveniles de *Meloidogyne*, *Nacobbus*, *Globodera*, *Heterodera*; juveniles y adultos de *Pratylenchus*,

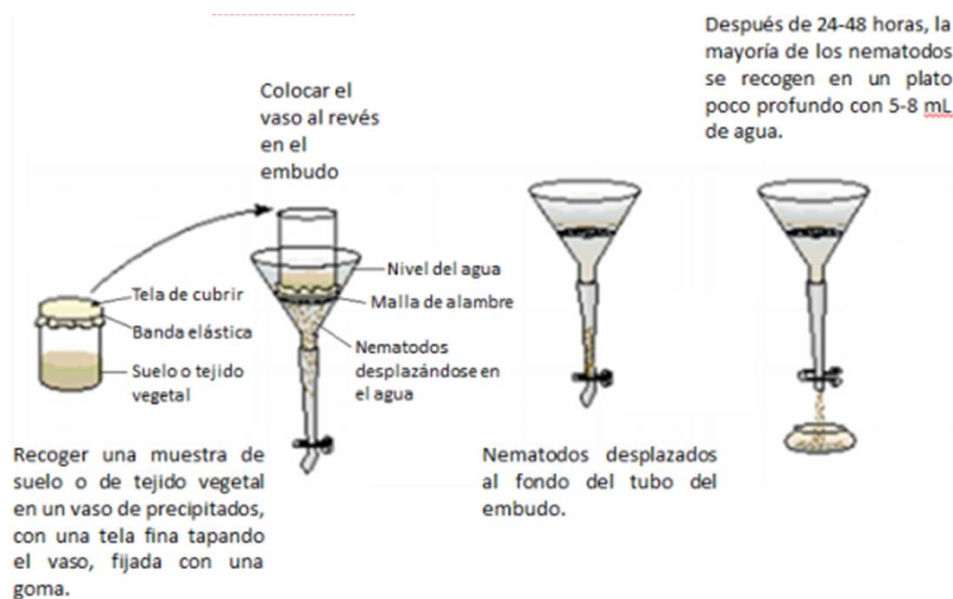


*Helicotylenchus* una muestra compuesta para análisis nematológico no debería ser mayor que 250 g (Lima-Medina et al., 2018)

- Para nematodos quiste (*Globodera*, *Heterodera*) y vectores de virus (*Xiphinema*, *Longidorus*) cada muestra compuesta debe ser de 500 g (Lima-Medina et al., 2018)
- Para nematodos de la Clase Enoplea (*Xiphinema*, *Longidorus*, *Trichodorus*), deben tomarse a una profundidad entre 40-50 cm

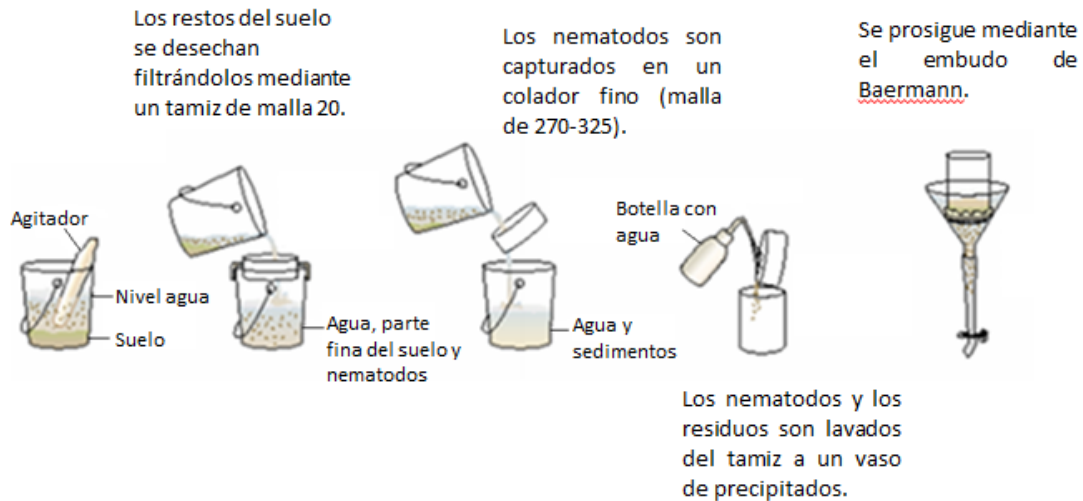
Una vez obtenida la muestra, se debe realizar la extracción de los nematodos, esta se puede realizar a través de algunas de las siguientes técnicas:

- a) **Embudo de Baermann:** La cual requiere que los nematodos se muevan a través de la muestra para su extracción. esta técnica consiste en un embudo de vidrio o de plástico de tamaño mediano. En su parte inferior se le ajusta una manguera de hule suave, que se cierra mediante una pinza de presión tipo mohr como se indica en la siguiente figura



Embudo de Baermann.  
Fuente: Agrios (2005).

b) **Método del tamizado o cribado:** Consiste en hacer pasar la muestra de suelo mezclada con agua a través de una serie de tamices como se indica en la figura (Tomado de Agrios, 2005).



Los tamices tienen determinado tamaño y para su conversión se usa la siguiente tabla:



**Tamices**

US MALLA	PULGADAS	MICRONES	MILÍMETROS
3	0.2650	6730	6.730
4	0.1870	4760	4.760
5	0.1570	4000	4.000
6	0.1320	3360	3.360
7	0.1110	2830	2.830
8	0.0937	2380	2.380
10	0.0787	2000	2.000
12	0.0661	1680	1.680
14	0.0555	1410	1.410
16	0.0469	1190	1.190
18	0.0394	1000	1.000
20	0.0331	841	0.841
25	0.0280	707	0.707
30	0.0232	595	0.595
35	0.0197	500	0.500
40	0.0165	400	0.400
45	0.0138	354	0.354
50	0.0117	297	0.297
60	0.0098	250	0.250
70	0.0083	210	0.210
80	0.0070	177	0.177
100	0.0059	149	0.149
120	0.0049	125	0.125
140	0.0041	105	0.105
170	0.0035	88	0.088
200	0.0029	74	0.074
230	0.0024	63	0.063
270	0.0021	53	0.053
325	0.0017	44	0.044
400	0.0015	37	0.037

45 Mesh = 354 µm

140 Mesh = 105 µm

400 Mesh = 37 µm

500 Mesh = 26 µm  
(para extracción huevos)

**Tabla de conversión de malla a micras**

*Tamices y tabla de conversión de medidas de malla a micras (Tomado de [https://www.academia.edu/33122547/TABLA\\_DE\\_CONVERSI%C3%93N\\_DE\\_MALLA\\_HASTA\\_MICRONES\\_Mesh\\_to\\_Micron\\_Conversion\\_Chart](https://www.academia.edu/33122547/TABLA_DE_CONVERSI%C3%93N_DE_MALLA_HASTA_MICRONES_Mesh_to_Micron_Conversion_Chart))*

- c) **Método de centrifugación-flotación:** La cual aprovecha las diferencias de gravedad específica entre nematodos y fracciones de suelo; es una técnica muy rápida y el recobrado es limpio, por lo que resulta fácil su observación al microscopio; no obstante, se debe trabajar con rapidez y cuidado, pues los nematodos se pueden deformar y hacer muy difícil la identificación. Este método permite extraer formas inactivas y nematodos lentos, además de posibilitar la observación y la selección directas bajo el microscopio (Hernández-Ochandia, 2016). El procedimiento completo se puede revisar en el siguiente enlace <https://docplayer.es/6454290-Practica-numero-1-metodos-de-extraccion-de-nematodos.html>

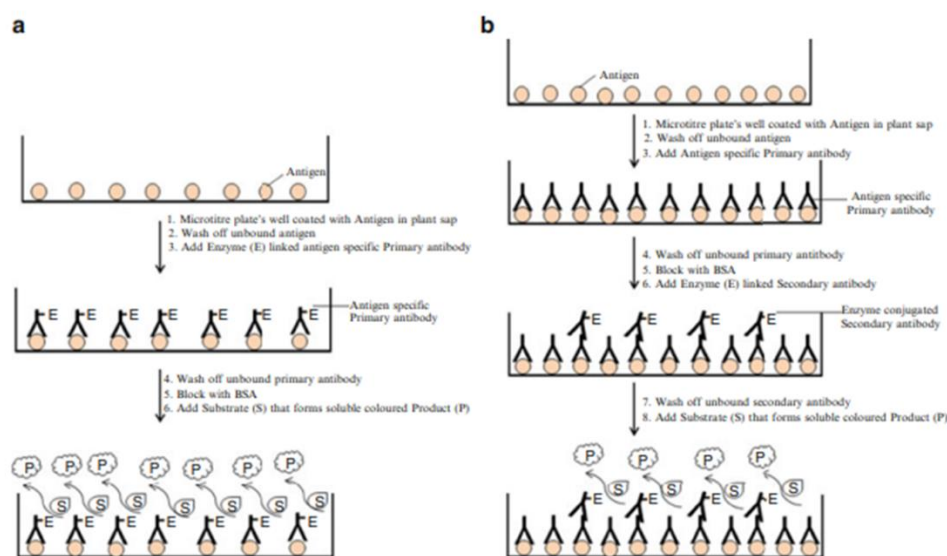
Una vez es extraído el nematodo, se usan diferentes métodos para la identificación.

## 5. Identificación De Patógenos De Plantas

La identificación del agente causal es clave en el diagnóstico de enfermedades en plantas y permite tener acertadas estrategias del manejo. La identificación puede hacerse de diferentes formas, las cuales dependerán del tipo de fitopatógeno, estas son:

- a) **Identificación morfológica:** A través de las características morfológicas del agente causal y dependerá del tipo de agente causal. Para esta identificación resulta importante las estructuras reproductivas de hongos y oomycetes, el tipo y características del micelio y cuerpos fructíferos, la forma de las células bacterianas acompañadas de tinción de Gram, las características y morfometría de los nematodos, entre otros (Jayawardena et al., 2021). Esto se explicará más adelante para cada uno de los tipos de patógenos. Cabe destacar el uso de microscopia, los cortes de tejidos vegetales y las tinciones
  
- b) **Identificación serológica:** Se realiza a través del uso de pruebas serológicas como ELISA, y demás basada en el uso de anticuerpos con especificidad hacia una agente causal que hace parte de la hipótesis del caso en campo, por tanto, están dirigidos hacia epitopes (parte reconocida) del antígeno que en este caso sería el agente causal (Patel et al., 2022). Por tanto, estas técnicas se basan en la reacción antígeno-anticuerpo. De esta forma, se han desarrollado diferentes técnicas que más que estar destinadas a la identificación se han definido para la detección, cabe mencionar dentro de estas técnicas:
  - **Técnica inmunoenzimática ELISA:** Los métodos serológicos que emplean enzimas como marcadores se conocen como ensayos inmunoenzimáticos, como el ELISA (Enzyme-linked immunosorbent

assay) que consiste en la inmovilización en una fase sólida, del antígeno o el anticuerpo, sobre el cual se adicionan, de forma secuencial y previo lavado para eliminar los elementos deficientemente fijados o no fijados, los demás componentes de la reacción (Yadav et al., 2016). La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo se revela mediante la adición del sustrato específico de la enzima y la consiguiente formación de productos coloreados, que permiten la evaluación de los resultados de forma visual, cualitativamente, o mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro denominado lector de placas ELISA. Hay varios tipos de ELISA, que pueden agruparse en dos categorías: (i) ensayos directos que utilizan como conjugados los anticuerpos específicos, que reconocen al patógeno, marcados con la enzima, (ii) los indirectos que emplean anticuerpos secundarios que reaccionan con los anticuerpos que reconocen de manera específica del patógeno (Hayrapetyan et al., 2023). Por ejemplo, se encuentran, los sandwich de doble anticuerpo (ELISA-DAS) y de doble anticuerpo indirecto (ELISA-DASI).



**Ensayo de ELISA: (a) Directo y (b) indirecto. Tomado de Yadav et al., (2016)**

- **Inmunoimpresión-ELISA:** Se realiza sobre soportes sólidos con los mismos principios que el ELISA, donde el antígeno se une a una membrana de nitrocelulosa o nylon, con afinidad por las proteínas, al presionar un corte de material vegetal sobre ésta y la detección se realiza directa o indirectamente utilizando anticuerpos.
  
- a) **Identificación mediante pruebas bioquímicas:** Son pruebas que se usan de manera convencional para la identificación de bacterias, de las cuales se hablan en el caso de identificación bacteriana
- b) **Identificación molecular:** Corresponde al uso de técnicas basadas en detección de ácidos nucleicos de los agentes causales, dentro de estas se incluyen:
  - **Técnicas basadas en PCR:** La PCR se refiere a reacción en cadena de la polimerasa, donde se replica de manera sintética el ADN mediante el uso de primers o cebadores (secuencias cortas de nucleótidos) que se unen a cada uno de los extremos de la cadena de nucleótidos del ADN blanco. De esta forma, la enzima ADN polimerasa se une a partir de los primers sintetiza la hebra complementaria. Dado que los primers son específicamente dirigidos a una región target dentro del genoma del organismo, la amplificación tendrá un tamaño de fragmento en pares de bases (pb) esperado y por tanto, cuando se produce amplificación es porque el organismo patógeno de la hipótesis es detectado y/o identificado como tal (Mirmajlessi, et al., 2015).

Estas técnicas involucran la extracción del ácido nucleico, ya sea ADN o ARN (este es convertido a cDNA) y por esta razón, es clave las técnicas de extracción que involucren un ADN de alta calidad en términos de pureza, integridad y concentración. Estos parámetros son determinados a través de la



cuantificación ya sea mediante QUBIT (concentración) o nanodrop (concentración y pureza) y la observación en gel de agarosa al 0,8% (integridad y pureza). El ADN debe tener buena pureza e integridad para evitar inhibición de la PCR, además que la concentración debe ser normalizada para todas las muestras, especialmente cuando se va realizar PCR en tiempo real. Se considera una concentración de máximo 20 ng/uL para evitar inhibición (Fleige & Pfaffl, 2006).

Respecto a la extracción de ADN, va depender de la naturaleza del organismo, si proviene de un cultivo puro o si va realizar la detección en tejido vegetal o en suelo. Por esta razón, se debe tener certeza del objetivo que se quiere alcanzar al usar este tipo de técnicas y no se debe considerar la primera herramienta de diagnóstico, pues esta es confirmativa después de realizar cada paso presente en la tuta de diagnóstico. Dentro de las técnicas basadas en PCR tenemos (Khera et al., 2023):

- I. **PCR convencional o de punto final:** un fragmento de ADN conocido es copiado y amplificado billones de veces usando primers específicos. El producto del PCR es posteriormente visualizado en un gel de agarosa y proporciona evidencia cualitativa de la presencia de ese fragmento de ADN en la muestra.
- II. **PCR anidada o nested:** Consiste en someter la misma muestra de ADN a dos reacciones consecutivas de PCR, la primera con primers que amplifican una región más amplia, y la segunda con primers específicos internos de la región primeramente amplificada. La PCR anidada resulta mucho más sensible que una reacción simple de PCR y su empleo se extiende a diferentes tipos de patógenos. Es posible realizar la llamada heminested-PCR que se basa en el mismo principio de la anidada, sólo que en la segunda amplificación se emplea un primers interno y uno de los primers externos empleados en la primera amplificación. Estas

variantes resultan altamente sensibles en el diagnóstico de virus, viroides, fitoplasmas y bacterias fitopatógenas, que generalmente se encuentran en baja concentración en las plantas hospederas (Rihne et al., 2021).

III. **PCR tiempo real:** Permite de manera automatizada no solo la detección sino la cuantificación exitosa de los fitopatógenos. De esta forma, la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir: “En tiempo real” esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es la proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción. Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: fluoróforos con afinidad por el ADN (Syber Green, BEBO, YOYO-1 y TOTO-1) y sondas específicas para fragmentos del ADN (sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla) es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco) (Bengtsson et al., 2003; Peters et al., 2004; Aguilera et al., 2014; Chauhan et al., 2023).

La cinética de amplificación por la PCR se puede dividir en cuatro fases: 1) inicial o basal, 2) geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), 3) lineal y 4) plateau o estacionaria (Life Technologies, 2012; Aguilera et al., 2014). Durante la fase inicial, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal, pero sirve para delimitar la línea base. En la fase geométrica, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la cinética de amplificación, el comportamiento del ADN es  $2^n$ , es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan dos, por lo que el producto de la PCR se duplica después de cada uno de los ciclos. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser

limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. Por último, la fase estacionaria muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes.

***Curva amplificación PCR tiempo real. Tomada de Aguilera et al., 2014.***

El Ct, del inglés cycle threshold, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La comparación de

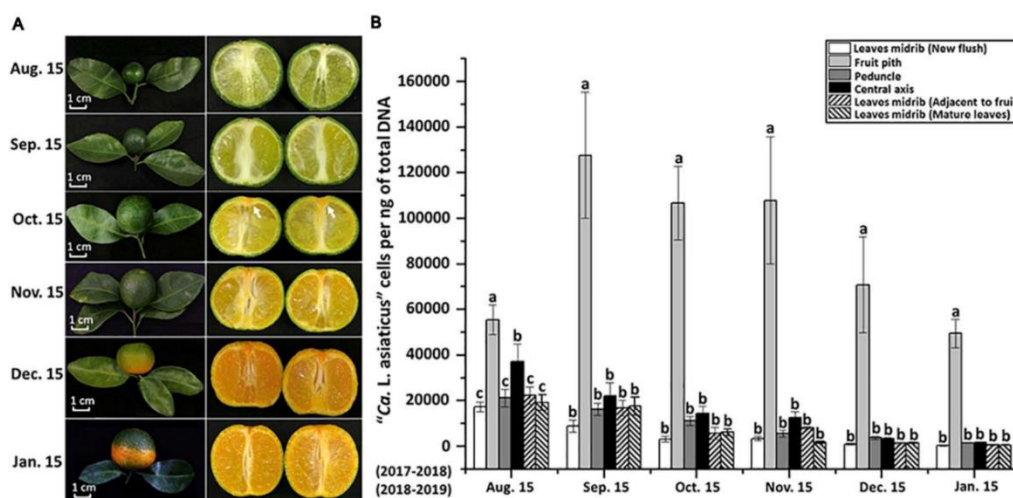


los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del ADN o ADNc específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del ARNm o del ADN (Serrano-Cumplido et al., 2021).

En la PCR en tiempo real existen dos tipos de cuantificación, la absoluta y la relativa. En ambos tipos se utiliza el valor de Ct para determinar la cantidad del ADN o ARN. La cuantificación absoluta, la cual requiere de la elaboración de una curva de calibración de diferentes diluciones de una muestra estándar (conocida) del organismo de interés vs los valores de Ct obtenidos para cada concentración y

el logaritmo de la concentración correspondiente. Esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración.

Por su parte la cuantificación relativa mide los cambios en el estado basal de un gen de interés versus un gen de expresión constante que actúa como control. La diferencia con la cuantificación absoluta radica en que no se parte de una cantidad conocida del ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo. Por esta razón esta parte de ARN que con el uso de la transcriptasa reversa se convierte en cDNA con el cual se realiza la amplificación.



**Distribución cuantitativa de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas) en ramas y frutos de cítricos usando PCR tiempo real. (A) Desarrollo de síntomas de frutos de mandarina “Shatangju” afectados por HLB (*Citrus reticulata* Blanco “Shatangju”). (B) Dinámica temporal de la población de CLas en diferentes partes de las ramas “Shatangju” afectadas por el HLB. Tomado de Fang et al., (2021).**

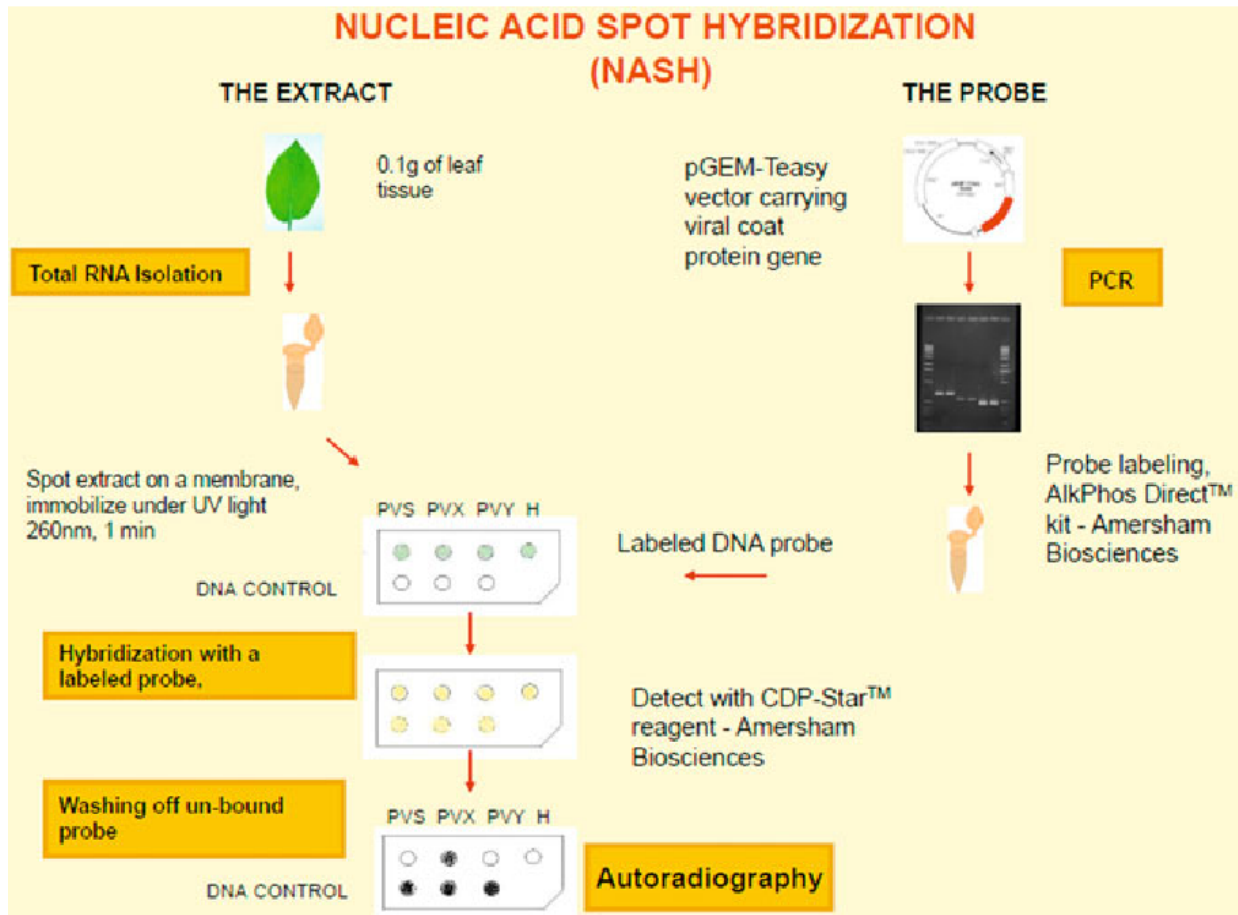
IV. **PCR multiplex:** La técnica se emplea para la amplificación simultánea de más de una secuencia diana en una sola reacción, utilizando más de una pareja de primers. Esta co-amplificación de dos o más dianas en una sola reacción es dependiente de la compatibilidad de los primers usados en la PCR, fundamentalmente en lo que respecta a las temperaturas de

alineamiento o annealing y en general, a las condiciones en que se realiza cada una de las etapas de la técnica (Bolívar et al., 2013).

- **Técnicas basadas en hibridización de ácidos nucleicos:** Se usa principalmente con dos propósitos, para determinar el grado de relación de dos secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, de dos virus y para la detección de virus u otros patógenos. La hibridación de ácidos nucleicos se lleva a cabo inmovilizando el ácido nucleico que se desea evaluar, en membranas de nitrocelulosa o nylon. De esta manera se tienen diferentes variantes, el ensayo de hibridación por puntos (dot) o manchas (spot) que es comúnmente utilizada en la detección de virus vegetales (Owens y Dinner 1984), el proceso implica la hibridación solido-líquido, donde:  
a).- el ácido nucleico de la muestra es colocado e inmovilizado sobre una membrana de nitrocelulosa o de nylon positivamente cargada, b).- Los sitios libres de unión de la membrana son posteriormente bloqueados con un DNA no homólogo (generalmente esperma de salmón o DNA del timo de becerro) o con proteína (generalmente albumina bovina, albumina de huevo o caseína de leche), c).- permitir que la hibridación se lleve a cabo entre la unión del ácido nucleico viral y la sonda (una secuencia corta de ADN específico), la cual está libre en la solución de hibridación, d).- el exceso de sonda que no hibridó es removida mediante serie de lavados con determinada astringencia, e).- la secuencia prueba es detectada por la molécula reportera usada en la sonda hibridada (González-Garza, 2017).

Antiguamente se usaban sondas radioactivas que tenían como reportero al  $^{32}\text{P}$  pero prácticamente están en desuso por la vida tan corta y lo peligroso del  $^{32}\text{P}$  radioactivo y han sido reemplazadas por sondas no radioactivas y de ellas la que más se usa es el sistema Dioxigenina (DIG)/antiDIG. En este sistema la membrana

es expuesta post-hibridación a anticuerpos antiDIG unidos a la enzima fosfatasa alcalina o peroxidasa. La señal es producida al agregar el sustrato adecuado que resulta en un producto cromógeno precipitado (Radford, 1983).



*Ensayo de hibridización de ácidos nucleicos por spot (NASH). Tomado de Sastry, (2013).*

## Identificación De Hongos Y Oomycetes Fitopatógenos

La identificación de oomycetes y hongos se pueden usar técnicas de determinación morfológica, técnicas serológicas y técnicas moleculares. La identificación a través de características morfológicas puede usarse incluso para organismos no cultivables pero que presentes signos sobre el tejido con síntomas. Cuando la muestra no muestra signos, se pueden inducir mediante el uso de cámaras húmedas, las cuales funcionan bien, aún, cuando se tienen royas, mildews vellosos y polvosos que son organismos biotrofos obligados. En tanto, los cultivos trampa descritos previamente, permiten el desarrollo de signos de oomycetes. Una vez obtenido el signo se hace un micopreparado sobre lamina o portaobjetos y se cubre con laminilla o cubreobjetos y/o se pueden hacer improntas con cinta transparente, en este caso estaríamos hablando de **preparaciones temporales**. En este tipo de preparaciones también se pueden usar coloraciones para cuando es difícil observar por tratarse de estructuras hialinas, por lo cual un colorante muy usado es el azul de lactofenol, sin embargo, en lo más posible se debe procurar realizar la observación conservando la coloración natural de la muestra, ya que esto otorga información importante para la identificación del agente causal (López-Jacome et al., 2013).. También se podrían realizar **preparaciones permanentes** donde adicionalmente se sella la misma con barniz transparente y se tienden a usar tinciones.

Para la identificación de los microorganismos como hongos y oomycetes se usan claves taxonómicas, teniendo en cuenta, además, la hipótesis planteada bajo la observación de la sintomatología y la información extraída de campo. En las claves taxonómicas cobra valor la presencia de estructuras reproductivas tales como cuerpos fructíferos, esporangios, conidias, clamidosporas, entre otras. Así como en la forma y velocidad de crecimiento y demás características coloniales sobre



diferentes medios de cultivos para los organismos cultivables. Por lo cual, se debe tener cierta experticia y conocimiento en cada uno de los grupos biológicos.



*Puccinia horiana* Roya blanca del crisantemo



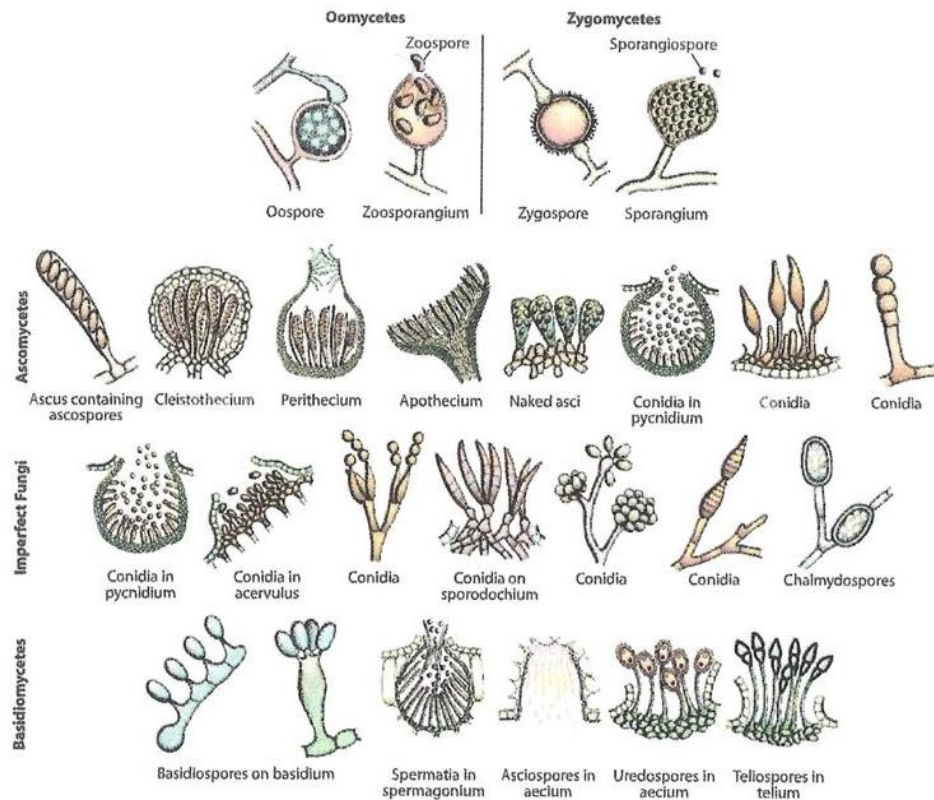
Roya del tallo del trigo *Puccinia graminis* f. sp. tritici

***Identificación morfológica de organismos no cultivables con presencia de signos en el tejido, mediante la observación microscópica de las estructuras reproductivas. En este ejemplo, se presentan dos royas del genero Puccinia que se caracterizan por presentar teliosporas pediceladas con una o dos celdas, septos transversales y las cuales pueden estar aisladas.***

Tomado y modificado de: [https://pl.wikipedia.org/wiki/Puccinia\\_horiana](https://pl.wikipedia.org/wiki/Puccinia_horiana); EPPO. (2020); [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/466581/26\\_GDSyD-RNTT\\_Puccinia\\_graminis\\_f\\_sp\\_tritici\\_Ug99V2.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/466581/26_GDSyD-RNTT_Puccinia_graminis_f_sp_tritici_Ug99V2.pdf) y <https://prod.senasica.gob.mx/ALERTAS/inicio/pages/single.php?noticia=3033>

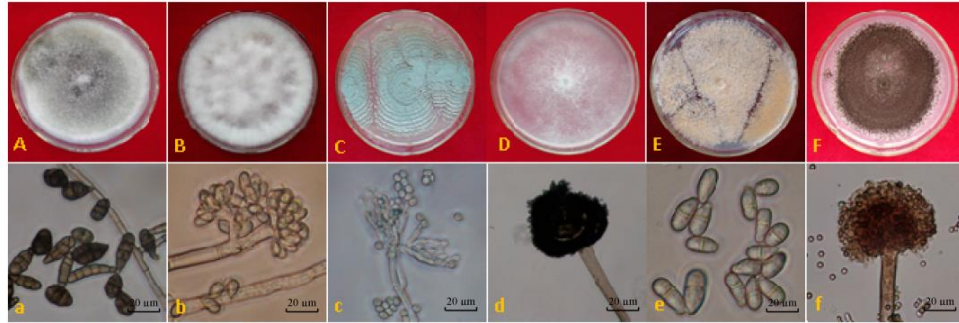
Por esta razón en la hipótesis debemos tener algo de claridad del tipo de organismo que se está esperando y hacer una búsqueda preliminar en la literatura

de las características morfológicas y de crecimiento del mismo. Conociendo además los medios de cultivos óptimos para su crecimiento y desarrollo.



***En esta figura se muestra esporas y cuerpos fructíferos para diferentes grupos de hongos y oomycetes. Tomado de Agrios, (2005). Estos cuerpos son claves para la identificación taxonómica por morfología***

La identificación usualmente se hace sobre cultivos puros o axenicos del organismo. Pero puede ocurrir que después de una cámara húmeda o cuando se aísla desde la planta, tanto hongos como oomycetes solo desarrollen micelio esteril y se haga imposible la identificación morfológica. En ese caso, se sugiere el uso de medios que estimulen la esporulación como el agar-agua y agar-avena. Pero aún si el problema persiste, se puede recurrir a la identificación por medio de PCR convencional usando los primers universales como se describirá en la siguiente sección.



***Las características de la colonia (A – F) y conidios (a – f) de los aislamientos de hongos patógenos postcosecha melocotones de 5 días de crecimiento sobre medio agar papa dextrosa (PDA). Donde (A) y (a) son la colonia y conidios de Alternaria tenuis; (B) y (b) Botrytis cinerea; (C) y (c) Penicillium digitatum; (D) y (d) Rhizopus nigricans; (E) y (e) Trichothecium roseum; (F) y (f) Aspergillus niger. Tomado de Zhang et al., (2019).***

Para el conocimiento de los caracteres morfológicos, están disponibles claves taxonómicas, artículos y otros textos en la literatura. El problema también puede ocurrir cuando no es posible tener signos observables a simple vista del patógeno y a esto se le suma la imposibilidad de que es un organismo no cultivable, como ocurre en algunos casos particulares. En estos casos, se sugiere el uso de cortes finos del tejido para realizar el montaje y la tinción diferencial cuando esto sea necesario.

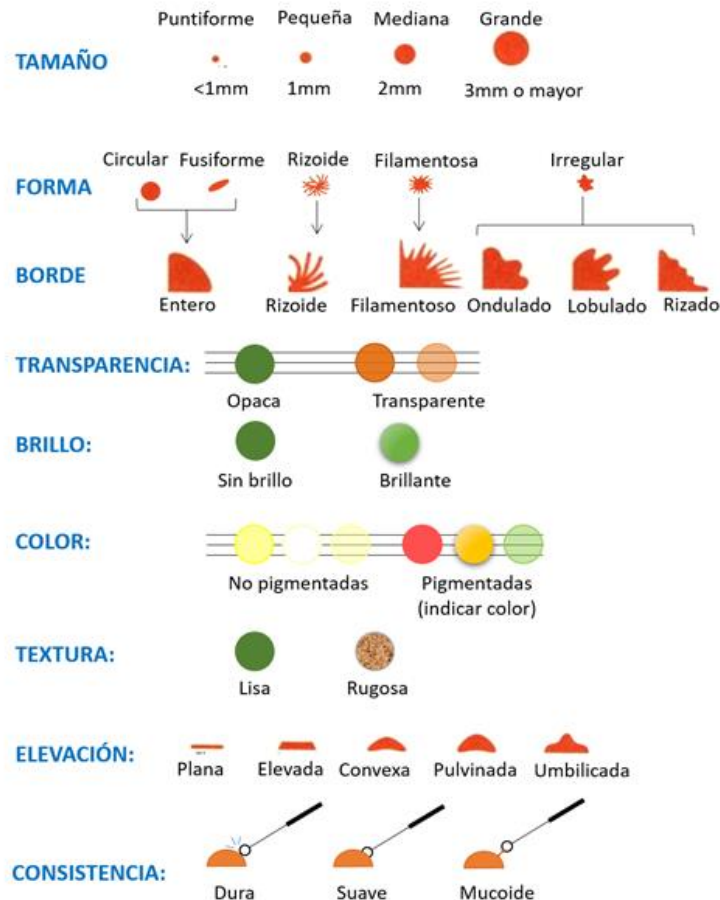


***Ascas con ascospores del hongo Taphrina deformans en la superficie de hojas de durazno enfermas y con síntomas del torce de la hoja del durazno. Tomado de Wang et al., (2020).***

## Identificación De Bacterias Fitopatógenas

La identificación de bacterias se puede usar técnicas de determinación morfológica, pruebas bioquímicas, técnicas serológicas y técnicas moleculares. La determinación morfológica va acompañada de pruebas bioquímicas y diferenciales, en todo caso para la aplicación de cualquier técnica de identificación es necesario tener cultivos puros o axenicos.

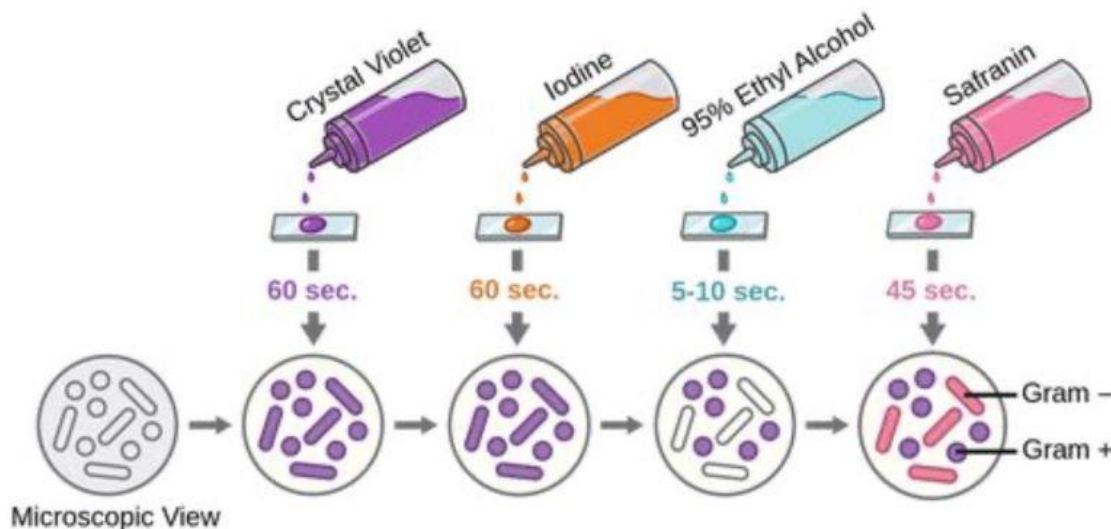
De manera morfológica, las colonias bacterianas pueden caracterizarse según su:



*Morfología colonial bacteriana. Se presentan todas las variantes de cada característica al describir una colonia bacteriana morfológicamente. La consistencia solo puede ser determinada mediante el uso de un asa bacteriológica.*  
Tomado de <https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>



Microscópicamente, se puede observar la forma de las células (cocos, bacilos, etc) y el tamaño, pero además mediante tinción de Gram distinguir entre células Gram + y Gram -. Este último rasgo, es importante para distinguir entre fitopatógenos después de la generación de la hipótesis.

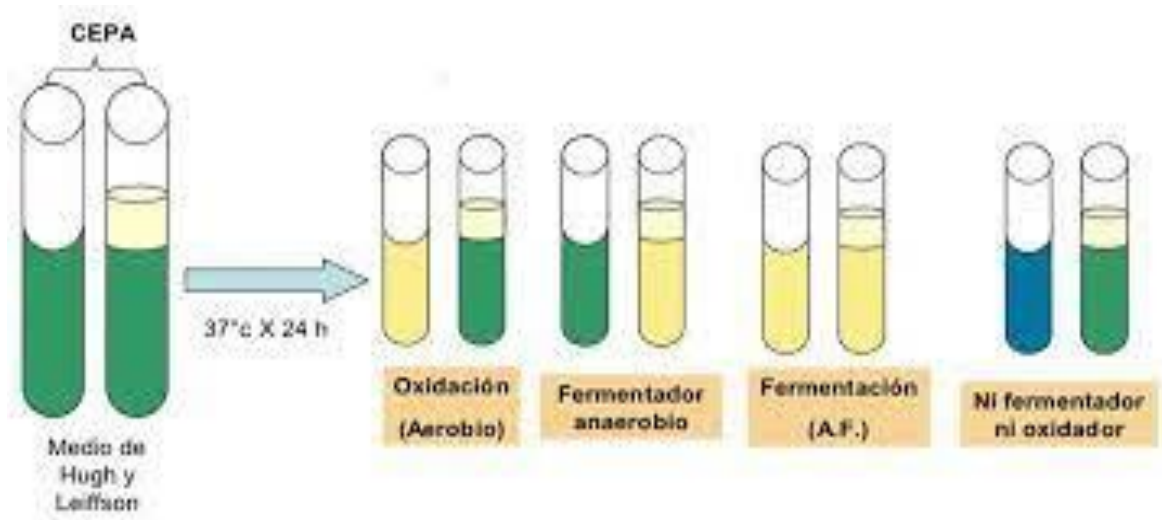


### ***Pasos de la tinción de Gram bacteriana.***

Tomado de [https://es.linkedin.com/posts/fran-guill%C3%A9n-6b96a745\\_la-tinci%C3%B3n-de-gram-es-una-t%C3%A9cnica-com%C3%BAn-utilizada-activity-7121165817626423296-IOjG](https://es.linkedin.com/posts/fran-guill%C3%A9n-6b96a745_la-tinci%C3%B3n-de-gram-es-una-t%C3%A9cnica-com%C3%BAn-utilizada-activity-7121165817626423296-IOjG)

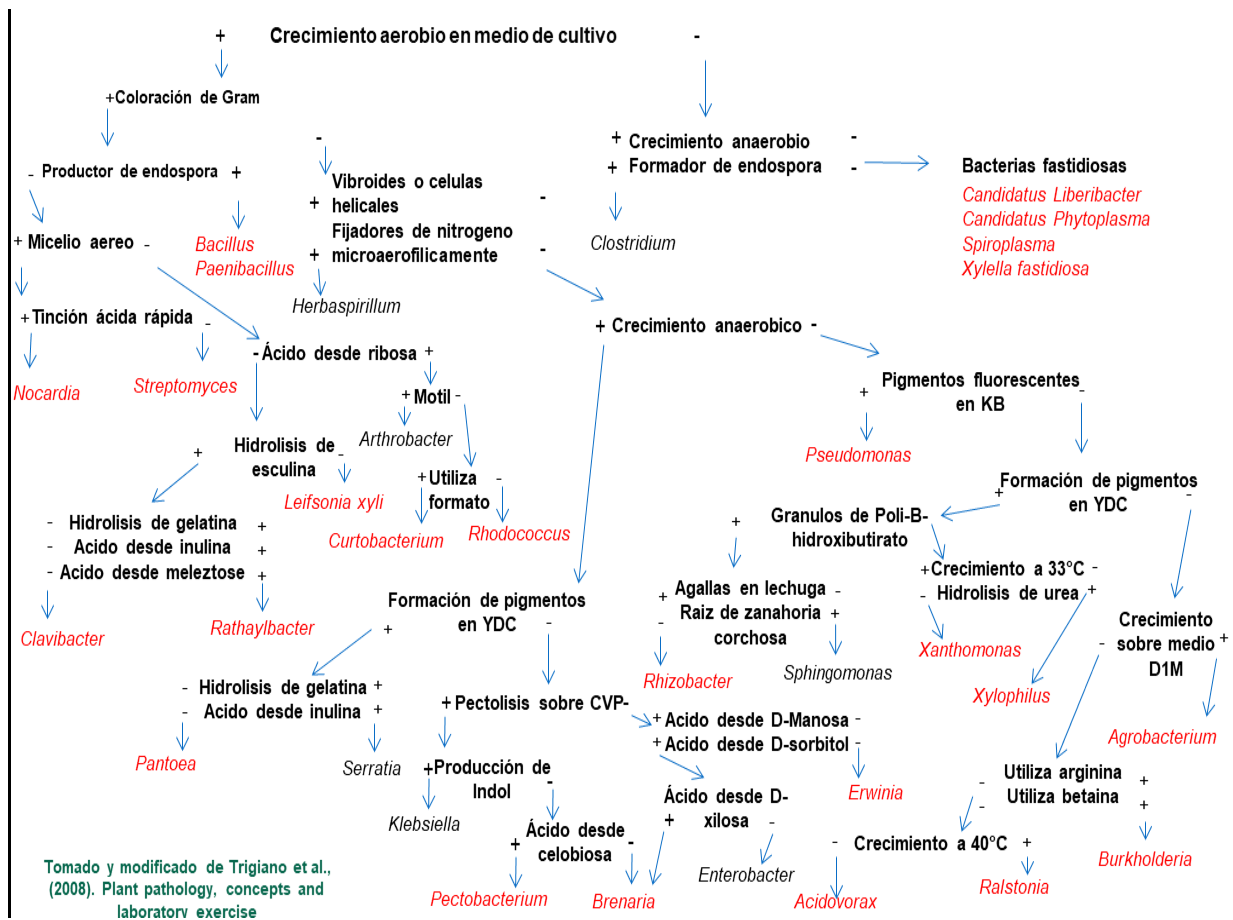
Así mismo, hay una serie de pruebas químicas que son aplicadas de manera cotidiana para la identificación bacteriana en varios ámbitos de la microbiología, dentro de estas se pueden mencionar: prueba de actividad catalasa, prueba de oxidación / fermentación Hugh & Leifson, test de ureasa, licuefacción de la gelatina, Test de pectólisis sobre CVP, dentro de otros. El conjunto de pruebas y sus resultados permiten la identificación de un género específico de bacterias.

**Test de oxidación/fermentación:** Se usan dos tipos de tupos, uno abierto y otro sellado con parafina. Las bacterias que respiran aerobiamente crecen en la superficie del medio del tubo abierto. Transforman la glucosa en CO<sub>2</sub>, la superficie del medio se verá ligeramente amarilla (por la formación de ácido carbónico originado al reaccionar el CO<sub>2</sub> con el agua del medio). En el tubo cerrado el cultivo se mantiene azul-verdoso. Las bacterias fermentadoras producen ácidos a partir de la glucosa. Viran el cultivo del tubo cerrado a amarillo; en el tubo abierto se inicia el viraje en el fondo, pero transcurridas 24 horas los ácidos pueden difundir por todo el medio virándolo a amarillo.



Tomado de:

<https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2017/02/26/practica-19-prueba-of-de-glucosa/>



*Cuadro ruta de identificación de bacterias fitopatógenas en laboratorio, mediante diferentes pruebas bioquímicas y el uso de medio selectivos. Tomado y modificado de Trigiano et al., (2008).*

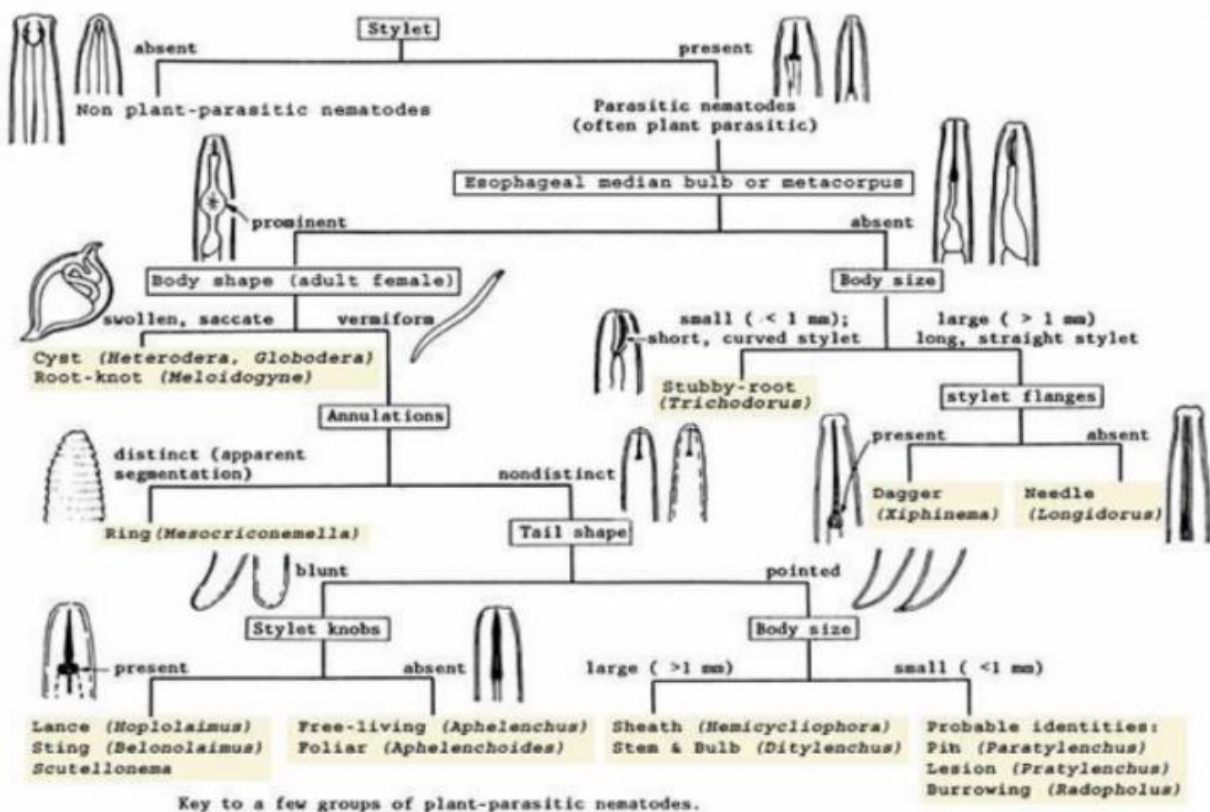
Las pruebas moleculares y serológicas ya se estudiaron anteriormente.

## Identificación De Nematodos

Después aislamiento y/o extracción de nematodos desde las diferentes muestras (plantas y/o suelo) y posteriormente se procede a la identificación, la cual puede realizarse a través de diferentes técnicas (Shao et al., 2023):



1. **Morfología y moformetria:** requiere de conocimiento básico en morfológica de nematodos, con el fin de no confundir la terminología. Es clave, conocer la forma de varios fitopatógenos y los tamaños corporales, existiendo guías taxonómicas como en la figura a continuación, que nos establece algunos caracteres básicos para la identificación. En términos morfológicos las características más usadas en identificación de nematodos son: cavidad bucal (presencia o ausencia y forma del estilete), longitud del estilete, forma de traslape de las glándulas esofageales en el intestino, tamaño y forma del cuerpo del nematodo adulto, longitud del cuerpo, tamaño de la cabeza, longitud de la cola, numero de anillos del cuerpo, numero de anillos de la cabeza a la base del esófago, número y posición de los ovarios en las hembras,

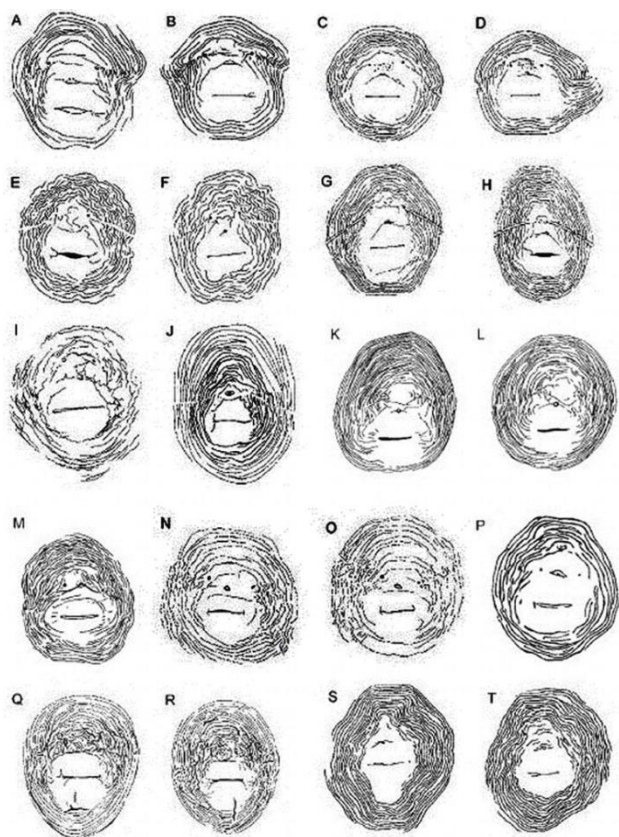


numero de anillos de la punta de la cola hasta la vulva, entre otros.

***Clave simplificada para la identificación de nematodos fitopatógenos.***

Tomada de [www.apsnet.org/Education](http://www.apsnet.org/Education)

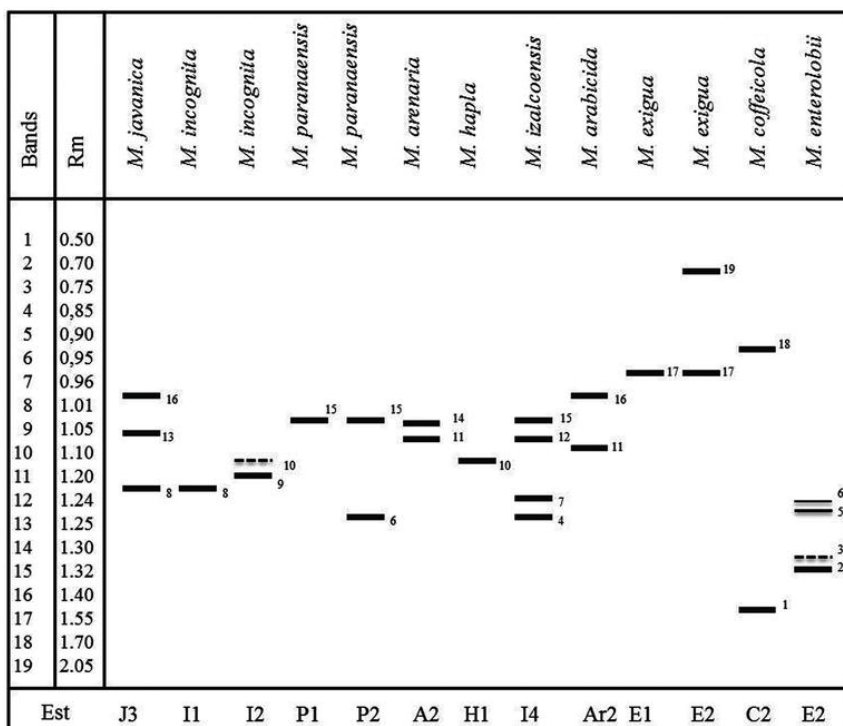
Una forma muy usada es el patrón de corte perineal el cual es ampliamente aplicado para el género *Meloidogyne* mediante el corte de la hembra enquistada en esta región, pero es una técnica que requiere de una alta experticia pudiéndose distinguirse patrones o configuraciones entre especies de este género de nematodos como se indica en la siguiente figura.



Patrones de cortes perineales de hembras del genero *Meloidogyne*. Tomado de Dechechi et al., (2017).

2. **Circulo de hospederos:** Es aplicado para nematodos que tienen un numero o especie de hospederos especifico, como es el caso de *Heterodera glycines* que afecta a plantas leguminosas. Pero no funciona con especie polífagas como las del género *Meloidogyne*
3. **Fenotipo de isoenzimas:** Se ha demostrado que los fenotipos enzimáticos, especialmente los de las esterazas, son específicos de las especies de

*Meloidogyne* y pueden utilizarse como caracteres taxonómicos fiables para la identificación de la mayoría de las especies principales y varias de las menores de este género. Esto requiere el uso de técnicas electroforéticas en placas de poliacrilamida muy delgadas en los que se pueden revelar los fenotipos de dos o más enzimas a partir del extracto de proteína de una sola hembra de *Meloidogyne*.

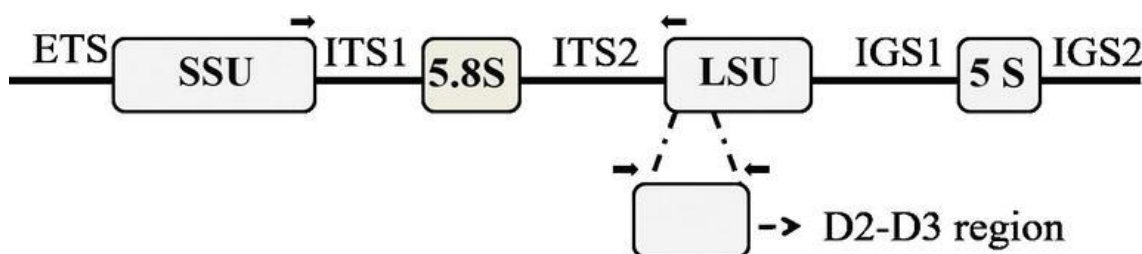


**Los fenotipos de esterasa (Est) de las principales *Meloidogyne* spp. asociado con el café.** Rm = relación de migración en relación con la banda rápida de *M. javanica*. Las líneas punteadas indican bandas débiles. Tomado de Dechechi et al., (2017).

- Citogenética:** Las técnicas citogenéticas para determinar el número de cromosomas se han utilizado con éxito en la clasificación de taxones superiores y la identificación de especies y patotipos de *Meloidogyne* y *Pratylenchidae*. Todos los Criconematoidea tienen un número cromosómico básico  $n = 5$ . Dolichodoroidea tiene  $n = 8$  y Heteroderidae y Meloidogynidae tienen  $n = 9$  (poliploidía 18)  $yn = 18$  (poliploidía 36, 54), respectivamente. *Radopholus similis citrophilus* se diferencia *similis similis* en tener  $n = 5$  en

comparación con  $n = 4$  en este último. Las especies de *Meloidogyne* se pueden diferenciar determinando el número de cromosomas.

5. **Técnicas moleculares:** Existen diferentes técnicas, aquellas basadas en PCR de acuerdo con diversos marcadores, los cuales están diseñados basados en regiones conservadas en el cistron del ADN ribosómico (ADNr), es decir, el espaciador transcrito externo (ETS), los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2), y las regiones espaciadoras intergénicas 1 y 2 (IGS1 e IGS2) como se indica en la siguiente figura



*Representación esquemática de genes de ARNr nucleares en células eucariotas. SSU = 18S — subunidad pequeña; LSU = 28S: subunidad grande; ETS: región espaciadora transcrita externa; ITS1 e ITS2: espaciadores transcritos internos; IGS1 e IGS2: regiones espaciadoras intergénicas; las flechas indican un posible punto de partida para la amplificación del cebador. El cuadro abierto indica los segmentos de expansión D2-D3 para el ARNr 28S. Tomado de Dechechi et al., (2017).*

Uno de los primeros métodos utilizados para diferenciar especies de nematodos fue el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), un método que utiliza enzimas de restricción para digerir el ADN genómico completo o un segmento amplificado del mismo para generar patrones de bandas de ADN de acuerdo con las divergencias en las secuencias entre los aislamientos. Esta técnica también se puede acoplar a la

hibridación del ADN con sondas marcadas radiactivas o no radiactivas. Aunque es eficaz para diferenciar los aislados de nematodos, este método se utiliza menos hoy en día debido a la complejidad técnica y la necesidad de una gran cantidad de ADN diana, que normalmente requiere el precultivo de poblaciones de nematodos.

Alternativamente, se han diseñado primers específicos de especies a partir de secuencias dispersas aleatoriamente en los genomas de nematodos, p. Ej., Banda de ADN obtenida de geles de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) o polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), con clonación posterior y secuenciación de bandas diferenciales a través de geles relacionados. Estos marcadores región amplificada caracterizada de secuencia específica de especie (SCAR) se han utilizado para diagnosticar nematodos con PCR convencional o en tiempo real (q-PCR)

6. **Características ecológicas y biogeográficas:** A partir de la localización, distribución geográfica, círculo de hospederos, entre otros.

## **6. Identificación Y Detección Molecular De Agentes Causales En Plantas**

Como se indicó previamente existen diferentes técnicas moleculares para la identificación y detección molecular de los patógenos de plantas. Cabe mencionar algunos detalles, dentro de estos, es común el uso de primers universales para la identificación, con el posterior uso de secuenciación y BLASTn (software con capacidad de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias reportadas en una base de datos, haciéndolo a través de un alineamiento local de nucleótidos). Para poder realizar este tipo de aproximación se debe tener un aislamiento puro y nunca se deben usar dichos primers universales en proceso de detección de un fitopatógeno sobre una muestra de tejido vegetal o suelo, al menos que se pretenda hacer metagenómica (la cual también usa primers universales que han sido diseñados para tal propósito).

Para detección se usan primers específicos de cada organismo, desarrollados para tal fin y que permiten su aplicación desde PCR convencional hasta tiempo real para que además de detectar se cuantifique la población de los organismos.

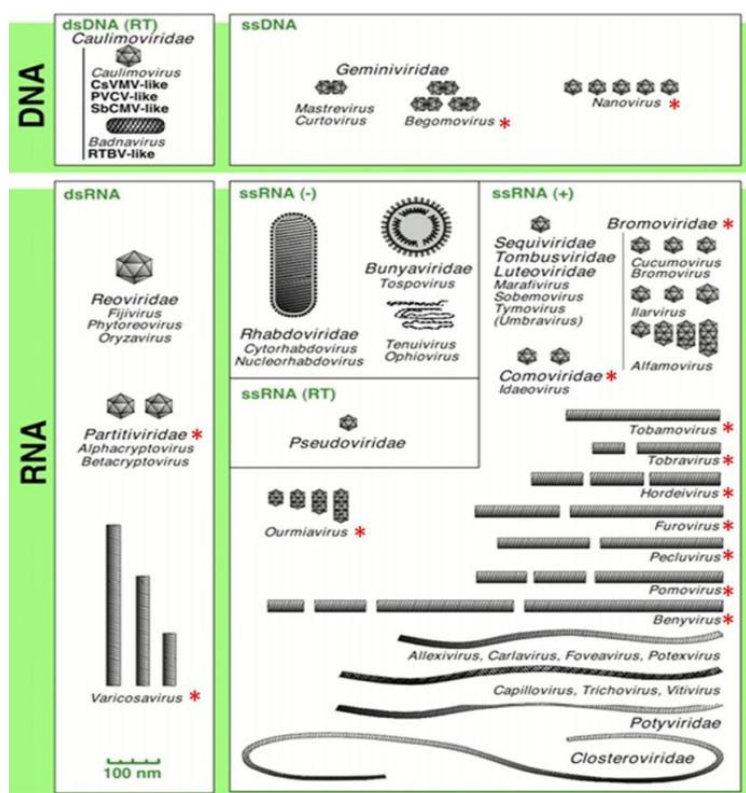
Los primers universales en cada uno de los tipos de organismos están dirigidos hacia la región o secuencia del ADN ribosomal (primers 27F y el 1525R), que en bacterias tienen como blanco la subunidad 16s del ribosoma (ADNr 16S) que tiene una longitud de aproximadamente 1500 pb. En tanto para los eucariotas para la subunidad 18s de ADNr específicamente el espacio transcrito interno (ITS) cuyo tamaño oscila entre 600 y 800 pb (en hongos primers ITS1 e ITS2; oomycetos ITS4 e ITS5, en nematodos ITS1 e ITS2) (Smart et al., 1996; Ghignone & Migheli, 2005; Meshram et al., 2018; Carta et al., 2018; Shao et al., 2023). Sin embargo, para algunos patógenos específicos es necesario realizar una detección molecular



complementaria a la información que se obtiene para el diagnóstico, debido al ser organismos no cultivables, para el caso tenemos los virus y los fitoplasmas.

## 6.1. Diagnóstico Y Detección De Virus Fitopatógenos

Los virus son organismos no vivos que están constituidos por una o más moléculas de ácidos nucleicos empaquetadas dentro de una cubierta proteica llamada cápside y que son considerados parásitos obligados, dado que no pueden replicarse sin usar la maquinaria de su hospedero (Gergerich y Dolja, 2006). A la fecha hay más de 1000 especies de virus vegetales reportados, estando estos organizados en diferentes familias que difieren en las características de su material genómico y estructurales como se puede observar en la siguiente figura





***Representación esquemática de familias y géneros de virus de plantas Todos los dibujos tienen una escala aproximada, lo que proporciona una vista comparativa de los tamaños de las partículas de virus. Tomado de Sicard, (2014).***

Los síntomas que producen los virus vegetales no son específicos pudiendo incluso confundirse con deficiencias nutricionales, daño por herbicidas, síntomas por fitoplasmas u otros. Dentro de los síntomas por virus están cambios en la coloración de hojas y tallos (mosaicos, moteados, enrojecimiento, bronceados, etc), enanismo, deformación de hojas (encrespamiento, rizado, epinastia, entre otros) y tallos, disminución del área foliar, reducción del tamaño de flores y frutos, manchas necróticas, entre otros (Scholthof et al., 2011).

Los virus pueden ser transmitidos vía vector, daño mecánico, dentro de otros. En el caso de los vectores estos pueden ser insectos, nematodos, ácaros, plasmodioforos, y para los insectos se destaca la relación que tienen los virus con sus vectores pudiendo ser: (a) no circulativa: Cuando las partículas de virus están retenidas sobre la cutícula del estilete o en la parte anterior del intestino. Pero no entra a las células del vector. Pudiendo ser no persistentes o semipersistentes y (b) circulativa: Cuando el virus entra a las células del vector. Pudiendo ser propagativa (Se replican e invaden de manera sistémica de los tejidos del vector antes de la transmisión a través de las glándulas salivales) (Roosinck, 2010).

En este sentido, la información de los vectores es importante como elemento de diagnóstico, considerando los siguientes puntos:

- a) Sintomatología
- b) ¿Dónde están los síntomas?
- c) Distribución síntomas en campo
- d) Existencia del vector en campo

e) Detección del patógeno e identificación

f) Postulados de Koch

Lo cual involucra además cada uno de los siguientes pasos:

### **Muestra**

1. Órgano afectado
2. Síntomas y etapas
3. Efecto en producción

### **Campo**

1. Distribución
2. Clima
3. Plagas – Vectores
4. Manejo
5. Fenología
6. Variedades

### **Literatura**

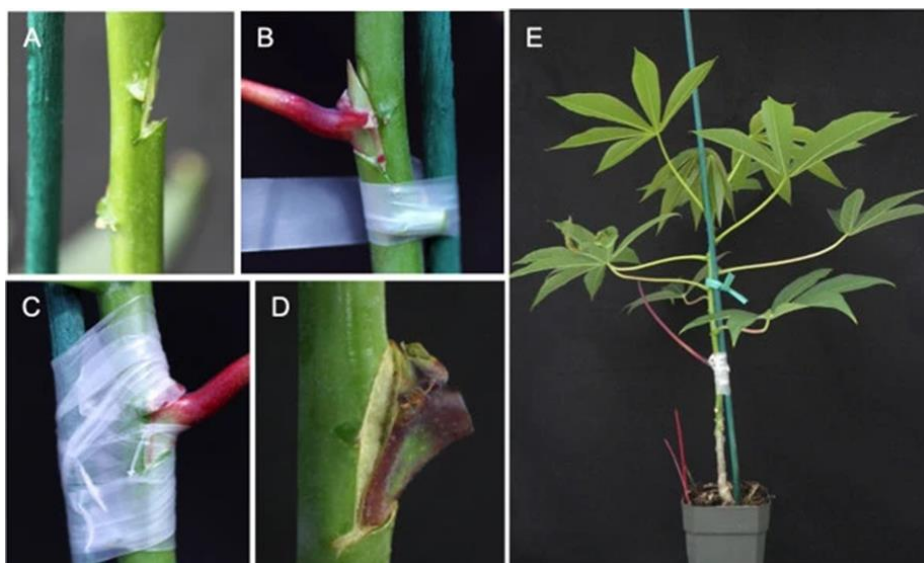
1. Asociación de síntomas
2. Métodos de detección

### **Identificación de virus fitopatógenos**

1. Métodos de identificación

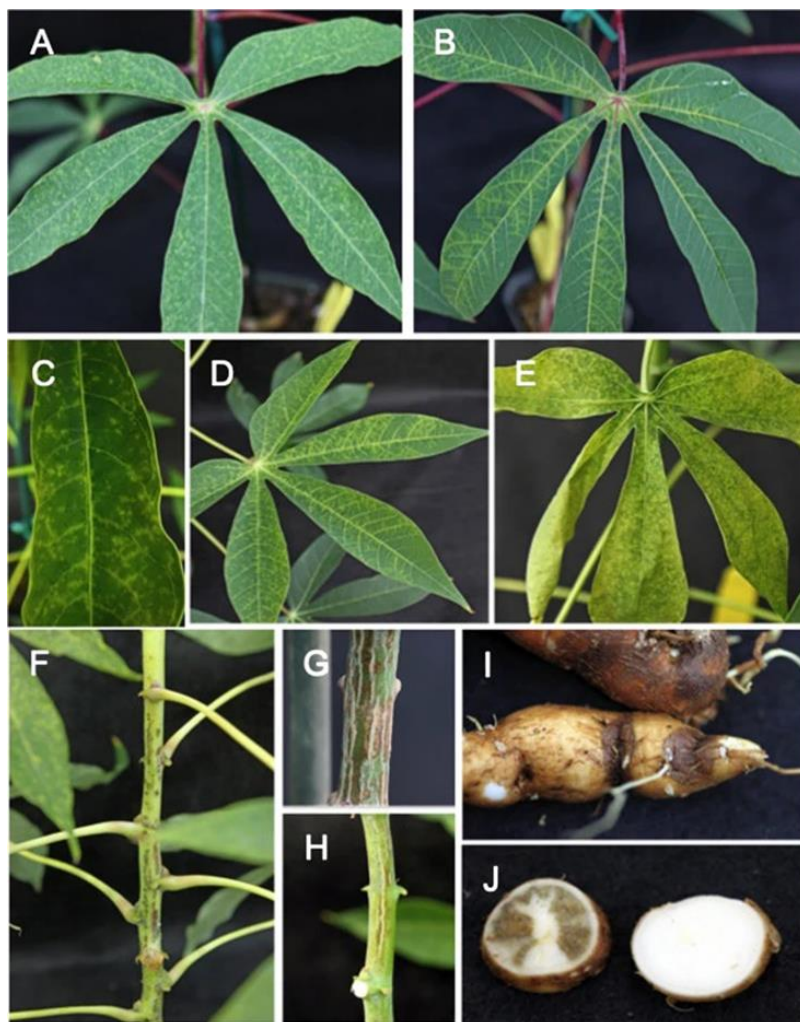
Dadas las características no cultivables de los virus, se requiere la detección en el tejido vegetal, una vez se requiere confirmar la hipótesis realizada. La detección puede realizarse a través de:

- a. Observación de sintomatología: la cual no es suficiente de acuerdo con lo presentado en cada uno de los capítulos de este texto
- b. Detección por plantas indicadoras: Especies o variedades de plantas que presentan susceptibilidad o tolerancia a ciertas condiciones. Por tanto, son plantas que reaccionan rápida y característicamente a la inoculación de la savia de plantas enfermas, preferiblemente mediante la formación de lesiones locales en hojas inoculadas. Para inocular las plantas se puede usar:
  - Inoculación mecánica: ayudándose de buffer y materiales abrasivos como el Carborundum 600
  - Inoculación por injerto: donde una parte de la planta enferma es injertada en la planta indicadora y sana, posteriormente se espera el desarrollo de los síntomas



**Pasos en el injerto de yemas en astilla de mandioca.** (A) se extrae la yema axilar de la parte del tallo de una planta de seis a ocho semanas para

exponer el tejido del cámbium, (B) se extrae la yema axilar de la parte no lignificada de las plantas infectadas con el virus con el pecíolo adherido, (C) injerto de yema asegurado con parafilm, (D) injerto de yema exitoso una semana después del inicio del injerto con la yema permaneciendo sana y adherida al patrón con formación visible de callos y (E) planta completa después de completar el injerto de yema en astilla. Tomado de Wagaba et al., (2013).



**Síntomas de CBSD en hojas, tallos y raíces de almacenamiento transmitidos por injertos de yemas.** (A) manchas cloróticas, (B) clorosis plumosa en las regiones nerviosas (C) detalle de manchas cloróticas 3-4 semanas después del inicio del injerto, (D) clorosis plumosa en las regiones venales, (E) síntomas severos

de CBSD en la hoja seis semanas después del inicio del injerto, (F) tallo mostrando síntomas de CBSD, (G) lesiones de corcho marrón y gris del tallo, (H) síntomas de CBSD visibles como rayas de color marrón en el tallo, (I) lesiones marrones visibles en la superficie exterior de raíces de almacenamiento 2.5 meses después de la inoculación del injerto y (J) sistemas típicos de CBSD observados dentro del parénquima de almacenamiento de raíces tuberosas 2.5 meses después. Tomado de Wagaba et al., (2013).

- Inoculación por vectores: Donde los vectores se colocan en contacto con plantas enfermas y posteriormente son liberados en un cultivo de plantas indicadoras
- Inoculación por suelo contaminado: Donde el suelo tiene partículas virales y se siembran las plantas indicadoras en el mismo

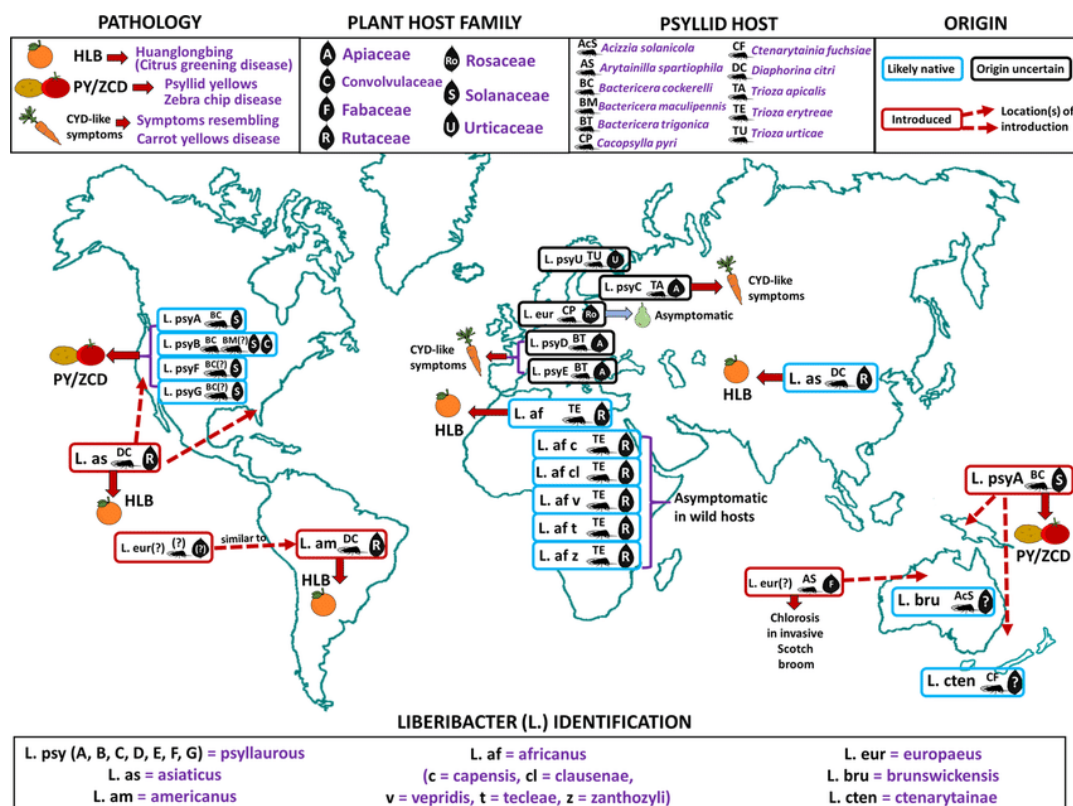
Todos estos métodos de inoculación se usan también para confirmar los postulados de Koch con los virus

- c. Detección por técnicas serológicas: Como fue explicada en la sesión anterior
- d. Detección por técnicas moleculares: Como fue explicada en la sesión anterior

## **6.2. Diagnóstico de enfermedades causadas por *Candidatus Liberibacter***

*Candidatus Liberibacter* es un género de bacterias Gram negativas, biotrofas obligadas, que habitan en el floema de las plantas y son transmitidas por insectos vectores Hemiptera, específicamente psílidos (Haapalainen, 2014). Son difícilmente cultivables, lo cual dificulta el diagnóstico, sin embargo, hay diferentes elementos que permiten tener precisión en el mismo. Dentro de estos debe mencionarse que las especies de *Ca. Liberibacter* son de hospedero,

localización geográfica y vector restringido y hasta en algunas clases específico, como se indica en el siguiente mapa:



**Rango de hospederos, localización geográfica y vector de algunas especies de bacterias del genero *Candidatus Liberibacter*. Tomado de Mauck et al., (2019).**

**\**Ca. Liberibacter psyllauros* es sinónimo de *Ca. Liberibacter solanacearum***

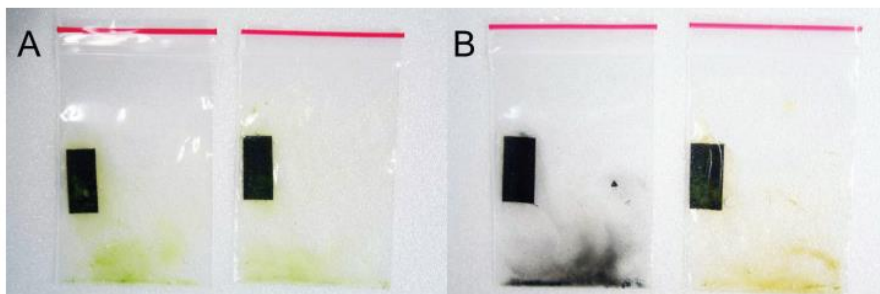
De esta manera, los síntomas ocasionados por *Ca. Liberibacter* dependen del patosistema, observando cambios en la coloración de hojas, flores y frutos, deformación, aparición de yemas axilares, entre otros. Por tanto, la sintomatología si es un elemento de diagnóstico, pero no es suficiente dado que se puede confundir con deficiencias nutricionales y fisiopatías; por esta razón es necesario tener un conjunto sumando el monitoreo e identificación del vector, la localización geográfica y la confirmación de la bacteria patógena mediante técnicas de PCR usando primers específicos.

El **monitoreo de insectos** en el caso de vectores de organismos patógenos de plantas dependerá de la naturaleza de los mismos, donde se puede usar diferentes herramientas y técnicas (Varón et al., 2020), dentro de estas se menciona para HLB (Huanglongbing de los cítricos o enfermedad del dragón amarillo) cuyo vector en América es el psílido *Diaphorina citri*:

- (a) **Jameo:** Donde se utiliza una red entomológica de aproximadamente 35 cm de diámetro y un mango extensible desde 70 cm a 130 cm. En cada árbol seleccionado se determinan tres sitios (ramas), y en cada uno de ellos se hace oscilar la jama de izquierda a derecha tres veces (tres pases dobles de jama), de tal manera que, como en cada rama se hacen tres pases dobles y son tres ramas, resultarían 9 pases dobles de jama, a 180 grados, por árbol.
- (b) **Golpeteo:** El muestreo por golpeteo de ramas consiste en golpear una rama seleccionada al azar tres veces con un tubo de PVC (40 cm x 1" de diámetro) o, en su defecto, sacudir la rama sobre una bandeja honda (32 cm x 32 cm x 8 cm de profundo) de aluminio colocada horizontalmente debajo de la rama. Los adultos de *D. citri* se cuentan sobre la bandeja una vez se ha golpeado o sacudido la rama.
- (c) **Tablero cromático:** Los tableros cromáticos son láminas plásticas de color amarillo que en ambas caras tienen adhesivo. Se utilizan tableros acrílicos amarillos de 24 cm x 18 cm. Se ubican dos trampas por árbol previamente seleccionado y se ubican aproximadamente a 1,5 m del suelo, cerca al dosel exterior de las ramas visibles en puntos de acceso fácil para la recolección y/o reposición. Los tableros son evaluados semanalmente y cambiados cada 15 días.
- (d) **Visual:** Se lleva a cabo a través de la observación de brotes con auxilio de una lupa de aumento mínimo de 10x. Esta técnica permite visualizar estados in-maduros del insecto como ninfas y huevos



Además de los elementos mencionados previamente, una muestra presuntiva puede ser evaluada mediante el test yodo-almidón como se muestra a continuación:



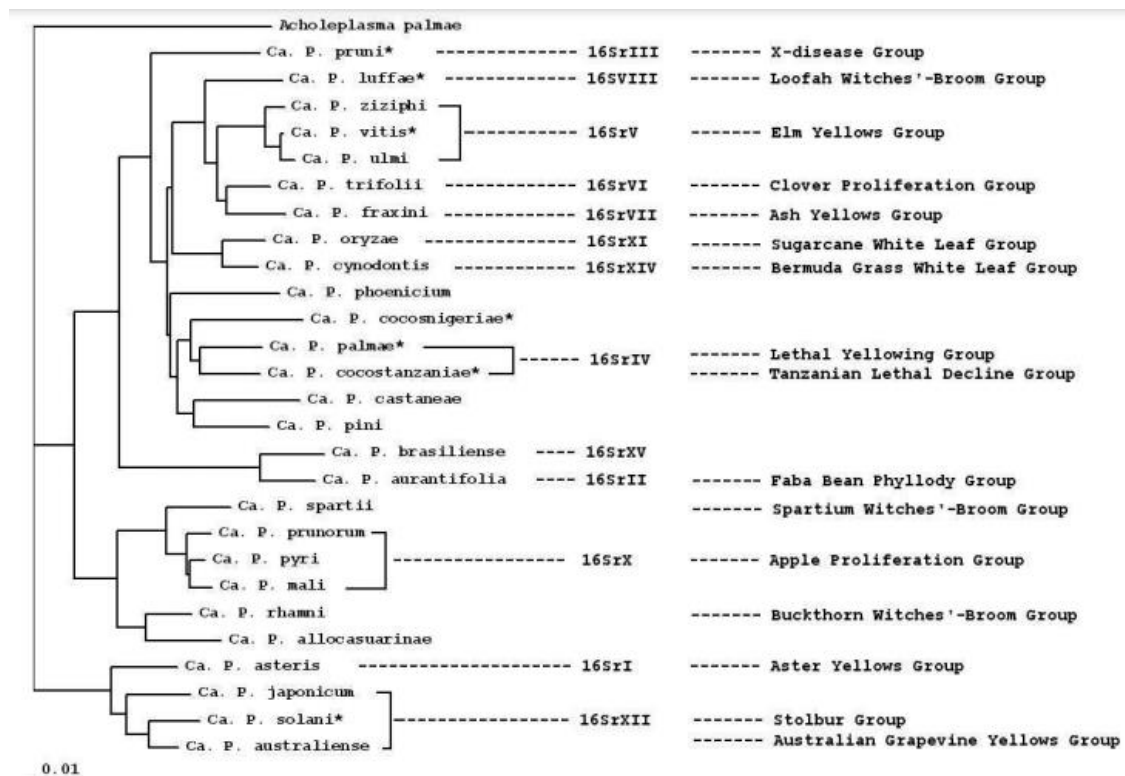
**Test yodo- almidón.** *A: Tejidos obtenidos del frotis del envés de la hoja agregando un mL de agua destilada. B: Izquierda: si después de agregar una gota de yodo, se observa una coloración oscura (Test positiva) (Tomado de Huang & Chen).*

Cuando la prueba es positiva podría ser un presuntiva para *Ca. Liberibacter* dado que en las hojas hay un almidón transitorio, pero dada a la obstrucción del floema, se acumula un 300% más almidón que lo normal. Sin embargo, una prueba positiva por sí sola no garantiza la presencia de *Ca. Liberibacter*, dado que problemas de nutrición como la deficiencia de zinc puede también darnos un test positivo. Por esta razón para confirmar la hipótesis es necesario realizar PCR terminando con la detección molecular del agente causal.

### **6.3. Diagnóstico de enfermedades causadas por *Candidatus phytoplasma***

*Candidatus Phytoplasma* es un género de bacterias Gram positivas, que carecen de pared celular y colonizan el floema de las plantas. Son transmitidas por insectos hemípteros incluyendo las familias Cicadellidae, Cixidae y Psyllidae (Ferriol et al., 2016). Para el año 2000 se conocían 15 grupos (como se muestra en

el siguiente árbol filogenético), pero, en la actualidad se sabe que hay 27 grupos, que varían en rango de hospederos, vectores y localización geográfica (Pérez-López et al., 2016). En estos últimos años, las enfermedades causadas por fitoplasmas son consideradas emergentes, dado la ampliación en el rango de hospedero y de localización geográfica. De hecho, en la revisión realizada por Pedraza et al., (2022) se encontraron 27 grupos.



*Árbol filogenético de las especies de del género "Candidatus Phytoplasma" y sus relaciones con los grupos identificados por Lee et al. (1998, 2000) y Seemüller et al. (1994, 1998b). Tomado de Firrao et al., (2005)*

El diagnostico de estas bacterias es similar al de *Ca. Liberibacter*, donde se debe acudir a la sintomatología, el monitoreo de presencia del vector, la información de campo y la detección molecular del patógeno en el tejido afectado.

## **7. Construyendo Rutas De Diagnóstico De Enfermedades De Plantas**

Como se mencionó en el capítulo de diagnóstico de enfermedades en plantas, la construcción de una ruta de diagnóstico involucra de manera general las siguientes etapas y elementos:

### **1. Observación de la sintomatología**

- Órganos afectados: hojas, flor, tallo, flores, frutos, raíz
- Tipo de síntomas: decoloración, necrosis, pudrición, virescencia, etc

### **2. Muestra**

- Órgano afectado: hojas, flor, tallo, flores, frutos, raíz
- Síntomas y etapas: síntomas iniciales, medios y finales. Degrade de síntomas
- Efecto en la producción: pérdidas totales, perdidas parciales, etc

### **3. Campo**

- Distribución: agregado, en parches, aleatoria, etc
- Clima: frio, templado, caliente, etc
- Insectos plagas – Vectores: presencia de posibles vectores del agente causal, necesidad de monitoreo e identificación
- Manejo: tipo de manejo dada a la problemática reportada en campo
- Fenología: Etapas fenológicas en la cual se presentó la problemática y sintomatología
- Variedades: variedad que presenta la sintomatología

#### **4. Literatura**

- Asociación de los síntomas: posibles agentes causales asociados a la sintomatología encontrada (bacterias, hongos, virus, viroides, nematodos, oomycetes, etc), o posibles causas de la problemática en campo (fisiopatías, deficiencias nutricionales, plaguicidas)
- Métodos de detección (directos, indirectos, sensibilidad, etc): método de detección más económico, rápido y eficaz que permita confirmar la hipótesis generada

#### **5. Generación de la hipótesis**

- De acuerdo con lo observado en campo y en las muestras y lo descrito en la literatura se genera la hipótesis estableciendo las posibles causas de la sintomatología

#### **6. Confirmación de la hipótesis**

- Muestreo: como se indicó en la sesión II se debe hacer un muestreo tratando de recolectar muestras con todos los síntomas observados y tratando de cubrir la mayor área posible
- Procesamiento de las muestras: como se indicó previamente se deben procesar las muestras para el aislamiento del agente causal, cuando es cultivable, o para su detección por métodos serológicos y moleculares
- Aplicación de métodos de detección: Son importantes especialmente cuando los agentes causales de la hipótesis no son cultivables
- Postulados de Koch: Son indispensables para los primeros reportes. No son obligatorios en todos los casos, a menos que se aíslen varios organismos desde la muestra y se tenga en duda cual de esos es el causante de la sintomatología

## 8. Conceptos Fundamentales

**Abscisión:** Es la pérdida organizada de una parte de una planta, generalmente una hoja, un fruto o una flor no fertilizada.

**Apresorio:** Estructura achatada que se forma en la parte terminal de una hifa cuya función es facilitar el proceso de adhesión del hongo a la planta

**Área bajo la curva de la enfermedad (AUDPC):** Área bajo la línea de grafica los valores de Y (intensidad de la enfermedad) vs X (unidades de tiempo)

**Atrofia:** Es una disminución progresiva del tamaño de una planta determinada que resulta en la interrupción completa de la multiplicación de las células vegetales.

**Ciclo primario de infecciones:** las primeras infecciones de un patógeno que ocurren en un nuevo cultivo, causadas por inóculo primario usualmente procedente de fuera del campo.

**Conidia:** Espora asexual producida por algunos hongos

**Efactor:** Proteína del patógeno involucrada en el desarrollo de la enfermedad mediante la supresión de las defensas de la planta

**Enfermedad en plantas:** Desviación nociva del funcionamiento normal de los procesos fisiológicos. Desde el punto de vista molecular: La **enfermedad** es el resultado de una interacción génica **compatible** entre el hospedero y el patógeno. Donde el patógeno es **virulento** y el hospedero es **susceptible**

**Enquistar:** formar un quiste, que en oomycetes es la estructura estacionaria formada por las zoosporas móviles previo a penetrar la epidermis del tejido de la planta.

**Epinastia:** Es la flexión rígida hacia abajo de la superficie superior de una hoja.

**Esporangios:** estructura reproductiva asexual típica de los oomycetes

**Etiolación:** Es el crecimiento alargado y delgado de una planta como resultado de la falta de luz o el crecimiento en completa oscuridad.

**Escala de severidad:** Estimaciones visuales de la intensidad de la enfermedad (escalas nominales, ordinales y de razón, etc.)

**Esclerocio (del griego skleron “duro”):** Cuerpo oscuro, duro, resistente a condiciones desfavorables, que puede permanecer en dormancia por períodos largos de tiempo y germinar cuando las condiciones favorables se restablecen. Se forma por agrupamiento y compactación de hifas

**Espora:** Unidad sexual o asexual de hongos, asexual en oomycetos

**Factores de patogenicidad:** Aquellos esenciales para causar enfermedad y están involucrados en las etapas iniciales del ciclo de patogenicidad

**Factores de virulencia:** Cualquier adaptación que le permite al patógeno invadir al hospedante y evadir las defensas del hospedero

**Filodia:** Es la transformación de órganos florales en estructuras como hojas debido a anomalías nutricionales inducidas por fitoplasmas. Reemplazo de órganos reproductivos por vegetativos

**Floema:** componente vascular de las plantas cuya función es conducir la savia elaborada en las hojas hacia abajo y el resto de la planta.

**Grupos de apareamiento:** se designa así a grupos distintivos de un microorganismo que muestran compatibilidad entre sí para cruzarse en el proceso de reproducción sexual.

**Haustorio:** Proyección de la hifa del hongo en el interior de la célula vegetal y funciona en el proceso de nutrición y comunicación del hongo

**Hifa:** estructura cilíndrica que corresponde a la unidad vegetativa de un hongo u oomyceto

**Hiperplasia:** Es una división celular excesiva que causa un crecimiento sobrecrecimiento en los tejidos de las plantas. Este es el caso de agallas, tumores, enación (una excrecencia de una hoja o tallo que a menudo se asocia con una infección viral), proliferación, fasciación y escoba de bruja.

**Hipertrofia:** Crecimiento excesivo de tejido vegetal causado por el agrandamiento anormal de células individuales en un tejido u órgano. Puede ser ocasionada por insectos, ácaros, nematodos y microorganismos patógenos.

**Hipofodio:** Estructura de penetración de algunos hongos en raíz

**Hipoplasia:** Es el subdesarrollo de los tejidos y órganos vegetales debido a la producción de células más pequeñas.

**Holonecrótico:** Células o tejidos vegetales que están completamente muertos.

**Hospedero:** Planta que sostiene y alberga al patógeno durante la interacción

**Humedad relativa:** a una temperatura dada es la cantidad de agua en estado de vapor contenida en la atmósfera expresada como una proporción de la cantidad de agua que saturaría la atmósfera a esa misma temperatura.

**Incidencia:** Numero de muestras con síntomas de enfermedad sobre el número total de muestras expresada en porcentaje



**Inóculo:** Un patógeno o sus partes (esporas, micelio, partículas de virus, etc.) que tienen la capacidad de infectar y colonizar tejido del hospedero, provocándole una enfermedad.

**Inóculo primario:** el inóculo responsable de provocar las primeras infecciones en un cultivo.

**Inóculo secundario:** inóculo generado dentro de un cultivo a partir de lesiones provocadas por inóculo primario

**Intensidad de la enfermedad:** Cantidad de enfermedad presente en una población de plantas

**Manejo integrado:** moderno concepto de combate de plagas cuya premisa es combinar todas aquellas medidas disponibles (químicas, culturales, genéticas, biológicas, etc.) e información sobre los ciclos de vida de las plagas y su interacción con el medio ambiente con el propósito de combatirlas en la forma más eficiente posible y al más bajo costo ambiental y económico posible.

**Micelio:** Parte vegetativa del hongo constituido por un conjunto de hifas

**Microorganismo:** cualquier organismo cuyo tamaño es tan pequeño que sólo es visible a través del aumento de los microscopios.

**Microorganismo saprofito:** Organismo que coloniza tejido vegetal muerto y sacar sus nutrientes de él

**Microscópico:** se refiere a cualquier organismo y/o partícula de tamaño tan pequeño que sólo puede ser visibilizado a través del aumento brindado por microscopios.

**Necrosis:** Es la muerte de una parte claramente delimitada de una planta o parte de un tejido.

**Patógeno:** Organismo que puede causar enfermedad en la planta

**Patógeno biotrofo:** Aquel que infecta plantas vivas y mantiene su hospedero vivo para su sobrevivencia

**Patógeno hemibiotrofo:** Aquel que en las fases iniciales del ciclo de patogénesis es biotrofo posteriormente necrotrofo

**Patógeno necrotrofo:** Aquel que infecta plantas vivas y la empieza a matar desde las primeras fases del ciclo de infección

**Patogenicidad:** La capacidad de un organismo para infectar el hospedero y causar enfermedad

**Patogénesis:** Los mecanismos biológicos que lideran el proceso de enfermedad

**Planta enferma:** Aquella que tiene una o más de las funciones fisiológicas están alteradas y su productividad esta disminuida como consecuencia de la infección de un patógeno

**Prevalencia:** Incidencia de campos con plantas enfermas en un área geográfica definida

**Priming:** fenómeno a través del cual una señal de estrés biótico o abiótico transitorio conduce a respuestas de defensa modificadas (normalmente más rápidas o más fuertes) tras la exposición a un estrés recurrente. Descrito para inmunidad y para respuestas a diversos estreses abióticos

**Plesionecrótico:** Tejidos casi muertos, como la zona circundante entre necrótico y el tejido sano de una mancha foliar por hongos.

**Resistencia:** Habilidad del hospedero para excluir o superar completamente o en algún grado el efecto de un patógeno

**Resistencia cuantitativa:** Suma aditiva de genes de resistencia

**Resistencia cualitativa:** Resistencia de algunos cultivares o variantes a razas o patovares del patógeno

**Rizomorfo** (del griego rhiza “raíz”+ morphe “forma”): hebra gruesa constituida por hifas que han perdido su individualidad organizándose como una unidad con función de resistencia

**Sarna:** numerosas zonas elevadas, rugosas, con márgenes irregulares, en la superficie de órganos tales como frutos, tubérculos

**Severidad:** Área de unidad muestreada afectada por la enfermedad sobre área total

**Signo:** Evidencia física de la presencia del patógeno. Ejemplo: el patógeno, una de sus partes o producto de la infección como micelio, conidia, masa de esporas, pústula, esclerocio etc

**Síntoma:** Reacción visible de una planta a la enfermedad o alteración la cual puede ser localizada o generalizada. Ejemplos: Manchas necróticas, cancro, marchitamiento, tizón etc

**Susceptibilidad:** Inhabilidad del hospedero para reconocer el patógeno y activar los mecanismos de defensa

**Tamo:** Se usa para describir, en el caso de Tizón tardío, las masas de esporangios de apariencia aterciopelada visibles en el borde de las lesiones esporulantes temprano por la mañana.

**Tolerancia:** Capacidad de las plantas para producir una buena cosecha aun cuando estuviera infectada por un patógeno

**Toxina:** Metabolito microbiano que a muy bajas concentraciones causa daño en las plantas

**Variegación:** La aparición de diferentes zonas coloreadas en hojas, tallos, frutos o flores. Por lo tanto, una planta variegada aparecería de dos tonos o multitonal.

**Virulencia:** El grado de patogenicidad

**Xilema:** componente vascular de las plantas cuya función es conducir la savia bruta (agua, minerales y hormonas) desde las raíces hacia la parte aérea de la planta.

**Zoosporas:** una espora producida asexualmente y que característicamente tiene capacidad de nadar. Al germinar puede infectar y colonizar el tejido del hospedero provocando la enfermedad.

## 9. Bibliografía

1. Agrios, G.N. (2005). Fitopatología, p. 952, México: Limusa.
2. Aguilera, P., Ruíz-Tachiquín, M.E., Rocha, M., Pineda, B., Chanez, ME. (2014). PCR en tiempo real. In book: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Edition: Primer Chapter: PCR en tiempo real. Publisher: Instituto Nacional de Ecología Editors: Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Roche Munive. SEMARNAT, México, 274 pp.
3. Alvarado-Capó, Y., Leiva-Mora, M., Dita Rodríguez, MA., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Portal, N., Kosky, R.G., García, L.R., Bermúdez-Caraballoso, I., Padrón-Montesino, J. (2003). Early evaluation of blackleaf streak resistance on *Musa* spp breeding programme by the use mycelium suspension of *Mycosphaerella fijiensis* En: Jacome, L. (Ed.) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana: present status and outlook. Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José Costa Rica. INIBAP. Montpellier.
4. Arguedas. (2008). Clasificación de síntomas de enfermedades forestales. Segunda parte- Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 5 (15).
5. Bailey, B. A., Evans, H. C., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2018). *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. Molecular plant pathology, 19(7), 1580–1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
6. Been, T.H. & Schomaker, C. H. (2006). Distribution patterns and sampling in Perry, R. N and Moens, M. (2006). Plant Nematology. Wageninge University and Research Centre. Pp: 302 – 326. <https://doi.org/10.1079/9781845930561.0302>
7. Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G., & Kubista, M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. Nucleic acids research, 31(8), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/gng045>
8. Bock, C. H., Chiang, K. S., & Del Ponte, E. M.(2016). Accuracy of plant specimen disease severity estimates: Concepts, history, methods, ramifications and challenges for the future. CABI Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour. 11, 1-13.

9. Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33.
10. Bos, L. (1981). Hundred years of Koch's Postulates and the history of etiology in plant virus research. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 87, 91-110  
<https://doi.org/10.1007/BF01976645>
11. Brito, M. (2010). Sintomatología y etiología. Universidad Central de Venezuela, Catedra de Fitopatología Protección Vegetal III. Disponible en:  
[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/CLASE\\_2\\_SINTOMATOLOGIA\\_Y\\_ETIOLOGIA.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/CLASE_2_SINTOMATOLOGIA_Y_ETIOLOGIA.pdf)
12. Buja, I., Sabella, E., Monteduro, A. G., Chiriaco, M. S., De Bellis, L., Luvisi, A., & Maruccio, G. (2021). Advances in Plant Disease Detection and Monitoring: From Traditional Assays to In-Field Diagnostics. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(6), 2129.  
<https://doi.org/10.3390/s21062129>
13. Burbano – Figueroa, O. (2020). Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Revista Argentina de Microbiología*, 52 (3), 242 – 245.
14. Carneiro, R. M. D. G., Lima, F. S. D. O., & Correia, V. R. (2017). Methods and Tools Currently Used for the Identification of Plant Parasitic Nematodes. En M. M. Shah & M. Mahamood (Eds.), *Nematology—Concepts, Diagnosis and Control*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.69403>
15. Carta, L. K., & Li, S. (2018). Improved 18S small subunit rDNA primers for problematic nematode amplification. *Journal of nematology*, 50(4), 533-542.  
<https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-051>
16. Chauhan, K., Kim, D. M., Cho, E., & Kim, D. E. (2023). Facilitation of Dye-Based Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction with Poly(ethylene glycol)-Engrafted Graphene Oxide. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(8), 1348.  
<https://doi.org/10.3390/nano13081348>
17. Chelston, B. (1981). An introduction to the diagnosis of plant disease. IICA, serie de libros y materiales educativos. San José, Costa Rica, pp, 47
18. Clifford, B., & Taylor, R. (2008). Bioestadística. Pearson Educación. México D.F
19. Cuervo, Y., Espadas, M., & de Los Ángeles, G. Fitopatología. Manual de Prácticas de Ingeniería Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México, pp, 88.

20. Curvelo, L., & Rojas, J. (2010). Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas. Trabajo presentado como requisito de grado para optar el título de Microbiólogo. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
21. Custódio, A. A. D. P., Pozza, E. A., Guimarães, S. D. S. C., Koshikumo, É. S. M., Hoyos, J. M. A., & Souza, P. E. D. (2011). Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1067-1076. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600005>
22. De Wolf, E. D., & Isard, S. A. (2007). Disease cycle approach to plant disease prediction. *Annual review of phytopathology*, 45, 203-220. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143329>
23. Del Ponte, E. M., Pethybridge, S. J., Bock, C. H., Michereff, S. J., Machado, F. J., & Spolti, P. (2017). Standard Area Diagrams for Aiding Severity Estimation: Scientometrics, Pathosystems, and Methodological Trends in the Last 25 Years. *Phytopathology*®, 107(10), 1161-1174. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0069-FI>
24. Durairaj, K., Velmurugan, P., Vedhanayakisri, K. A., Chang, W.-S., Senthilkumar, P., Choi, K.-M., Lee, J.-H., & Oh, B.-T. (2019). Reprint of “Molecular and phenotypic characterization of pathogenic fungal strains isolated from ginseng root rot”. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 105, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.11.005>
25. Fang, F., Guo, H., Zhao, A., Li, T., Liao, H., Deng, X., Xu, M., & Zheng, Z. (2021). A Significantly High Abundance of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in Citrus Fruit Pith: in planta Transcriptome and Anatomical Analyses. *Frontiers in microbiology*, 12, 681251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.681251>
26. Ferriol, X., Paredes, C., Hernández, L., & Pantoja, M. (2016). Los fitoplasmas características generales y sintomatología que producen en las plantas. *CitriFrut*, 33(1), 27-36.
27. Firrao, G., Gibb, K., & Streten, C. (2005). Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus phytoplasma*'. *Journal of Plant Pathology* 87(4), 243-263.



28. Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 126–139.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
29. Gergerich. (2007). Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible. The Plant Health Instructor. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0122-01>
30. Ghignone, S., & Migheli, Q. (2005). The Database of PCR Primers for Phytopathogenic Fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 113(1), 107-109.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-005-0652-y>
31. Goldsmith F. B., Harrison, C. M., & Morton, A. J. (1986). Description and analysis of vegetation. Pp 437-523 en. Moore, P.D & Chapman, S.B. (eds.). *Methods in plant ecology*. Blackwell Scientific Publications. New York
32. González, L. C. (1981). Introducción a la fitopatología. Instituto Interamericano de Cooperación para agricultura. San Jose, Costa Rica. Disponible en:  
<https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/16538/BVE21058448e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
33. González, R., Avella, A & Díaz, J. E. (2015). Plataformas de monitoreo para vegetación: Toma y análisis de datos. In book: Monitoreo a procesos de restauración ecológica: aplicado a ecosistemas terrestres (pp.87-107). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt
34. González-Garza, R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 591-610.
35. Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., & Madiraju, C. (2023). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2612, 1–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2903-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2903-1_1)
36. Hernández-Ochandia, D., Rodríguez Hernández, M. G., Miranda-Cabrera, I., & Holgado, R. (2016). Métodos para la extracción de nematodos presentes en suelos del agrupamiento Ferralítico en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 31(3), 228-232
37. Huanca, S. (2013). Diagnostico e identificación de agentes fitopatógenos causantes de enfermedades en el duraznero en los valles bajos del municipio de Mocomoco. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Mayor de San Andrés, La paz – Bolivia.

38. Huang, G & Chen, P. Protocolo de diagnóstico de Huanglongbing en hojas de cítricos. OIRSA. San Salvador, El Salvador. Pp, 36.
39. Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., De Farias, A. R. G., Bhunjun, C. S., Fernandez, H. S., Manamgoda, D. S., Udayanga, D., Herath, I. S., Thambugala, K. M., Manawasinghe, I. S., Gajanayake, A. J., Samarakoon, B. C., Bundhun, D., Gomdola, D., Huanraluek, N., Sun, Y., Tang, X., Promputtha, I., & Thines, M. (2021). What is a species in fungal plant pathogens? *Fungal Diversity*, 109(1), 239-266. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00484-8>
40. Johnson, E. S., Rutherford, M. A., Edgington, S., Flood, J., Crozier, J., Cafá, G., Buddie, A. G., Offord, L., Elliott, S. M., & Christie, K. V. (2017). First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot on *Theobroma cacao* in Jamaica. *New Disease Reports*, 36(1), 2-2. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.036.002>
41. Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023). Polymerase Chain Reaction (PCR). In StatPearls. StatPearls Publishing.
42. Krug, J. C., Mueller, G. M., Bills, G., & Foster, M. S. (2004). Moisture chambers for the development of fungi. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S (eds), *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier, Amsterdam, pp, 589 – 593.
43. Lenz, G., Costa, I. D. D., Balardin, R. S., Marques, L. N., Arrué, A., Stefanelo, M. S., & Zemolin, C. R. (2009). Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha de isariopsis da videira. *Ciência Rural*, 39(8), 2301-2308. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000800005>
44. Life technologies. (2012). Real time PCR handbook. On line in: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
45. López-Jacóme, LE., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, CA., Ortega-Peña, S., Cerón, G., & Franco, R. (2013). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3 (1), 10 – 18.
46. Mancini, V., Murolo, S., & Romanazzi, G. (2016). Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. *Plant Pathology*, 65 (5), 691 – 703. <https://doi.org/10.1111/ppa.12515>
47. Martínez, G., Sarria, G., Torres, G., Aya, H., Ariza, J., & Rodríguez, J. (2008). *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 29, 31-41

48. Mauck, K. E., Sun, P., Meduri, V. R., & Hansen, A. K. (2019). New *Ca. Liberibacter* psyllaorous haplotype resurrected from a 49-year-old specimen of *Solanum umbelliferum*: a native host of the psyllid vector. *Scientific reports*, 9(1), 9530. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45975-6>
49. Mendiburu F. 2005. Estadística Aplicada a la FORESTERIA II. Universidad Nacional Agraria. México D.F.
50. Merga, W. (2018). Measuring and Analysis of Plant Diseases. *International Journal of Research Studies in Agricultura Sciences*. 4, 12, 1 – 8.
51. Meshram, S., Kumar, S., & Srivashtav, V. (2018). Primers in Plant Pathology Bonanza for Plant Disease Diagnosis. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 4886 – 4904.
52. Miller, S. A., Beed, F. D., & Harmon, C. L. (2009). Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annual review of phytopathology*, 47, 15–38. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081743>
53. Mirmajlessi, S. M., Destefanis, M., Gottsberger, R. A., Mänd, M., & Loit, E. (2015). PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: a systematic review. *Systematic reviews*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-9>
54. Mohamed, A. A., Behiry, S. I., Younes, H. A., Ashmawy, N. A., Salem, M. Z. M., Márquez-Molina, O., & Barbabosa-Pilego, A. (2019). Antibacterial activity of three essential oils and some monoterpenes against *Ralstonia solanacearum* phylotype II isolated from potato. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103604. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103604>
55. Molina, J. (2010). Aislamiento y caracterización de hongos patógenos presentes en lulo, tomate de árbol y mora de castilla potencialmente patógenos para los cultivos de gúlua (*Pasiflora edulis* var. *edulis* sims.). Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de microbióloga agrícola y veterinaria. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
56. Mora, A.G., Rivas, V.P., Góngora, C.C., Tovar, S.A., Cristóbal, A.J., Loeza, K.E., Michereff, J.S., Marinelli, A., & Osada, V.K. (2000). Sistemas computarizados en la epidemiología: 2-Log ver. 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas

- logarítmicas. XXIX Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Puerto Vallarta, México.
57. Mostacedo, B., & Fredericksen, T. S. (2000). Manual de Monitoreo a procesos de restauración ecológica aplicado a ecosistemas terrestres métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal. Santa Cruz de la Sierra.
  58. Patel, R., Mitra, B., Vinchurkar, M., Adami, A., Patkar, R., Giacomozzi, F., Lorenzelli, L., & Baghini, M. S. (2022). A review of recent advances in plant-pathogen detection systems. *Heliyon*, 8(12), e11855. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11855>
  59. Pedraza Herrera, L. A., Sánchez, F., Arias Avila, V., Moreno, M. F., & Sánchez Leal, L. C. (2022). Enfermedades emergentes y reemergentes de plantas en Latinoamérica: Una revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 13(2), 15-51. <https://doi.org/10.22490/21456453.4639>
  60. Pérez-López, E., Luna-Rodríguez, M., Olivier, C. Y., & Dumonceaux, T. J. (2016). The underestimated diversity of Phytoplasmas in Latin America. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(1), 492–513. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000726>
  61. Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J., & Day, M. J. (2004). Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of immunological methods*, 286(1-2), 203–217. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.01.003>
  62. Piedra, R. (2015). Guía de muestreo de nematodos fitoparásitos en cultivos agrícolas. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA – Costa Rica). Disponible en: <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H10-10789.PDF>
  63. PM 7/027 (2) *Puccinia horiana*. (2020). *EPPO Bulletin*, 50(2), 207-216. <https://doi.org/10.1111/epp.12658>
  64. Poletto, T., Muniz, M., Lucio, A. D., Fantinel, V. S., Heldwein, A. B., Reiniger, L., & Blume, E. (2020). Diagrammatic scale for quantifying severity of brown leaf spot on *Carya illinoensis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 92(suppl 1), e20180889. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180889>
  65. Radford A. J. (1983). Comparisons using 35S- and 32P-labeled DNA for hybridization on nitrocellulose filters. *Analytical biochemistry*, 134(2), 269–271. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90296-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90296-8)

66. Raghavendran, C. V., Bheema, R., Mahaboob, S. K., & Mani, T. R. (2023). Bibliometric Analysis on Identifying Plant, Crop Diseases Using Machine Learning and Deep Learning. In Book: Recent Developments in Electronics and Communication Systems. KVS. Ramachandra Murthy et al. (Eds).
67. Rihne, T., Namita, Singh, K. P., Singh, M. K., & Talukdar, A. (2021). Improvement in molecular detection of phytoplasma associated with rose by selection of suitable primers and development of a multiplex PCR assay. 3 Biotech, 11(4), 190. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02713-y>
68. Riley, M.B., Williamson, M.R., & Maloy, O. (2002). Plant disease diagnosis. Spanish translation by José Carlos Ureta R., 2016. The Plant Health Instructor. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1021-01>
69. Rivera, M. C., & Wright, E. R. (2020). Apuntes de la Patología Vegetal.: Fundamentos y prácticas para la salud de las plantas. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Disponible en: [https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/apuntes\\_de\\_patologia\\_vegetal\\_0.pdf](https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/apuntes_de_patologia_vegetal_0.pdf)
70. Rivers T. M. (1937). Viruses and Koch's Postulates. Journal of bacteriology, 33(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/jb.33.1.1-12.1937>
71. Roossinck M. J. (2010). Lifestyles of plant viruses. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 365(1548), 1899–1905.
72. Sastry, K.S. (2013). Diagnosis and Detection of Plant Virus and Viroid Diseases. In: Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6524-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6524-5_5)
73. Scala, V., Pucci, N., & Loreti, S. (2018). The diagnosis of plant pathogenic bacteria: a state of art. Frontiers in bioscience (Elite edition), 10(3), 449–460. <https://doi.org/10.2741/e832>
74. Schaad, N. W. (1987). Use of Selective Agar Media in Diagnosis of Plant Diseases Caused by Bacteria. En E. L. Civerolo, A. Collmer, R. E. Davis, & A. G. Gillaspie (Eds.), Plant Pathogenic Bacteria (Vol. 4, pp. 818-820). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-3555-6\\_177](https://doi.org/10.1007/978-94-009-3555-6_177)
75. Schmidt S. J. (2005). Econometría. Mc Graw Hill. México D. F
76. Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., & Foster, G. D. (2011).

- Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 12(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
77. Schubert, T. S., Breman, L. L., & Walker, S. E. (1999). Basic concepts of plant disease and collect a sample for disease diagnosis. *Plant Pathology Circular No 3025*. Disponible en: <https://ccmedia.fda.gov/content/download/11313/file/pp307.pdf>
  78. Schuck, S., Weinhold, A., Luu, V. T., & Baldwin, I. T. (2014). Isolating fungal pathogens from a dynamic disease outbreak in a native plant population to establish plant-pathogen bioassays for the ecological model plant *Nicotiana attenuata*. *PloS one*, 9(7), e102915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102915>
  79. Serrano-Cumplido, A., Ruiz Garcia, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19 [Application of the PCR number of cycle threshold value (Ct) in COVID-19]. *Semergen*, 47(5), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2021.05.003>
  80. Shao, H., Zhang, P., Peng, D., Huang, W., Kong, L. A., Li, C., Liu, E., & Peng, H. (2023). Current advances in the identification of plant nematode diseases: From lab assays to in-field diagnostics. *Frontiers in plant science*, 14, 1106784. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1106784>
  81. Sicard, A. (2014). Fonctionnement des populations de virus multipartites de plantes au cours des différentes étapes de leur cycle de vie [Theses]. <https://hal.inrae.fr/tel-02801967>
  82. Simko, I., & Piepho, H. P. (2012). The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. *Phytopathology*, 102(4), 381–389. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0216>
  83. Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., & Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and environmental microbiology*, 62(8), 2988–2993. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2988-2993.1996>
  84. Trigiano, R. N., Windham, M. T., & Windham, A. S. (Eds.). (2008). *Plant pathology concepts and laboratory exercises* (2nd ed). CRC Press.

85. Universidad de Georgia. How to methods – making a moist chamber – Plant pathology. Disponible en: <http://plantpath.caes.uga.edu/content>
86. Universidad Nacional del Altiplano Puno Perú, Lima-Medina, I., Bravo, R. Y., Universidad Nacional del Altiplano Puno Perú, Aguilar-Gómez, M. I., & Universidad Nacional del Altiplano Puno Perú. (2018). Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de Maíz (*Zea mais* L.) en las regiones de Puno y Cusco. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 20(1), 31-38. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.328>
87. Van Der Heyden, H., Dutilleul, P., Charron, J.-B., Bilodeau, G. J., & Carisse, O. (2021). Monitoring airborne inoculum for improved plant disease management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41(3), 40. <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00694-z>
88. Varón Devia, E. H., Vargas Berdugo, Á. M., Rodríguez Polanco, E., Pérez Artiles, L., Guarín Molina, J. H., Kondo Rodríguez, D. T., Flórez Cárdenas, C. M., Bermeo Fúquene, P. A., & Rico Sierra, E. M. (2020). Métodos de detección de HLB y de monitoreo y control biológico del vector *Diaphorina citri* en cultivos de cítricos en el Tolima (Primera). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia)*. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.institutional.7403565>
89. Venbrux, M., Crauwels, S., & Rediers, H. (2023). Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Frontiers in plant science*, 14, 1120968. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>
90. Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115
91. Wagaba, H., Beyene, G., Trembley, C., Alicai, T., Fauquet, C. M., & Taylor, N. J. (2013). Efficient transmission of Cassava brown streak disease viral pathogens by chip bud grafting. *BMC Research Notes*, 6(1), 516. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-516>
92. Wang, Q., Sun, M., Zhang, Y., Song, Z., Zhang, S., Zhang, Q., Xu, J. R., & Liu, H. (2020). Extensive chromosomal rearrangements and rapid evolution of novel effector superfamilies contribute to host adaptation and speciation in the basal ascomycetous fungi. *Molecular plant pathology*, 21(3), 330–348. <https://doi.org/10.1111/mpp.12899>
93. Wang, S. (2021). *Diagnosing Hemp and Cannabis Crop Diseases*. CABI. Nevada Department of Agriculture, USA



94. Yadav, N., & Khurana, S. M. P. (2016). Plant Virus Detection and Diagnosis: Progress and Challenges. *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology*, 97–132. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2610-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2610-9_7)
95. Zhang, S., Zheng, Q., Xu, B., & Liu, J. (2019). Identification of the Fungal Pathogens of Postharvest Disease on Peach Fruits and the Control Mechanisms of *Bacillus subtilis* JK-14. *Toxins*, 11(6), 322. <https://doi.org/10.3390/toxins11060322>



