

OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS SEROLÓGICOS PARA LA DETECCIÓN DE *Ralstonia solanacearum* (SMITH) YABUUCHI

Elba Álvarez*, Aleika Iglesia*, A. García** y Elizabet Blanco**

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de la Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: elba@censa.edu.cu; **Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Ayuntamiento # 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución. Ciudad de La Habana. Cuba

RESUMEN: La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, afecta a varios cultivos económicamente importantes. El manejo seguro de esta enfermedad depende del diagnóstico preciso y temprano. El objetivo del presente trabajo fue la optimización de métodos serológicos para la detección de *R. solanacearum*. Se obtuvieron anticuerpos policlonales para ser utilizados en las técnicas serológicas. Se determinó la sensibilidad y especificidad de los métodos. El límite de detección fue desde 10^4 a 10^6 UFC/mL para los extractos de plantas y tubérculos mediante el sistema ultramicroanalítico (SUMA), DAS-ELISA, DOT-BLOT, aglutinación con partículas látex e inmunofluorescencia. Cuando las muestras fueron previamente incubadas en caldo SMSA, antes de ser evaluadas, se incrementó la detectabilidad, siendo tan baja como 10^2 UFC/mL. Los aislados pertenecientes a los biovars 1 y 2 fueron detectados adecuadamente por estas técnicas. No se observó la presencia de reacciones cruzadas con otros géneros y especies de bacterias estudiadas. Los parámetros analíticos para las técnicas serológicas fueron superiores al 90%.

(Palabras clave: marchitez bacteriana; *Ralstonia solanacearum*; sistema ultramicroanalítico; ELISA; DOT-BLOT; aglutinación con látex; inmunofluorescencia)

OPTIMIZATION OF THE SEROLOGIC METHODS FOR THE DETECTION OF *Ralstonia solanacearum* (SMITH) YABUUCHI

ABSTRACT: The bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, affects various economically important crops. A successful disease management depends on the precise and early diagnostic. The objective of the present work was to optimize the serologic methods to detect *R. solanacearum*. Antibody polyclonal was obtained for being used in the serological techniques. The sensitivity and specificity of methods were determined. The detection limit was from 10^4 to 10^6 CFU/mL detected in plant extracts and tubercles by ultramicroanalytic system, ELISA, DOT-BLOT, latex agglutination and immunofluorescence. When the sample was first incubated in SMSA broth prior testing, the sensitivity of pathogen detection used was as low as 10^2 CFU/ml. *R. solanacearum* isolates belonging to biovars 1 and 2 were successfully detected with this technique. No cross-reactions was obtained with other genera and bacteria species studied. The analytical parameters to serology tests were estimated above 90%.

(Key words: bacterial wilt; *Ralstonia solanacearum*; ultramicroanalytic system; ELISA; DOT-BLOT; latex agglutination; immunofluorescence)

INTRODUCCIÓN

La marchitez bacteriana es una enfermedad provocada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Esta bacteria está distribuida por todo el mundo

y tiene un amplio rango de hospedantes con variaciones fenotípicas y genotípicas, representando una grave amenaza para las producciones. Cuando esta bacteria se instala en un país o región, las posibilidades de diseminación son múltiples (suelo infectado,

aguas, labores culturales, etc.), ya que es un patógeno de suelo y persiste en él por muchos años aún sin el hospedante específico (1,18). Es importante considerar el origen de las semillas portadoras de las primeras infecciones para aplicar las medidas fitosanitarias (3).

Entre los aspectos más importante en relación con esta enfermedad se encuentra el diagnóstico y detección del agente causal, para ello se usan técnicas serológicas y enzimáticas (ELISA), Inmunofluorescencia e Inmuncaptura que detectan bajas concentraciones de *R. solanacearum* y son recomendadas para el diagnóstico (8, 9,13). La sensibilidad de estos métodos puede ser superior con el uso de medios selectivos y precultivo de las muestras en los mismos. Estas técnicas son utilizadas como componentes importantes en los estudios epidemiológicos de la marchitez bacteriana con un costo razonable (3,12).

En nuestro país la enfermedad es cuarentenada (4), pero se presentan las condiciones propicias de humedad y temperatura para el desarrollo y sobrevivencia de esta bacteria. Actualmente la padecen todas las islas del Caribe y países del continente Americano, provocando grandes daños anualmente en la cosecha o dejando tierras sin poder ser utilizadas por estar contaminadas. También afecta a otros países con los que mantenemos relaciones económicas y de intercambio de semillas. Por la amenaza potencial que esta enfermedad representa nos propusimos como objetivo desarrollar un sistema de diagnóstico para ser utilizado en su vigilancia y prevención.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas: Las cepas de *R. solanacearum* utilizadas como controles positivos proceden del Laboratorio Central de Cuarentena de Cuba, todas pertenecen a la raza 1 y son las siguientes: cepa 2623 biovar 1 aislada de tomate y donada por EMBRAPA-CENARGEN (Brasil) en forma no viable, M-4 biovar 2 aislada de papa de una intersección, cepa 6 biovar 1 aislada de papa procedente del Ecuador. Todas estas cepas excluyendo la 2623, se cultivaron en los medio descritos SPA y 523 (14). A las 48 horas de crecimiento los cultivos se concentraron por centrifugación a 3000 rpm y se lavaron con solución salina. Las células se inactivaron con solución de formaldehído al 0.3% toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados en solución salina y mediante densidad óptica a una longitud de onda de 640 nm se ajustó a una concentración final de 1×10^8 UFC/mL.

Como controles negativos se utilizaron las siguientes cepas del cepario del Laboratorio de Fitobacteriología del CENSA: *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium chrysanthem*, *Ralstonia syzygii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris pv. vasculorum*.

Obtención de anticuerpos: Se obtuvieron anticuerpos policlonales en conejos Chinchillas con 2,5 kg de peso contra las tres cepas de *R. solanacearum* en estudio, se utilizó un esquema de inmunización que combinó la inoculación intramuscular con la subcutánea. Para determinar el título de anticuerpos se utilizó la técnica de inmunodifusión doble en láminas de agarosa (13).

Optimización de las pruebas serológicas: ELISA, SUMA y DOT-BLOT

Para la optimización de las pruebas enzimáticas se purificaron las IgG anti-*Ralstonia solanacearum* mediante cromatografía de afinidad con una columna de proteína A, para obtener el conjugado específico la IgG se marcó con fosfatasa alcalina (SIGMA) según procedimiento descrito (11). Se determinó la dilución óptima del conjugado evaluándose diluciones desde 1:500 hasta 1:1500 y para el anticuerpo el rango de diluciones evaluadas fueron de 1:5000 hasta 1:8000. La detectabilidad analítica se determinó mediante un análisis de correlación entre los valores obtenidos para el control positivo y el control negativo a diferentes concentraciones (desde 10^1 – 10^7 UFC/mL). Para las pruebas de ELISA y SUMA se estableció el valor límite para el control positivo dado por dos desviaciones estándar sobre la media del control negativo.

Se realizó la estandarización del DOT- BLOT indirecto con el uso del antisuero policlonal obtenido anti-*R. solanacearum* evaluándose las diluciones desde 1: 200 hasta 1:1000 y el conjugado anti- conejo 1:500 hasta 1:1500. Para el DOT-BLOT directo se empleó el mismo conjugado específico utilizado para el ELISA donde se evaluaron diluciones desde 1:300 hasta 1:2000 y del antisuero 1:200 hasta 1:1000. La positividad estuvo dada por la presencia de manchas con coloración desde azul a morada bien definida, la negatividad por la no presencia de color o manchas de color verde por los extractos de las plantas o de color carmelita. Después de optimizado el protocolo para ELISA y DOT-BLOT se determinó la especificidad analítica frente a las cepas referidas anteriormente como controles negativos a concentración de 10^7 UFC/mL.

Obtención del conjugado látex globulina.

Sensibilización de las partículas de látex: Se utilizaron partículas de látex de 0.78 μm de diámetro (suministradas por la casa BANGS LAB). La suspensión al 30% de las partículas de látex se diluyó al 10 % en buffer glicina-salina (GBS) pH 8.4, y se unió con las diferentes diluciones de cada una de las IgG obtenidas anti- *R. solanacearum* según esquema propuesto (2) se adicionó ázida sódica como preservativo y se conservó a 4°C.

Se determinó la dilución óptima de las inmunoglobulinas unidas al látex por evaluación frente a diferentes concentraciones de *R. solanacearum*, (10^2 a 10^8 UFC/mL), se seleccionó la mayor dilución que detectó una menor concentración de la bacteria. Se determinó la especificidad analítica frente a las mismas bacterias utilizadas como controles negativos a una concentración de 10^7 UFC/mL. Se utilizaron tampón glicina y solución salina como controles negativos, así como un conjugado látex-inmunoglobulina acoplado con la IgG de conejo no inmunizado. Los controles positivos se elaboraron con células de *R. solanacearum* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL inactivadas por calor y conteniendo azida zódica al 0,1 % como preservativo.

Control negativo: Se realizó la conjugación de partículas de látex con gammaglobulina procedente de un conejo no inmunizado a la misma concentración de proteína a la cual se utilizaron las gammaglobulinas correspondientes a los animales inmunizados.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La inmunofluorescencia indirecta se realizó según se describe (8). El anticuerpo policlonal obtenido en el presente trabajo, fue usado como primer anticuerpo a una diluciones de 1600, 3200 y 6400. El segundo anticuerpo anti-conejo marcado con fluoresceína procedente de la SIGMA fue usado en diluciones de 1:100, 1:200 y 1:400, las láminas conteniendo las células teñidas se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop) con el objetivo de 100. Se utilizaron los mismos controles positivos y negativos referidos para las demás técnicas serológicas.

Evaluación de las técnicas serológicas.

Para determinar si existía interferencia de las técnicas con los extractos de plantas todas ellas una vez optimizadas se evaluaron frente a los siguientes extractos: tomate (tallo y hojas), tubérculo de papa, pimiento (tallo y hojas), tabaco (tallo y hojas), procedentes de plantas sanas y contaminadas artificialmente con *R. solanacearum* a concentracio-

nes desde 10^2 hasta 10^6 UFC/ml. Se tomaron cinco muestras de hojas y tallos contaminados, se pesaron 10 gramos, se maceraron en morteros estériles, se le añadió 90 mL tampón fosfato (PBS) manteniéndose en agitación durante 30 min. a temperatura de 26-28°C, se tomó el sobrenadante y se repartió a razón de 500 μL para realizar las diferentes pruebas serológicas directamente de la muestra. Para los bioensayos serológicos se tomaron 500 μL del extracto con el mismo volumen del caldo SMSA según se describe (12). Se incubaron durante 48 h a 30°C con agitación constante y se realizaron las pruebas serológicas ELISA-DAS, SUMA, látex e IFI. Las muestras también fueron sembradas en medio SPA y TTC preparados según se refiere (14) para el conteo de la bacteria como técnica de referencia. Para los controles negativos se utilizaron: *Pectobacterium chrysanthem*, *Ralstonia syzygii* y extractos de tallos sanos. Las muestras positivas y negativas para el SUMA y el ELISA se determinaron mediante punto de corte dado por (X sanos+2S) a partir de los controles sanos incluidos en el ensayo. Las muestras de extractos directos y de medio preenriquecido fueron analizadas por duplicado, al igual que con la técnica de aglutinación con partículas látex anti-globulina *R. solanacearum*. Una vez estandarizados los métodos se procedió a la evaluación de los parámetros de desempeño se utilizaron 365 muestras de tubérculos de papa de ellas 260 positivas corroboradas por cultivo en medio TTC (14) y 105 negativas.

RESULTADOS

El inmunosuero obtenido a partir de la cepa 2623 frente a su antígeno homólogo mostró títulos de anticuerpos de 1/128 por agar gel difusión, y mantuvo el mismo título frente a antígenos correspondiente a las cepas 6 del Ecuador biovar 1 y M-4 biovar 2.

En la optimización del ELISA, el análisis estadístico mostró diferencia significativa en las concentraciones de los reactantes para ($p < 0.001$). La concentración adecuada de IgG fue de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una dilución de 1:6000 y para el conjugado la dilución de 1:800, la concentración adecuada del antígeno para el control positivo fue de 10^5 UFC/mL. Este sistema puede detectar la bacteria hasta el orden de 10^2 a 10^4 UFC/mL con el uso de medio preenriquecido y directamente del extracto del tallo, respectivamente (Tabla 1). No se observó la presencia de reacciones inespecíficas con las demás especies y géneros de bacterias usadas como controles negativos, excepto con la especie *R. syzygii*, donde los valores de fluorescencia para el SUMA y las densidades ópticas para el ELISA estuvieron muy cerca al punto de corte cuan-

do no se utilizó medio enriquecido. Los parámetros de desempeño diagnóstico frente a extractos de tubérculos de papas enfermos y sanos se muestran en la Tabla 2.

TABLA 1. Detectabilidad analítica para las técnicas enzimáticas evaluadas./ *Analytical detection of the enzymatic techniques evaluated*

| Prueba | <i>Ralstonia solanacearum</i> Concentración UFC/mL | | | | | |
|---------------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 10 ² | 10 ³ | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ |
| ELISA-DAS con medio enriquecido | + | + | + | + | + | + |
| ELISA-DAS sin medio enriquecido | - | - | + | + | + | + |
| SUMA con medio enriquecido | + | + | + | + | + | + |
| SUMA sin medio enriquecido | - | - | + | + | + | + |
| DOT-BLOT con medio enriquecido | + | + | + | + | + | + |
| DOT-BLOT sin medio enriquecido | - | - | - | + | + | + |

DOT-BLOT.

En el DOT-BLOT indirecto la dilución óptima del antisuero de *R. solanacearum* fue de 1:500 y la del conjugado anti-conejo 1:700; el nivel de detección estuvo fue del orden de 10⁶ UFC/mL con el DOT-BLOT directo con conjugado específico la dilución adecuada fue de 1:700 y el antisuero 1:200 para un nivel de detección de 10⁵ UFC/mL (Fig 1). Con el uso del medio enriquecido y preincubación el nivel de detección bajo hasta 10² UFC/mL.

Aglutinación con látex.

El conjugado látex globulina detectó 10⁵ UFC/mL, cuando los conjugados fueron enfrentados a las tres

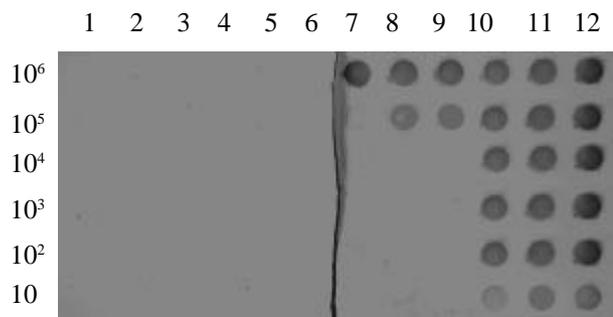


FIGURA 1. Resultados de la detección mediante DOT-BLOT./ *Results of detection by DOT-BLOT.*

Leyenda: 1 *Pectobacterium carotovorum*, 2 *Pectobacterium atrosepticum*, 3 *Pectobacterium chrysanthem*, 4 *Ralstonia solanacearum* cepas 2623, M-4 biovar, cepa 6 respectivamente, 10, 11 y 12 extracto contaminado con las mismas cepas de *Ralstonia solanacearum* después de ser incubado en medio de enriquecimiento.

cepas de *R. solanacearum*, evaluadas independientemente del biovar, no existiendo reacciones cruzadas con las demás bacterias estudiadas como controles negativos. Reconoció a las muestras de tallos de tomate positivas contaminadas artificialmente. La detectabilidad de la bacteria mediante inmunofluorescencia fue del orden de 10⁵ UFC/mL.

DISCUSIÓN

Los antisueros mostraron títulos elevados de anticuerpos contra *R. solanacearum* aspecto fundamental, para la sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas (13, 16). Las pruebas optimizadas detectaron bajas concentraciones de la bacteria en el material contaminado 10⁴-10⁵ UFC/mL. En cuanto al nivel de detección del ELISA los valores informados

TABLA 2. Parámetros diagnósticos para las pruebas serológicas./ *Diagnostic parameters to serology tests*

| MUESTRAS | SUMA | DOT-BLOT | LÁTEX |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Positivas: 260 Negativas: 105 | Vp: 252 Fn: 8 Fp: 7 Vn: 98 | Vp: 250 Fn: 10 Vn: 100 Fp: 5 | Vp: 245 Fn: 15 Vn: 96 Fp: 9 |
| Sensibilidad diagnóstica (D-SN) | 97.2% | 96.1% | 96.4% |
| Especificidad diagnóstica (D-SP) | 93.5% | 95.2% | 91.4% |
| Eficacia (E) | 95.7 % | 95.8% | 93.4% |
| Valor predictivo positivo (VPP) | 97.2 % | 97.7% | 96.4% |
| Valor predictivo negativo (VPN) | 93.5 % | 91.2% | 87.2% |

Leyenda: Vp: Verdaderos positivos, Fn: falsos negativos, Fp: Falsos positivos, Vn: Verdaderos negativos

por otros autores fluctúan en el rango de 10^4 - 10^7 UFC/mL (8, 9, 12,16). La IFI resultó menos sensible que el ELISA, mientras el DOT-BLOT y el látex, resultaron similares. Es de señalar que Caruso *et al.* (3), al realizar una comparación de pruebas serológicas para el diagnóstico de esta enfermedad, encontró que la prueba de ELISA resultó más sensible que la IFI. La prueba IFI presenta la desventaja de la interpretación subjetiva de la morfología de la tinción celular además son frecuentes las reacciones cruzadas producidas por bacterias que comparten antígenos de pared, procedentes del suelo o asociadas a tejidos de la planta, con morfología celular similar a *R. solanacearum*. Las pruebas serológicas son de gran importancia para el diagnóstico, teniendo presente que en ocasiones el aislamiento del patógeno a partir del material vegetal puede fallar en estados avanzados de infección o por presentarse la forma de la bacteria denominada viable no cultivable, donde a pesar de encontrarse la enfermedad no es posible aislar el agente. Por otra parte las bacterias saprofitas que crecen en el tejido enfermo pueden enmascarar o inhibir el patógeno en el medio de aislamiento. La detección del estado latente de la enfermedad también es muy importante (5, 7,14).

Mediante el uso de medio pre-enriquecido se logró aumentar la detectabilidad de los métodos a niveles tan bajos como es el orden de 10^2 UFC/mL. En los últimos años se ha trabajado en la evaluación de medios pre-enriquecidos e incubación directa de las muestras en los mismos para aumentar la eficiencia de las técnicas, ya que permiten la multiplicación de *R. solanacearum* e inhiben las bacterias contaminantes aumentando la sensibilidad y especificidad del método y quizás también diluye los inhibidores potenciales de las pruebas ELISA (12). Pero a pesar de todas estas ventajas tiene el inconveniente de que extiende el tiempo de los resultados de 4 horas, el cual se logra con el montaje de estas técnicas directas del extracto vegetal, hasta 48 horas cuando se usa el enriquecimiento y que en ocasiones no todos los laboratorios disponen de los componentes de los medios de cultivos.

En relación con el diagnóstico mediante aglutinación con partículas látex, los resultados se obtuvieron mucho más rápidos que con las demás técnicas, solo en 5 min mostrando una detectabilidad adecuada. Los métodos de aglutinación rápida con partículas de látex tienen varias ventajas que incluyen: especificidad, sensibilidad y simplicidad pues no requieren de equipos especializados (2), aunque se señala poca estabilidad en el reactivo y una menor sensibilidad en relación a las técnicas moleculares (6). Mediante el uso de técnicas moleculares muchos de estos problemas

pueden ser resueltos (10, 15,17). Sin embargo en la actualidad el diagnóstico serológico sigue siendo una opción adecuada para la detección de la marchitez bacteriana (12, 14,16). Teniendo en cuenta la necesidad de disponer de técnicas rápidas y sencillas. La aglutinación con partículas látex es una buena alternativa, y puede ser utilizada por los laboratorios de sanidad vegetal, contribuyendo así a la vigilancia de esta enfermedad cuarentenada para Cuba.

REFERENCIAS

1. Agrios, G.N. (2000): *Plant Pathology* (4ª ed.) San Diego, Academic Press, p. 803.
2. Álvarez, Elba.; Iglesia, Aleika; Díaz, Maricela y Peralta Ester, Lilia (2005): Detección simultánea y diferencial de los serovares I y III de *Xanthomonas albilineans* mediante aglutinación con látex. *Rev. Protección Veg.* 20(3): 150-154.
3. Caruso, P.; Gorris, M.T.; Cambra, M.; Palomo, J.L.; Collar, J. y López, M.M. (2002): Enrichment double-antibody sandwich indirect enzyme-linked immunosorbent assay that uses a specific monoclonal antibody for sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic potato tubers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3634-3638.
4. Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal (2004). Resolución 335 del 2004. Lista oficial de enfermedades exóticas y cuarentenadas.
5. Durand, M. y Pelletier, G. (2003): Contribution of molecular and cellular biology and genetics to plant protection. *C. R. Biologies.* 326:23-35.
6. Frenck, E.R.; Gutarra, L.; Aley, P. y Helphinstone, J. (1993): Methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato crops. *Bacterial Wilt section 5, International Workshop*, October 11-16: New Dheli, India.
7. Hunter, P.J. y Taylor, J.D. (2006): Patterns of interaction between isolates of three patovar of *Pseudomonas syringae* and accession of range of host and non host species. *Plant Pathol.* 55: 48-53.
8. Janse, J.D. (1988): A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin.* 18: 343-51.
9. Lozada, R. (2001): Detección *Ralstonia solanacearum* en un suelo de uso potencial para la multiplicación de semilla de papa utilizando la

- técnica molecular de PCR. *Trabajo de grado para optar por el título de Magíster en Microbiología*. Bogotá Colombia, págs 2-5: Universidad Javeriana.
10. Olmos, A.; Bertolini, E. y Cambra, M. (2002): Simultaneous and cooperational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *J. Virol. Methods*. 106: 1523.
 11. Peralta, E.L.; Larramendy, R. y Alfonso, R. (1999): Aplicación del sistema ultramicroanalítico (SUMA) al diagnóstico del VMCA por Elisa indirecto. *Rev. Protección Veg.* 8: 277-281.
 12. Priou, S.; Gutarra, L. y Aley P. (2006): An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathol.* 55: 36-45.
 13. Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. y Forde, S.M.D. (1995): Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricult. Immunol.* 7: 67-79.
 14. Schaad, N.W. y Jones, J.B. (2001): *Plant Pathogenic Bacteria. II. Gram negative bacteria*. Third edition. APS PRESS. Pág 151-162.
 15. Schönfeld, J.; Heuer, H.; van, E. y Smalla, K. (2003): Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *J. Appl. Environmen Microbiol.* 69: 7248-56.
 16. Stefanova, Marusia; Basalto, A.; Geraldo, H.N.; Oliveira y Viana, C. (2005): Obtención de antisueros para el diagnóstico de *Pseudomonas syringae*. pv. *tabaci*. *Fitosanidad.* (9): 2.
 17. Yu, Q.; Alvarez, A.M.; Moore, P.H.; Zee, F.; Kim, M.S.; de Silva, A.; Hepperly, P.R. y Ming, R. (2003): Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolate from ginger in Hawaii. *Phytopath.* 93:1124-1130.
 18. Wicker, E.; Grassart, L.; Mian, D.; Coranson, R.; Dufeal, D.; Guilbaud, C y Prior, P. (2002): *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp., new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Bact. Wilt Newsl.* 17: 20-21.

(Recibido 20-7-2007; Aceptado 24-10-2007)

VI SEMINARIO CIENTIFICO INTERNACIONAL DE SANIDAD VEGETAL

En Ciudad de La Habana, Cuba, del 22 al 26 de septiembre del 2008.

Estimados colegas.

El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) y el Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), se complacen en invitarlos al **VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal**, que se celebrará en Ciudad de La Habana-Cuba, del 22 al 26 de septiembre del 2008.

En este seminario de carácter científico-técnico, se crearán las condiciones para el intercambio entre investigadores, especialistas, profesores, estudiantes y trabajadores de extensión agraria en el campo de la Sanidad Vegetal.

Estamos seguros que el alto nivel científico de esta reunión, similar al logrado en Seminarios anteriores, junto a la hospitalidad y belleza de nuestra ciudad, harán de su estancia una fructífera y agradable experiencia.

Para más información del evento
vea las indicaciones en los sitio web
www.inisav.cu y www.censa.edu.cu



CENSA
CENTRO NACIONAL
DE SANIDAD AGROPECUARIA