

Las enfermedades de las plantas y su diagnóstico

Álvaro L. Gaitán Bustamante

Las enfermedades han estado siempre asociadas a la agricultura. Una vez aparecía la enfermedad, era claro que los individuos enfermos eran focos para la dispersión hacia la población, en lo que se denominaba *contagium vivum*, pero las causas fundamentales de las enfermedades permanecieron como un misterio durante siglos. Los romanos, como muchos pueblos de la antigüedad, atribuían el origen de las enfermedades a los caprichos de los dioses, y en abril de cada año celebraban la Robigalia, que honraba a Robigo, una divinidad que debía ser aplacada para evitar la aparición de las royas y así preservar las cosechas (Smith, 1875).

Con la identificación de los agentes infecciosos y de las consecuencias de las deficiencias vitamínicas en el siglo XIX, el concepto del origen de las enfermedades o la etiología cambió radicalmente y desde entonces se ha manejado como una relación causa-efecto, donde se requiere la presencia de un factor (biótico o abiótico) para que cause un disturbio en el normal desarrollo y funcionamiento de un organismo. Las plantas, como organismos vivos, son susceptibles al ataque de patógenos que les producen enfermedades, y el estudio de éstas es el objeto de la Fitopatología. En sentido estricto, ese estudio comprende los microorganismos y los factores medioambientales que causan las

enfermedades, los mecanismos por los que estos factores inducen enfermedades y los métodos para prevenir o controlar los daños que se generan (Agrios, 1997). Científicamente, la causa de una enfermedad se ha determinado siguiendo los llamados Postulados de Koch, propuestos por el Premio Nobel de Medicina Robert Koch (1905). Estos postulados permiten descubrir la asociación de un agente causante con un organismo afectado, el aislamiento del agente causante en forma pura si es un agente biológico y la repetición de los síntomas una vez se ha re-inoculado el agente en un hospedante sano.

La información generada por el sinnúmero de pruebas realizadas por investigadores alrededor del mundo ha permitido tener a disposición un conocimiento diferencial de las enfermedades, el cual se conoce como diagnóstico.

Identificar claramente la enfermedad y el agente causante asociado es una necesidad de primer orden en el proceso de toma de decisiones ante un problema fitosanitario. Ya sea que se trate de una asistencia para un cultivo o planta afectada, de una medida preventiva en el caso de una cuarentena, de control químico preventivo o curativo, de una certificación en la producción de materiales libres de enfermedades o de un estudio epidemiológico de la distribución o determinación de vectores de una enfermedad, se requiere de metodologías que permitan detectar la presencia de un agente causante, o la causa de una enfermedad, en el menor tiempo posible y con la mayor certeza.

Los agentes infecciosos

De un inmenso número de macro y microorganismos presentes en el medio ambiente sólo unos pocos son capaces de causar enfermedades en plantas, y de éstos, un grupo aún más reducido son compatibles con el café (Tabla 1). Entre estos organismos se destacan los hongos por su frecuente implicación en problemas en café; sin embargo, nematodos, bacterias, virus y fitoplasmas también hacen parte del cuadro de agentes causantes de enfermedades.

Nematodos

Los nematodos son un tipo de gusanos de cuerpo redondeado (nematelmintos), diferentes taxonómicamente de los anillados (anélidos) como la lombriz de tierra. Los nematodos son pequeños y generalmente transparentes, con tamaños que varían entre $300\mu\text{m}$ hasta 4mm.

Las hembras adultas de algunas especies pueden presentar tamaños mayores, color blanquecino y forma de pera. Muchos nematodos parásitos de plantas poseen un estilete o aguja rígida hueca, que usan para penetrar los tejidos de la planta y alimentarse mediante la extracción de los contenidos celulares.

Los nematodos se reproducen siempre por huevos, producto de la unión de gametos, o de partenogénesis. De los huevos salen estados juveniles que crecen en tamaño mediante mudas, pasando por cuatro estadios. En la última muda ocurre la diferenciación sexual. No todos los

Tabla 1. Enfermedades del café en el mundo.

Enfermedades bacterianas	
Tizón bacteriano	<i>Pseudomonas syringae</i> patovar <i>garcae</i> Amaral
Atrofia de las ramas	<i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al.
Enfermedades fúngicas	
Antracnosis	<i>Glomerella cingulata</i> (Stonem.) Spauld,
Pudrición radical de armilaria	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl Ex Fries) Kummer
Enfermedad de Bar	<i>Fusarium stilboides</i> Wollenw
Mancha del fruto o mancha de hierro	<i>Cercospora coffeicola</i> Berk. & Br.
Llaga negra o pudrición negra de la raíz	<i>Rosellinia bunodes</i> Berk & Br. Saac.
Llaga estrellada de la raíz	<i>Rosellinia pepo</i> Pat.
Damping off o volcamiento	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn
Añublo pardo	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz
Mancha foliar café o muerte descendente	<i>Phoma</i> sp.
Chancro o llaga macana	<i>Ceratocystis fimbriata</i> (Ell. & Halst.) Hunt
Chancro	<i>Phomopsis coffeae</i> Bondarzeva-Monteverde
Collar spot	<i>Fusarium stilboides</i> Wollenz
CBD o enfermedad de las cerezas	<i>Colletotrichum kahawae</i> Waller & Bridge
Die-back o muerte descendente	<i>Ascochyta tarda</i> Stewart
Pudrición seca de la raíz	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.
Añublo foliar	<i>Ascochyta tarda</i> Stewart
Mancha foliar	<i>Phyllosticta coffeicola</i> Speg.
Mal rosado	<i>Corticium salmonicolor</i> Berk & Br.
Ampollamiento rojo (Robusta)	<i>Cercospora coffeicola</i> Berk & Br.
Pudrición roja de la raíz	<i>Ganoderma philippi</i> (Bres & P. Henn.) Bres
Roya anaranjada	<i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Br.
Roya polvosa o polvorienta	<i>Hemileia coffeicola</i> Mauble & Rog.
Mancha foliar suramericana	<i>Mycena citricolor</i> Berck & Curt.
Arañera	<i>Corticium koleroga</i> (Cooke) Hoehnel
Quemazón de la punta	<i>Phoma</i> sp.; <i>Phoma constarricensis</i> Ech
Traqueomicosis	<i>Gibberella xylarioides</i> Heim & Saccas
Cereza verrugosa	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. Ex Fries var. <i>coffeae</i> Hendr.
Nematodos	
Nudo radical	<i>Meloidogyne incognita</i> ; <i>M. javanica</i> ; <i>M. exigua</i>
Virus	
Mancha ampollada	Virus sin caracterizar
Algas	
Mancha algácea	<i>Cephaleuros virescens</i> Kunze.
Mancha bronceada	-----

Lista modificada de Waller, 1998

estadios juveniles son capaces de infectar plantas y ante la ausencia de un hospedante, algunas especies pueden permanecer quiescentes y otras mueren pues no pueden alimentarse saprofiticamente (Agrios, 1997)

Hongos

Los hongos comprenden un amplio grupo de organismos tanto macroscópicos como microscópicos que se encuentran

distribuidos prácticamente en la totalidad del hábitat del planeta. Los hongos pueden ser unicelulares o multicelulares, presentando sus células uno o varios núcleos definidos y una pared exterior rígida compuesta en parte por el polímero quitina. En la gran mayoría de los hongos sus células crecen apicalmente y forman filamentos denominados hifas, las cuales en conjunto constituyen el micelio el cual se puede apreciar macroscópicamente como diminutas motas de algodón de diversos colores, dependiendo de la capacidad del hongo para producir pigmentos. Sin embargo, algunos cuerpos reproductivos son tan grandes que se observan creciendo en el suelo o en el tronco de los árboles como “costras”, “orejas” o “sombrellas”. Los hongos son heterotróficos, es decir, obtienen sus nutrimentos de la materia orgánica pues no pueden aprovechar la luz solar.

Los hongos presentan diversas fases del ciclo de vida caracterizadas por sus mecanismos de reproducción que pueden ser sexuales, asexuales y parasexuales. Cuando una fase sexual es conocida, se denomina a ese estado del hongo como el Teleomorfo; si se trata de la fase asexual se le llama el Anamorfo, y cuando se reconocen las dos se denomina el Holomorfo. Los mecanismos asexuales de reproducción comprenden la producción de células llamadas conidias que le permiten una dispersión efectiva y una colonización rápida al organismo. Además, con el fin de sobrevivir a condiciones adversas, los hongos producen células de resistencia conocidas como clamidosporas (Kendrick, 1992), o estructuras celulares complejas denominadas esclerocios.

En los teleomorfos se pueden identificar diferentes estructuras reproductivas que son la base para la clasificación taxonómica de los hongos. Así, las cinco grandes divisiones de los hongos son: Oomycetes, Zigomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes.

Los Oomycetes comprende un grupo particular de hongos, entre los que se encuentran *Phytophthora* y *Pythium*, cuyas paredes celulares contienen celulosa, sin quitina, como es lo usual. A cambio de conidias, producen células biflageladas llamadas zoosporas, y el producto de la unión sexual es una espora de paredes gruesas u oospora. Los Zigomycetes son un grupo de hongos que al fusionar sus hifas producen una estructura denominada zigospora. Aquí se encuentra el moho del pan (*Rhizopus* spp.) y la mayoría de endomicorizas.

Los Ascomycetes agrupan a los hongos que producen ascas, especies de vainas que contienen ocho ascosporas. Las ascas pueden estar libres (gimnotecios) u organizadas en cuerpos fructíferos o ascocarpos, conformados por las células productoras de ascas y unas células de recubrimiento que le dan una forma de botella al conjunto. Estos cuerpos fructíferos pueden ser de tres tipos: apotecio, si la botella tiene una abertura ancha; peritecio, si la abertura es estrecha, y cleistotecio, si no existe abertura.

Los Basidiomycetes comprenden aquellos hongos que producen basidios, estructuras en forma de mazo o bate que en su extremo más grueso generan cuatro basidiosporas. Los basidios pueden estar organizados en

agallas las cuales se observan como láminas en la parte inferior de las “sombrellas” que crecen en el campo. Este grupo también comprende algunas levaduras y las royas, muy importantes en las enfermedades de plantas. Finalmente, los Deuteromycetes corresponden a las fases anamórficas de muchos hongos, algunos de los cuales no tienen una fase sexual conocida (Kendrick, 1992).

Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares microscópicos que carecen de un núcleo típico, pero tienen uno o dos nucleoides los cuales no poseen membrana. Al igual que los hongos, no pueden sintetizar su propio alimento y son muy importantes en la degradación de la materia orgánica. Las bacterias presentan paredes celulares que les confieren forma, la cual varía entre cocos (esféricas) y bacilos (alargadas). Aunque algunas pueden formar estructuras de resistencia a condiciones adversas, llamadas esporas, éstas no se presentan en bacterias causantes de enfermedades en plantas.

Para su clasificación se utiliza inicialmente la morfología y la reacción ante la tinción de Gram, la cual depende de la composición de la pared celular. Aquellas bacterias que toman el primer colorante (cristal violeta - iodo) se denominan gram - positivas. Las que no, se tiñen con un colorante de contraste (fuschina) y se les conoce como gram - negativas. Entre estas últimas están la mayoría de las bacterias patógenas de plantas. Para la identificación se requiere además determinar características

como la capacidad de reducir azúcares, producción de gas y motilidad, entre otras.

Fitoplasmas

Los fitoplasmas se pueden considerar como una versión simplificada de una bacteria. Son organismos procarióticos, unicelulares, de un tamaño inferior a una micra y gram-negativos. Contrario a las bacterias, no son de vida libre y requieren constantemente de una célula hospedante para su desarrollo; no tienen pared celular y presentan formas diversas (pleomórficos); carecen de flagelos y no producen esporas (Fudl y Calavan, 1974). Adicionalmente, poseen 10 veces menos ADN que las bacterias (Fernández, 1979).

Por su similitud con agentes patógenos de humanos, inicialmente fueron denominados “organismos parecidos a micoplasmas” (mycoplasm like organisms o MLOs, por sus siglas en inglés), pero a partir de 1994 el término fue reemplazado oficialmente por fitoplasma, reflejando la exclusividad de estos patógenos en vegetales (Sinclair *et al.*, 1996).

Los fitoplasmas han sido asociados con más de 200 distintas enfermedades de plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, árboles y plantas herbáceas. Para su transmisión en la naturaleza requieren estar asociados con insectos vectores (Albanese *et al.*, 1995).

Virus

Al igual que los fitoplasmas, los virus son parásitos obligados; es decir, requieren

permanentemente de una célula hospedante para cumplir su ciclo de vida. Sin embargo, los virus son muy diferentes a los demás organismos debido a que carecen de membranas, citoplasma u organelos y sólo están constituidos por una cápside proteínica menor de una micra de diámetro que protege la información genética, que puede estar en forma de ADN o ARN. Sus formas son muy variadas, incluyendo cilindros y poliedros.

El diagnóstico convencional

Por muchos años el diagnóstico se ha basado principalmente en la observación de los síntomas y el estudio de los organismos asociados en comparación con registros en publicaciones. Para muchas enfermedades la sintomatología es tan particular que pocas veces requiere de una caracterización más profunda para confirmar. Tal es el caso de ciertas royas (como la roya del café *Hemileia vastatrix*), deformaciones como la agalla de la corona (*Agrobacterium tumefaciens*), o virosis como el mosaico del tabaco. Sin embargo, también es común encontrar que síntomas parecidos pueden ser causados por diferentes agentes como es el caso de las necrosis o las clorosis y por tanto, es necesario proceder a una observación microscópica mediante raspados o micropreparados para discernir la identidad del agente causante.

En el “damping-off” o volcamiento, por ejemplo, se puede encontrar asociados *Pythium*, *Rhizoctonia* o *Fusarium* como posibles causantes. Normalmente, ésta información debe ser complementada con

la obtención de cultivos puros del patógeno por técnicas microbiológicas de aislamiento.

En el caso de los hongos, donde la complejidad de los sistemas reproductivos permite apreciar una alta diversidad de estructuras tanto asexuales como sexuales, es posible llegar rápidamente por la vía de cultivos axénicos, microscopía y estudios taxonómicos a determinar no sólo el género sino la especie del organismo agresor. Las bacterias, por el contrario, poseen pocos caracteres morfológicos descriptivos, salvo forma y motilidad y requieren de pruebas bioquímicas para su identificación. Estas pruebas reflejan la capacidad de la bacteria para degradar ciertos metabolitos o para producir pigmentos, pero requieren de mayor tiempo, reactivos e infraestructura.

Para muchas enfermedades éste puede ser el final de la cadena de diagnóstico. En sistemas de producción con manejo integrado de plagas y enfermedades que practiquen rotación de cultivos, uso moderado de pesticidas químicos, con aprovechamiento de la diversidad genética y en condiciones climáticas estables, la presión de selección sobre los patógenos puede ser baja, favoreciendo la presencia de epidemias de fácil diagnóstico, conocido manejo y escasa influencia en la producción. Pero éste no es el caso para muchos sistemas de cultivo donde los desbalances continuos favorecen la proliferación de nuevas variaciones de los patógenos con una mayor capacidad de atacar genotipos diferentes del hospedante (mayor virulencia) o con la

habilidad de desarrollar síntomas más severos (agresividad aumentada).

Como ejemplo de esta habilidad de cambio de los patógenos está el caso de la roya de la hoja del trigo (*Puccinia recondita*), donde se calcula que con sólo un 1% del área foliar infectada se producen en cada hectárea 10^{11} esporas por día, de las cuales, por una frecuencia de mutación espontánea de 10^{-8} resultan 1.000 mutantes para cada gen particular (Parlevliet y Zadoks, 1977).

Como resultado de lo anterior las metodologías de diagnóstico debieron ser refinadas. En respuesta a la mayor virulencia se han identificado los genotipos diferenciales, líneas de plantas de la misma especie que se diferencian en sus reacciones de compatibilidad con un patógeno. Este tipo de caracterización se basa en la teoría del gen-por-gen, propuesta por Flor (1955), la que de manera recíproca ofrece una explicación a la existencia de razas, líneas del patógeno que difieren en su capacidad de afectar un grupo de genotipos del hospedante.

Para afrontar la situación de agresividad aumentada, además de la observación de síntomas más severos, se han desarrollado pruebas serológicas que permiten la diferenciación de aislamientos del patógeno basadas en la presencia de moléculas (proteínas, carbohidratos, y en menor grado, lípidos), que contienen estructuras particulares epítopes que pueden ser reconocidas por un anticuerpo producido por el sistema inmune de los mamíferos. Estas

pruebas son de especial interés en la identificación de virus, los cuales no son cultivables en medios artificiales, y pueden presentar similitudes morfológicas en observaciones con microscopía electrónica.

Entre las pruebas serológicas más conocidas está el Ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzima o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), que combina la capacidad de reconocimiento entre el anticuerpo y el epítope, con la intensidad de la señal ofrecida por una reacción enzimática que ocurre en el mismo sitio. En el caso de los virus y otros organismos de difícil aislamiento y cultivo, como las bacterias fastidiosas y los fitoplasmas, las técnicas de indexación por injerto se utilizan como alternativa de diagnóstico. En estos casos se utilizan plantas susceptibles al patógeno, que presentan sintomatologías más evidentes y rápidas que cuando se usa el hospedante normal.

Finalmente, el uso extensivo de productos químicos para el control ha tenido como consecuencia la aparición de aislamientos resistentes a las diferentes familias de pesticidas presentes en el mercado, haciendo necesarias las pruebas de antibiogramas para verificar el estado de resistencia o susceptibilidad de los patógenos de una zona a las moléculas recomendadas.

El diagnóstico molecular

La globalización de la economía es una tendencia que no sólo afecta el movimiento de bienes o servicios alrededor del mundo,

modificando las condiciones de oferta y demanda que modelan a los mercados, sino que también se presenta como un riesgo sanitario debido a la movilización de agentes infecciosos con los productos o por medio de portadores sanos.

Igualmente, la globalización ha traído consigo nuevas condiciones de competitividad de los mercados, con exigencias en movilización, calidad, precios y conservación del medio ambiente. Estas exigencias se ven plasmadas en las regulaciones que comprenden los acuerdos internacionales, tanto regional como mundialmente con el WTO (World Trade Organization) o la Comisión del *Codex Alimentarius* de la FAO (Martin *et al*, 2000).

Siendo el manejo de enfermedades uno de los costos obligatorios en la producción agrícola, y dependiendo de ese control una parte de la competitividad de los productores, se exige directamente de la Fitopatología la presentación de alternativas menos costosas, más eficientes y ecológicamente amigables, que le brinden una ventaja económica al negocio de la agricultura de un país y le permitan cumplir con la legalización asociada al comercio agrícola internacional. Aunque las técnicas descritas para el diagnóstico convencional siguen siendo válidas para muchos de los problemas vigentes, el avance de la ciencia, la estandarización de las pruebas, la necesidad de certificación y la obligación de ser competitivos, conllevan a una actualización de uno de los componentes clave de apoyo en el trabajo fitosanitario como lo es el servicio de diagnóstico.

Esos avances en la actualidad dependen del conocimiento y uso de la molécula de ADN, que es el principio de la información que diferencia o agrupa a individuos. De manera práctica, los fragmentos de ADN que representan una ubicación locus determinado en un cromosoma se denominan marcadores moleculares.

Técnicas basadas en hibridación del ADN

La hibridación es la capacidad de las cadenas del ADN de realinearse entre sí para formar una doble hélice, así las secuencias de éstas no sean mutuamente complementarias en su totalidad. La estabilidad de esta asociación y el grado de complementariedad entre las dos cadenas dependerá de condiciones como la temperatura y la presencia de cationes libres en el medio. Entre las técnicas basadas en la hibridación está el Dot-Blot. En esta aplicación, el ADN de las muestras para analizar se coloca sobre un soporte sólido, una membrana de nylon, y se sumerge en una solución de hibridación en la cual flota libremente un ADN conocido, denominado **sonda**. Luego de algunas horas la sonda se habrá alineado con las muestras de la membrana que presenten suficiente complementariedad, y dado que la sonda está marcada con una molécula que emite radiación o luz, es posible visualizar los resultados directamente en la membrana o en film de autoradiografía. En ciertos casos, una serie de ADNs conocidos se coloca en la membrana y ADN o ARN de la muestra se marca y es añadido a la

solución. Este Dot-Blot Reverso permite hacer un barrido “screening” de una muestra para detectar la presencia de múltiples patógenos.

La hibridación también permite estudiar las variaciones en secuencia, si se examinan los cambios en los sitios específicos reconocidos por enzimas especializadas en cortar el ADN, “enzimas de restricción”.

Las digestiones con estas enzimas seguidas de la hibridación con una sonda conocida, producen patrones de fragmentos que pueden ser característicos para especies, subespecies o individuos. Estas diferencias se conocen como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLPs (Engels, 1981).

Técnicas basadas en la PCR

El desarrollo de la técnica de PCR, reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.*, 1985), revolucionó el trabajo de laboratorio concerniente al ADN. La técnica combina la capacidad de hibridación del ADN, con la habilidad de la enzima Taq Polimerasa para copiar fragmentos cortos de ADN a altas temperaturas. Para determinar la región del ADN que se quiere copiar se sintetizan dos iniciadores “primers”, que son cadenas sencillas de ADN de 20 a 30 nucleótidos. A una temperatura entre 50°C y 65°C, los iniciadores hibridan con sus regiones complementarias en el ADN a analizar, y a partir de allí la enzima Taq Polimerasa inicia la síntesis de una nueva molécula de ADN. Si el proceso

se repite unas 30 veces, el resultado es una amplificación factorial de un fragmento de ADN que puede comenzar con una cantidad inicial del orden de picogramos (10^{-12} g) y llevarlo a una final del orden de microgramos (10^{-6} g). Estas cantidades ya permiten fácilmente observar, manipular y hacer estudios adicionales en la muestra amplificada.

Cuando se amplifican varios fragmentos de un individuo o especie se obtiene un patrón de bandas que puede ser único, como los códigos de barras usados para identificar productos. Por ser tan particulares, a estos patrones se les ha denominado huellas digitales, o “fingerprints”, y son la base del diagnóstico molecular. Los fragmentos que conforman éstas pueden obtenerse de diferentes maneras: amplificados de manera aleatoria como los RAPDs (Williams *et al.*, 1990); combinados con cortes con enzimas de restricción en el caso de los AFLPs (Zabeau y Vos, 1993); examinando la extensión de secuencias microsátélites (Weber y May, 1989), o las diferencias en las regiones ITS que separan genes que codifican para el ARN ribosomal (Hillis y Dixon, 1991); y finalmente, al comparar organismos muy similares detectando las variaciones en un solo residuo nucleotídico, como en los SNPs (Paran y Michelmore, 1993).

El estado del arte y el futuro

La determinación de marcadores moleculares basados en el ADN, correspondientes a fragmentos amplificados

de manera única por PCR con parejas específicas de iniciadores, permite avanzar un paso más en los métodos de detección a un nivel de sensibilidad único. En los más recientes se elimina la necesidad de hacer separaciones de los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa. Como primera medida se tiene el TaqMan (Lee, 1993), donde una sonda se marca en uno de sus extremos con una molécula fluorescente o es posible llevar a cabo varias reacciones de PCR en un mismo tubo con parejas específicas de primers para detectar organismos diferentes, en una prueba conocida como multiplex PCR (Chamberlein *et al.*, 1988). La combinación de marcación con fluorescencia que se hibrida con múltiples genotipos distribuidos sobre una placa de vidrio se conoce como microarray (Shalon *et al.*, 1996), y puede permitir el procesamiento de miles de muestras de una manera rápida y automatizada.

Conclusión

A pesar del avanzado conocimiento de las enfermedades de las plantas, las condiciones climáticas cambiantes, la capacidad de mutación en los patógenos y las presiones económicas en la diversificación de cultivos generan nuevos problemas o la intensificación de algunos ya existentes. Para proponer alternativas viables de manejo de enfermedades que permitan un control de costos de producción que favorezcan al productor agrícola y resguardar la sanidad vegetal en una economía globalizada, el campo del diagnóstico fitosanitario debe permanecer actualizado con las mejores herramientas disponibles por la ciencia. A comienzos del siglo XXI, el diagnóstico por medio de marcadores moleculares basados en los ácidos nucleicos aparece como la ruta a seguir para permanecer competitivos en el estudio de las enfermedades infecciosas.

Referencias

- AGRIOS, G. Plant pathology. 4. ed. San Diego, Academic Press, 1997. 635 p.
- ALBANESE, G.; ROSA, R. LA; OCHOA C., F. Organismos similares a los micoplasmas (MLO). Nuevos criterios para su clasificación taxonómica y situación actual de su conocimiento en Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía 13:493-502. 1995.
- CADENA G., G. Sintomatología de la mancha algácea del caféto *Cephaluros virescens* Kunze. Cenicafé 33(2): 67-73. 1982.
- CHAMBERLAIN, J.; GIBBS, R.; RANIER, J.; NGYYEN, P.; CASKEY, C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Research 20: 1717-1723. 1988.
- ENGELS, W. Estimating genetic divergence and genetic variability with restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Science 78: 6329-6333. 1981.

- FERNÁNDEZ, V. Introducción a la fitopatología. Vol. IV. Hongos y mycoplasmas. 3. ed. Buenos Aires, INTA, 1979. p. 499-544. (Colección Científica INTA).
- FLOR, H. Host-parasite interactions in flax rust, its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685. 1955.
- FUDL-ALLAH, A. E.; CALAVAN, E. C. Cellular morphology and reproduction of the mycoplasma-like organism associated with citrus stubborn disease. *Phytopathology* 64: 1309-1313. 1974.
- HILLIS, D.; DIXON, M. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453. 1991.
- KENDRICK, B. The fifth kingdom. 2. ed. Newburyport, Focus Information Books, 1992. 406 p.
- LEE, L. Allelic discrimination by nick translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 21: 3761-3766. 1993.
- LEGUIZAMÓN C., J.E. Etiología de la mancha bronceada del café. *Cenicafé* 26 (3): 123-130. 1975.
- MARTIN, R.; JAMES, D.; LEVESQUE, C. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 38. 207-239. 2000.
- PARAN, I.; MICHELMORE, W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985-993. 1993.
- PARLEVIET, J.; ZADOKS, J. The integrated concept of disease resistance a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* 26: 5-21. 1977.
- SAIKI, K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G.; ERLICH, H.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354. 1985.
- SHALON, D.; SMITH, S.; BORWN, P. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* 6:639-645. 1996.
- SINCLAIR, W.; GRIFFITHS, H.; DAVIS, R. Ash yellows lilac witches-broom: Phytoplasmal diseases of concern in forestry and horticulture. *Plant Disease* 80: 468-475. 1996.
- SMITH, W. A Dictionary of greek and roman antiquities. London, John Murray, 1875. p995.
- WALLER, J. Proposed lists of common names for diseases of cacao, coffee, Douglas-fir, oak and yellow poplar. *Phytopathology News* 32(5): 78. 1998.
- WEBER, J.; MAY, P. Abundant class of human DNA polymorphisms, which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396. 1989.
- WILLIAMS, J.; KUBELIK, K.; LIVAK, J.; RAFALSKI, J.; TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535. 1990.
- ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprints. *European Patent Application Publication* 0534858A1. 1993.