

**UNIVERSIDAD DE MATANZAS
"CAMILO CIENFUEGOS"**

Título: Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos.

**Autores: Olga Lidia Macias Figueroa
Yosmary Delgado Calvo
Eliel Peña Marrero
Roberto León Betancourt
Roberto Elías Barreto**

**Email olga.macias@umcc.cu
yosmari.delgado@umcc.cu**

Año 2006

I. Introducción.

Las enfermedades de las plantas tienen una notable importancia en la agricultura moderna, no sólo porque poseen el potencial de destruir enteramente las cosechas, sino porque aún en los casos en que no causan pérdidas totales, por lo general reducen, en forma crónica, el rendimiento de la mayoría de los cultivos y obligan a tomar medidas de lucha que aumentan los costos de producción; además afectan la calidad y durabilidad de los productos cosechados.

Las enfermedades vegetales se conocen desde que el hombre empezó a cultivar la tierra, pero los conceptos sobre ellas han sufrido un largo proceso evolutivo de más de veinte siglos. Ya filósofos griegos, como Teofrasto (370 – 286 a.n.e.), citan la aparición de enfermedades en los cultivos y especulan sobre sus posibles causas y tratamientos curativos. Durante la Edad Media encontramos que los sabios de aquella época se asombraban ante la aparición de enfermedades vegetales, pues su confusión era total acerca de los factores originarios de éstas. La experimentación científica no estaba al alcance de todos, y el perspicaz observador de la naturaleza veía limitada su capacidad de observación por la necesidad de tener que explicar los fenómenos naturales por medio de un proceso de razonamiento deductivo. Interpretaciones incorrectas, basadas en un análisis poco profundo de los hechos, influidas por la superstición, y en algunos casos, por las creencias religiosas, fueron pasando de una a otra generación, hasta llegar a ser aceptadas como verdades inmovibles (Patiño, et al., 1981).

Incluso, a finales del siglo XVIII, los criterios actuales sobre el origen y la naturaleza de las enfermedades vegetales, así como sobre la relación del medio ambiente con el desarrollo de éstas, no habían sido adoptados aún por los investigadores en el estudio de las ciencias botánicas y agrícolas.

El desarrollo alcanzado por la Fitopatología entre las ciencias agrícolas, adquiere en la actualidad relevante importancia en la agricultura moderna. El estudio de los numerosos enemigos de las plantas constituye uno de los pilares fundamentales para obtener cosechas más productivas, necesidad impostergable de la humanidad (De Faz, 1987).

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen en la tierra. Son organismos ancestrales que han colonizado exitosamente cada nicho ecológico posible. Se encuentran prácticamente en todas las regiones del planeta, desde los polos, en ambientes bajo el punto de congelación y muy secos hasta los trópicos con temperaturas altas y con elevada precipitación pluvial. Su presencia y actividad es esencial para la salud y funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas. Los microorganismos también pueden ser causantes de numerosas enfermedades a las plantas. Las condiciones para la proliferación de los patógenos hasta alcanzar niveles epidémicos, son especialmente favorecidas por la difusión de cultivos genética y culturalmente homogéneo (Zadoks y Schein, 1979).

Los estudios microevolutivos y genéticos en poblaciones naturales se basan en la evolución de la diversidad y la comparación entre poblaciones y grupos jerárquicos a lo largo del tiempo en diferentes ambientes.

La materia prima del mejoramiento es la variación genética disponible en el material de partida, de ahí, que evaluar y marcar la variación genética es de gran importancia para la eficiencia de la selección.

El genoma de los organismos superiores contiene miles de loci estructurales y una elevada proporción del ácido desoxirribonucleico con carácter repetitivo o redundante. Por lo tanto la estimación de la cantidad exacta de variabilidad genética es una población imposible en la práctica. Los estimados de variabilidad constituyen una muestra de la variación genética total existente en la población estudiada (Sigarroa, et al, 2001).

Los mismos autores agregan que la variación genética puede ser en diferentes niveles, desde el estimado fenotipo hasta el material hereditario o ADN. La mayor parte de estos estudios se han realizado a nivel alélico (proteínas, isoenzimas, fragmentos de ADN o al nivel nucleotídico (secuencia de base)). Como los estudios se iniciaron con proteínas y enzimas, las estimaciones de los indicadores se desarrollaron por organismos diploides. Por lo que a través de las técnicas moleculares se ha hecho posible obtener datos de los genomas de organelos tales como las mitocondrias y los cloroplastos.

El objetivo del siguiente trabajo consiste en desarrollar algunos conceptos básicos para el estudio de la Fitopatología como ciencia al servicio de la agricultura y describir algunas de las técnicas que se aplican en el diagnóstico de patógenos y la determinación de variabilidad genética de los mismos así como las técnicas para estudiar las variables climáticas

Desarrollo.

Generalidades sobre enfermedades, plantas y patógenos.

La **Patología Vegetal** o **Fitopatología** es la ciencia que se ocupa de las enfermedades de las plantas.

La enfermedad es un fenómeno exclusivo y propio de los sistemas vivientes, que incumbe a todos los niveles de organización biológica. La ciencia que estudia la enfermedad, o **Patología**, es una disciplina general de la Biología, del mismo nivel y con similar objeto (disfunción y función) que la Fisiología. En este contexto general el concepto de enfermedad ha evolucionado considerablemente a lo largo de la historia y, sobre todo, durante los siglos XIX y XX (Llácer, et al, 1996).

Patiño, et al, 1981), señala en su libro Sanidad Vegetal, que no hay una línea clara de demarcación entre lo que se considera una planta sana o normal y una planta enferma, de ahí que se hace difícil definir lo que es enfermedad. Existen tantas definiciones como autores han abordado el tema. Sin embargo, se puede considerar que: “plantas enfermas son aquellas cuyo desarrollo fisiológico y morfológico se ha alterado desfavorablemente y en forma progresiva por un agente extraño, hasta tal punto que se producen manifestaciones visibles de esa alteración”. Estas manifestaciones, que son características de cada enfermedad, se llaman síntomas.

Llácer, et al (1996), plantean que una buena definición de enfermedad es aceptada por el Comité de Terminología de la American Phytopathological Society: “enfermedad es la disfunción de un proceso, causada por una acción continuada, con efectos deletéreos para el sistema viviente, y resultante en la manifestación de síntomas”. Los mismos autores agregan que esta definición, puede aplicarse a todos los sistemas o niveles de organización vivientes, cabe resaltar cuatro aspectos fundamentales:

- 1.La disfunción se manifiesta por medio de síntomas, que no tienen por que ser macroscópicos (Ej. Muchos estados patológicos solo son reconocibles a nivel molecular).
- 2.Los efectos son negativos para el sistema viviente, por tanto muchas situaciones consideradas como enfermedad desde el punto antropocéntrico (Ej. Roturas de color de flores debidas a infecciones virales) no lo son según este concepto.
- 3.Se debe a una acción continuada, lo que la diferencia de daños o accidentes (Ej. Si una máquina amputa una mano a un operario, éste sufre un daño y queda manco, pero no enfermo, y lo mismo con un pedrisco y un cerezo en flor).
- 4.Es un proceso y como tal dinámico y, al menos hasta cierto punto, reversible (Ej. Una planta que pierde superficie foliar, debido a la actividad de fitófagos, no es una enfermedad).

Importancia de las Enfermedades.

La enfermedad, como disfunción, puede llevar a una disminución de la productividad y de la producción biológica de las plantas. La disminución de la producción debida a enfermedades y/o el aumento de costos de producción encaminados a prevenir y controlar las enfermedades, resultan en una disminución de la producción económica que llamamos pérdida.

La importancia de las pérdidas debidas a enfermedades es obvia cuando resultan de grandes epidemias con efectos catastróficos sobre cultivos, regiones o sociedades enteras. Baste citar la epidemia en el cultivo de la papa en Irlanda, provocada por el hongo *Phytophthora infestans* (Mont) (de Bary) en el año 1845, que resultó en una hambruna cuya consecuencia fue la reducción de la población de la isla, debida a la mortalidad y emigración, a un 70 % de su nivel anterior a dicha epidemia. A otra escala, y ciñéndonos a situaciones actuales en España, podemos citar la epidemia de la tristeza de los cítricos, que desde 1957 ha infectado unos doce millones de árboles, causando la muerte de más de un millón, y obligando a un cambio importante en el cultivo del naranjo mediante el uso de portainjertos tolerantes, o las epidemias de necrosis de tomate debidas a los virus del mosaico del pepino (CMV) y del bronceado del tomate (TSWV) que desde los últimos años han llevado a una reducción drástica de la superficie de dicho cultivo en buena parte de sus áreas tradicionales de la costa levantina.

Cramer, 1967, menciona que normalmente, sin embargo, las enfermedades permanecen más o menos endémicas en un área geográfica, y causan pérdidas variables de un año a otro según sea su incidencia. Dentro de las limitaciones propias de este tipo de estudios, las evaluaciones de pérdidas a nivel mundial sitúan las debidas a enfermedades en un 12 % (diferencia entre la producción económica obtenida, o real, y la alcanzable si se optimizaran los sistemas de control disponibles). (Pimentel, 1981). La importancia de las pérdidas debidas a enfermedades frente a las debidas a otras causas como plagas de artrópodos o malas hierbas, crece con la tecnificación y con la intensificación de la agricultura: así, es que el 13 % (sobre un total del 25 % debido a enfermedades, plagas y malas hierbas) en Europa Occidental, y de un 11 % (sobre un total del 43 %) en Asia. Sin duda esto refleja una menor eficacia del control de enfermedades respecto al de plagas o malas hierbas. Aunque los datos globales presentados son antiguos, los datos más recientes de que se dispone para cultivos y áreas concretos indican que siguen siendo válidos (Oerke et al, 1994).

Rabbinge, 1993, considera que las necesidades de alimento, fibra, madera, etc. de una población mundial en continua expansión, y que la productividad de los principales cultivos herbáceos (como cereales, leguminosas, papa o remolacha) parece estar cercana a un tope impuesto por las características del propio sistema productivo, es decir, de la planta, la importancia de las enfermedades de las plantas es evidente.

¿Es posible disminuir las pérdidas debidas a las enfermedades de las plantas?
Es de esperar que sí, y este es uno de los objetivos de la Patología Vegetal.

Parece claro que las modificaciones del medio que comporta la actividad agrícola y, en menor medida, forestal, favorecen la incidencia de las enfermedades. Cabe destacar dos grupos principales de causas de la importancia de las enfermedades en el agroecosistema:

Aquellas relacionadas con la homogeneidad de los cultivos: la mayor parte de la superficie cultivada lo está con muy pocas especies (Ej. El 90 % de los alimentos procede de solo 15 especies). Además, dentro de una parcela en explotación o incluso región, se tiende a la uniformidad genética de estas pocas especies. A estas mismas escalas el cultivo es uniforme, no sólo genéticamente sino por su distribución espacial, de hecho lo normal es que individuos de una sola variedad ocupen todo el espacio. Por último, a esta uniformidad genética y espacial puede añadirse una uniformidad temporal, al cultivarse las mismas especies o variedades en el mismo espacio estación tras estación.

La uniformidad de los cultivos, agrícolas o forestales, resulta en unas oportunidades muy favorables para el incremento de las poblaciones de los patógenos que tengan la virulencia necesaria, y por tanto para el incremento del impacto negativo de las enfermedades.

Aquellas relacionadas con la propia actividad agrícola o forestal. Además de las alteraciones del agroecosistema debidas a multitud de prácticas ligadas a la intensificación de los cultivos, cabe destacar:

- Incrementos involuntarios de susceptibilidad a patógenos de variedades mejoradas con otros fines.
- El agroecosistema, a diferencia de los ecosistemas naturales, repone continuamente el huésped, evitando su extinción y la del patógeno.
- La introducción de patógenos o huéspedes en áreas nuevas lleva a nuevas combinaciones que pueden ser especialmente importantes. Como ejemplos se pueden citar la introducción de América a Europa de *Plasmopara viticola*, y su contacto con la vid europea, mucho más susceptible que las especies americanas, o la introducción del cacao de América a África Occidental, y su contacto con el virus del brote hinchado del cacao (CCSV) que encuentra en él un huésped más favorable, y en el que causa una enfermedad más grave, que en su huésped natural (el baobab).

Dentro de las posibilidades más o menos estrechas se puede tratar de modificar estas causas, de forma que el agroecosistema sea menos favorable al desarrollo de las enfermedades. Sin embargo, no hay que olvidar que los patógenos, como las plagas y las malas hierbas, se han domesticado con las plantas cultivadas y son componentes inherentes al agroecosistema con los que es obligado convivir (Zadoks, 1993).

Burdon, (1987), plantea que los patógenos son también componentes esenciales de los ecosistemas naturales, donde no siempre conviven con sus huéspedes en condiciones cercanas al equilibrio, como a menudo se da por supuesto con cierta ingenuidad. El estudio del papel de los patógenos en las poblaciones naturales de las plantas se ha iniciado en fecha relativamente reciente. Según se progresa en este campo parece claro que los equilibrios poblacionales huésped – patógeno sólo se manifiestan a nivel metapoblacional, con extinciones y recolonizadores de huéspedes y patógenos en las distintas subpoblaciones, como demuestran, por ejemplo, los trabajos del grupo Burdon sobre poblaciones silvestres de *Linux marginales* y su patógeno *Melampsora lini*. En otras ocasiones los patógenos pueden causar epidemias devastadoras y eliminar a un huésped casi por completo de amplias áreas geográficas (Brasier, 1990).

Gibas, 1980; aportó que la infección por un patógeno puede suponer una ventaja selectiva, como es el caso de la infección de la leguminosa silvestre *Kennedyia rubicunda* por el tymovirus del mosaico de la Kennedyya (KMV), cuyos síntomas conllevan una no preferencia de las plantas infectadas por parte de los fitófagos. Evidentemente el estudio del papel de las enfermedades en poblaciones naturales de plantas contribuirá a desterrar ideas simplistas y a una mejor comprensión de las posibilidades de manejo de los patógenos en el agroecosistema.

Importancia Económica de la Fitopatología

Las enfermedades de las plantas no solamente hacen disminuir las cosechas y su rendimiento, sino también reducen considerablemente el valor de las tierras en que han aparecido y hecho sus estragos.

A veces, las epidemias vegetales han sido la causa de numerosas pérdidas de vidas humanas; por ejemplo, los daños que pueden causar las enfermedades, lo tenemos en la destrucción que han sufrido los cacaos, producto de la enfermedad pudrición del cogollo, lo que ha mermado considerablemente la producción de este notable renglón exportable, en detrimento de nuestra economía.

Es bueno señalar que las enfermedades de las plantas causan daños en forma directa, al originar una disminución de la producción en cantidad y calidad; e indirectamente, al dificultar el desarrollo del fruto, y por tanto, su valor.

Las plantas, actualmente están expuestas a un mayor número de enfermedades que en el pasado; la explicación es lógica, los cultivos han aumentado en extensión y variedad, lo que ha facilitado la aparición y propagación de numerosas enfermedades desconocidas anteriormente en el país; de ahí la importancia que desde el punto de vista económico adquiere el dominio de esta ciencia para evitar así el desarrollo y extensión de las enfermedades en nuestro país.

La Patología Vegetal tiene como objeto, el conocimiento de las enfermedades de las plantas en cualquiera de sus aspectos, y orientado hacia su prevención y control. Tiene, por consiguiente, una doble vertiente:

- a) Un núcleo científico teórico, cuyo objeto es comprender la naturaleza de las enfermedades de las plantas.
- b) Una componente técnica, mediante la cual la teoría se hace útil y se orienta al control de las enfermedades.

La Patología Vegetal, es por tanto una ciencia biológica y una Ciencia Agraria, y se participa y se interrelaciona con las otras ciencias de estos dos ámbitos (Biología Molecular, Fisiología Vegetal, Genética, Microbiología, Ecología, Fitotecnia, Entomología Agrícola, Herbología, etc.) y con aquellas ciencias matemáticas y físicoquímicas que le sirven de apoyo.

La doble naturaleza de la Patología Vegetal y su desarrollo, condicionado por su importante vertiente económica, a moldeado el papel de los fitopatólogos que, hasta fecha muy reciente, rara vez se han ocupado únicamente de los aspectos teóricos de su ciencia, sino que se han ocupado además, de sus derivaciones técnicas. Esta circunstancia ha sido ventajosa en ciertos aspectos del desarrollo de esta ciencia, pero a menudo dificulta a quienes la ejercen al tener una visión global de la Patología Vegetal como tal disciplina científica, con un cuerpo unitario de doctrina. En efecto, la pluralidad de huéspedes y de patógenos, puede llevar a una aparente atomización de los aspectos técnicos de la disciplina, que impida percibir la comunidad de conceptos, hipótesis y métodos que comparten.

El amplio campo científico de la Patología Vegetal puede dividirse en al menos cuatro grandes áreas:

Etiología: Estudio de la naturaleza y causas de la enfermedad.

El análisis etiológico basado exclusivamente en la teoría del germen, según las llamadas reglas de Koch, ha tenido los efectos colaterales negativos de relegar a segundo plano el análisis de las enfermedades de causa no biológica o de causa compleja. A lo largo del siglo XX se ha hecho de nuevo hincapié en la importancia etiológica de factores asociados al huésped y al medio. Esto ha dado lugar a una etiología basada en el ya clásico “triángulo de la enfermedad” que representa a esta como la interacción de factores asociados al patógeno, huésped y medio ambiente. La más reciente “pirámide de la enfermedad” introduce el tiempo como elemento modificador de estos tres conjuntos de factores en la actualidad se huye de tendencias reduccionistas y se subraya esta naturaleza multicompuesta de la enfermedad, como punto de partida necesario para su comprensión (Bateman, 1978).

Patogénesis:

La enfermedad como fenómeno que afecta a individuos.

El estudio de la patogénesis debe explicar la especificidad de las interacciones entre huésped y patógeno, que desembocan en una relación **compatible** (o de **susceptibilidad**) o **incompatible** (o de **resistencia**). El análisis de los fenómenos relativos a la interacción huésped-patógeno comienza al reconocerse el patogenismo de los hongos. Inicialmente se aborda mediante métodos histológicos de los que se trata de obtener información sobre los cambios que tienen lugar en el huésped. El empleo de los métodos de la Fisiología Vegetal caracteriza una segunda etapa del estudio de la patogénesis. Mc New, (1960), comenta sobre los trabajos realizados durante la primera mitad del siglo XX permiten descubrir patrones de disfunción (o de desarrollo de la enfermedad) comunes a distintas enfermedades, independientemente del tipo de agente que las induzca lo que lleva a agrupar las enfermedades según los procesos afectados (destrucción de reservas, interferencia con el transporte vascular, interferencia con la fotosíntesis, entre otros.). El enfoque fisiológico permite además analizar con detalles los distintos mecanismos ofensivos en el patógeno y defensivos en el huésped y su papel en el desarrollo de la enfermedad (Whitman, et al 1994).

Clarke, et al 1992, menciona que durante los últimos veinticinco años, la metodología propia de la biología molecular ha llevado a un desarrollo espectacular el análisis de los aspectos primarios de la relación huésped – patógeno, que ha culminado con la identificación y caracterización de genes de avirulencia / virulencia en el patógeno y muy recientemente, de los primeros genes de resistencia en plantas.

3- Epidemiología

La enfermedad como fenómeno que afecta a poblaciones.

La epidemiología, desde sus inicios a mediados del siglo XIX, pasa por una primera etapa descriptiva de las tres componentes de la enfermedad, patógeno (ciclos vitales, principalmente), huésped (diferencias de resistencia / susceptibilidad) y medio ambiente (sobre en cuanto al afecto en los ciclos vitales de los patógenos). Posteriormente la epidemiología evoluciona a una ecología, descriptiva y cualitativa de los patosistemas.

El reconocimiento de la importancia del factor tiempo, y el paso a una etapa teórico – cuantitativa, es sorprendentemente reciente. Los trabajos pioneros de Van Der Plank, (1963), aplican por primera vez la metodología de la demografía y la ecología al análisis de la dinámica poblacional de la enfermedad. Campbell, et al, 1990, comentan que el análisis de la variación espacio – temporal de las enfermedades, si bien no ha generado hipótesis ni metodologías de originalidad científica sino que ha adoptado los métodos y modelos desarrollados por ecólogos, epidemiólogos (médicos o veterinarios) y demógrafos, a supuesto un gran avance en el entendimiento de las epidemias y en el desarrollo de simuladores y modelos predictivos. Por otro lado, la

aplicación de la genética de poblaciones al estudio de la interacción entre las poblaciones de plantas y patógenos, ha contribuido notablemente a entender las causas de las epidemias (Thompson et al, 1992). Esto ha generado una contribución muy notable (y, ésta sí, original): una teoría de control que permite desarrollar estrategias eficaces basadas en el uso científico de las distintas técnicas (o métodos) de control de que se dispone.

Control.

El control de las enfermedades es la razón última de la Patología Vegetal y, por otro lado, constituye su vertiente aplicada y técnica, como contrapuesta a científica. De hecho, tradicionalmente y aún en la actualidad, los programas de control de las diversas enfermedades en los distintos entornos agroecológicos, se han desarrollado de forma fundamentalmente empírica. Esto ha conllevado, a menudo, ineficacia o efectos negativos, como problemas de contaminación por plaguicidas o de implantación en las poblaciones de patógenos de resistencias a aquellos, o de superación rápida de la protección conferida por genes de resistencia. El desarrollo científico de la Patología Vegetal y ciencias afines, ha posibilitado, desde hace más o menos tres décadas, el planteamiento de estrategias de control científicamente correctas y técnicamente eficaces. Esto se ha conseguido principalmente por la integración de conocimientos sobre:

- a) La epidemiología de la enfermedad.
- b) La fisiología de la producción y el efecto de la enfermedad en ella.
- c) La economía del cultivo considerando los condicionantes necesarios desde una perspectiva de agricultura sostenible.

Los conceptos de umbral económico de daños o de control integrado, desarrollados por otros profesionales de la protección de cultivos (Carlson, 1971).

Algunos efectos significativos del cambio en la perspectiva desde la que se orienta el control.

- a) La revalorización de prácticas de control con pequeño efecto inmediato sobre las poblaciones de patógenos, pero con efectos potencialmente importantes y estables a largo plazo, si se integran en estrategias más amplias. Así, los métodos basados en la modificación del medio a través de prácticas culturales o en el control biológico, cobran especial relevancia.
- b) La reconsideración del uso de la resistencia genética, incluyendo la obtenida por método de ingeniería genética (resistencia por transgenes). Los progresos en el análisis de la genética de poblaciones de huésped y patógenos, principalmente en poblaciones naturales, permiten diseñar estrategias en la que la resistencia, procurando una protección eficaz, no sea rápidamente erosionada.

Dentro de las estrategias de manejo, el uso de variedades resistentes posee máxima prioridad a nivel mundial; sin embargo, no siempre es posible contar

con variedades que posean dichas características por lo que se agrava debido a la cantidad de especies y razas existentes.

Generalidades sobre diagnóstico de enfermedades.

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

El diagnóstico y manejo de enfermedades y otros desórdenes en las plantas depende del conocimiento de todos los factores que afectan el crecimiento y desarrollo de los mismos. Usualmente, hay factores ambientales que causan daño y afectan el crecimiento de las mismas, causando que éstas se observen poco vigorosas. Esto promueve que organismos causantes de enfermedades y otras plagas, como insectos y ácaros, afecten las plantas. Al realizar un diagnóstico debe asegurarse de tener un cuadro amplio del caso particular que está analizando y considerar otros factores como, la historia del lugar y el patrón de daño causado por la enfermedad o plaga.

Según Malagón y Pupiro, (2003), el diagnóstico de las enfermedades de forma rápida y precisa evita el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos como plaguicidas.

En años pasados, básicamente la detección de patógenos dependía de métodos que requieren de mucha experiencia, habilidad y conocimiento de la taxonomía de los microorganismos. Además son técnicas que consumen mucho tiempo. Sin embargo las técnicas modernas han permitido una detección más eficiente de variedades patogénicas con mayor rapidez y precisión, ejemplo de ello tenemos el uso de técnicas serológicas (ELISA) y moleculares (PCR) (Rosales, 2003 citado por Malagón y Pupiro, 2003).

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

Procedimientos para realizar un diagnóstico

El diagnóstico incluye la identificación del problema, el alcance del problema, importancia de la magnitud del problema, método de control empleado, demanda de investigación y costo-beneficio (Vázquez, 2003).

1.2 Diagnóstico presuntivo

Para realizar un diagnóstico presuntivo lo más certero posible el fitosanitario debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

Examinar el campo y los alrededores.

Identificación de la especie o variedad enferma.

Patrones de anormalidad, distribución geográfica de la enfermedad en el campo y comparación de plantas.

Examinar plantas individuales, posición de síntomas y signos.

Prácticas agrícolas del cultivo: fertilización, riego y control químico.

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

1.3 Diagnóstico de confirmación

1.3.1 Diagnóstico tradicional.

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

Diagnóstico macroscópico el cual se basa en la observación de síntomas. Es muy importante la experiencia del fitopatólogo y su conocimiento de las variables que inciden en la enfermedad, como el cultivo a investigar, el suelo, clima, patógeno.

Diagnóstico microscópico, que consiste en la observación de la estructuras del microorganismo fitopatógeno. Esta observación puede ser directamente al microscopio de luz, para el caso de las bacterias, hongos, nemátodos o en el uso de microscopía electrónica para identificar a los virus

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

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

2. Técnicas clásicas para el diagnóstico

Un requisito previo para el control de cualquier enfermedad es la detección e identificación apropiada del organismo causal. La detección de patógenos en plantas con síntomas puede ser relativamente simple si se tiene extensa experiencia con el diagnóstico de la enfermedad y aislamiento del patógeno. Por otro lado la detección del patógeno en las semillas y materiales de propagación asintomática tales como: tubérculos de papa, pueden ser sumamente difíciles cuando la población de los patógenos es muy baja en los propágulos. Debido a esto se necesita técnicas capaces de detectar un número bajo de patógenos en los propágulos. Antes del desarrollo de las técnicas serológicas el único método disponible y fiable para la identificación de hongos y bacterias fue el aislamiento en medio de cultivo y prueba de patogenicidad. Las pruebas serológicas permiten el diagnóstico presuntivo de enfermedades

bacteriana. Sin embargo hasta que no se desarrollaron las técnicas basadas en ADN, no se pudo detectar los patógenos en plantas asintomáticas (Shaad y Frederik, 1992).

2.1 Empleo de medios selectivos

Mediante el empleo de medios selectivos se puede realizar una determinación cuantitativa de población. Algunos medios selectivos se basan en las posibilidades de las bacterias de utilizar sustratos específicos. La presencia o ausencia de crecimiento y el color de las colonias son importantes. Ejemplo: Las especies del género *Erwinia* causantes de la pudrición blanda producen enzimas peptolíticas que sirvieron de base para la confección de un medio selectivo que contiene polipectato sódico, las cavidades que se forman en la superficie del medio indican la presencia de microorganismos peptolíticos. Estas enzimas degradan las pectinas de la lámina media, causando el colapso del tejido, pudrición blanda y muerte de la célula.

Otros medios se basan en la tolerancia del patógeno a cierto número de antibióticos, fungicidas, bactericidas que los microorganismos saprófitos no toleran o no soportan en determinadas concentraciones. Se emplean también diferentes colorantes que provocan un crecimiento característico y desarrollo de colonias cuyo aspecto permite distinguirlas fácilmente de otros que no se corresponde con el patógeno estudiado contaminante.

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

Técnica de microscopía óptica y electrónica

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

2.3 Técnicas serológicas.

El uso de inmunoensayos en la detección de patógenos de plantas ha sido rutinario en los últimos años, especialmente en virus entre los más usados están:

Método por aglutinación: Consiste en hacer reaccionar cantidades equivalentes de los reactantes (Ag y Ac). La formación de gránulos aglutinados o agregados indican una reacción positiva. Las reacciones de aglutinación son menos específicas pues tienen la desventaja de depender grandemente de los factores físicos químicos, tales como, concentración de electrolitos, pH, temperatura y tiempo.

Método por precipitación: Pueden ser en medios líquidos o en geles. Estos métodos han demostrado tener una notable eficacia para individualizar y purificar los antígenos dotados de diferencias particulares. La unión del Ag y Ac se traduce por la formación de un precipitado insoluble con la condición que los reactivos se encuentren a concentración equivalente.

Método del látex: Está basado en la prueba de aglutinación. Los Ac son adheridos a partículas de látex. Al enfrentarse el látex sensibilizado con el Ag específico se produce la agregación entre estas esferas y los Ag. Esta prueba ha sido usada principalmente en Virología, en Bacteriología la técnica ha sido usada con éxito para detectar *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* y *Ralstonia solanacearum* en papa y *Xanthomonas albilineans* en caña. El método es de 100 a 1000 veces más sensible que una aglutinación normal, la reacción aparece más rápida, generalmente no es necesario microscopio para observar la reacción, se necesita muy poco inmunosuero, no requiere la clarificación de la savia.

Técnica de Inmunofluorescencia: Esta técnica se basa en la conjugación de anticuerpos específicos con moléculas teñidas con productos, ejemplo, la fluoresceína, que produce un color verde amarillento. Es muy sensible para identificar bacterias fitopatógenas y útil para analizar un gran número de muestras. La técnica de inmunofluorescencia permite identificar un antígeno con la ayuda de un inmunosuero conocido, e investigar y titular un anticuerpo con la ayuda de un antígeno conocido.

Técnica inmunoenzimática ELISA: El ensayo se basa en la interacción específica de un antígeno (patógeno) y un anticuerpo (proteínas inmunoglobulinas producidas en un vertebrado superior, usualmente conejos). La reacción se visualiza a través de la acción de un conjugado enzima-anticuerpo sobre un sustrato. Es un método rápido de gran sensibilidad, especificidad y bajo costo, que supera a muchas técnicas de diagnóstico empleadas con anterioridad.

Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA, todas basadas en el mismo principio. El tipo de técnica y anticuerpo a emplear dependerá del objetivo de la aplicación (campo, laboratorio), tipo de muestra (suelo, agua tejido) y nivel de sensibilidad y rapidez requerida. La técnica ELISA con sándwich de doble anticuerpo es una de las más empleadas, en este caso el antígeno es ubicado entre dos anticuerpos específicos, el de captura y el de marcaje, este último está conjugado a una enzima y puede cuantificarse en el espectrofotómetro. Esta técnica es de gran utilidad en la detección de patógenos de mezclas complejas, tales como, suelo, extractos de plantas.

Las técnicas de inmunodetección han sido usadas en la detección de microorganismos fitopatógenos, principalmente virus y bacterias y en menor escala para hongos. Una aplicación importante se ha encontrado en los estudios de taxonomía de microorganismos, la fisiología de la enfermedad y la ecología de los patógenos. Con el empleo de estas técnicas se pueden establecer estrategias de manejo de patógenos, como la certificación de semillas o fijación de cuarentenas.

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

al, 1999).

Técnicas avanzadas para el diagnóstico.

Dentro de estas se encuentran las relacionadas con la biología molecular que serán abordadas mas adelante con las técnicas para medir variabilidad genética.

Técnicas para evaluar patogenicidad y etiología.

Para determinar la patogenicidad y la etiología de un patógeno comúnmente es necesario aplicar los postulados de Koch, los cuales permiten identificar de forma rápida utilizando hospedantes sanos de la misma especie el agente causal que esta causando afectaciones fisiológicas a las plantas (Flores-Olivas, et al, 1997., lañez, 1998) los cuales son enunciados a continuación:

- El organismo debe ser encontrado asociado con la enfermedad en todos los casos observados.
- El organismo patógeno debe ser aislado y cultivado in vitro en el laboratorio.
- El organismo patógeno debe ser inoculado a un hospedante sano de la misma especie o variedad en la cual aparece la enfermedad.
- El organismo patógeno debe ser reaislado en cultivo puro y tener las mismas características que el postulado 2.

Técnicas para la producción de inóculo.

- Método de Hussey y Barrer (1973).

Según, Sánchez, y Rodríguez, (2000), Se emplea una suspensión de huevos y larvas de una población pura de *Meloidogyne incognita*, raza 2, proveniente del cultivo del tabaco y multiplicada en tomate.

El método comprende la desintegración, en una licuadora, de las raíces fuertemente agalladas por el nemátodo, con solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.5 %, esto se aplica para la una mejor recolección de los huevos, adultos y juveniles de la plaga.

- Obtención de inóculo in vitro.

Martínez et al, (2002) utilizaron esta técnica para inducir la esporulación en el hongo *Alternaria solani* agente causal del tizón temprano de la papa.

Técnicas para conocer la variabilidad microbiana.

Existen varios géneros para describir las variaciones en la capacidad patogénica de una especie (Robinson, 1969), entre ellos, las formas especiales y razas fisiológicas. La primera se refiere cuando el diapasón de hospedantes lo constituyen especies, géneros, etc, pero nunca variedades o líneas. El otro

concepto está relacionado cuando las diferencias en la patogenicidad radican al nivel de variedades o líneas del hospedante.

Las especies de *Alternaria* que se caracterizan por ser parásitos lo son en tejidos vivos y alternativamente pueden comportarse como saprofitos en distintos sustratos. Las especies que conforman el género manifiestan gran similitud en el comportamiento patogénico en los distintos hospedantes, entre ellos: Las enfermedades que provocan son más severas en climas cálidos y húmedos y los conidios son resistentes a las condiciones adversas (Rotem, 1994). Otra de las características comunes a varias especies del género es la producción de toxinas para asistir al proceso patogénico (Nishimura, 1983; Cotty y Misaghi, 1984; Ozcelik, 1996, citados por Pérez, 2003).

Estudios genéticos poblacionales en hongos fitopatógenos.

El manejo de las enfermedades es un desafío continuo de los productores. El ambiente complejo en que los patógenos interactúan con los hospedantes hacen difícil su control. Una de las causas del éxito limitado en el manejo de las enfermedades es el escaso conocimiento de la variabilidad y de la estructura genética de las poblaciones de los patógenos (Martin y English, 1997). Obstáculos conceptuales y biológicos, además de la falta de comunicación impiden una integración efectiva entre genetistas y fitopatólogos (Milgroom y Fry, 1997).

Los patólogos vegetales comenzaron los estudios en genética cuando se descubrieron las razas fisiológicas en poblaciones de hongos. Las preguntas que surgen a partir de este descubrimiento son las mismas que se hacen en la genética poblacional, por lo que pudiera decirse, que hubo una integración natural entre esta disciplina y la epifitología (McDonald, 1997).

Las bases para los estudios poblacionales y las variaciones, esta puede ser introducida dentro de una población por mutaciones, recombinaciones y la migración. La variación existente actúa mediante los procesos de selección y deriva genética (Leung *et al*, 1993).

Según varios autores, el futuro de la fitopatología, desde el punto de vista, de la genética poblacional será enfatizar en el papel que tienen las fuerzas evolutivas mencionadas anteriormente en el cambio de las poblaciones de los fitopatógenos (Leung *et al*, 1993; Milgroom y Fry, 1997).

- Marcadores Fenotípicos

En el estudio de los hongos fitopatógenos, el análisis de la virulencia es el método más empleado para caracterizar las poblaciones de los patógenos (Leung *et al*, 1993). Consiste generalmente en determinar el espectro de virulencia en un grupo de variedades diferenciadoras. Esta medida de la variación genética brinda información sobre la estructura patogénica de la población y es por tanto es de mayor interés directo para productores, mejoradores y patólogos.

Existen, sin embargo, algunas limitaciones en el empleo de este análisis para inferir la estructura poblacional y es que los genes involucrados en la especificidad con el hospedante representa una pequeña fracción de los genes en el patógeno y pueden estar sometidas a una fuerte selección por el hospedante (Leung et al, 1993).

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

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

Hibridación de ácidos nucleicos: Se basa en el apareamiento de secuencias de bases de nucleótidos del ADN de tal forma, que marcando una de las secuencias de nucleótidos (marcadores no radioactivos) se genera una señal que nos permite observar la hibridación. Existen variaciones de la técnica de hibridación, la más usada y sencilla es la hibridación tipo gota (dot blot) en la que una gota de la muestra a analizar simplemente se fija en la matriz de nitrocelulosa. Cuando la hibridación se realiza con sondas no radiactivas, estas se detectan por reacciones colorimétricas. Existe una serie de variantes de hibridación que, aunada al empleo de marcadores moleculares, son herramientas poderosas en el diagnóstico de enfermedades vegetales y en la detección de la variación genética dentro y entre las poblaciones, el análisis y detección de la expresión de genes, tanto del patógeno como de la planta y en estudios taxonómicos y epidemiológicos (Flores- Oliva, et al, 1997).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades vegetales. Es utilizada en la detección de patógenos en semillas, el cultivo de tejidos, detección de toxinas y residuos de pesticidas (Flores-Olivas, et al ,1997). La PCR es una técnica que permite determinar relaciones filogenéticos entre especies y constituye una buena herramienta de análisis de la biología de las poblaciones (Baró, 1998). Según Shaad,et al, Mutasa ,et al, citados por Flores-Olivas, et al ,1997 entre las ventajas de la PCR está la detección de moléculas simples en mezclas complejas sin usar sondas radioactivas y con alta sensibilidad. Una de las ventajas sobre los métodos tradicionales es que no se necesita cultivar los organismos antes de la detección.

La PCR fue ideada por el bioquímico estadounidense Kary B. Mullis en 1983 y se generalizó a finales de la década de los 80. Es fácil de automatizar y puede copiar una sola molécula de ADN varios millones de veces en unas pocas horas (Encarta, 2006).

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

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena.

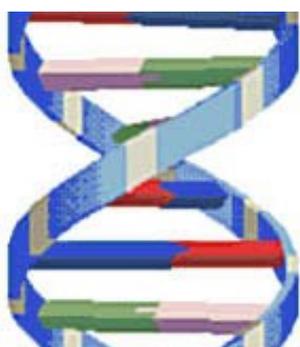
2ª Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.

3ª Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa

Las aplicaciones de la PCR son múltiples y parecen estar sólo limitadas por la imaginación de los científicos. Entre ellas tenemos: la amplificación de fragmentos de genes como rápida alternativa de la clonación, la modificación de fragmentos de ADN, la detección sensible de microorganismos seguido de una segura genotipificación,

La elección del método de análisis dependerá del organismo estudiado y sobre todo de su variabilidad genética, para delimitar especies o grupos dentro de especies se han utilizado ampliamente marcadores de tipo proteínas o isoenzimas. Las técnicas basadas en el análisis comparado del tamaño de los fragmentos de ADN permiten distinguir aislamientos específicos Baró citado por (Pérez, 2003).

Los estudios genéticos de cualquier organismo requieren una forma fácil y precisa de registrar los caracteres o marcadores, deben ser fáciles de identificar y seguir en la descendencia y ser polimórficos (informativos).



Los marcadores del polimorfismo del ácido desoxirribonucleico (ADN) o marcadores moleculares (MM) se emplea en el monitoreo de la diversidad genética, tanto en estudios filogenéticos como en el control de la estabilidad o de la novedad genética con fines mejoradores (Ceballos, 2000).

La variabilidad genética es un fenómeno común en la naturaleza y es necesaria para la evolución de los organismos, se puede observar a nivel de individuos, el cual presenta varios *loci* con diferentes alelos, o también a nivel de población, en donde se encuentran la diferencia entre los grupos de individuos (McDonald, 1997).

En los últimos años, el uso de los marcadores moleculares en la actividad conservacionistas de los recursos fitogenéticos, ha ido en aumento y cabe esperar que continúe esta tendencia en la medida que surjan nuevos productos biotecnológicos y se establezcan medidas para su protección legal, en Cuba se trabajo en base a esto.

Actualmente los marcadores se clasifican en morfológicos y moleculares.

Marcadores Morfológicos

Los marcadores morfológicos son caracteres fácilmente detectables en un organismo, no destructivos y permiten analizar gran número de individuos. En plantas puede ser: altura, diámetro, formas o color, etc. En cambio, en los hongos son raros, aunque se han utilizado en estudios importantes a nivel de laboratorio sobre la variación y recombinación genética (Michelmore y Hulbert, 1987). Son útiles en estudios de laboratorios, pero muy difíciles de observar en poblaciones naturales, tienen un limitado número de alelos y generalmente son afectados por las condiciones ambientales, lo que los hace caracteres poco estable, además de poder presentar codominancia (no se puede inferir todos los genotipos a partir del fenotipo) o epistasia (un gen puede enmascarar la acción de otro gen) (Egger, 1992).

Marcadores Moleculares

Marcador molecular (MM): En la literatura se recogen diversas definiciones del término marcador molecular:

- Son segmentos de ADN que se consideran como marcas o puntos de referencias para el análisis del genoma. Estos segmentos, usualmente, representan variantes a sitios polimórficos que pueden ser identificados empleando estrategias generales, tales como Hibridación molecular o Amplificación enzimática del ADN (Caetano – Anollis, 1993).
- Es toda variabilidad de naturaleza bioquímica – molecular susceptible de ser de algún modo asociada con la variabilidad de algún parámetro morfológico agronómico, permitiendo la determinación inequívoca de los progenitores además de transmitirse en forma estable a la progenie (Campos, 1995).
- Cualquier fenotipo molecular originado de la expresión de un gen (Ejemplo: Isoenzima) o de un segmento específico de ADN correspondiente a regiones del genoma que se expresen o no (Ferreira y Grattapaglia, 1995).
- Cuando se habla de un marcador molecular se define a su vez como un marcador genético, es necesario verificar su comportamiento de acuerdo con las leyes básicas de herencia mendeliana segregante (León, 1998).

Los marcadores moleculares ofrecen soluciones exitosas en numerosos cultivos y se consideran entre las 10 tecnologías de mayor impacto para el siglo XXI. Con el advenimiento de ellos, se revolucionaron los estudios genéticos debido a sus múltiples ventajas con respecto a los morfológicos, los cuales permiten analizar directamente el genotipo sin la influencia de los factores ambientales. Dentro de sus ventajas se encuentran:

- Permite mayor nivel de polimorfismo para cada locus estudiado y pueden ser estudiados varios locus al mismo tiempo. Lo que facilita el mapeamiento genético.

- Los marcadores moleculares son generalmente neutros en relación con los efectos fenotípicos, con influencia mínima de efectos epistáticos o pleiotrópicos.

En general son codominantes, conteniendo mayor cantidad de información genética por locus.

Según el nivel en el cual los genes son detectados, los marcadores moleculares se dividen en proteínicos (isoenzimáticos) y de ADN.

Isoenzimas

La mayoría de los organismos contiene diferentes formas de muchas de sus enzimas activas, estas formas (isoenzimas) comparten una misma actividad catalítica y son específicas del estado de desarrollo del individuo y de la especie. Las isoenzimas pueden codificarse por diferentes alelos de un mismo locus (alozimas) o por locus genéticos separados, frecuentemente poseen diferente movilidad electroforética, debido a las diferencias en las secuencias aminoacídicas, lo cual reflejan diferencias en la secuencia del ADN (Egger, 1992).

Esta técnica se ha empleado mayormente en la década del 70' para el estudio de hongos fitopatógenos. La misma permite el procesamiento de un gran número de muestras y es generalmente sensible para detectar variaciones dentro de la población. Sin embargo, los marcadores isoenzimáticos están influenciados por las condiciones de crecimiento, edad y tipo de estructura, se limita a las regiones codificadoras del ADN y generalmente no es lo suficientemente variable para los análisis de poblaciones (Egger, 1992). Muchos de los alelos detectados son monomórficos (loci con ninguna o poca variación entre los individuos). No obstante, las isoenzimas siguen siendo un potente marcador genético en hongos que poseen suficiente variación (MCDonald, 1997).

Existen al menos tres áreas fundamentales en las cuales se puede emplear análisis isoenzimático:

1. Esclarecimiento y delimitación de tasas de hongos.
2. Identificación de cultivos de hongos a nivel de especie y subespecie.
3. Estudios genéticos incluyendo genética poblacional.

Su utilidad como marcador molecular está bien documentada y las variantes genéticamente definidas de las isoenzimas han demostrado su importancia en la evolución de la variabilidad de especies, en los cultivos del arroz, maíz, frijol, ajo, trigo y soya (León, 1998).

Marcadores genéticos selectivamente neutrales

La variación selectivamente neutral se refiere a la variación que no afecta el fitness (o que asume que no lo afecta y que no está bajo selección). Esta variación no se refleja en el fenotipo y puede llegar a ser, incluso, una diferencia en un nucleótido en un gen o en un fragmento de ADN repetitivo. En la actualidad, entre los marcadores más utilizados, están los basados en el

ADN (ácido desoxirribonucleico). Los juegos de marcadores moleculares, repartidos por el genoma, y para los que se suele recurrir a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se encuentran:

- ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) (Random Amplified Polymorphic DNA)
- Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) (Restriction Fragment Length Polymorphism).
- Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Mc Donald, (1997), plantea que los mencionados marcadores detectan el segundo tipo de variación, por lo que son marcadores neutrales no influenciados por el ambiente, y por este motivo pueden ser determinados con menor ambigüedad que los marcadores tradicionales, los cuales abordaremos más adelante.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es utilizada para el diagnóstico de patógenos que afectan cultivos de importancia económica (Ej. Geminivirus). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los marcadores de ADN que tiene por base esta técnica, tiene sus múltiples aplicaciones en la identificación de variedades y son especialmente útiles en la diferenciación de materiales obtenidos por variación somoclonal o mutaciones a través de los marcadores RAPD usando ocho cebadores, de firma comercial Operan Technologies, fue posible detectar diferencias entre los mutantes y su donante después de calcular los coeficientes de similitud, la distancia y realizar análisis de componentes principales como el software. SPSS para Windows (SPSSWIN).

El uso más común de las técnicas de marcadores moleculares de ADN en las investigaciones de mejoramiento genético de vegetales es el estudio de la diversidad de genes, sin embargo, existen otras alternativas diferentes, en las cuales la diferenciación de cultivares, a través de estos marcadores, especialmente los basados en la PCR pueden ser utilizados en los programas de mejoramiento.

Por diversas razones, que incluyen costos relativos, espacios, cantidades de ADN, molde y tiempo, estos marcadores superan al resto de los marcadores más convencionales como el RFLP y la electroforesis de proteínas. La aplicación de esta técnica trae especiales beneficios en los casos de programas de investigación para el mejoramiento de cultivos de ciclo más largos.

ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)

Los marcadores RAPD han sido ampliamente utilizados por sus ventajas prácticas que pueden resumirse en simplicidad y rapidez, desde su aparición, esta técnica se ha utilizado ampliamente en el estudio de la variabilidad genética de los hongos. La detección del polimorfismo es rápida, sin necesidad de hacer transferencia y tener conocimiento previo del ADN como sucede en el

RFLP. Se requiere de poca cantidad de ADN, lo que lo hace adecuado para hongos biótrofos (McDonald, 1997).

Entre sus limitaciones se encuentra el hecho de ser menos informativo que el RFLP (marcador dominante) y tiene problemas de reproducibilidad. Entre los factores que influye en la reproducibilidad de los resultados se encuentra el aparato termociclador y el origen de la enzima polimerasa.

Cuando se estudia una gran cantidad de aislamientos la técnica RAPD es una de las más recomendadas.

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Esta técnica es fácil de interpretar, constituye un marcador codominante y ofrece un potencial ilimitado de alelos por locus. Tiene ventajas para los estudios de genética poblacional con respecto a RAPD, debido a la alta especificidad cuando se utilizan sondas específicas, que el ensayo puede tolerar contaminaciones con ADN de otros orígenes y los experimentos son reproducibles. Su desventaja fundamentalmente radica en que requiere mayor experiencia e insumos que el RAPD, además de que consume mayor cantidad de tiempo.

Boehm *et al.*, (1993), plantean que la aplicación de esta técnica ha sido muy importante en el estudio de hongos fitopatógenos. Se ha esclarecido la estructura genética de la población global del agente causal de la enfermedad del Mal de Panamá en el cultivo del plátano (*Fusarium oxysporum* fsp. cubense).

Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP)

Esta técnica está basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción genómicos empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Polimerase Chain Reaction. Es usada en ADN de cualquier origen y complejidad. Los cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa no están dirigidos a una secuencia conocida del ADN. La técnica de AFLP detecta polimorfismo debido a cambios en y alrededor de los sitios de restricción.

Las ventajas de esta técnica las describe Majer en (1996) y se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Es un marcador neutral y detecta polimorfismo en todo el genoma.
2. Es rápido y eficiente.
3. Es real y reproducible porque la unión del cebador es muy específica tanto con la secuencia del adaptador como el sitio de restricción de la enzima.

Las desventajas del AFLP respecto al RAPD es que se requiere más experiencia (ligazón, digestiones con enzimas de restricción y manipulación de geles de poliacrilamidas) y sufren de los mismos problemas analíticos del RAPD (McDonald, 1997).

Esta técnica se ha aplicado para determinar variabilidad intraespecífica en diferentes especies. En un estudio combinado de RAPD y AFLP mostró que el número total de bandas obtenidas con cuatro combinaciones de AFLP fue cuatro veces superior a la obtenida con 10 cebadores y el número de bandas polimórficas es casi tres veces superior, en este caso se encontró la relación entre el origen de los aislamientos y no entre los patotipos (González, 1998).

Marcadores genéticos convencionales

Virulencia

Tradicionalmente los patólogos vegetales han usado marcadores genéticos que son relevantes en la agricultura como es la virulencia de los patógenos, el cual se basa en determinar la virulencia de diferentes aislados según la magnitud de la respuesta de determinados genotipos del hospedante con genes de resistencia diferente, o la resistencia a fungicidas específicos. Estos marcadores brindan información útil a los programas de mejoramiento genético, a las compañías químicas y al servicio de extensión agrícola.

No son marcadores neutrales ya que la distribución de la variación genética de otro loci no seleccionado (todos los que no sean los de la virulencia o la sensibilidad) puede estar asociada con las variantes alélicas de la virulencia y la sensibilidad a los fungicidas (desequilibrio gamético en la población).

Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG).

Es un marcador empleado para clasificar y diferenciar cepas de hongos. Los genes que determinan la incompatibilidad vegetativa proporcionan marcadores naturales para una gran variedad de hongos. Los grupos de compatibilidad son muy útiles para la identificación de clones de hongos que se reproducen mayormente por vía asexual, aunque se ha demostrado que hongos con el mismo VCG no siempre son miembros del mismo clon (McDonald, 1997).

La principal ventaja de los VCG es lo relativamente fácil y barato de implementar. Una de sus mayores desventajas es que es un marcador fenotipo y por tanto no es adecuado para medir similitud y diferenciación en la población y además, algunos aislamientos no forman mutantes (Kistler, 1997).

Técnicas para evaluar el efecto de las variables climáticas.

Los hongos, como patógenos de los cultivos agrícolas, son conocidos por la humanidad desde el siglo IV antes de nuestra era. Teofrasto (amigo y discípulo de Aristóteles) en sus trabajos mencionaba los champiñones, trufas, colmenillas y otros. En el siglo I de nuestra era, algunos fijaron su atención en aquellos que descomponían las bases de los troncos de árboles (Gómez, 1997).

Durante un largo período, los hongos impunemente causaron enormes daños a la humanidad y esta buscaba distintos métodos para eliminarlos, pero no tenían éxito, porque no conocían su naturaleza.

En 1578 apareció el primer libro del profesor holandés Klausius y no fue hasta mediados del siglo XIX que la micología empezó a desarrollarse, después de los trabajos clásicos de una serie de micólogos entre los cuales se encuentra el francés Antón De Bary y la fitopatología recibió entonces un fuerte empuje a raíz del descubrimiento del caldo bordelés en 1881.

Por supuesto, era imposible en aquella época hablar de pronóstico y señalización y mucho menos como parte integrante de la fitopatología, pues esta disciplina tiene sentido solamente cuando no sólo se conocen las causas que provocan las enfermedades en las plantas, sino cuando además, existen medidas para su control. Es por eso que no es extraño que muchos señalen que los primeros gérmenes del pronóstico los encontremos en los seleccionadores. (Gómez, et al., 1993).

El hambre que en 1847 azotó a Irlanda, como resultado de lo que hoy es considerada la primera migración de *Phytophthora infestans* en el mundo y que llevó a la tumba a 1 millón de personas que se alimentaban casi exclusivamente de la papa e hizo emigrar a 2 millones de ellos al otro lado del océano. Esto provocó que comenzaran a realizar estudios acelerados en diferentes países como Holanda, Inglaterra, Irlanda, Estados Unidos, Perú, Bulgaria y la antigua URSS con vista a predecir las epidemias y señalar las fechas de control con medios químicos de control. Los métodos actuales que tienen como fundamento el que elaborara Van Everdingen en 1926 forma hoy parte del conjunto de medidas del manejo integrado de plagas en el cultivo de la papa con el objetivo de optimizar las aplicaciones de productos químicos y no seguir aumentando la contaminación en nuestro planeta, más aún, cuando nos encontramos hoy ante la segunda migración de este patógenos en el mundo, cargado de una intensa dosis de agresividad y virulencia, producto del intercambio genético y otros factores en los que el hombre juega un rol decisivo como parte del complejo e interactuante mundo epidemiológico.

- Pronóstico

No es más que el conocimiento con antelación de los intervalos, niveles de infección y daños que pueden producir las plagas, con el fin de poder adoptar las medidas necesarias para su control.

Guadalupe, (1997), plantea que no existe un método estándar o único, debido a que el mismo depende de las particularidades biológicas de las plagas en cuestión, de las condiciones ambientales y del desarrollo científico – técnico del país. Por lo que existen diferentes métodos de pronóstico para un mismo agente nocivo. Además, para la elaboración, adaptación y su puesta en práctica, es necesario el desarrollo de una estructura de elevado nivel técnico organizativo, que pueda estudiar el comportamiento de los agentes nocivos con los factores bióticos y abióticos desde el nivel territorial hasta el nivel de nación y que se puedan adoptar las medidas de protección en los plazos indicados.

Mucho se conoce hoy en día sobre como los factores meteorológicos afectan el desarrollo de las enfermedades. Los factores climáticos que más

frecuentemente limitan las interacciones y los rendimientos potenciales de los cultivos son la temperatura y la humedad.

El clima como factor aislado es el único ingrediente básico utilizado para elaborar advertencias para su uso táctico. Según Bourque (1970), las enfermedades de las plantas para las cuales el pronóstico con la ayuda de información meteorológica puede ser de valor práctico al agricultor son los que tienen los cuatro siguientes requerimientos fundamentales.

1. Que la enfermedad cause daños económicamente significativo en términos de cantidad o calidad en el área que concierne.
2. Que la enfermedad sea variable en el tiempo (momento de aparecer, velocidad e desarrollo, máximo nivel de incidencia) y una parte apreciable de su variación sea atribuida a factores ambientales que actúen directa e indirectamente.
3. Que se disponga de medidas de control, ya sean preventivas o curativas y que puedan ser operadas a un costo económicamente aceptable.
4. Que exista información de investigaciones de laboratorio y epidemiológicos sobre la dependencia e interrelaciones entre la enfermedad y los factores climáticos.

Clasificación de los parámetros.

De acuerdo al tiempo que media entre la emisión de la señal y al cumplimiento del pronóstico, los mismos pueden clasificarse en:

- Pronóstico a corto plazo.
- Pronóstico a mediano plazo.
- Pronóstico para muchos años.

• Señalización

Se apoya en la información que brindan las Empresas, Cooperativas, Agricultores y otras instituciones acerca de la aparición de la plaga basada en el pronóstico, con el objetivo de que se apliquen las medidas más adecuadas para la protección de las plantas.

Naumova Modificado.

Este método, no es más que una modificación de un original ruso basado en los conocidos “días críticos” del pionero holandés sobre esta temática Van Everdingen en 1926 y que ha servido de base para todas las metodologías elaboradas en múltiples países, considera un período de alerta si durante 2 días consecutivos la humedad relativa media es mayor o igual a 84 %, la humedad relativa mínima es mayor o igual a 60 %, la temperatura máxima 84 %, la humedad relativa mínima es mayor o igual a 60 %, la temperatura máxima se encuentra entre 15 – 28 °C y la temperatura mínima es superior a los 11°C, bajo estas condiciones deben esperarse brotes ligeros de la enfermedad en zonas bajas y partes inferiores de las plantas y se recomienda localizar los focos y tratar localmente en plantaciones con más de 30 días.

Un “período crítico”, es considerado si durante 2 días consecutivos, se presentan esas mismas condiciones, pero la temperatura máxima es inferior a 25 °C, deben esperarse brotes fuertes de la enfermedad y si ocurren varios períodos críticos continuos, la epifitotia es eminente, sobre todo en presencia de lluvias, fuerte nocividad en plantaciones con más de 30 días.

Conclusiones

- Las técnicas de diagnóstico de fitopatógenos constituyen una herramienta indispensable para el trabajo de los fitopatólogos.
- La biología molecular constituye una técnica de avanzada tanto en el diagnóstico de enfermedades como en la determinación de variabilidad genética de fitopatógenos.
- La determinación de las variables climáticas y dentro de ella el pronóstico y señalización constituyen una herramienta importante para establecer las medidas de control de los patógenos.

BIBLIOGRAFIA

1. Bateman, D. F. 1978. The dynamic nature of disease. En. "Plant Disease, an advanced treatise". Vol. III, (J. G. Horsfall & E. B. Cowling, Eds.). p. 33 – 83. Academic Press, NY.
2. Brasier, C. M. 1990. China and the origins of dutch elm disease: an appraisal. *Plant Pathol.* 39: 5 – 16.
3. Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ® 2005. © 1993-2004 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
4. Boehm, E. W. A., Ploetz, R. C, Kistler, H. C. 1993. Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups *Fusarium oxysporum* fsp. *cubense*. *Mol. Plant Microbe Interaction* 7(4): 196 – 207.
5. Bourque, P. M. 1970. Use of weather information in the prediction of plant disease epiphytotics. *Annual Review at Phytopathology.* 8: 345 – 371.
6. Burdon J. J. 1987. Diseases and plant population biology. Cambridge University Press.
7. Campanioni, N., Caballero, R., Estrada, J., Martínez, R., Fresneda, J., Méndez, A. 1984. 80 años de la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas. Editorial Científico – Técnica, Ciudad de La Habana. Cuba.
8. Caetano – Anollis, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. In *PCR Methods and Application*, (Cold Spring Harbor Lab. Press ISSN): 85 – 94.
9. Campbell, C. L. & Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, NY.
10. Campos, H. 1995. Marcadores moleculares: conceptos. *Agrosur* 23(1): 68 – 75.
11. Cardín, P. 1914. Tercer Informe Anual. Febrero 1909. Informe del Departamento de Entomología y Patología Vegetal.
12. Carlson, G. A. 1971. Economic aspects of crop loss and control at the farm level. En. "Crop loss assessment methods"(L. Chiarappa, Ed.), pp. 2311 – 2316, FAO, Roma.
13. Ceballos, A. M. (2000). Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis del cafeto (*Coffea* spp), mediante el uso de marcadores morfohistológico y moleculares. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
14. Clarker, H. R. G., Leigh, J. A., Douglas, C. J. 1992. Molecular signals in the interactions between plants and microbes. *Cell* 71: 191 – 199.
15. Cotty, P. J. & Misaghi, I. J. 1984. Zinniol production by *Alternaria solani*. *Turkish Journal of biology.* 21: 353 – 358.
16. Cramer, M. M. 1967. Defensa vegetal y cosecha mundial. Bayer, Leverkusen.
17. De Faz, A. B. Fernández de Cossío. 1987. Principios de Protección de Plantas. Editorial Científico – Técnica, Ciudad de La Habana. Ministerio de Cultura. 601p. Cuba.

18. Egger, K. N. 1992. Analysis of fungal population structure using molecular techniques. En. "The fungal Community, its organization and role in ecosystem", 2da edic. GC Carroll y Dt Wiclow edic. Mycology 9:2 193 – 208.
19. Flores, A.O et al, 1997. Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. 56p.
20. Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. 1995. Introducción al uso de marcadores en el análisis genético. Segunda edición, Brasilia: EMBRAPA – CENARGEN, 220p.
21. Gibas, A. 1980. A plant virus that partially protects its wild legume host against herbivores. Intervirology 13: 42 – 47.
22. Gómez, I. Guadalupe 1997. Pronóstico y señalización de las enfermedades fungosas que atacan el cultivo de la papa. Fitosanidad Vol. 3 (1): 23 - 31.
23. Gómez, I. Guadalupe, Figueroa, M., Hernández, A., Rico, V. M., Pedroso, P., Secada, Irina Guerra, Marta E. y Castellanos, L. 1993. Clasificación bioclimática del tizón temprano de la papa en Cuba. 8vo Forum de Ciencia y Técnica. INISAV. C. Habana. Cuba.
24. González, Aileen., Miguel, Alexander., Stefanova, Marusia. 1999. Cancrosis bacteriana de los Cítricos. Boletín Técnico 5(2) octubre.
25. González, M., Rodríguez, R, Zavala, Ma. Elena, Jacobo, J. L., Hernández, F., Acosta, J., Martínez, O., Simpson, J. 1998. Characterization of mexican isolates of *Collectotrichum lindemutianum* by using differential cultivars and molecular markers. Phytopathol. 88(4): 292 – 299.
26. Herrera, L. 2003. La Fitopatología Cubana. Historia, desarrollo y actualidad. Fitosanidad, Vol. 7, No. 3, 55 – 62. Cuba
27. Horsfall, J. G. & Cowling, E. B. 1977. Prologue: How disease is managed. En. " Plant Disease, an advanced treatise". Vol. I, (J. G. Horsfall & E. B. Cowling, Eds). p. 1 – 10. Academic Press, NY.
28. Hussey, R. S. & K. R. Barker. 1973. A compararisson of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant Diseases. Repr. 5 T (12) : 1025 – 1028.
29. Iañez, Pareja. E [en línea] El papel de los microorganismos en las enfermedades. Curso de Microbiología general., 1990. En el servidor. [HYPERLINKmailto:eianez@goliat.ugr.es](mailto:eianez@goliat.ugr.es)
eianez@goliat.ugr.es
30. Kistler, H. C. 1997. Genetic diversity in the plant – pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. En. Simposio de "Population genetics of soilborne fungal plant pathogens". Phytopathol. 87(4): 474 – 479.
31. León, O. 1998. Marcadores moleculares. Principales tipos y bases moleculares, ventajas y limitaciones. Comide, M. T. (Editora), CNIC, p 1 – 18.
32. Leung, H., Nelson, Rebeca, J. and Leach, J. E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. En: Advances in Plant Pathology. Academic Press, pp. 157 – 205.
33. Llácer, G., López, M., Trapero, A., Bello, A. 1996. Patología Vegetal. Sociedad Española de Fitopatología. PHYTOMA – España. 695p.

34. Majer, Dorotea, Mithen, R. Lewis, B. G, Vos, P. & Oliver, R. P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100 (9): 1107 – 1111
35. Pupiro, M. L., Malagón, Rodríguez. L. 2003. Técnicas del diagnóstico de las enfermedades en las plantas. Trabajo de patología vegetal. Universidad Agraria de La Habana. La Habana.
36. Mayea, S., Herrera, L., Andreu, C. M. 1983. Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 425p. Cuba.
37. Martin, F. N. & English, J. T. 1997. Introduction to the Symposium “Population genetics of soilborne fungal pathogens”. *Phytopathology.* 87: 446 – 447.
38. McDonald, B. A. 1997. The population genetics of fungi: Tools and Techniques. En Simposio de “Population genetics of soilborne fungal plant pathogens”. *Phytopathol.* 87(4): 448 – 453.
39. Mc New, G. L. 1960. The nature, origin and evolution of parasitism. En. “Plant Patology, an advanced treatise”. Vol. II, (J. G. Horsfall & A. E.
40. Michelmore, R. W., S. H. Hulbert 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Ann Rev Phytopathol.* 25: 383 – 404.
41. Milgroom, M. G. & Fry, W. E. 1997. Contributions of population genetics to plant diseases epidemiology and management. En: Anonymuus. pp. 1 – 30. Millar, S.A., and Martin, R.R. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol* 26: 409-432p.
42. Nishimura, S. 1983. Host – specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology.* 21: 87 – 116.
43. Ozcelik, N. 1996. Investigation on phytotoxic effects of fungal metabolites. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 20: 85 – 89.
44. Patiño, María del Rosario, Hernández, P., Suárez, R. 1981. Sanidad Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. Ministerio de Educación. pp. 231 – 242. Cuba.
45. Pérez, S. 2003. Variabilidad cultural, patogénica y genética del agente causal del Tizón temprano (*Alternaria solani*) del tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) en Cuba. Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). pp 11 – 26
46. Rabbinge, R. 1993. The ecological background of food production. En. “Crop protection and sustainable agriculture”, (J. C. Zadoks, Ed.), John Wiley & Sons, NY.
47. Robinson, R. A. 1969. Disease resistance terminology. *Rewiew of Applied Mycology.* 48: 593 – 606.
48. Rodríguez Eida, R. Acevedo y María La O. 2001. Determinación del contenido relativo de ADN en *Ustilago scitaminea*, agente causal del carbón de la caña de azúcar. *Revista Protección Vegetal* Vol. 16, N. 2 – 3, 111 - 115.
49. Rotem, J. 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press (The American Phytopathological Society), St. Paul. Minnesota.

50. Sánchez, Lourdes y Mayra, G. Rodríguez. 2000. Utilización del método de Hussey y Barker para la colecta de inóculos del nemátodo *Meloidogyne incognita* en el cultivo del tabaco. Revista de Protección Vegetal. Vol. 15, No. 2: 109 – 113.
51. Shaad, W., Reid D, Frederick. 2002. Real-time and its application for rapid plant disease diagnostics. Plant Pathol.24: 250-258p.
52. Sigarroat, A., Cornide, M. T., Leonard, H. 2001. Paquete de Programa DIVERS. Revista Biología. Vol 15, No.1.
53. Stakman, E. C. & Harrar, J. G. 1957. Principles of Plant Pathology. Ronald Press, NY.
54. Thompson, T. N. & Burdon, J. J. 1992. Gene – for – gene coevolution between plants and parasites. Nature 360: 121 – 125.
55. Van Der Plank, J. E. 1963. Plant disease. Epidemics and control. Academic Press, NY.
56. Vázquez, Luis L. 2003. Manejo Integrado de Plagas. INISAV. CU
57. Whitman, S., Dinesh – Kumar, S. P., Choi, D., Hahi, R., Cow, C., Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the interleukin – 1 receptor. Cell 78: 1101 – 1115, y referencias incluidas.
58. Zadoks, J. C. 1993. Crop protection: why and how. En. “Crop protection and sustainable agriculture”, (J. C. Zadoks, Ed.), John Wiley & Sons, NY.
59. Zadoks, J. C. and R. Schein, 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford University Press. N Y. 427pp.