

FORO

Elementos e importancia del diagnóstico de problemas fitosanitarios

Elkin Bustamante R.*
Galileo Rivas P.*

RESUMEN. El manejo integrado de plagas (MIP) tiene como primer fundamento el diagnóstico ecológico de plagas. Este principio busca dar una respuesta acertada al productor agrícola y forestal, sobre la naturaleza de los problemas fitosanitarios que se le presentan en su sistema de producción. Habitualmente, los profesionales del agro identifican las plagas pero no realizan un diagnóstico de problemas fitosanitarios. Con base en un diagnóstico preciso y el uso de la información obtenida, es posible seleccionar las estrategias y tácticas más apropiadas de MIP. De esta manera se evita la relación simplista patógeno-plaguicida o patógeno-variedad resistente. En este artículo se presentan los elementos básicos del diagnóstico de plagas y la importancia de las consideraciones sobre la fisiología de la planta, fenología planta-plaga, predisposición, procedimientos generales del diagnóstico y algunas técnicas para la identificación del agente causal.

Palabras clave: Diagnóstico, Manejo Integrado de Plagas, Identificación, Plagas, Factores abióticos, Factores bióticos.

ABSTRACT. Elements and importance of the diagnosis of phytosanitary problems. The ecological diagnosis forms the basis of integrated management of pests. This approach aims to give sound answers to agricultural and forestry producers about the nature of the phytosanitary problems found in their production systems. Usually, agriculture professionals identify pests by do not perform a diagnosis of phytosanitary problems. Based on a precise diagnosis and the use of information obtained, it is possible to select the most appropriate IPM strategies and tactics. In this way, the simplistic relation of pathogen-pesticide or pathogen-resistant variety is avoided. In this article the basic elements of pest diagnosis and the importance of plant physiology, plant-pest phenology, predisposition, general diagnostic procedures and some techniques to identify the causal agent, are presented.

Key Words: Diagnosis, Integrated Pest Management, Identification, Pest, Abiotic factors, Biotic factors.

Introducción

En el ámbito de las ciencias agronómicas y la fitoprotección, el panorama que se ofrece a la profesión va más allá de la relación simplista patógeno-químico o patógeno-variedad resistente. Los profesionales tenemos la obligación de responder como conocedores del área, con una conceptualización clara y una estructura operativa funcional y ética como las planteadas por Grogan (1981). En la medida en que se limita la responsabilidad profesional únicamente a la detección del agente causal y a su supresión por medios físicos o químicos, el profesional se estará volviendo redundan-

te, porque los avances tecnológicos permiten que esa función la cumpla un técnico calificado en el manejo de los instrumentos de laboratorio.

El manejo integrado de plagas (MIP) con su concepción ecológica enfatiza como primer fundamento, el diagnóstico correcto del problema fitosanitario; basados en el diagnóstico, el agricultor o asistente técnico pueden seleccionar las estrategias y tácticas de manejo apropiadas (Bustamante 1984).

Existen por lo menos cuatro grupos de técnicos que desempeñan actividades de diagnóstico:

- Extensionistas en sanidad vegetal, asistentes técni-

Recibido: 20/03/99. Aprobado: 30/06/99.

* CATIE. Área Agricultura Ecológica. 7170 Turrialba, Costa Rica. E-mail: ebustama@catie.ac.cr y grivas@catie.ac.cr

cos, funcionarios de empresas de agroquímicos. Este grupo es responsable del acierto o el fracaso de los profesionales de la fitoprotección a nivel del agricultor.

- Profesionales dedicados a las clínicas de identificación y diagnóstico.
- Profesionales con preparación taxonómica, grupo exigente en la nitidez de la identificación y caracterización.
- Especialistas con gran experiencia en las principales plagas de un cultivo.

Las decisiones más frecuentes a nivel del cultivo son las siguientes:

- Con base en un diagnóstico correcto, se toman las medidas de manejo de la plaga.
- Para diagnosticar un problema fitosanitario cuya naturaleza e identidad no es reconocida por el agricultor o asistente técnico, se recolectan muestras e información de campo y se recurre a especialistas antes de definir las tácticas de manejo.
- Aunque no se tiene conocimiento sobre la identidad de la plaga y las condiciones que le favorecen, se decide aplicar medidas de amplio espectro con la finalidad de acertar en su control.

En los dos primeros casos se hace uso de la experiencia en diagnóstico para evitar riesgos de pérdidas en el cultivo e inversiones costosas de manejo. Sin embargo, en la tercera decisión se juega al azar por desconocimiento del agente causal y se cae en el error de la "automedicación" por propia decisión o por confiar en el consejo de otra persona con poca o ninguna experiencia en diagnóstico.

En este artículo se presentan consideraciones generales del diagnóstico, sus fundamentos y procedimientos con énfasis en problemas fitopatológicos.

Qué es el diagnóstico y cuáles son sus niveles

El diagnóstico se puede definir como el arte científico de reconocer por observaciones, estudio o experimentación, la naturaleza de la causa de un problema y los factores que inciden en su desarrollo (Grogan 1981; Streets 1972).

El diagnóstico es una etapa fundamental en el ámbito de la fitoprotección. Para realizarlo se deben analizar las condiciones en que se presenta el problema, en especial el manejo del cultivo y las interacciones planta-agente causal-organismos benéficos-condiciones agroclimáticas, es decir, se requiere de un análisis integral que conlleve a un acertado juicio sobre la etiología del problema y los factores que lo favorecen.

Este enfoque tiene gran aceptación en la actualidad, donde la protección del ambiente y la salud humana son una exigencia de primer orden y la producción sostenible y el MIP son incorporados a los programas agrícolas a nivel mundial.

El diagnóstico se puede llevar a cabo a través de diferentes niveles, de acuerdo con su objetivo y la experiencia, recursos físicos y técnicos a disposición del profesional (Bustamante 1986, Streets 1972, Shurtleff y Averre 1997).

1. Nivel de campo. Se puede realizar en condiciones precisas que permitan identificar la plaga por sus síntomas, signos, distribución en el campo u otros factores. En este caso, la experiencia con el cultivo y sus plagas es fundamental. Muchos asistentes técnicos en cultivos específicos no solo pueden identificar el problema principal, sino también otros de incidencia económica importante.

2. Diagnóstico de confirmación. Cuando se presentan condiciones de campo que no permiten establecer la identidad de los organismos causales, es necesario reunir información de campo y recolectar muestras para análisis de laboratorio. Esto permite además de una clasificación más exacta y útil, la elaboración de las listas y mapas de distribución de plagas de una región.

Es importante recordar que diferentes organismos o factores abióticos pueden ocasionar un síntoma similar en la planta; por lo tanto, se deben evitar los diagnósticos precipitados carentes de información. Cuando todos los rasgos característicos de la plaga no están presentes para llegar a un diagnóstico preciso, se puede dar un diagnóstico presuntivo, sujeto a una confirmación posterior.

3. Diagnóstico de nuevas plagas. En algunos casos, en especial con enfermedades, el agente causal del problema fitosanitario no es conocido, y se hace necesario iniciar un estudio interdisciplinario que permita determinar la naturaleza de la plaga y establecer la identidad exacta, con el fin de orientar su manejo.

Este nivel de diagnóstico exige en muchos casos la disponibilidad de equipos, la participación de diferentes especialistas y el tiempo necesario para realizar un estudio clínico minucioso y analizar las condiciones de campo en que se presenta el problema.

4. Diagnóstico regional. En este nivel se utiliza toda la información de una plaga para que un equipo de trabajo pueda hacer el reconocimiento, en una zona o en un país, de la presencia de esta plaga y las condiciones en que se da. Este diagnóstico indica además la distribución, importancia y prioridad de la plaga para

emprender una campaña de manejo o erradicación o una investigación más amplia, y serviría de base para establecer un servicio de información geográfica de plagas.

Además de la distribución de la plaga, también se puede conocer la presencia de algún tipo de resistencia de la planta o de enemigos naturales, así como problemas de fertilidad o estructura del suelo.

Cuando la plaga no se conoce en un área o país se realiza un reconocimiento negativo, donde se hace énfasis en la búsqueda del agente causal, con el fin de confirmar su ausencia o detectar su introducción. La búsqueda de la escoba de bruja del cacao, la broca del cafeto o el gorgojo *Kaphra*, son motivo de dicho reconocimiento.

Para llevar a cabo estos cuatro niveles de diagnóstico se necesita de la participación de profesionales dedicados a diferentes actividades y de varias especialidades, lo cual confirma la importancia de la mayor integración entre funcionarios de extensión, sanidad vegetal e investigación, en una región o país.

Elementos básicos del diagnóstico

El profesional que realiza actividades de diagnóstico debe disponer de los siguientes elementos básicos: racionalidad, objetividad, conocimientos técnicos, equipo adecuado y habilidad para trabajar en grupo. Estos aspectos constituyen el punto inicial que un técnico dedicado a esta actividad debe considerar, a lo cual, con el tiempo se adicionan, mayores conocimientos y experiencias que lo llevan a convertirse en un experto (Bustamante 1986, Streets 1972, Shurtleff y Averre 1997).

La racionalidad es el elemento del diagnóstico que orienta a una organización sistemática de los labores de campo y laboratorio, acordes con el conocimiento técnico-científico, con el fin de hacerlo más ordenado y preciso.

El complemento a la racionalidad es la objetividad, factor que indica la necesidad de proceder de acuerdo a la existencia de una realidad para cada diagnóstico. La ausencia de este elemento expone al profesional a cometer errores por apresuramiento o exceso de confianza en su experiencia. Por ejemplo, el amplio conocimiento de la bacteria *Pseudomonas solanacearum* como causante de la marchitez de la planta de tomate, no puede conducir a generalizar que este microorganismo es el causante de todo marchitamiento en este cultivo. Diagnósticos subjetivos pueden darse por parte de especialistas, con costos inne-

cesarios de control, pérdidas de cultivos y perjuicios para la comercialización internacional, así como pérdida de credibilidad.

Los conocimientos más utilizados por los profesionales en diagnóstico son: anatomía y fisiología de las plantas, factores que predisponen el ataque de plagas y problemas abióticos del cultivo, fenología del cultivo y la plaga, técnicas de manejo del cultivo y metodologías de diagnóstico.

Cuando el área se circunscribe a uno o dos cultivos, el nivel de conocimientos y precisión se adquiere en menor tiempo. En el caso de realizar diagnóstico de plagas en diversos cultivos es importante el apoyo de expertos en el cultivo y especialistas en diferentes áreas de fitoprotección.

Interferencia fisiológica de la plaga y expresión de síntomas

Las plagas y agentes abióticos que afectan las plantas pueden interferir uno o varios de los cinco procesos fisiológicos básicos: 1) absorción y transporte de agua y nutrimentos; 2) fotosíntesis y metabolismo; 3) transporte de fotosintatos; 4) desarrollo de frutos y 5) maduración y senescencia de tejidos (Agrios 1986, McNew 1960, Horsfall 1979).

Absorción y transporte de agua y nutrimentos. El área de absorción (raíces y pelos absorbentes) puede ser afectada por patógenos del suelo, tales como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Erwinia* spp., *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. (Agrios 1986, McNew 1960).

Los insectos también contribuyen al deterioro de la raíz, especialmente los géneros *Phyllophaga* (Coleopt.: Scarabaeidae) y *Diabrotica* (Coleopt.: Chrysomelidae). La presencia de semilla recién germinada y plántulas desenterradas puede deberse a ratas, taltuzas, ardillas o pájaros (Saunders *et al.* 1998).

Por su parte, las malezas pueden afectar el desarrollo radicular del cultivo por competencia y presencia de sustancias alelopáticas (De la Cruz 1987).

Los principales factores abióticos que pueden afectar el sistema radicular son: sobrefertilización, sequía, inundación, exceso de sales solubles y herbicidas (Agrios 1986, Shurtleff y Averre 1997).

Los síntomas más comunes asociados con esta interferencia son la necrosis, la pudrición de las raíces y tallos de las plantas ("damping off"), las agallas, el desarrollo de raíces adventicias, las decoloraciones típicas de deficiencias nutricionales en el follaje y frutos y la marchitez de la planta. Otros síntomas no fácilmente

te detectables son la disminución del tamaño de las hojas y su capacidad fotosintética.

Los microorganismos patógenos que actúan sobre los haces vasculares, son en su mayoría hongos y bacterias tales como: *Fusarium oxysporum* (diferentes formas especiales de acuerdo con los cultivos), *Verticillium* spp., *Pseudomonas solanacearum* (diferentes razas) *Phytophthora* spp. (Agrios 1986).

El taponamiento del xilema por parte de estos organismos produce el síntoma clásico de marchitamiento, el cual en el caso de las bacterias puede ser reconocido por el flujo blanquecino, que se observa a partir del corte transversal de un trozo de tallo de la planta afectada, que se sumerge en agua (French y Hebert 1982).

Fotosíntesis y metabolismo. Las hojas pueden ser interferidas en su acción fotosintética por una capa de crecimiento micelial, como es el caso del mildew polvoso de las hojas y las fumaginas, crecimientos de color oscuro de hongos como *Capnodium* sp. La maleza como plaga de competencia, puede interferir la radiación solar y disminuir el nivel de actividad fotosintética del cultivo.

Sin embargo, el punto de intercepción más crítico, es la disminución del área foliar por la acción de insectos comedores de hojas y de patógenos que causan lesiones en el follaje e interfieren el metabolismo de proteínas y la producción de la clorofila. Mildewes vellosos, royas, antracnosis, manchas y mosaicos, son algunos de los síntomas más comunes de las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y fitoplasmas (Agrios 1986).

Se pueden presentar efectos similares, como los causados por deficiencias de nutrimentos y fitotoxicidad de herbicidas hormonales y de contacto (Agrios 1986, Shurtleff y Averre 1997).

Transporte de fotosintatos. El floema es la vía de movilización de los azúcares y metabolitos a sitios de crecimiento o almacenamiento, éste puede ser interferida por virus, fitoplasmas y protozoarios tipo *Phytomonas*, los cuales pueden necrosar el floema. Síntomas tales como hojas rojizas y encrespamientos se deben al exceso de azúcares en la hoja (Agrios 1986, McNew 1960, Sinclair *et al.* 1996).

Algunos hongos como *Pyricularia oryzae*, al desarrollarse en la base de la panoja interrumpen el paso de fotosintatos a los granos, *Rhizoctonia solani* al atacar el cuello del tallo en papa, bloquea el floema e impide

el desarrollo normal de tubérculos y causa la formación de tubérculos aéreos (Agrios 1986).

Desarrollo de frutos. En el desarrollo de frutos se presentan dos interferencias, además del llenado incluido en el acápite anterior, que pueden generarse por elementos bióticos y abióticos. En primer lugar se puede observar la caída de frutos pequeños y flores por deficiencias nutricionales, insectos, bacterias, hongos y virus. Los patógenos más conocidos son *Botrytis cinerea* y *Erwinia amylovora*. El otro efecto conocido en frutos, es el reemplazo del tejido por crecimientos de estructuras de hongos, tales como esporas y esclerocios en granos y tubérculos (Agrios 1986, Bustamante y Thurston 1965, Bustamante 1975, McNew 1960, Neergaard 1979).

Maduración y senescencia de tejidos. Las hojas y los frutos especialmente, presentan interferencias por patógenos, insectos y factores abióticos que aceleran la senescencia de los tejidos. En algunos casos, las condiciones de maduración y senescencia estimulan el ataque de hongos como *Alternaria* spp. en solanáceas, al disminuir el contenido de carbohidratos. En los frutos cualquier daño a la estructura física ocasionado por vertebrados e insectos y la acción de hongos y bacterias son los causantes de la mayoría de pudriciones y pérdida de vigor y germinación de semillas (Agrios 1986, Bustamante 1986, Neergaard 1979).

Aparte de estas cinco interferencias, es importante considerar el efecto sobre el meristemo apical que ocasionan los insectos. Asimismo vertebrados, hongos y bacterias que atacan plántulas de monocotiledóneas y dicotiledóneas, en algunos casos, el daño es total y en otros la planta presentará deformaciones posteriormente (Saunders *et al.* 1998).

El concepto de predisposición

La mayoría de plantas son inmunes o resistentes al ataque de las plagas con las cuales entran en contacto (especialmente hongos y bacterias) y la penetración y posterior infección es prevenida frecuentemente por barreras físicas (paredes celulares gruesas, formación de capas de corcho y absición, presencia de tricomas) o bioquímicas (formación de fitoalexinas y sustratos resistentes a las enzimas del patógeno, reacciones de hipersensibilidad). Sin embargo, existen factores no genéticos que actúan previo al proceso de infección y afectan la susceptibilidad de las plantas, sometiendo-

las a un estado de predisposición (Yarwood 1976, Mussel y Malone 1979).

Inicialmente, se pensaba que las enfermedades de los cultivos se debían únicamente a factores del ambiente. Posteriormente, cuando se desechó la teoría de la generación espontánea se consideraba a los microorganismos como la consecuencia y no la causa de las enfermedades. A mediados del siglo XIX fue superada esta etapa y los fitopatólogos centraron su atención, casi exclusivamente, en los agentes causales de las enfermedades, restándole relevancia a los factores que intervienen en su establecimiento y desarrollo (Colhoum 1973, Suárez y Torres 1996).

La predisposición es definida como la tendencia de tratamientos y condiciones que actúan antes de la inoculación o introducción del incitante al afectar la susceptibilidad del cultivo a agentes patógenos bióticos o abióticos. La predisposición es, por lo tanto, un incremento en la susceptibilidad o vulnerabilidad debido a causas externas que se traduce en una reducción de la resistencia de las plantas a las enfermedades (Bustamante *et al.* 1993, Yarwood 1976).

El concepto no debe confundirse. Si un factor biótico o abiótico incrementa la susceptibilidad de la planta a las enfermedades, es predisposición. Si afecta positiva o negativamente al patógeno, esto puede ser protección, terapia, erradicación o activación, pero no predisposición.

En este sentido, al presentarse desviaciones de las condiciones ambientales óptimas requeridas por la planta, los procesos fisiológicos funcionan en forma inadecuada, lo cual ocasiona normalmente fallas generales de los mecanismos de defensa (Levitt 1980, Schoeneweiss 1983).

El estrés tecnológico, la predisposición y las enfermedades iatrogénicas

La importancia de un patógeno que ataca una planta en su ambiente natural, generalmente es muy poca, pero conforme la agricultura tiende al monocultivismo y a la implementación de diversas técnicas agronómicas, además de causar un desequilibrio en el ecosistema y favorecer la proliferación de plagas, también se coloca a las especies cultivadas en un estado de predisposición.

La continua búsqueda del incremento en la productividad muchas veces promueve la adopción de técnicas que pueden provocar estrés severo, tales como altas densidades de siembra, uso excesivo de plaguicidas, especialmente herbicidas, especies de sombra

cultivadas a plena exposición solar, métodos y dosis inadecuadas de fertilización. (Huber 1980, Levesque y Rahe 1992, Russell *et al.* 1989). Esto es denominado estrés tecnológico y es inducido por un inapropiado manejo de la plantación; además puede tener gran importancia en todo tipo de cultivos.

La planificación del manejo del cultivo o el manejo de una enfermedad por cualquiera de las tácticas conocidas no se puede visualizar como un procedimiento lógico, si se ignora la relevancia que tiene la predisposición, ya que sin darse cuenta de ello se puede colocar al cultivo bajo estas condiciones y luego provocará extrañeza los altos niveles de severidad o incidencia de una enfermedad presente en el campo.

En el caso del cultivo de café, Lobos (1993) evaluó el efecto de tres porcentajes de sombra sobre la severidad e incidencia de *Fusarium spp.* y *Phoma costarricensis*, respectivamente, que atacaban plantas de café y determinó que las plantas que crecieron bajo plena exposición solar alcanzaron el mayor índice de severidad y la incidencia más alta se produjo bajo condiciones del 75 y 100% de luminosidad. Lo cual indica que la alta intensidad de luz es un factor importante de estrés que incrementa la susceptibilidad del cultivo al ataque de ambos patógenos. El mismo autor también evaluó el efecto de dos herbicidas en el desarrollo general de plantas de café y su predisposición al ataque de enfermedades del follaje y la raíz, determinando que los residuos de diurón afectaron negativamente el crecimiento de estas e incrementaron la severidad e incidencia de los patógenos mencionados.

Horsfall (1979) consideró que el incremento en el uso de agroquímicos, a partir de la mitad del presente siglo estuvo acompañada del incremento de enfermedades **iatrogénicas**, que corresponden o se generan a partir de las prescripciones o recomendaciones dadas por fitopatólogos, agrónomos o ingenieros forestales, para el manejo de la enfermedad. Por lo tanto, es una enfermedad generada por el **doctor** ("iatro en griego significa doctor).

Una lista de 45 químicos, que pueden inducir enfermedades iatrogénicas en 21 hospedantes, son discutidas por Horsfall (1979). La mayoría son herbicidas o reguladores del crecimiento, así como también fungicidas, insecticidas y nematocidas. El 85% de las enfermedades inducidas son de origen fungoso, seguidas por las virales.

Uno de los efectos principales de los agroquímicos es la reducción de resistencia en el hospedante, mediante cambios en los niveles de azúcar, las estruc-

turas de resistencia y la nutrición mineral. También pueden incrementar el potencial de inóculo del patógeno (Horsfall 1979).

Por tanto, en el diagnóstico es fundamental conocer los factores de predisposición, los cuales pueden definir la presencia de un patógeno oportunista, la mayor incidencia y severidad de una enfermedad o el incremento del inóculo potencial del patógeno

Fundamentos fenológicos para el diagnóstico

El conocimiento de la fenología del cultivo es muy importante para el profesional dedicado al diagnóstico, ya que la susceptibilidad del cultivo al daño causado por plagas, varía de acuerdo con su estado de desarrollo. A su vez, la incidencia de las plagas está en función de los factores ambientales y de la condición del cultivo. En la figura 1 se presentan las principales enfermedades del tomate, con relación al estado fenológico del cultivo. El conocimiento de la presencia de las plagas, de acuerdo con el estado de desarrollo del tomate, puede servir al técnico o al agricultor para concentrar sus esfuerzos de detección, monitoreo y control. Se podrá, entonces, evaluar con mayor propiedad la importancia del ataque de una plaga en particular y las posibles medidas de manejo, conociendo: a) la variedad del cultivo, b) la población de las plagas y c) sus umbrales de acción en función de la etapa del desarrollo del tomate (CATIE 1990).

Durante la etapa de plántula, cualquier daño al follaje o a las raicillas puede ser crítico para su supervivencia. El agricultor debe estar consciente de la presencia de malezas, plagas invertebradas (cortadores, ácaros, áfidos, mosca blanca) y patógenos (*Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* spp.).

Durante el desarrollo vegetativo, la mayor parte de la energía de la planta se dirige a formar el follaje. En este período el daño causado por otras plagas al área foliar no es tan crítico, porque la planta tiene tolerancia a la pérdida de follaje y una gran capacidad de recuperación para regenerar el tejido fotosintético perdido. Los nematodos comienzan a invadir el sistema radical según las condiciones ambientales, enfermedades como las virosis, marchitez y tizones, estarán presentes, y su importancia es variada.

La etapa reproductiva trae consigo otras enfermedades primarias. La incidencia de virosis y los nematodos en la etapa vegetativa se refleja durante la etapa reproductiva, en la que puede causar pérdidas significativas de producción. Las variedades de tomate de hábito determinado, al concentrar la maduración

de los frutos en un período muy corto, favorecen el desarrollo de ciertos patógenos que crecen preferiblemente sobre los frutos maduros en el campo.

Procedimiento general de diagnóstico

Al iniciar las actividades de diagnóstico el técnico debería consultar la información disponible sobre las plagas y problemas abióticos más importantes del cultivo y contar con el equipo adecuado para recolectar muestras del campo, descritos detalladamente por Shurtleff y Averre (1997).

En el diagnóstico de cultivos comerciales es ventajoso conocer las características morfológicas del cultivar, calidad de semilla y resistencia a las plagas. Tan pronto se inicia el análisis de campo, es pertinente obtener con el cultivador o su asistente, la información sobre el problema y la relación con cultivos anteriores o contiguos. De igual manera se debería conocer la historia de prácticas culturales y las condiciones meteorológicas de las últimas semanas. También es fundamental determinar cuales patógenos pueden multiplicarse en las malezas predominantes en el cultivo o barbecho (Bustamante *et al.* 1970).

Los puntos de vista del agricultor sobre la posible naturaleza del problema son importantes porque es la persona que mejor conoce su cultivo y los cambios presentados.

La observación del problema debería incluir los siguientes pasos:

1. Observar las características del terreno; si es posible, examinar el cultivo en diagonales y la importancia que tienen los bordes y áreas altas o bajas del lote.
2. Analizar la distribución de la plaga, el número de especies afectadas, diferencias en el suelo, pendientes y cultivos vecinos. Estas observaciones ayudan a determinar la naturaleza de la plaga o el factor abiótico. En el cuadro 1 se presentan las características de los hospedantes atacados, tiempo de aparición de la plaga, tejido afectado y distribución de campo. Las plagas pueden ser específicas en sus hospedantes, mientras que factores abióticos como toxicidad por herbicidas y fertilizantes pueden afectar varias especies de cultivos (Bennett 1993, Shurtleff y Averre 1997).
3. Identificar la parte de la planta afectada, las interferencias fisiológicas causadas por la plaga. En algunos casos, la presencia de signos permite la identificación en el campo, de la naturaleza del problema, lo cual puede ser confirmado en el laboratorio.

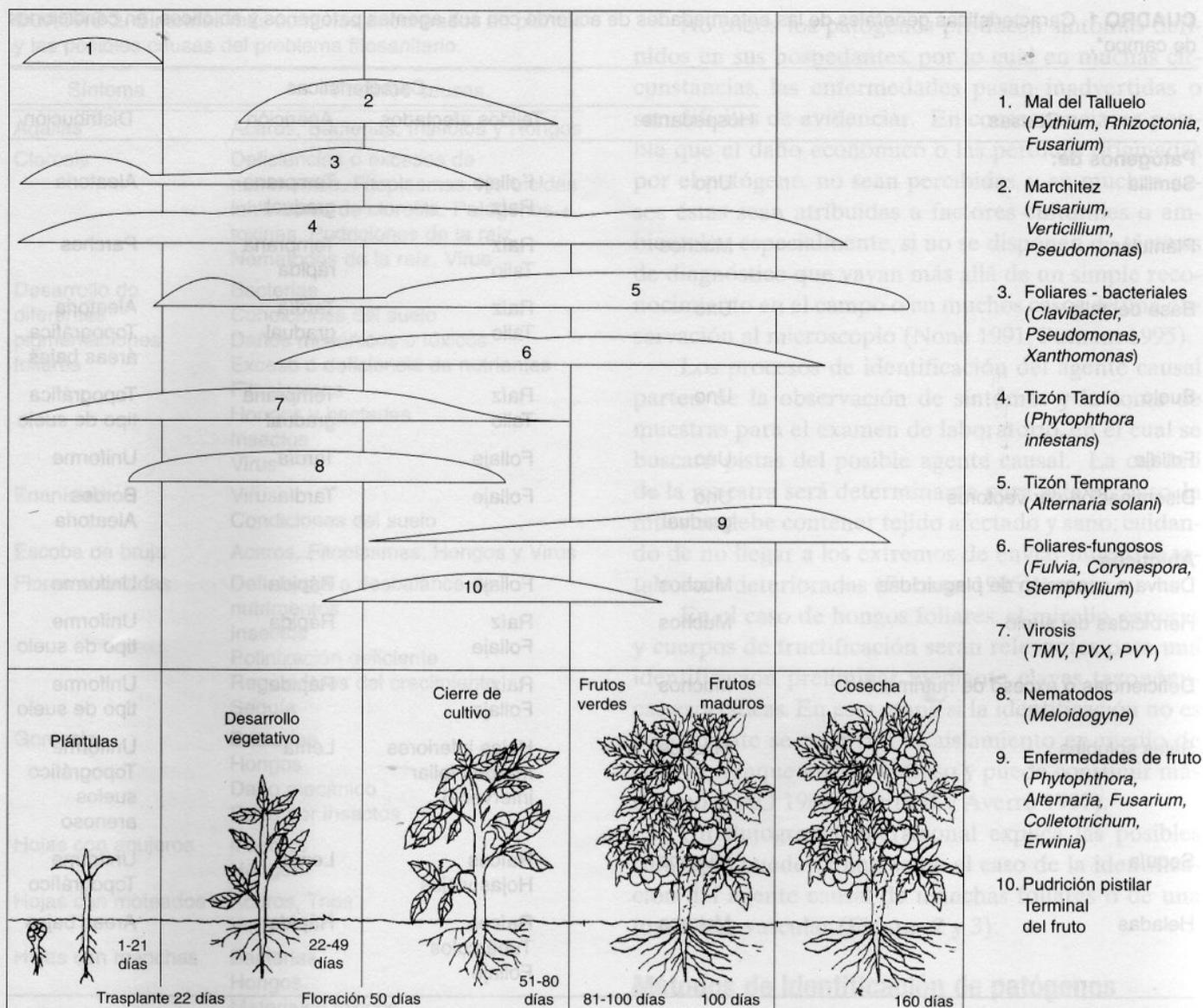


Figura 1. Patógenos que afectan el cultivo del tomate en sus diferentes etapas fenológicas.

4. Una vez revisadas las características o "firma" de la plaga (numerales 2 y 3), el técnico puede formular una hipótesis sobre la naturaleza del problema y la necesidad de toma de muestras (suelo, raíces, hojas, etc.) para el análisis correspondiente de patógenos, deficiencias de nutrientes, exceso de sales (Howler 1983, Shurtleff y Averre 1997).

En el cuadro 2 se señalan los síntomas más comunes que se encuentran en plantas y las posibles causas. En el caso de varios síntomas se pueden presentar más de cinco posibles agentes causales, lo que demuestra la importancia de la objetividad y buen razonamiento requeridos para un diagnóstico (CATIE 1993).

La recolección de muestras de la planta permitirá realizar en el laboratorio un estudio para confirmar la presencia o ausencia de patógenos. Algunas de las indicaciones generales más importantes son las siguientes:

- Seleccione ejemplares con diferentes niveles de desarrollo de síntomas, incluyendo plantas aparentemente sanas.
- Plantas muertas o podridas no constituyen buenos ejemplos de análisis.
- Coloque sus muestras de inmediato en bolsas plásticas, no las cierre totalmente y no añada toallas húmedas, las cuales aceleran los procesos degenerativos del tejido recolectado.

CUADRO 1. Características generales de las enfermedades de acuerdo con sus agentes patógenos y abióticos, en condiciones de campo*.

| Causas | Características | | | |
|--------------------------------------|-----------------|---|---------------------|--|
| | Hospedante | Tejidos afectados | Aparición | Distribución |
| Patógenos de: | | | | |
| Semilla | Uno | Follaje Raíz | Temprana gradual | Aleatoria |
| Plántulas | Muchos | Raíz Tallo | Temprana rápida | Parches |
| Base del tallo | Uno | Raíz Tallo | Tardía gradual | Aleatoria Topográfica áreas bajas |
| Suelo | Uno | Raíz Tallo | Temprana gradual | Topográfica tipo de suelo |
| Follaje | Uno | Follaje | Tardía | Uniforme |
| Diseminación por vectores | Uno gradual | Follaje | Tardía | Bordes Aleatoria |
| Abióticos | | | | |
| Deriva o aspersión de plaguicidas | Muchos | Follaje | Rápida | Uniforme |
| Herbicidas del suelo | Muchos | Raíz Follaje | Rápida | Uniforme tipo de suelo |
| Deficiencias o exceso de nutrimentos | Muchos | Raíz Follaje | Rápida | Uniforme tipo de suelo |
| Sales solubles | Muchos | Hojas inferiores margen foliar intervenal | Lenta | Uniforme Topográfico suelos arenoso |
| Sequía | Muchos | Raíces Hojas viejas | Lenta | Uniforme Topográfico |
| Heladas | Muchos | Raíces Tubérculos Follaje | Rápida | Áreas bajas |

* Modificado de Shurtleff y Averre (1997).

- Envíe lo más pronto posible sus muestras acompañadas de la información más importante (Cuadro 3).
- Cuando se presente marchitez o amarillamiento se debe enviar, en el caso de cultivos anuales, toda la planta. Esta debe extraerse con raíces y suficiente tierra.
- En el caso de tejidos suculentos no cierre la bolsa plástica. Coloque los materiales embolsados en una caja de cartón que facilite el transporte.
- Los frutos con síntomas y signos pueden envolverse en papel periódico y transportarse en una caja de cartón para protección de la muestra.

Identificación del agente causal

La determinación de la etiología de una enfermedad en un cultivo es habitualmente un proceso complejo

que requiere de la información más completa posible, sobre el cultivo en estudio, las condiciones ambientales donde se desarrolla, prácticas culturales utilizadas y agentes bióticos o abióticos que pudiesen haber interferido el desarrollo normal de las plantas (Grogan 1981).

El diagnóstico correcto de los problemas fitosanitarios es una etapa importante en el manejo integrado de plagas; esto requiere de la identificación del agente causal. En muchos casos la información generada por este proceso de investigación es incompleta para ser interpretada por el investigador. En la actualidad existen diversas metodologías que permiten agilizar la identificación y reconocimiento de un patógeno en el ámbito de campo o laboratorio (Putnam 1995, Shurtleff y Averre 1997).

CUADRO 2. Síntomas más comunes encontrados en plantas y las posibles causas del problema fitosanitario.

| Síntoma | Posibles causas |
|--|---|
| Agallas | Acaros, Bacterias, Insectos y Hongos |
| Clorosis | Deficiencias o excesos de nutrimentos, Fitoplasmas, Herbicidas inhibidores de clorofila, Patógenos + toxinas, Pudriciones de la raíz, Nematodos de la raíz, Virus |
| Desarrollo de diferentes pigmentaciones foliares | Bacterias Condiciones del suelo Daños mecánicos o tóxicos Exceso o deficiencia de nutrientes Fitoplasmas Hongos y bacterias Insectos Virus |
| Enanismo | Virus Condiciones del suelo |
| Escoba de bruja | Acaros, Fitoplasmas, Hongos y Virus |
| Flores abortadas | Deficiencia o desbalance de nutrimentos Insectos Polinización deficiente Reguladores del crecimiento Sequía |
| Gomosis | Bacterias Hongos Daño mecánico Daño por insectos |
| Hojas con agujeros | Insectos Hongos |
| Hojas con moteados | Acaros, Trips Virus |
| Hojas con manchas | Bacterias Hongos Materiales tóxicos |
| Hojas cortadas | Insectos |
| Mal del talluelo | Hongos del suelo Insectos Sales solubles |
| Marchitamiento | Bacterias vasculares Exceso de agua Exceso sales solubles Hongos vasculares Insectos Nematodos Pudrición de la raíz Suelo seco |
| Pata de rana | Herbicidas, Virus |
| Pudrición | Bacterias, Hongos y Surfactantes |
| Raíces adventicias | Estrés de agua Hongos Nematodos Pudriciones radicales |
| Tizones | Heladas, Hongos |

No todos los patógenos producen síntomas definidos en sus hospedantes, por lo cual en muchas circunstancias, las enfermedades pasan inadvertidas o son difíciles de evidenciar. En consecuencia, es posible que el daño económico o las pérdidas originadas por el patógeno, no sean percibidas, y en muchos casos éstas sean atribuidas a factores culturales o ambientales, especialmente, si no se disponen de tácticas de diagnóstico que vayan más allá de un simple reconocimiento en el campo o en muchos casos de una observación al microscopio (None 1991, Putnam 1995).

Los procesos de identificación del agente causal parten de la observación de síntomas y la toma de muestras para el examen de laboratorio, en el cual se buscará pistas del posible agente causal. La calidad de la muestra será determinante para este proceso, la muestra debe contener tejido afectado y sano; cuidando de no llegar a los extremos de enviar muestras totalmente deterioradas (Putnam 1995).

En el caso de hongos foliares, el micelio, esporas y cuerpos de fructificación serán relevantes para una identificación preliminar mediante claves taxonómicas específicas. En esta etapa si la identificación no es concluyente se recurrirá al aislamiento en medio de cultivo; aunque este es tedioso y puede consumir más tiempo (FAO 1985, Shurtleff y Averre 1997).

Un flujograma operacional explica las posibles rutas que pueden tomarse en el caso de la identificación del agente causal de manchas foliares o de una marchitez vascular (Figuras 2 y 3).

Métodos de identificación de patógenos

Microscopía de luz. El examen microscópico de una muestra con síntomas inducidos por factores bióticos o abióticos constituye una herramienta básica para la observación y determinación de la presencia o ausencia de estructuras específicas de un organismo. Preparaciones simples de tejidos vegetales teñidos con algún colorante, son esenciales para la observación microscópica en diferentes aumentos u objetivos (Castaño 1994, Shurtleff y Averre 1997). Las técnicas de microscopía de luz han evolucionado a lo que actualmente se conoce como histopatología; permitiendo, observar inclusiones específicas y alteraciones morfoanatómicas de la célula (Christie y Edwardson 1986). En diferentes trabajos se han detallado los efectos que producen algunos virus y fitoplasmas en la célula hospedante (Overman *et al.* 1992, Rivas *et al.* 1999) (Fig. 4).

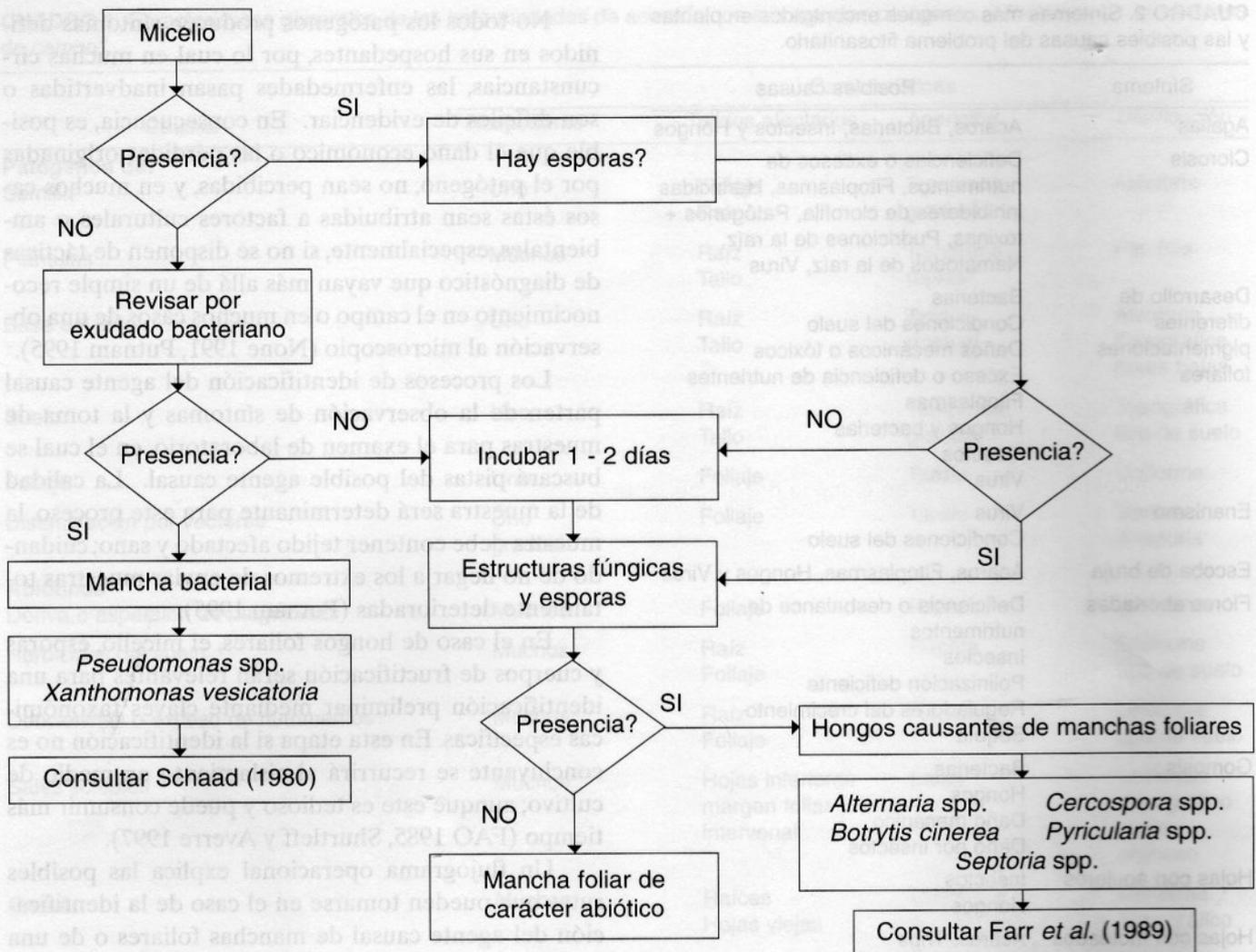


Figura 2. Diagrama de flujo operacional para el examen de manchas foliares.

CUADRO 3. Información necesaria para el estudio de muestras, en el diagnóstico de plagas.

| Items | Especificaciones |
|----------------------------------|---|
| A. Ubicación | Nombre, dirección residencia, teléfono, fax, correo electrónico del interesado |
| B. Identificación | Cultivo, variedad, procedencia, fecha de envío, No. de muestra de la muestra |
| C. Síntomas y signos en el campo | Breve descripción |
| D. Condiciones de crecimiento | Naturaleza del suelo, condiciones climáticas irrigación (cantidades, tiempo), fertilización, plaguicidas utilizados (ingrediente activo y formulación, dosis y forma de aplicación) |
| E. Síntomas en detalle | Follaje, tallo, tronco o ramas, flores, frutos, raíces |

Las observaciones microscópicas evidencian de una manera clara al posible agente causal. Pero su interpretación requiere de un adecuado entrenamiento para ofrecer un juicio correcto sobre lo que se mira a través del lente. Este es un método rápido y poco costoso (Christie y Edwardson 1986).

Microscopía electrónica. Los laboratorios que tienen acceso a un microscopio electrónico pueden utilizar esta herramienta para el diagnóstico de ciertos patógenos, como los virus. Es suficiente una gota de savia proveniente de tejido infectado, para colocar en la rejilla de transmisión, teñir y visualizar en el microscopio las partículas de interés. La habilidad para detectar dichas partículas, depende en gran medida, de la concentración del patógeno en el tejido enfermo. Pero éste es un método muy costoso e impráctico para utilizarlo rutinariamente (Putnam 1995). La figura 5 muestra las partículas geminadas de un geminivirus.

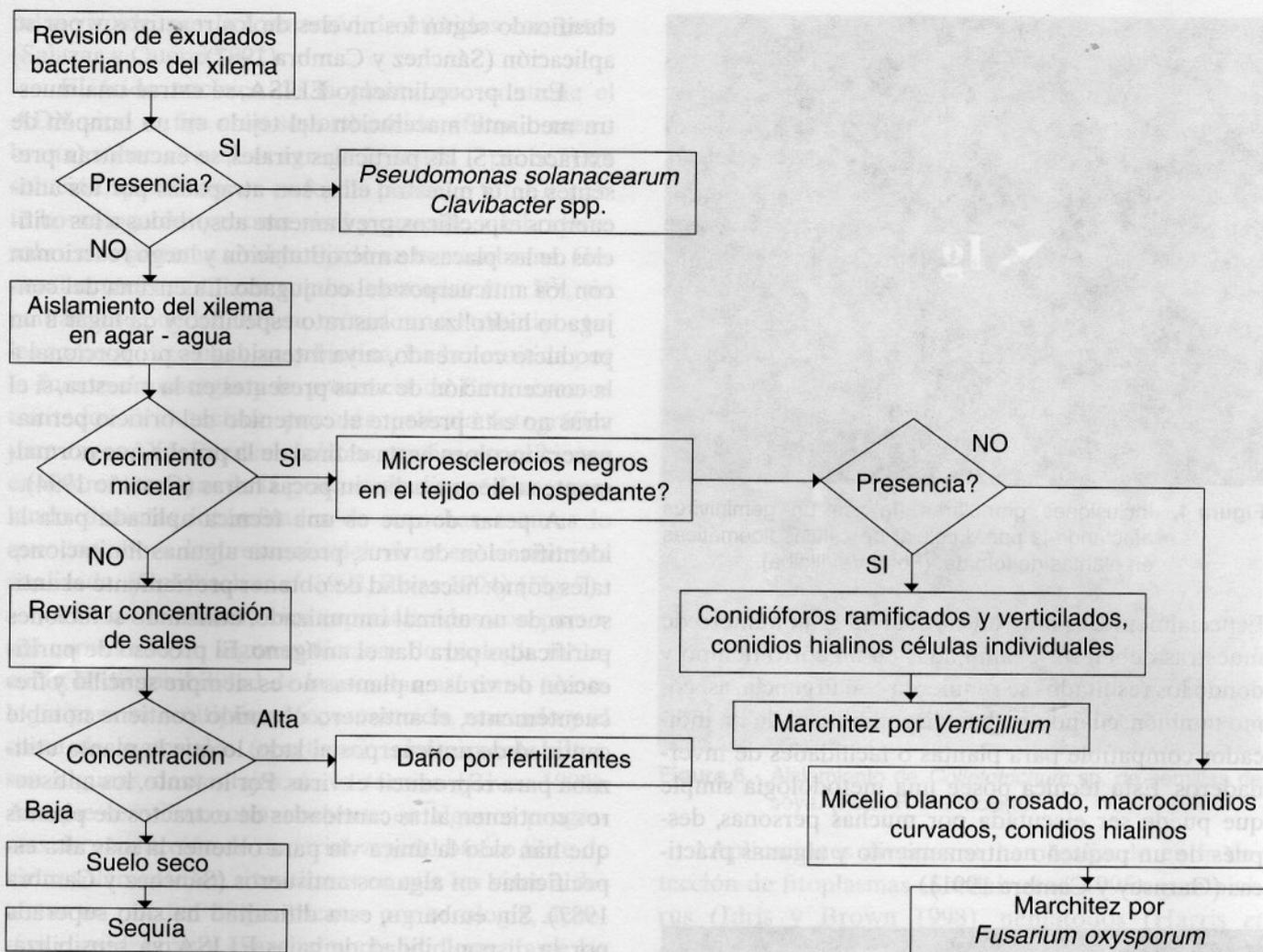


Figura 3. Diagrama de flujo operacional para el examen de marchitez vascular.

Medios de cultivo. Los medios de cultivo son una valiosa herramienta para el aislamiento de patógenos y son altamente sensitivos para su detección en tejidos enfermos. Su uso depende de la disposición en el laboratorio. Los medios se puede preparar o comprar en casas comerciales. La asepsia del material y del ambiente de trabajo es la clave para trabajar con ellos, porque las muestras pueden ser fácilmente contaminadas por patógenos secundarios, que conducirían a una apreciación errónea de la verdadera detección. Las hojas, tallos y cualquier otra estructura, debe limpiarse con hipoclorito de sodio. Posteriormente, se siembra el material en cajas de Petri y se incuba a temperatura ambiente o en incubadora (FAO 1985, Putnam 1995, Shurtleff y Averre 1997). La figura 6 muestra un aislamiento de *Colletotrichum* sp. en semillas de soya.

Inmunoserología. Las técnicas serológicas como ELISA se basan en la especificidad de la reacción antígeno-

no-anticuerpo, en la cual un anticuerpo reconoce al antígeno y se combina sólo con la porción que le dio origen (Rivas 1994). Estas son empleadas para determinar las relaciones entre dos virus, para identificar un virus que causa una enfermedad y para detectar virus en muestras de plantas sintomáticas y asintomáticas (Castaño 1994).

Una de las técnicas serológicas de más aplicación es el método directo de doble anticuerpo de ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay"). Esta es una prueba muy sensitiva y se basa en el uso de un conjugado "anticuerpo-enzima" (Castaño 1994). El método ELISA ha sido utilizado para la detección y estimación cuantitativa de un gran número de antígenos en plantas, incluyendo virus, organismos tipo fitoplasmas, bacterias y hongos. Este método detecta sólo antígenos virales y no la cantidad de infección presente. ELISA ha comenzado a ser un procedimiento estándar, porque es un método sensible, exacto y rápido.

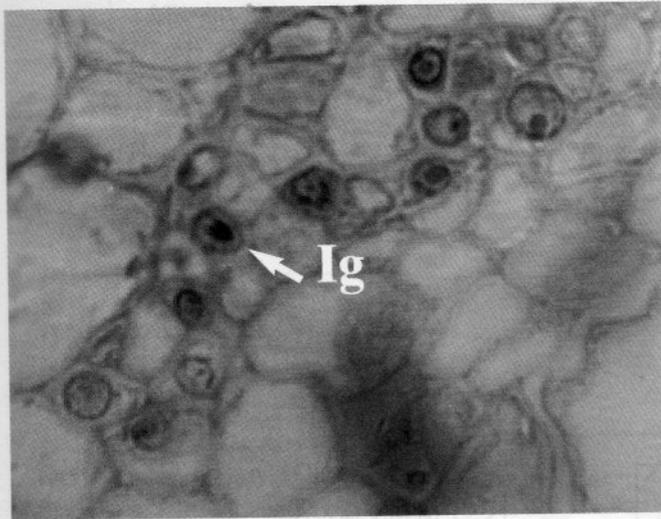


Figura 4. Inclusiones granulares (Ig) de un geminivirus afectando la pared celular de células floemáticas en plantas de tomate. (Foto: V. Villalba).

Especialmente, es muy eficaz cuando gran número de muestras deben ser examinadas en un corto tiempo y donde los resultados se requieren con urgencia, así como también, cuando no hay disponibilidad de un indicador compatible para plantas o facilidades de invernaderos. Esta técnica posee una metodología simple que puede ser ejecutada por muchas personas, después de un pequeño entrenamiento y algunas prácticas (Garnsey y Cambra 1991).

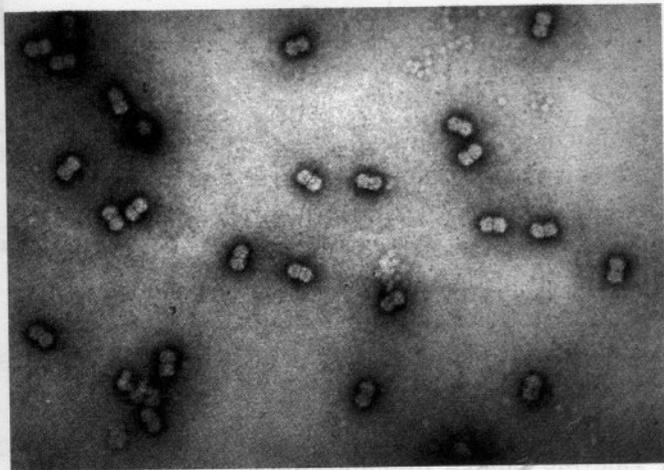


Figura 5. Partículas virales de un geminivirus (Foto: R. Lastra).

Las pruebas ELISA no requieren de equipo costoso de trabajo y sus aplicaciones prácticas en la agricultura son la detección o diagnóstico de hospedantes naturales de viroides, estudio de la diseminación de una enfermedad en una población, detección de virus en semillas sexuales o asexuales y distribución y migración del virus dentro de la planta, este a su vez es

clasificado según los niveles de los reactivos y por su aplicación (Sánchez y Cambra 1987).

En el procedimiento ELISA, se extrae una muestra mediante maceración del tejido en un tampón de extracción. Si las partículas virales, se encuentran presentes en la muestra, ellas son atrapadas por los anticuerpos específicos, previamente absorbidos a los orificios de las placas de microtitulación y luego reaccionan con los anticuerpos del conjugado. La enzima del conjugado hidroliza un sustrato específico y da lugar a un producto coloreado, cuya intensidad es proporcional a la concentración de virus presentes en la muestra, si el virus no está presente el contenido del orificio permanecerá incoloro hasta el final de la prueba que normalmente se lleva a cabo en pocas horas (Castaño 1994).

A pesar de que es una técnica aplicada para la identificación de virus, presenta algunas limitaciones tales como: necesidad de obtener previamente el antisuero de un animal inmunizado, utilizando soluciones purificadas para dar el antígeno. El proceso de purificación de virus en plantas no es siempre sencillo y frecuentemente, el antisuero obtenido contiene notable cantidad de anticuerpos al lado, lo que la planta utilizaba para reproducir el virus. Por lo tanto, los antisueños contienen altas cantidades de extractos de plantas que han sido la única vía para obtener la más alta especificidad en algunos antisueños (Sánchez y Cambra 1987). Sin embargo, esta dificultad ha sido superada por la disponibilidad de cajas-ELISA ya sensibilizados (Garnsey y Cambra 1991).

Rivas *et al.* (1995) muestrearon 19 especies de plantas silvestres, asociadas al tomate y chile dulce, con síntomas de virosis o con adultos de *Bemisia tabaci*. En 14 de ellas se detectaron, mediante la técnica de DAS ELISA, los virus del moteado leve del chile (PMMV), X de la papa (PVX), Y de la papa (PVY), del mosaico del tabaco (TMV) y al menos un geminivirus por la técnica de hibridación. También, mostraron la presencia de un geminivirus, en las tres localidades estudiadas, en ocho especies de plantas silvestres, pero solo *Bidens pilosa*, *Desmodium* sp., *Sida rhombifolia* y *Spermacoce latifolia* mostraron síntomas de virosis, además solamente cinco especies tuvieron dos virus simultáneamente. El virus más frecuente fue el PMMV.

Hibridación molecular. Esta prueba se basa en la habilidad de los ácidos nucleicos para formar híbridos cuando reaccionan con bandas homólogas. En un proceso de incubación con extractos de plantas, estas pruebas detectan la presencia del ácido nucleico vi-

ral o viroide, por la formación de híbridos con estos (Salazar y Querci 1992).

El ácido nucleico de la planta que contiene el ADN viral se fija a un soporte sólido, (filtro o membrana) sobre el cual se agrega la sonda ("probe") en solución, que reconoce en forma parcial o total, la parte homóloga del genoma viral y procede a hibridarse sobre este genoma viral ya fijado en la membrana. Generalmente, se utilizan sondas marcadas con P^{32} , sin embargo se pueden utilizar métodos no radiactivos tales como la digoxigenina y biotina. La luz emitida por la fuente de energía y la presencia de fluorocromos excitados es detectado por una película fotográfica para rayos "X". Pueden realizarse varias exposiciones en diferentes áreas de la película de diagnóstico, revelando distintas intensidades de manchas oscuras lo que corrobora la presencia del virus en la muestra analizada. (Goldbach *et al.* 1992, Rivas 1994) (Fig. 7).

El uso de laboratorios especializados con personal capacitado en algunas técnicas de biología molecular, la disponibilidad de las sondas, así como tecnología para su multiplicación, extracción, marcado y el costo de materiales (reactivos) relativamente altos, son algunas desventajas de la técnica (Rivas 1994). Aunque se utiliza rutinariamente en algunos programas de producción de material vegetal básico libre de virus; solamente, en situaciones en que los virus a detectar no pueden diagnosticarse por serología, deberían considerarse y eventualmente implementarse las técnicas de hibridación molecular (Salazar 1990). En el caso de geminivirus, Rivas y Lastra (1993) detectaron en extractos de muestras de tejido foliar proveniente de plantas de tomate infectadas, un geminivirus transmitido por *B. tabaci*, que reaccionó positivamente en la prueba de hibridación de ácidos nucleicos con la sonda CdTV. Otras aplicaciones son descritas por Pallás *et al.* (1999) para la detección de virus en claveles y por Salazar y Querci (1992) quienes usaron esta técnica para la detección de virus y viroides en papa.

Reacción de la polimerasa en cadena. Es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN. Con esta técnica se amplifica un segmento de ADN en presencia de: una polimerasa (taq) de ADN que resiste altas temperaturas, oligonucleótidos iniciadores cebadores "primers" para iniciar la reacción y los cuatro nucleótidos (dNTPS), para formar el segmento deseado del ácido nucleico que se desea analizar (Saiki *et al.* 1985). Con estos componentes, el ADN es desnaturalizado por calentamiento a más de $90^{\circ}C$, luego por enfriamiento a menos $60^{\circ}C$,

se permite la hibridación de los cebadores y la cadena es extendida por la polimerasa a $72^{\circ}C$ en una solución tampón. Este proceso es repetido de 20 a 40 ciclos hasta producir el segmento de ADN deseado. Este nuevo ADN se puede clonar y secuenciar para comparar su similitud con el segmento correspondiente del ADN en prueba, porque los cebadores son específicos únicamente para determinadas secuencias del ADN que se analiza (Rivas 1994).

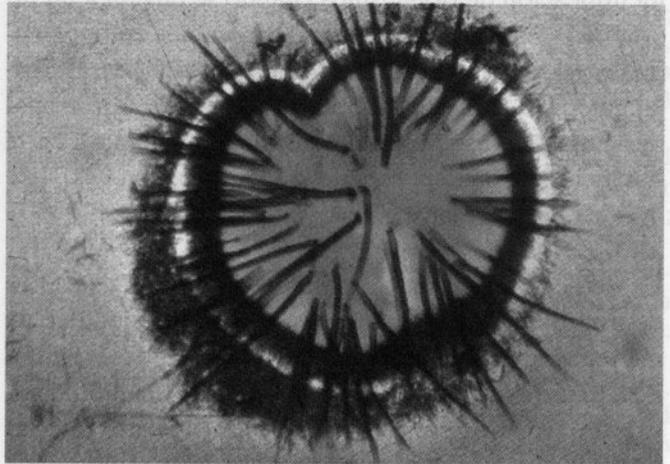


Figura 6. Aislamiento de *Colletotrichum* sp. de semillas de soya. (Foto: F. Marmolejo).

Aplicaciones diversas se han realizado en la detección de fitoplasmas (Sinclair *et al.* 1996), geminivirus (Idris y Brown 1998), nematodos (Harris *et al.* 1990) y bacterias (Seal 1994).

Métodos de identificación de artrópodos. El estudio comparativo de las estructuras que presentan los in-

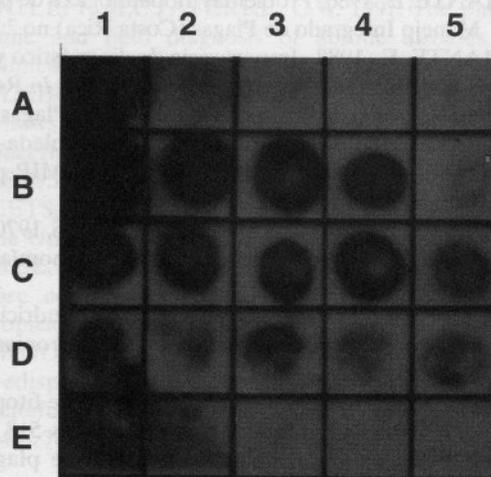


Figura 7. Detección de geminivirus mediante hibridación molecular. Los círculos negros indican la presencia del virus en la muestra analizada. (Foto: G. Rivas).

sectos en diferentes estadios, es importante para la correcta identificación de un insecto plaga. En este caso, las claves taxonómicas desempeñan un rol importante para el estudio completo de estos organismos. Coto (1997, 1998), Coto *et al.* (1995) y Ochoa *et al.* (1991) han elaborado materiales útiles para el reconocimiento de plagas invertebradas en América Central.

La adecuada recolección de especímenes (larvas, adultos, entre otros; en buen estado) es esencial para la identificación de organismos cuando se envían a un taxónomo. Estos servicios están disponibles en universidades y centros internacionales de investigación agrícola, que disponen de este tipo de personal. La principal desventaja de este tipo de consulta es la demora en la obtención de la respuesta de la identificación.

Limitaciones

La detección segura y rápida de un agente causal es determinante para el establecimiento de medidas de manejo. Este es un proceso complejo cuando se desconocen las pautas y metodologías a tener en cuenta para esta acción. Es importante tener presente que las técnicas convencionales no son las únicas que puede usar el investigador. Para los patógenos, las técnicas

moleculares son un componente más que debería ser considerado al desarrollar una metodología de diagnóstico. Una ventaja es que las técnicas antes descritas son confiables y resultan un complemento preciso en el diagnóstico de plagas, en plantas cultivadas o de interés agrícola para el hombre. Sin embargo, estas metodologías también tienen desventajas como: requieren mucha laboriosidad, precisión, personal calificado, equipos y laboratorios adecuados, así como también de reactivos costosos. Una biotecnología apropiada, puede contribuir directamente al establecimiento de una agricultura sostenible porque la aplicación de sus diferentes metodologías en el diagnóstico y protección de cultivos, permitirá la incorporación de tecnologías más compatibles con el ambiente y las características tecnológicas de los pequeños y medianos productores de Latinoamérica y el Caribe. No obstante, estas nuevas tecnologías no son rentables a corto plazo para América Latina y el Caribe, pero sus frutos influirán en forma definitiva y beneficiosa a largo plazo, en los programas agrícolas destinados a los sectores más necesitados (Izquierdo *et al.* 1995).

Literatura citada

- AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Mexico, Editorial Limusa. 756 p.
- BENNETT, W.F. 1993. Nutrient deficiencias / toxicities in crop plants. St. Paul, Minnesota, APS. 202 p.
- BUSTAMANTE, E. 1975. Enfermedades del maíz en Colombia. El cultivo del maíz. *In* Manual de Conferencias. Colombia, ICA. p. 103-112.
- BUSTAMANTE, E. 1984. Manejo integrado de plagas. *Ciencia y Tecnología (Colombia)* 2:14-24.
- BUSTAMANTE, E. 1986. Problemas fitopatológicos de post-cosecha. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* no.2:39-45.
- BUSTAMANTE, E. 1988. Importancia de diagnóstico y la organización de los recursos en Centro América. *In* Reunión de la Red Regional de Diagnóstico Vegetal de Plagas (1987, Guatemala). Memorias. Bustamante, E.; Arboleda-Sepúlveda, O. Ed. Turrialba, Costa Rica. CATIE/MIP. p. 8.17. Serie Técnica. Informe Técnico. No. 139.
- BUSTAMANTE, E.; PATIÑO, H.; CARDENAS, S. 1970. Consideraciones fitosanitarias sobre malezas. *Agronomía Tropical (Colombia)* 26:189-194.
- BUSTAMANTE, E.; THURSTON, H.D. 1965. Pudrición dura de los tubérculos de la papa. *Agricultura Tropical (Colombia)* 21:113-121.
- CASTAÑO-ZAPATA, J. 1994. Principios básicos de fitopatología. 2 ed. Honduras, Zamorano Academic Press. 518 p.
- CATIE. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Turrialba, C.R., CATIE. Serie Técnica /CATIE, No. 151. 138 p.
- CHRISTIE, R.; EDWARDSON, J. 1986. Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Disease* 70: 273-279.
- COLHOUM, J. 1973. Effects of environmental factors on plant disease. *Annual Review Phytopathology* 11:343-364.
- COTO, D. 1997. Lepidóptera en cultivos anuales y perennes: Manual de reconocimiento. Turrialba, C.R., CATIE. 64 p.
- COTO, D. 1998. Estados inmaduros de insectos de los órdenes Coleoptera, Diptera y Lepidoptera: Manual de reconocimiento. Turrialba, C.R., CATIE. 163 p.
- COTO, D.; SAUNDERS, J.L.; VARGAS, C.L.; KING, A.B.S. 1995. Plagas invertebradas de cultivos tropicales con énfasis en América Central: un inventario. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 200 p.
- DE LA CRUZ, R. 1987. La aleopatía en el manejo de malezas. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* no.6:36-43.
- FAO. 1985. Manual para patólogos vegetales. Santiago, Chile, FAO. 438 p.
- FARR, D.F.; BILLS, D.F.; CHAMURIS, G.; ROSSMAN, G. 1989. Fungi on plants and plant products in USA. St. Paul, Minnesota, APS. 1252 p.
- FRENCH, E.R.; HEBERT, T.T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, IICA. 290 p.
- GARNSEY, S.; CAMBRA, M. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA for citrus pathogens. *In* Graft-Transmissible Diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. C.N. Roistacher, Ed. Roma, FAO. p. 193-216.
- GOLDBACH, R.; HAAN, P.; VERDUIN, B. 1992. Gene sequences in viruses, viroids, and prokaryotes, and the development of diagnostic tools. *In* Biotechnology and crop improvement in Asia. Moss, J.P. Ed. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 265-279.

- GROGAN, R.G. 1981. The science and art of plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:333-51.
- HARRIS, T.S.; SANDALL, L.J.; POWERS, T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juvenils by polimerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *J. Nematol.* 22: 518-524.
- HORSFALL, J.G. 1979. Iatrogenic disease: mechanism of action. *In Plant Diseases*. Eds. Horsfall, J.G.; Cowling, E.B. New York, Academic Press. p. 343-355.
- HOWELER, R.H. 1983. Análisis del tejido vegetal en el diagnóstico de problemas nutricionales: algunos cultivos tropicales. Cali, Colombia, CIAT. 28 p.
- HUBER, D. 1980. The role of mineral nutrition in defense in plant disease. J.G. Horsfall; E.B. Cowling, Ed. New York, Academic Press. p. 381-406.
- IDRIS, A.M.; BROWN, J.K. 1998. Sinaloa Tomato Leaf Curl Geminivirus: Biologic and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88(7): 648-657.
- IZQUIERDO, J.; CIAMPI, L.; GARCIA DE, E. 1995. Biotecnología apropiable: realidad de su desarrollo y aplicación en América Latina y el Caribe. Santiago, Chile, FAO. 81 p.
- LEVESQUE, C.; RAHE, J. 1992. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. *Annual Review of Phytopathology* 30:579-602.
- LEVITT, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. *In Physiological Ecology*. T.T. Kozlowski. Ed. New York, Academic Press. 607 p.
- LOBOS, H. 1993. Efecto de factores de estrés tecnológico sobre café (*Coffea arabica*), cultivar Caturra y su predisposición al ataque de hongos fitopatógenos. Tesis M.Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 105 p.
- McNEW, G.L. 1960. The nature, origin, and evolution of parasitism. *In Plant Pathology*. J.G. Horsfall; H.E. Diamond Ed. New York, Academic Press. p. 19-69.
- MUSSEL, H.; MALONE, M. 1979. Disease tolerance: reducing the impact of disease-induced stress on crop yields. *In Stress physiology in crop plants*. Mussel and Staples, Ed. Wiley. 510 p.
- NEERGAARD, P. 1979. Seed Pathology. London, MacMillan. 839 p.
- NONE, S. 1991. Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicados al cultivo de Tejidos. *In Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Fundamentos y Aplicaciones Roca, W.M.; Mroginski, L.A. Eds. Cali, Colombia, CIAT. p. 633-693.
- OCHOA, R.; AGUILAR, H.; VARGAS, C. 1991. Acaros fitófagos de América Central: Guía ilustrada. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 251 p.
- OVERMAN, M.A.; KO, N.J.; TSAI, H.J. 1992. Identification of viruses and mycoplasmas in maize by use of light microscopy. *Plant Disease* 76: 318-322.
- PALLAS, V.; SANCHEZ-NAVARRO, J.; CAÑIZARES, M.C.; CANO E.A. 1999. A new test for detectin carnation viruses. *Flora Culture International* 9(5): 32-34.
- PUTNAM, M. 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. *Crop Protection* 14(6):517-525.
- RIVAS PLATERO, G.G. 1994. Geminivirus transmitidos por la mosca blanca. Boletín Informativo MIP no.33 (Costa Rica). Hoja técnica 10.
- RIVAS PLATERO, G.G.; LASTRA, R.; 1993. Detección no radiactiva de geminivirus en tomate mediante hibridación de ácidos nucleicos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* no.30:7-1.
- RIVAS PLATERO, G.G.; RAMIREZ, P.; CUBILLO, D.; HILJE, L. 1995. Detección de virus en plantas silvestres asociadas con el tomate y chile dulce en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* no. 38:37-39.
- RIVAS PLATERO, G.G.; VASQUEZ MORERA, VILLALBA, V.; HILJE, L.; RAMIREZ, P. 1999. Histopatología de geminivirus en tomate. *In Semana Científica* (4, 1999, Turrialba, Costa Rica). Actas. p. 93-94.
- RUSSELL, G.; JARVIS, P.; MONTEITH, J. 1989. Absortion of radiation by canopies and stand growth. *In Plant canopies: their growth, form and function*. Russell, G., Marshall, B.; Jarvis, P. New York, Ed. Cambridge University. p. 21-39.
- SAIKI, P.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SALAZAR, L.; QUERCI, M. 1992. Detection of viroids and viruses by nucleic acid probes. P: 129-144. *In Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. Duncan, J.M.; Torrance, L. eds. Blackwell Scientific Publications. p. 9-14.
- SALAZAR, L.F. 1991. Detección de viroides y virus con técnicas de ADN recombinante. *In Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W.M.; Mroginski, L.A. Ed. Cali, Colombia, CIAT. p. 877-886.
- SANCHEZ-VIZCAINO, J.; CAMBRA-ALVAREZ, M. 1987. Enzyme immunoassay techniques, ELISA in animal and plant diseases. 2 ed. Paris, Office International des Epizooties. Technical series No 7 p. 30-33.
- SAUNDERS, J.L.; COTO, D.; KING, A.B. 1998. Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. San José, Costa Rica, CATIE. 305 p.
- SCHAAD, N.W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, Minnesota, APS. 68 p.
- SCHOENEWEISS, D. 1983. Drought predisposition to *Cytospora canker* in blue spruce. *Plant Disease* 67(4):383-385.
- SEAL, S. 1994. DNA based diagnostic techniques for *Pseudomonas solanacearum* wilt in Asia. Working Group Meeting (3, 1994). MacDonald, D. Eds. Proceedings International Crops Research. Institute for The Semi-Arid Tropics.
- SHURTLEFF, M.C.; AVERRE, C.W. 1997. The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases. St. Paul, Minnesota, APS Press. 256 p.
- SINCLAIR, W.A.; GRIFFITHS, H.M.; DAVIS, R.E. 1996. Ash yellows and lilac witches'-broom: Phytoplasmal disease of concern in forestry and Horticulture. *Plant Disease* 80(5): 468-475.
- STREETS, R.B. 1972. The diagnosis of plant diseases. Tucson, The University of Arizona Press, 236 p.
- SUAREZ, M.C.; TORRES, E. 1996. Louis Pasteur, un hombre libre comprometido con el conocimiento. *Agricultura Tropical (Colombia)* 33(2):21-41.
- YARWOOD, C. 1976. Modification of the response-predisposition. *In Physiological plant pathology*. R. Heitefuss, R.; Williams, P.H. Berlin, Universitätsdruckerei v. 4 p. 703-718 p.