

Retos y perspectivas de la fitopatología: una visión reflexiva desde los avances en la investigación en micología vegetal

Rafael M. Jiménez Díaz (Catedrático de Patología Vegetal, de la RADE, Fellow de la APS, Premio Rey Jaime I de Medioambiente. Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3; e Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Edificio C-4, Celestino Mutis, Campus Rabanales, Córdoba; e-mail: ag1jdir@uco.es)

Este artículo se basa en la Ponencia que tuve el honor de presentar en las Jornadas Científicas (Valencia, 9-11 de Noviembre, 2011) con las que la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) celebró el 30º Aniversario de su fundación, en la que traté de resumir los principales avances en el conocimiento sobre hongos y oomicetos fitopatógenos que han tenido lugar durante los últimos 30 años, y de compartir algunas reflexiones sobre el presente y el futuro de la Fitopatología como disciplina científica y agronómica en España (y posiblemente en otros países), basadas en mi experiencia de más de 35 años en la enseñanza superior y la investigación en Fitopatología.

Los avances en el conocimiento sobre hongos y oomicetos fitopatógenos durante los últimos 30 años son demasiado numerosos y diversos en naturaleza para que puedan ser resumidos en este artículo. Por ello, mi propósito es resaltar algunos de los que, desde mi punto de vista, constituyen nuevos paradigmas en la Micología Vegetal y la Fitopatología, que he seleccionado con la intención de significar su repercusión sobre las estrategias, métodos y medidas de lucha contra las enfermedades de las plantas cultivadas.

Avances en la taxonomía de hongos y oomicetos

Como ha venido ocurriendo en las Ciencias Biológicas en su sentido más amplio, los avances en el conocimiento sobre hongos y oomicetos fitopatógenos han estado mediados por el desarrollo de nuevas metodologías, instrumentos y protocolos de estudio. Sin embargo, la interdependencia entre las innovaciones tecnológicas y los descubrimientos en Micología es en la actualidad más fuerte que nunca; algunos ejemplos de ello son los avances en las tecnologías de análisis y secuenciación del DNA y sus repercusiones sobre la taxonomía y la filogenética molecular de hongos y oomicetos, así como sobre la comprensión a nivel molecular de la regulación genética de la patogenicidad en ellos y la resistencia a la infección en la planta, y

la repercusión de innovaciones en las tecnologías de observación microscópica y uso de genes que codifican para proteínas fluorescentes de diferentes propiedades espectrales en la mejor comprensión de los procesos de infección (DEAL, 2011).

Hace algo más de 30 años los hongos abandonaban la posición taxonómica como subreino en el reino vegetal y eran reubicados en un reino propio con dos divisiones (Mixomycota y Eumycota). La información proporcionada por numerosos análisis moleculares y estudios bioquímicos y ultraestructurales realizados durante los últimos años ha dado lugar a que los organismos ubicados en el reino Hongos sean reasignados a uno de los nuevos reinos Mycota (Fungi), Chromista (= Straminipila) o Protozoa. Es más, la forma de concebir la taxonomía fúngica comenzó a cambiar a principios de los años 90 con la posibilidad de obtener numerosas

copias de los genes del RNA ribosómico mediante ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de analizar los productos de ella (WHITE *et al.* 1990), y dicho cambio se consolidó 10 años más tarde con la propuesta de un sistema para el reconocimiento de especies fúngicas basado en la concordancia de genealogías de varios genes nucleares (Ej., *-tubulin*, *EF-1*, regiones ITS e IGS del rDNA, etc.) y mitocondriales (*cox1*, *coxII* y su región espaciadora, *mtSSU DNA*, etc.) conservados, funcionales y ortólogos denominado con las siglas GCPSR ("Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition"), que es aplicable tanto a hongos con reproducción sexual conocida como a los de reproducción asexual estricta (TAYLOR *et al.*, 2000).

Durante los últimos 10 años, los estudios filogenéticos moleculares sobre hongos han pro-

liferado de forma exponencial, propiciando que se disponga de extensos bancos de datos de secuencias multilocus procedentes de análisis rigurosos de muestras representativas de los miembros de taxones de Mycota. Tal disponibilidad ha culminado con la propuesta de un conjunto de cerca de 70 autores de dichos estudios de una clasificación filogenética de Mycota de amplio consenso que incluye órdenes y taxones de rango superior (HIBBETT *et al.*, 2007). Esta clasificación incluye un subreino, Dikarya, que comprende a los Filos Ascomycota y Basidiomycota, y eleva a las Clases Basidiomycetes, Urediniomycetes, y Ustilaginomycetes de clasificaciones anteriores a los Subdivisiones Agaricomycotina, Pucciniomycotina, y Ustilaginomycotina, respectivamente.

En la nueva clasificación, las modificaciones más significativas respecto de anteriores clasificaciones conciernen a los taxones que tradicionalmente han estado incluidos en los Filos Chytridiomycota y Zygomycota. El Filo Chytridiomycota es considerado de manera más restrictiva, e incluye ahora a las Clases Chytridiomycetes y Monoblepharidomycetes, pero trata al Orden Blastocladales de los Chy-

tridiomycota como Filo Blastocladiomycota. El Filo Zygomycota no es aceptado en la clasificación propuesta, pendiente de que se resuelvan las relaciones entre los clados que hasta ahora se han venido situando en los Zygomycota, que en la nueva clasificación son distribuidos entre el Filo Glomeromycota y varios Subfilos de ubicación todavía incierta.

Los estudios sobre filogenia molecular también han influido de manera determinante sobre nuestra comprensión de la filogenia de los hongos fitopatógenos incluidos tradicionalmente en la Clase Oomycetes, propiciando cambios en la clasificación de ellos a todos los niveles (VOGLMAYR, 2008), de manera que ahora constituyen el Filo Oomycota del Reino Chromista (Straminipila), y en su mayoría pertenecen a la Subclase Peronosporomycetidae de la Subdivisión Peronosporomycotina (DICK, 2002). Los Peronosporomycetidae comprenden el Orden Peronosporales, que contiene a la Familia Albuginaceae y los mildius zoospóricos de las Familias Peronosporaceae que infectan plantas dicotiledóneas, y el Orden Pythiales, que contiene a la Familia Pythiaceae con los géneros *Phytophthora* y *Pythium*, entre otros. Dick (2002) ha postulado

que los mildius que infectan dicotiledóneas y los que infectan gramíneas tienen historias evolutivas independientes y ha situado a estos últimos en la Familia Sclerosporaceae del Orden Sclerosporales en la Subclase Saprolegniomycetidae.

Por otra parte, los Plasmodiophoromycetes de interés como agentes fitopatógenos o vectores de virus vegetales, i.e., *Plasmodiophora*, *Polymyxa* y *Spongospora*, pertenecen ahora al Reino Protozoa.

Innovaciones taxonómicas y su repercusión sobre la etiología y diagnóstico de micosis vegetales

El concepto de especie fúngica. La identificación exacta y rápida del agente etiológico es imprescindible para establecer las estrategias y tácticas adecuadas para el control de una enfermedad. En el caso de las micosis vegetales, la delimitación precisa de las especies fúngicas es crítica para: (i) el establecimiento de cuarentenas y otras normas reguladoras; (ii) la definición y selección de resistencia al patógeno; (iii) la preservación de la biodiversidad; (iv) la especificación de organismos para

NichinoEurope

 **Nihon Nohyaku**

Nichino Europe is a wholly owned subsidiary of Nihon Nohyaku Co. Ltd., of Japan; a successful R&D based company with an impressive track record of discovery and development of innovative plant protection products. Nichino Europe, based in Cambridge, manages the development, registration and distribution of Nihon Nohyaku's active substances and products within the EU and certain neighbouring territories.

Business Development Manager – Southern Europe

To support the company's growth especially in Southern Europe, we require a Business Development Manager to join our small team. The successful candidate will work closely with the Senior Business Development Manager but also with the regulatory and sales Team. The position is expected to provide technical and marketing support to our national distribution partners and to initiate and follow up new projects in the region.

The position will require travel in Europe and periodically to Japan.

We are looking for a highly self-motivated individual with in-depth experience in the crop protection business. Fluency in English and one Southern European language is essential, knowledge of other Southern European languages is an asset. The position shall be home based (in a Southern European country).

Please apply via e-mail with cover letter, an indication of your salary expectation and a full CV by 31 January 2012 to: Glyn Jones, Director; Nichino Europe. Email: gjones@nichino-europe.com

biocontrol; y (v) la producción de antibióticos y patentes, entre otros. Por ello, el concepto de especie fúngica ha sido objeto de continuadas consideraciones durante las últimas décadas. Hasta principio de los años 90, la taxonomía fúngica estuvo dominada por el concepto de **morfo-especie** (i.e., grupo de individuos distinguibles de otro grupo por diferencias en caracteres morfológicos) y sujeta a profundas controversias. Un ejemplo de ello es la taxonomía de *Fusarium* de la sección *Liseola*, cuya resonancia está estrechamente relacionada con la capacidad de sus miembros de producir importantes micotoxinas (Ej., deoxinivalenol, fumonisinas, etc.). La atención a la presencia o ausencia de polifálidas y/o microconidias napiformes, y microconidias formando cadenas cortas, largas o agrupadas en falsas cabezuelas, dio lugar a la distinción de cuatro a seis morfo-especies (según autores) en *Fusarium moniliforme* sensu Snyder & Hansen (denominación actualmente deslegitimada). Leslie (1991, 1995) abordó la confusión subyacente en este sistema mediante la caracterización de la compatibilidad sexual entre miembros de las morfo-especies [i.e., **especies biológicas**: grupo(s) de individuos potencialmente susceptibles de inter cruzamiento pero reproductivamente aislados de otros grupos], lo cual ha dado lugar a la identificación de ocho poblaciones sexualmente compatibles (A a H) que se corresponden respectivamente con *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, y *F. circinatum*.

El análisis filogenético mediante el sistema GCPSR ha propiciado la identificación de **especies filogenéticas** dentro de especies morfológicas (i.e., el más reducido grupo de individuos reconocibles que comparten un linaje monofilético), de manera que éstas constituyen verdaderos **complejos de especies**. Ejemplos de complejos de especies son *Bremia lactucae*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Peronospora arborescens*, *P. farinosa*, *P. trifoliorum*, y *P. viciae*, entre otras, en Oomycota (VOGLMAYR, 2008), y *Armillaria mellea*, *Colletotrichum acutatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Gibberella fujikuroi*, *G. zeae* y *Rhizoctonia solani*, entre otras, en Mycota (CUBETA y VILGALYS, 1997; O'DONNELL, 2000; O'DONNELL *et al.*, 1998; 2004). Así, en el complejo de especies *G. fujikuroi* se han identificado 43 especies, ocho de las cuales se corresponden con las especies

biológicas caracterizadas por Leslie; y en la morfo-especie *F. graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) asociada a la Necrosis de la espiga de cebada y trigo se han diferenciado nueve especies, de las cuales la denominación *F. graminearum* s. str. se ha retenido para la especie más comúnmente asociada con la enfermedad (O'DONNELL *et al.*, 2004).

El concepto de especies crípticas. La caracterización de complejos de especies en morfo-especies fúngicas ha dado lugar a la identificación de **especies crípticas** (i.e., grupos fúngicos morfológicamente indistinguibles para los que se puede inferir aislamiento reproductivo porque no manifiestan recombinación entre sí), cuya significación fitopatológica es particularmente relevante cuando se les pueden asignar propiedades biológicas. Por ejemplo, Geiser *et al.* (1998) identificaron dos especies crípticas en *Aspergillus flavus* (una morfo-especie toxigénica morfológicamente uniforme y de reproducción estrictamente asexual), de las cuales una es genéticamente similar a *Aspergillus oryzae*, una especie no toxigénica que durante miles de años se ha utilizado en la producción de alimentos y bebidas en países asiáticos que por su morfología es difícilmente distinguible de *A. flavus*. Similarmente, análisis filogenéticos de diferentes secuencias génicas revelaron que dos enfermedades de cítricos sintomatológicamente distintivas, denominadas 'Caída de frutos' del naranjo dulce y la mayoría de otros cítricos y 'Antracnosis de la lima Key', son causadas por linajes filogenéticos diferentes del hongo mitosporico *C. acutatum* (PERES *et al.*, 2008); y que las poblaciones de *Pythium irregulare* que infectan cultivos hortícolas y ornamentales en el Estado de Pennsylvania comprenden dos especies crípticas, de las cuales una comprende aislados sensibles al fungicida mefenoxan y corresponde al neotipo de la especie (i.e., *P. irregulare* s. str.), mientras que la otra, *P. cryptoirregulare*, contiene aislados sensibles y resistentes al fungicida (GARZÓN *et al.*, 2005; 2007).

El concepto de formae speciales en el complejo de especies F. oxysporum. Originariamente, este taxón subespecífico fue concebido como grupo de aislados morfológicamente indistinguibles de otros con-específicos que comparten especialización patogénica

sobre especies o géneros botánicos. Hasta ahora se han definido cerca de 150 *formae speciales*, que en su mayoría son colonizadoras del xilema y causantes de marchitez, y en menor número colonizadoras del córtex (Ej., ff. spp. *lilii*, *tulipae*) o del córtex y del xilema (Ej., f. sp. *gladioli*) de bulbosas, o causantes de necrosis de raíz y marchitez de plantas de semilla (Ej., ff. spp., *lini*, *basilici*) (BAAYEN *et al.*, 2000). Desde un punto de vista evolutivo se ha venido asumiendo que la especialización patogénica de los miembros de una *forma specialis* deriva de un antepasado común parasítico pero no patogénico, y en consecuencia deben estar genéticamente relacionados. Esta presumible relación evolutiva ha sido respaldada por investigaciones realizadas recientemente en Australia (donde *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* se detectó por vez primera en 1993) para explicar la aparición del patógeno en cultivos de algodón (*G. hirsutum*), ante la posibilidad de que el patógeno hubiera sido introducido inadvertidamente. En dichas investigaciones se concluyó que en Australia *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* comprende linajes distintivos, genéticamente relacionados con linajes nativos de *F. oxysporum* habitantes de suelo rizosférico de *Gossypium* spp. silvestres, que difieren de otros linajes de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* existentes en otras partes del mundo (KIM *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2004; 2006). Además, dichos aislados rizosféricos no son patogénicos en *Gossypium* spp. silvestres pero sí moderadamente virulentos en *G. hirsutum*, y cuando se utilizan para inoculaciones sucesivas de algodón su virulencia se incrementó durante las infecciones seriadas, presumiblemente como consecuencia de la selección de mutantes espontáneos más virulentos que los aislados parentales (WANG *et al.*, 2008).

En la propuesta relación genética de los aislados de una *forma specialis* de *F. oxysporum* con un antepasado no patogénico subyace un origen monofilético del taxón (i.e., la evolución hacia el patogenismo se ha producido una sola vez). Sin embargo, estudios de filogenia molecular indican que sólo algunas *formae speciales* de la morfo-especie son **monofiléticas** (Ej., ff. spp. *albedinis*, *ciceris*, *conglutinans*, *lilii*, *tulipae*) mientras que alrededor del 80% de ellas (Ej., ff. spp. *cubense*, *dianthi*, *phaseoli*, *lini*, *lycopersici*, *melonis*, *vasinfectum*, etc.) son **polifiléticas** (i.e., la patogeni-

idad huésped-específica es una característica que ha evolucionado de forma convergente en eventos múltiples e independientes) (BAAYEN *et al.*, 2000; JIMÉNEZ-GASCO *et al.*, 2002; O'DONNELL *et al.*, 1998).

Que una *forma specialis* de *F. oxysporum* sea polifilética tiene repercusiones importantes sobre las estrategias de desarrollo y utilización de variedades resistentes al patógeno, puesto que abre la posibilidad de que los diferentes linajes clonales de aquélla puedan albergar características patogénicas particulares y que los genes de virulencia en el patógeno y de resistencia en la planta difieran en diferentes áreas evolutivas. De hecho, que linajes del patógeno puedan tener historias evolutivas diferentes en distintas áreas geográficas confiere incertidumbre a que la resistencia desarrollada contra poblaciones locales en un área sean efectivas cuando se utilicen en otras evolutivamente diferentes (PLOETZ, 2006). Estas circunstancias han llevado a cuestionar el concepto de *forma specialis* tal como fuera

propuesto por Snyder & Hansen, por ser filogenéticamente equívoco y patogénicamente de inferior valor predictivo al de los linajes clonales, puesto que la existencia de la misma patogenidad básica en ellos requeriría que los genes o grupos de genes que la regulan puedan ser transferidos horizontalmente (i.e., vegetativamente) (BAAYEN *et al.*, 2000; PLOETZ, 2006). Recientemente, Ma *et al.*, (2010) han demostrado que dicha transferencia puede tener lugar en condiciones experimentales al constatar que los cromosomas que contienen genes de virulencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre tomate fueron transferidos horizontalmente a aislados de *F. oxysporum* no patogénicos, convirtiéndolos en patogénicos. Esto abre la posibilidad de que la patogenidad básica de una *forma specialis* sea compartida por distintos linajes de ella, si se demuestra que dicho fenómeno tiene lugar extensa y frecuentemente en condiciones naturales.

Etiología y control de micosis vegetales: Diversidad genética y patogénica en las poblaciones del agente

La utilización de variedades resistentes al patógeno es la estrategia más práctica, económicamente eficiente y ambientalmente respetuosa para el control de enfermedades de cultivos, pero su uso puede ser dificultado por el desarrollo de variantes patogénicas en las poblaciones del agente. Por ello, la utilización eficiente de dicha resistencia es propiciada por el conocimiento de la historia y potencial evolutivo del patógeno, que puede ser inferida de la estructura genética de sus poblaciones a través del análisis de la diversidad en ellas de razas patogénicas y la evolución de su virulencia, y de la compatibilidad somática entre sus miembros, indicadoras de una estructura clonal.

Evolución de razas patogénicas y su virulencia: El caso de las *formae spe-*

Combate a los insectos y ácaros de la manera más natural

Las piretrinas naturales son insecticidas y acaricidas con una rápida acción de contacto, un amplio espectro y sin residuos.

KENPHYR es un producto totalmente natural, obtenido de flores secas de Pelitre (*Crysanthemum cinerariifolium*), con una riqueza de un 4% DE PIRETRINAS y formulado con una base de aceites vegetales, principalmente aceite de soja, que incrementan su actividad insecticida.

Se recomienda su utilización para el control de la mosca blanca, trips, pulgones, cochinillas, orugas, escarabajos y otros tipos de insectos y ácaros, en todo tipo de cultivos, ya sean hortícolas, frutales de hueso y pepita, cítricos, frutales subtropicales, etc.

Apto para cultivo ecológico



EXTRACTO DE PELITRE

KENPHYR

PIRETRINAS NATURALES



BIAGRO

Bioestimulantes Agrícolas
que respetan la naturaleza

ciales de *F. oxysporum* y *Verticillium dahliae*. Aunque ambos hongos fitopatógenos son de reproducción asexual estricta, ambos difieren en la naturaleza y extensión de su especialización patogénica, de manera que, contrariamente a las *formae speciales* de *F. oxysporum*, *V. dahliae* se caracteriza por un patogenismo inespecífico sobre el que subyace la capacidad de adaptación a huéspedes preferenciales sobre los cuales expresa superior virulencia (*entendida aquí como la capacidad relativa de estirpes de un patógeno de causar una determinada cantidad de síntomas en plantas o genotipos vegetales particulares*). Sin embargo, los dos hongos parecen poseer una capacidad de desarrollar razas patogénicas superior a la que podría presumirse, que bajo presión selectiva son capaces de superar la resistencia existente en variedades de sus huéspedes, cuya evolución y relaciones filogenéticas han sido estudiados mediante análisis molecular.

Las *formae speciales* de *F. oxysporum* parecen propensas a experimentar mutaciones espontáneas, cuya presumible acumulación favorecida por continuadas interacciones con variedades susceptibles o resistentes de sus huéspedes propician subsiguientes incrementos de virulencia y eventualmente el desarrollo de nuevas razas patogénicas, como sugieren los resultados de Wang *et al.* (2008) con *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* en algodón en Australia. Este proceso puede tener lugar a partir de aislados no patogénicos [v. gr., el desarrollo de la raza 1 de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* en Maryland (APPEL y GORDON, 1994) y de la raza 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en Florida (GALE *et al.*, 2003)], o de razas preexistentes [v. gr., el desarrollo de la raza 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a partir de la raza 2 en California (CAI *et al.*, 2003)]; y las nuevas razas pueden ser evolutivamente polifiléticas y tener dos o más orígenes evolutivos independientes, como ocurre con la raza 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y el grupo de las ocho razas conocidas de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (SKOVGAARD *et al.*, 2001) o, alternativamente, ser monofiléticas.

Según Gordon y Martin (1997), la variación en virulencia en una *forma specialis* monofilética de *F. oxysporum* subsiguiente a la adquisición de patogenicidad en una pequeña población fundadora no-patogénica debe proceder de la acumulación de mutaciones para virulencia

producidas en áreas de cultivo del huésped geográficamente aisladas y, en consecuencia, las razas patogénicas de la *forma specialis* que mantienen una estrecha relación filogenética derivarían unas de otras, en un proceso secuencial de pasos discretos, en lugar de originarse de manera independiente. Esta hipótesis ha sido contrastada por vez primera por Jiménez-Gasco *et al.* (2004) en estudios sobre la filogenia de las ocho razas conocidas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (razas 0, 1A, 1B/C, 5 a 6). En dichos estudios, cada una de las ocho razas constituyó un linaje monofilético y sobre la filogenia inferida de los linajes clonales fue posible superponer la patogenicidad de las razas sobre las variedades diferenciadoras que permiten distinguirlos. El análisis de esta correspondencia sugiere que las razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* han evolucionado siguiendo un proceso secuencial y discreto de adquisición o pérdida de patogenicidad antes referido, que se infirió de los dos escenarios evolutivos más simples posibles: (i) considerando solamente que tiene lugar ganancia (pero no pérdida) de patogenicidad sobre cultivares resistentes, y (ii) admitiendo que se pudo producir tanto ganancia como pérdida de dicha patogenicidad (JIMÉNEZ-GASCO *et al.*, 2004). El primero de dichos escenarios postula que han podido tener lugar al menos tres eventos paralelos de ganancia de patogenicidad y la existencia de tres antepasados raciales que nunca han sido observados. En este caso, la primera adquisición de patogenicidad a partir de la raza más antigua y desconocida habría dado lugar a la raza menos virulenta, la raza 0 causante de Amarillez, y a partir de ella habrían evolucionado posteriormente las razas más virulentas causantes de Marchitez. El segundo escenario inferido en el estudio propone a la raza 1A causante de Marchitez como la antepasada común de todas las demás razas, en lugar de una raza desconocida como propone el primer escenario, y comparativamente es más simple que éste.

La evolución de las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* según el patrón descrito por Jiménez-Gasco *et al.* (2004) respalda a la **acumulación de genes de resistencia** en un mismo genotipo vegetal (i.e., 'piramidar' dichos genes) como estrategia para la mejora de variedades de garbanzo con resistencia duradera, porque la superación de varios genes

de resistencia debe requerir más tiempo y ser más costoso para el patógeno que superar genes individuales de resistencia. Además, dicha acumulación de genes en la mejora genética de una variedad resistente es propiciada por la ubicación de los genes de resistencia contra las razas 1A, y 2 a 5 en un mismo grupo de ligamiento. Cualesquiera que sea el proceso en la evolución de las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, su desarrollo puede tener lugar sin el uso de resistencia según lo indica la existencia de las razas 0, 1A, 1B/C, 5, y 6 en zonas de cultivo de Andalucía donde nunca se han utilizado variedades resistentes, y de las razas 2 a 4 en India antes de que se hubieran utilizado variedades con resistencia a la raza 1A (JIMÉNEZ-GASCO *et al.*, 2004). En otros casos, la utilización extensa de variedades con resistencia a una raza prevalente da lugar a que eventualmente sea reemplazada por otra virulenta sobre aquéllas, v. gr., el desarrollo de las razas 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* en el noroeste del Estado de Washington tras monocultivo extenso de variedades de guisante con resistencia a la raza 1, y de las razas 2 y 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en diversos lugares tras la intensificación del cultivo de variedades de tomate con los genes de resistencia *Ie I₂* (GALE *et al.*, 2003; KRAFT *et al.*, 1981).

Como con las razas de *F. oxysporum* ff. spp., la utilización de variedades de la planta huésped altamente resistentes ha propiciado la selección de razas patogénicas preexistentes en las poblaciones de *V. dahliae* capaces de superar dicha resistencia, como lo muestra el desarrollo de las razas 1 y 2 de *V. dahliae* en lechuga y tomate. En ambos casos, la resistencia a la raza 1 conferida por un único gen dominante fue superada por la raza 2, dando lugar a epidemias severas en variedades hasta entonces resistentes (VALLAD *et al.*, 2006). En tomate, la resistencia es conferida por el gen *Ve1* del locus *Ve* (FRADIN *et al.*, 2009), cuya reiterada utilización en la mejora de variedades resistentes a la raza 1 ha dado lugar a la prevalencia de la raza 2 en Canadá, EE UU, Japón y países de varios países europeos, presumiblemente a partir de aislados de dicha raza preexistentes que infectaban otros cultivos y plantas arvenses (Ej., Ligoxigakis y Vakalounakis, 1992). Estudios comparativos de aislados de dicha raza mediante análisis de su DNA han concluido que la raza 2 se ha originado en

diferentes ocasiones de forma independiente (DOBINSON *et al.*, 1998). Otras investigaciones mediante análisis moleculares indican que las razas 1 y de 2 de *V. dahliae* en lechuga estaban presentes en suelos en California antes de que utilizaran variedades de lechuga resistentes a ellas, y que dichas razas están molecularmente relacionadas con aislados que anteriormente infectaban fresa y guindilla, respectivamente (SUBBARAO *et al.*, 1997).

Análisis de la compatibilidad vegetativa (somática) para inferir la estructura genética de las poblaciones del patógeno.

La compatibilidad vegetativa (definida como la capacidad genéticamente regulada en estirpes de una especie fúngica de establecer anastomosis hifal y formar heterocarios estable) restringe la heterocariosis entre miembros de la especie fúngica genéticamente diferentes y ha atraído la atención de los fitopatólogos durante los últimos 20 años, porque su eventual correlación con atributos ecológicos y patogénicos es potencialmente de aplicación práctica en investigaciones epidemiológicas y el diagnóstico de enfermedades (LESLIE, 1993; 1996). Esta capacidad ha sido estudiada mediante: (i) mutantes espontáneos auxotrofos en la utilización de diversas formas de nitrógeno para establecer Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG, acrónimo del término en inglés 'Vegetative Compatibility Group') en *Cryphonectria parasitica*, *F. oxysporum* ff. spp. y *V. dahliae*; (ii) demostración microscópica del establecimiento de la condición plurinucleada para establecer Grupos de Anastomosis (AG, acrónimo de 'Anastomosis Group') en el complejo de especies *R. solani*; y (iii) formación de zonas de aversión micelial o 'barrage' (i.e., incompatibilidad somática) entre colonias enfrentadas para definir Grupos de Compatibilidad Micelial (MCG, acrónimo de 'Mycelial Compatibility Group') en *Rosellinia necatrix* y *Sclerotium rolfsii*. Investigaciones sobre la regulación genética de la compatibilidad vegetativa en varios Ascomycetes indican que es determinada por la homocigocis en cada uno de 7 loci en *C. parasitica*, y 10 en *G. fujikuroi* (denominados loci *vic* por 'vegetative incompatibility') (Ej., CARLING, 1996; CUBETA y VILGALYS, 1997; LESLIE, 1996).

En particular, el análisis de VCGs ha demostrado ser de gran utilidad para el estudio de la diversidad genotípica en poblaciones de

hongos fitopatógenos de reproducción estrictamente asexual, como son *V. dahliae* y *F. oxysporum* ff. spp., porque su genoma se transmite unitariamente y de forma completa de una generación a la siguiente, y la pertenencia de aislados de ellos a un mismo VCG determina la única posibilidad de intercambio genético mediante recombinación mitótica en un ciclo parasexual. Consecuentemente, los VCGs en dichos hongos podrían constituir linajes clonales, de forma que cada VCG comprende un grupo de miembros genéticamente aislado de los demás grupos. Ello propicia que entre VCGs puedan existir diferencias en muchas características, incluyendo las de su patogenicidad sobre plantas y cultivares, por lo cual pueden ser de utilidad diagnóstica y epidemiológica como marcadores genéticos de aquéllas (KATAN, 1991; 2000; ROWE, 1995). Diversos estudios en poblaciones de *V. dahliae* procedentes de diferentes cultivos en distintas áreas geográficas han identificado globalmente seis VCGs (VCG1 a VCG6), en tres de los cuales (VCG1, VCG2, y VCG4) se pueden diferenciar dos subgrupos (A y B) por el vigor y frecuencia de las complementaciones prototróficas (KATAN, 2000; ROWE, 1995). La comparación del DNA completo de aislados representativos todos los VCGs mediante análisis de AFLPs demostraron una fuerte correlación entre la pertenencia de los aislados a un VCG y su agregación por la similitud molecular, indicando que los VCGs son entidades genéticamente sólidas y distintivas, independientemente del origen geográfico y de huésped de los aislados que lo componen (COLLADO-ROMERO *et al.*, 2006). Además, estudios sobre las relaciones evolutivas entre VCGs indican que son monofiléticos, excepto el VCG2B y posiblemente los VCG2A y 4B que son polifiléticos de manera que la compatibilidad somática entre los aislados de estos últimos ha evolucionado convergentemente, en lugar de divergentemente a partir de un antepasado común como se asume a menudo (BERBEGAL *et al.*, 2011; COLLADO-ROMERO *et al.*, 2008).

La polifilia de los VCGs de *V. dahliae* puede ser importante en el control de las Verticilosis, porque implica que se pueden desarrollar nuevos linajes cuyos aislados varíen en atributos ecológicos, fisiológicos o patogénicos. Aún así, numerosos estudios han demostrado que en determinados VCGs subyace la adaptación a huéspedes preferenciales sobre los que son

marcadamente virulentos, de manera que son marcadores genéticos de virulencia de valor predictivo para el diseño de rotaciones de cultivos. Por ejemplo, los aislados del VCG1A son característicamente muy virulentos y defoliantes sobre algodón y olivo, los del VCG2B son no-defoliantes y altamente virulentos sobre alcachofa, algodón y menta, y los del VCG4A son particularmente virulentos sobre patata. Dicha utilidad predictiva es especialmente válida cuando en un área de cultivo prevalece el escaso número de VCGs que corresponde a una estructura clonal del patógeno, como ocurre en las poblaciones de *V. dahliae* que infecta alcachofa en la Comunidad Valenciana y olivo en Andalucía (JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2006; 2011; KOROLEV *et al.*, 2008; ROWE, 1995).

La estructura de las poblaciones de *R. solani* también lleva consigo la asociación entre las características patogénicas de sus aislados y su pertenencia a AGs. Así, entre los 13 AGs descritos (AG1 a AG13), siete de los cuales (AG1 a AG4 y AG6 a AG9) comprenden subgrupos que varían en una o más características bioquímicas, ecológicas, o genéticas, existen grupos cuyos aislados son no-patogénicos (AG6, -7 y -10), escasamente virulentos sobre las plantas que pueden atacar (AG9/crucíferas, patatas; AG11/arroz, trigo), son patogénicamente poco específicos (AG4), o son específicos y altamente virulentos (AG3/patata, AG8/cereales) (CUBETA y VILGALYS, 1997; CARLING, 1996). En consecuencia, tanto con *R. solani* como con *V. dahliae* la **identificación específica** del agente durante el proceso diagnóstico es **información insuficiente** para el control eficiente de la enfermedad.

Caracterización, detección y cuantificación de especies fúngicas, formae speciales, patotipos y razas en las micosis vegetales

La necesidad de caracterización rápida y precisa del agente etiológico y sus variantes patogénicas para el control eficiente de las enfermedades de las plantas, junto con las limitaciones para ello que se producen cuando ha de ser obtenida mediante bioensayos y las facilidades que por el contrario ofrecen las tecnologías basadas en el análisis del DNA, han hecho posible que se desarrolle una valiosa diversidad de protocolos moleculares que abren nuevas y mejores perspectivas en las accio-

nes para el diagnóstico, epidemiología y control de las enfermedades. Por ejemplo, las ventajas que ofrecen los ensayos PCR para la identificación de los agentes fitopatógenos han convertido a éstos en la herramienta diagnóstica preferida en muchos laboratorios (MARTIN *et al.*, 2000; SCHAAD *et al.*, 2003), de manera que existe un elevado número de iniciadores y protocolos PCR disponibles para la identificación de hongos fitopatógenos (<http://www.sppadbase.com>) (GHIGNONE y MIGHELLI, 2005). Igualmente, se han desarrollado bases de datos de secuencias de genes que propician la identificación de especies de *Fusarium* o las *formae speciales* de *F. oxysporum*, respectivamente, mediante la comparación de secuencias del factor de elongación de la transcripción EF1- (GEISER *et al.*, 2004; <http://fusarium.cbio.psu.edu>) o de éste y de la región espaciadora intergénica del DNAr (O'DONNELL *et al.*, 2009).

La disponibilidad de marcadores de DNA específicos de razas y patotipos del patógeno hace factible abordar la caracterización a gran escala de las poblaciones existentes en extensas áreas de cultivo de las plantas huésped y la identificación de las variantes patogénicas prevalentes, posibilitando con ello tomar decisiones anticipadamente sobre la oportunidad de siembra o plantación y la elección de las variedades más adecuadas para ello (Ej., JIMÉNEZ-GASCO *et al.*, 2003; JIMÉNEZ-DÍAZ *et al.*, 2011). Asimismo, el desarrollo de protocolos PCR eficientes en la detección y cuantificación del patógeno y sus variantes patogénicas en substratos complejos (Ej., plántones, semillas, suelo) hacen posible: (i) la práctica de programas de certificación sanitaria no destructivos [Ej., *V. dahliae* en plántones de olivo (MERCADO-BLANCO *et al.*, 2003a)]; (ii) la evaluación sanitaria de lotes de semilla de siembra [Ej., *P. arborescens* en semillas de adormidera (MONTES-BORREGO *et al.*, 2011)]; y (iii) la verdadera evaluación de la resistencia a la infección sistémica en genotipos vegetales (Ej., JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; MERCADO-BLANCO *et al.*, 2003b). Además, el uso de dichos protocolos y estudios de expresión génica han contribuido conceptualmente a la ciencia fitopatológica; v. gr., demostrar que la infección sistémica en los mildiús y la transmisión del patógeno en la semilla son más frecuentes de lo concebido hasta ahora (Ej., MONTES-BORREGO *et al.*, 2009; 2011), y que la reacción de tolerancia en las traqueomicosis incluye la supresión de la expresión de genes implicados en la expresión de síntoma en la planta extensamente colonizada por el patógeno (Ej., ROBB, 2007; ROBB *et al.*, 2007).

Avances en el conocimiento sobre las interacciones planta-patógeno y el control de las micosis vegetales

Además de los aspectos referidos anteriormente, los avances tecnológicos en el amplio rango de diversidad disciplinar que incluye desde la biología celular y molecular a la teledetección espectral y térmica, pasando por la genómica comparativa, transcriptómica y proteómica, están contribuyendo a modificar algunas de nuestras percepciones sobre los mecanismos que subyacen en las interacciones que caracterizan a las micosis vegetales, así como ofreciendo nuevas oportunidades para su control. Un reducido número de ejemplos de ello son: (i) el papel de la síntesis de glicerina en los apresorios melanizados de *Magnaporthe grisea* y *Colletotrichum* spp. para generar la enorme presión que propicia la penetración directa de la superficie vegetal intacta y el desarrollo subsiguiente de la patogénesis; (ii) la regulación de la patogenicidad por genes individuales que codifican para enzimas que detoxifican compuestos defensivos preformados en la planta que determinan su resistencia basal; (iii) la interacción directa receptor-ligando entre las proteínas R y Avr codificadas respectivamente por los genes *R* de resistencia y *Avr* de 'avirulencia' en la hipótesis gen a gen de Flor no explica suficientemente los resultados de la interacción planta-patógeno, y las proteínas R actúan como **proteínas 'guarda'** (protectoras) de las proteínas vegetales que son dianas de los productos de los genes *Avr* (que en ausencia de genes *R* desempeñan un papel causativo en la patogénesis y se denominan **'efectores'**); (iv) las toxinas fúngicas, consideradas generalmente como factores determinantes de patogenicidad o virulencia, no intervienen necesariamente *via* citotoxicidad sino que también pueden perturbar la ruta de transmisión de señales de respuestas defensivas en la planta, dando lugar al desarrollo de síntomas; (v) el desarrollo de síntomas en las plantas susceptibles puede no ser necesariamente consecuencia de metabolitos del patógeno sino estar mediada por genes de la planta; y (vi) el incremento de la temperatura en la copa vegetal consecuencia de la reducción de transpiración en las traqueomicosis puede ser detectado por sensores ópticos remotos móviles y servir para la detección, epidemiología y control de las enfermedades (Ej., LUCENA *et al.*, 2010; ROBB *et al.*, 2007; YARDEN *et al.*, 2003).

Una de las repercusiones más sugestivas de los avances biotecnológicos en la visión actual

de las interacciones microbianas en plantas concierne la extensión del endofitismo en ellas y su percepción como campo emergente en el control de micosis vegetales y plagas de fitófagos. Numerosos y recientes estudios están contribuyendo a resaltar el interés de los hongos endofitos como reducto de biodiversidad y capaces de inducir la expresión de mecanismos de defensa contra la infección en plantas y/o de producir metabolitos tóxicos (Ej., BACKMAN y SIKORA, 2008; PORRAS-ALFARO y BAYMAN, 2011). Más aún, hongos considerados normalmente como saprotrofos, pero entomopatógenos, como *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium* spp. (ex *V. lecanii*), son endofitos naturales en plantas con capacidad de reducir el desarrollo de la enfermedad en ellas (OWNLEY *et al.*, 2010). Comprender mejor la ecología de estos hongos y su actividad como endofitos en plantas a través de la investigación podría dar lugar a nuevos paradigmas en la sanidad de los cultivos a través del biocontrol.

Retos y perspectivas

Durante los 30 años transcurridos desde la creación de la SEF no solo se han producido los avances en el conocimiento y cambios de paradigmas conceptuales en los hongos y oomicetos fitopatógenos que he tratado de resumir arriba; también han tenido (y continúan teniendo) lugar cambios importantes en una diversidad de aspectos que inciden directamente sobre el control de las micosis vegetales y otras enfermedades de las plantas. Ejemplos de ellos son, entre otros: (i) la emergencia de nuevas micosis (Ej., los complejos de enfermedades de Petri en la vid y Colapso del melón), y re-emergencia de otras que habían dejado de tener repercusión importante sobre las cosechas como consecuencia de modificaciones en los sistemas de producción y/o la estructura de las poblaciones de los patógenos [Ej., la Necrosis de la espiga de cebada y trigo (*F. graminearum*), el Mildiú de la patata y tomate (*Phytophthora infestans*)]; (ii) los impactos potenciales de cambios medioambientales; (iii) las nuevas formas de agricultura (Ej., ecológica, integrada, sostenible); (iv) las innovaciones en las tecnologías de producción agrícola (Ej., introducción de nuevos cultivos, variedades, y patrones, intensificación de las plantaciones, estrategias de laboreo, uso de cubiertas vegetales, tecnologías de riego, mecanización de la cosecha, etc.); (v) las acciones legislativas, como la Directiva 2009/128/CE que establece el manejo integrado como estrategia fundamental para promover la sanidad vegetal y fomenta el uso de medios no químicos para ello; y (vi) la introducción de patógenos exó-

ticos (Ej., en España: *F. oxysporum* f. sp. *basilici*, *F. circinatum*, *Mycosphaerella nawae*, *Ophiostoma novo-ulmi*, *Phytophthora ramorum*, *P. hedraeandra*, *P. tentaculata*, etc.), cuya relevancia concierne tanto el desarrollo de nuevas enfermedades en el hábitat de introducción sobre miembros de su gama de huéspedes conocida, como el desarrollo de enfermedades en huéspedes hasta entonces desconocidos, como es el caso de *Phytophthora* spp. no especializadas patogénicamente (MORALEJO *et al.* 2009).

Curiosamente, además, la profusión de introducciones de especies fúngicas exóticas en nuevas áreas geográficas ha ido paralela al desarrollo frecuente de híbridos interespecíficos en hongos y oomicetos, cuyo descubrimiento ha sido propiciado por la expresión de nuevas capacidades patogénicas y confirmado mediante análisis del DNA [Ej., *Malampora medusae* x *M. occidentalis*/ patogénico sobre *Populus* resistentes a *M. occidentalis*, *P. cambivora* x *P. fragariae* (= *P. alni*)/ patogénico sobre alisos, *P. catorum* x *P. nicotianae*/ patogénico sobre ornamentales, *V. dahliae* x *Verticillium* spp. (= *V. longisporum*)/ patogénico sobre crucíferas, *Botrytis aclada* x *Botrytis bysoidea*/ patogénico sobre cebolla] (CLEWES y BARBARA, 2008; ÉRSEK y NAGY, 2008). Según Brasier (2000), la profusión de introducciones de especies fúngicas exóticas en un área propicia el establecimiento de hibridaciones con especies autóctonas de las que han estado geográficamente aisladas, porque las barreras genéticas entre ellas son más débiles que las existentes entre especies con-geográficas.

Los cambios antes relacionados plantean nuevos escenarios para la Fitopatología y constituyen nuevos retos para su genuina razón de ser como ciencia y profesión: evitar o reducir las repercusiones negativas de los ataques de enfermedades sobre los cultivos agrícolas y forestales. Esta razón de ser confiere a la Fitopatología una peculiaridad que posiblemente la distingue de otras ciencias,

que no es otra que el satisfacer su compromiso de servir a agricultura y agricultores no interfiere necesariamente con su desarrollo como ciencia de aplicación, y por lo tanto excluye cualquier consideración de ser percibida como tecnología estrictamente empírica basada en 'recetarios', o como ciencia biológica básica ensimismada en novedades aparentemente estériles. De hecho la entidad de la Fitopatología como disciplina científica es equiparable a la de otras disciplinas que constituyen los currículos agronómicos y biológicos, pero además es integradora de muchas de ellas y al tiempo rica a en los matices de las delicadas interacciones entre plantas y microorganismos que gobiernan el desarrollo de la enfermedad en plantas. Precisamente, esta riqueza de interacciones inter-organismales, junto con la variedad de agentes fitopatógenos y de relaciones con otras ciencias, han propiciado que la investigación fitopatológica haya sido una contribuidora neta al conocimiento en las Ciencias de la Vida ('Life Sciences'), como pusieron de manifiesto Kommendahl (2000) y Sequeira (2000), ambos ex-presidentes de la Sociedad Norteamericana de Fitopatología (APS), y más recientemente James R. Cook en una conferencia plenaria con ocasión del Congreso Centenario de la APS celebrado en Minnesota el año 2008.

El avance en el conocimiento sobre los hongos y oomicetos fitopatógenos que he resumido en las páginas anteriores es solo una muestra de los habidos en otros campos de la Fitopatología, pero prueba convincente del compromiso con el descubrimiento de la investigación fitopatológica en España y otros países. Sin embargo, también en ambos ámbitos es cada vez es más patente la convicción de que dicho avance no alcanza satisfactoriamente la 'diana' sobre la que subyace su búsqueda: la aplicación para incrementar la eficiencia en el control de las enfermedades y mejorar la sanidad de los cultivos (Ej., SEQUEIRA, 2000; WALE,

2005). Para alcanzar dicha 'diana', los conocimientos deben ser transmitidos durante el proceso de educación superior, y adaptados para ser transferidos a los sectores profesionales y técnicos. Sin embargo, las perspectivas de que ello pueda tener lugar satisfactoriamente en España son desalentadoras. Vista desde mi experiencia personal de más de 35 años de docencia de la Fitopatología en la Universidad de Córdoba, el contenido curricular en materia fitopatológica en las ETSIAs ha venido sufriendo una continuada erosión durante sucesivos planes de estudios, que ha culminado en la configuración curricular para la adaptación de las nuevas enseñanzas agronómicas al Espacio Europeo de Educación Superior (coloquialmente conocido como Plan Bolonia) en la que la docencia fitopatológica de grado y postgrado es notoriamente inferior en extensión a la que se impartía hace 20 años, al tiempo que la información derivada de la investigación fitopatológica en España disponible para la docencia de la Fitopatología es más abundante y mejor que nunca. ¿Si las perspectivas son de un nivel insuficiente de formación de los técnicos superiores para la práctica profesional de la Fitopatología en la producción agrícola actual y venidera, cómo puede entenderse que puedan hacer frente a los cambios y retos identificados arriba? Estas y otras preguntas deberían ser objeto de reflexión por la SEF e instituciones públicas y privadas relacionadas con la Sanidad Vegetal a través de la Fitopatología.

Agradecimientos: Las investigaciones del autor referidas en el texto han sido financiadas por los proyectos: OLI96-2131, AGF97-1479, 1FD97-0763-CO3-01, QLK5-CT1999-01523, y Fundación Ramón Areces. Agradezco a los Drs. B.B., Landa, P. Castillo, y M.M. Jiménez Gasco la lectura crítica y comentarios sobre el manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- APPEL, D.J., y GORDON, T.R. 1994. *Local and regional variation in populations of Fusarium oxysporum from agricultural field soils*. Phytopathology 84:786-791.
- BAAYEN, R.P., O'DONNELL, K., BONANTS, P.J.M., CIGELNIK, E., KROON, L.P.N.M., ROEBROECK, E.J.A., y WAALWIJK, C. 2000. *Gene genealogies and AFLP analyses in the Fusarium oxysporum complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing root rot and wilt diseases*. Phytopathology 90:891-899.
- BACKMAN, P.A., y SIKORA, R.A. 2008. *Endophytes: An emerging tool for biological control*. Biol. Control 46:1-3.
- BERBEGAL, M., GARZÓN, C., ORTEGA, A., ARMENGOL, J., JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., y JIMÉNEZ-GASCO, M.M. 2011. *Development and application of new molecular markers for the analysis of genetic diversity in Verticillium dahliae populations*. Plant Pathol. 60:866-877.
- BRASSIER, C. 2000. *Plant Pathology: The rise of hybrid fungi*. Nature 405:134-135.
- CAI, G., GALE, L.R., SCHNEIDER, R.W., KISTLER, H.C., DAVIS, R.M., ELIAS, K.S., y MIYAO, E.M. 2003. *Origin of race 3 of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici at a*

- single site in California. *Phytopathology* 93:1014-1022.
- CARLING, D.E. 1996. *Grouping in Rhizoctonia solani by hyphal anastomosis reaction*. En: B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S., Neate, y G. Dijst, eds. en: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda.
- CLEWES, E, y BARBARA, D.J. 2008. *Two allopolyploid ascomycetes fungal pathogens were not rescued by vertical transmission*. *New Phytol.* 177:583-585.
- COLLADO-ROMERO, M., MERCADO-BLANCO, J., OLIVARES-GARCÍA, C., VALVERDE-CORREDOR, A., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2006. *Molecular variability within and among Verticillium dahliae vegetative compatibility groups determined by fluorescens amplified fragment length polymorphisms and polymerase chain reaction markers*. *Phytopathology* 96:485-495.
- COLLADO-ROMERO, M., MERCADO-BLANCO, J., OLIVARES-GARCÍA, C., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2008. *Phylogenetic analysis of Verticillium dahliae vegetative compatibility groups*. *Phytopathology* 98:1019-1028.
- COOK, R.J. 2008. *Contributions of Plant Pathology to the Life Sciences in the past 100 years. APS Centennial*. <http://www.apsnet.org/publications/webcasts/Webcasts/RJCook/player.html>.
- CUBETA, M.A., y VILGALYS, R. 1997. *Population biology of the Rhizoctonia solani complex*. *Phytopathology* 87:480-484.
- DEAL, R.B. 2011. *Grand challenge. Accelerating discovery through technology development*. http://www.frontiersin.org/technical_advanced_in_plant_science/10.3389/fpls.2011.00
- DICK, M.W. 2002. *Towards and understanding of the evolution of the downy mildews*. Pgs1-57 en: P.T.N. Spencer-Phillips, U. Gisi, y A. Lebeda, eds. *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic Publishers. Secaucus, N.J.
- DOBINSON, K.F., PATTERSON, N.A., WHITE, G.J., y GRANT, S. 1998. *DNA fingerprinting and vegetative compatibility analysis indicate multiple origins for Verticillium dahliae race 2 tomato isolates from Ontario*. *Can. Mycol. Res.* 102:1089-1095.
- ÉRSEK, T., y NAGY, Z.A. 2008. *Species hybrids in the genus Phytophthora with emphasis on the alder pathogen Phytophthora alni: a review*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122:31-39.
- FRADIN, E.F., ZHANG, Z., AYALA, J.C. J., CASTROVERDE, C.D., NAZAR, R.N., ROB, J., LIU, C.-M., y THOMMA, B.P.H.J. 2009. *Genetic dissection of Verticillium wilt resistance mediated by tomato Ve1*. *Plant Physiol.* 15:320-332.
- GALE, L.R., KATAN, T., y KISTLER, H.C. 2003. *The probable center of origin of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici VCG 0033*. *Plant Dis.* 87:1433-1438.
- GARZÓN, C.D., GEISER, D.M., y MOORMAN, G.W. 2005. *Amplified fragment length polymorphism analysis and internal transcriber spacer and coxII sequences revealed a species boundary within Pythium irregulare*. *Phytopathology* 95:1489-1498.
- GARZÓN, C.D., YÁNEZ, J.M., y MOORMAN, G.W. 2007. *Pythium cryptoirregulare, a new species within the P. irregulare complex*. *Mycologia* 99:291-301.
- GEISER, D.M., PITT, J.I., y TAYLOR, J.W. 1998. *Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 95:388-393.
- GEISER, D.M., JIMÉNEZ-GASCO, M.M., KANG, S., MAKALOWSKA, I., VEERARAGHAVAN, N., WARD, T.J., ZHANG, N., KULDAU, G.A., y O'DONNELL, K. 2004. *FUSARIUM-1D v 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:473-479.
- GHIGNONE, S., y MIGUELI, Q. 2005. *The data base of PCR primers for phytopathogenic fungi*. *Eur. J. Plant Pathol.* 113:107-109.
- HIBBETT et al. 2007. *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. *Mycol. Res.* 111:509-547.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., MERCADO-BLANCO, J., OLIVARES-GARCÍA, C., COLLADO-ROMERO, M., BEJARANO-ALCÁZAR, J., RODRÍGUEZ-JURADO, D., GIMÉNEZ-JAIME, A, GARCÍA-JIMÉNEZ, J., y ARMENGOL, J. 2006. *Genetic and virulence diversity in Verticillium dahliae populations infecting artichoke in eastern-central Spain*. *Phytopathology* 96:288-298.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., OLIVARES-GARCÍA, C., LANDA, B.B., JIMÉNEZ-GASCO, M.M., y NAVAS-CORTÉS, J.A. 2011. *A region-wide analysis of genetic diversity in Verticillium dahliae infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes*. *Phytopathology* 101:304-315.
- JIMÉNEZ-GASCO, M.M., MILGROOM, M.G., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2002. *Gene genealogies support Fusarium oxysporum f. sp. ciceris as a monophyletic group*. *Plant Pathol.* 51:72-77.
- JIMÉNEZ-GASCO, M.M., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2003. *Development of a polymerase chain reaction-based assay for the identification of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6*. *Phytopathology* 93:200-209.
- JIMÉNEZ-GASCO, M.M., MILGROOM, M.G., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2004. *Stepwise evolution of races in Fusarium oxysporum f. sp. ciceris inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences*. *Phytopathology* 94:228-235.
- JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D., MONTES-BORREGO, M., JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., NAVAS-CORTÉS, J.A., y LANDA, B.B. 2011. *In planta and soil quantification of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris and evaluation of Fusarium wilt resistance in chickpea with a newly developed quantitative PCR assay*. *Phytopathology* 101:250-262.
- KATAN, T. 1999. *Current status of vegetative compatibility groups in Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* 27:51-64.
- KATAN, T. 2000. *Vegetative compatibility in populations of Verticillium - an overview*. Pgs. 77-94 en E. Tjamos, R.C. Rowe, J.B. Heale, y D. Favel, eds. *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN.
- KIM, Y., HUTMACHER, R.B., y DAVIS, R.M. 2005. *Characterization of California isolates of Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*. *Plant Dis.* 89:366-372.
- KOMMEDAHL, T. 2000. *Millennial milestones in Plant Pathology*. APSnet Feature Story. <http://www.apsnet.org/online/feature/Milestones/Top.html>.
- KOROLEV, N., PÉREZ-ARTÉS, E., MERCADO-BLANCO, J., BEJARANO-ALCÁZAR, J., RODRÍGUEZ-JURADO, D., JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., KATAN, T., y KATAN, J. 2008. *Vegetative compatibility of cotton-defoliating Verticillium dahliae in Israel and its pathogenicity to various crop plants*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122:603-617.
- KRAFT, J.M., BURKE, D.W., y HAGLUND, W.A. 1981. *Fusarium diseases of beans, peas, and lentils*. Pages 142-156 en: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. P.E., Nelson, T.A. Tousson, y R.J. Cook, eds. The Pennsylvania State University Press. University Park, PE.
- LESLIE, J.F. 1991. *Mating populations in Gibberella fujikuroi (Fusarium Section Liseola)*. *Phytopathology* 81:1058-1060.
- LESLIE, J.F. 1993. *Fungal vegetative compatibility*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:127- 150.
- LESLIE, J.F. 1995. *Gibberella fujikuroi: available populations and variable traits*. *Can. J. Bot.* 75 (Suppl. 1):S282-S291.
- LESLIE, J.F. 1996. *Fungal vegetative compatibility-promises and prospects*. *Phytoparasitica* 24:3-6.
- LUCENA, C., BERNI, J.A.J., MONTES-BORREGO, M., TRAPERO-CASAS, J.L., LANDA, B.B., ZARCO-TEJADA, P., y NAVAS-CORTÉS, J.A. 2010. *High resolution thermal remote sensing imagery for Verticillium wilt detection in olive*. Pg. 81 en: *Book of Abstracts 10th International Verticillium Symposium*. Corfú, Grecia.
- MA, L.-J., et al. 2010. *Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium*. *Nature* 464:367-373.
- MARTIN, R.R., JAMES, D., y LÉVESQUE, C.A. 2000. *Impacts of molecular diagnostics technologies on plant disease management*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:207-239.
- MERCADO-BLANCO, J., RODRÍGUEZ-JURADO, D., PARRILLA-ARAUJO, S., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2003a. *Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating Verticillium*

- dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 87:1487-1494.
- MERCADO-BLANCO, J., COLLADO-ROMERO, M., PARRILLA-ARAUJO, S., RODRIGUEZ-JURADO, D., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2003b. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63:91-105.
- MONTES-BORREGO, M., LANDA, B.B., NAVAS-CORTÉS, J.A., MUÑOZ-LEDESMA, F.J., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2009. Role of oospores as primary inoculum for epidemics of downy mildew caused by *Peronospora arborescens* in opium poppy crops in Spain. *Plant Pathol.* 58:1092-1103.
- MONTES-BORREGO, M., MUÑOZ-LEDESMA, F.J., JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., y LANDA, B.B. 2011. Real-time PCR quantification of *Peronospora arborescens*, the opium poppy downy mildew pathogen, in seed stocks and symptomless infected plants. *Plant Dis.* 95: 143-152.
- MORALEJO, E., PÉREZ-SIERRA, A.M., ÁLVAREZ, L.A., BELBAHRI, L., LEFORT, F., y DESCALS, E. 2009. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathol.* 58:100-110.
- O'DONNELL, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919-938.
- O'DONNELL, K., CIGELNIK, E., y NIRENBERG, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.
- O'DONNELL, K., WARD, T.J., GEISER, D.M., KISTLER, H.C., y AOKI, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* 41:600-623.
- O'DONNELL, K., et al. 2009. A two-locus DNA sequence database for the typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 40:936-948.
- OWNLEY, B.H., GWINN, K.D., y VEGA, E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55:113-128.
- PORRAS-ALFARO, A., y BAYMAN, P. 2011. Hidden fungi, emerging properties: Endophytes and microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:291-315.
- PERES, N.A., MACKENZIE, S.J., PEEVER, T.L., y TIMMER, L.W. 2008. Post bloom fruit drop of citrus and Key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 98:345-352.
- PLETZ, R.C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Phytopathology* 96:653-656.
- ROBB, J. 2007. *Verticillium* tolerance: resistance, susceptibility or mutualism. *Can. J. Bot.* 85:903-910.
- ROBB, J., LEE, B., y NAZAR, R. 2007. Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. *Planta* 226:299-309.
- ROWE, R.C. 1995. Recent progress in understanding the relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica* 23:31-38.
- SCHAAD, N.W., FREDERICK, R.D., SHAW, J., SCHNEIDER, W.L., HICKSON, R., PETRILLO, M.D., y LUSTER, D.G. 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:305-324.
- SEQUEIRA, L. 2000. Legacy for the Millenium: A century of progress in Plant Pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:1-17.
- SKOVGAARD, K., NIRENBERG, H.I., O'DONNELL, K., y ROSENDAHL, S. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology* 91:1231-1237.
- SUBBARAO, K.V., HUBBARD, J.C., GREATHEAD, A.S., y SPENCER, G.A. 1997. *Verticillium* wilt. Pages 26-27 in: Compendium of Lettuce Diseases. R.M. Davis, K.V Subbarao, R.N. Raid, y E.A. Kurtz, eds. APS Press, St Paul, MN.
- TAYLOR, J.W., JACOBSON, D.J., KROKEN, S., KASUGA, T., GEISER, D.M., HUBBET, D.S., y FISHER, M. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31:21-32.
- VALLAD, G.E. QIN, Q.-M., GRUBE, R., HAYES, R.J., y SUBBARAO, K.V. 2006. Characterization of race-specific interactions among isolates of *Verticillium dahliae* isolates pathogenic on lettuce. *Phytopathology* 96:1380-1387.
- VOGLMAYR, H. 2008. Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *Eur. J. Plant Pathol.* 122 3-18.
- WALE, S.J. 2005. The science of appliance. *Plant Pathol.* 54:715-722.
- WANG, B., BRUBAKER, C.L., y BURDON, J.J. 2004. *Fusarium* species and *Fusarium* wilt pathogens associated with native *Gossypium* populations in Australia. *Mycol. Res.* 108:35-44.
- WANG, B., BRUBAKER, C.L., TATE, W., WOODS, M.J., MATHESON, B.A., y BURDON, J.J. 2006. Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum in Australia. *Plant Pathol.* 55:746-755.
- WANG, B., BRUBAKER, C.L., TATE, W., WOODS, M.J., y BURDON, J. J. 2008. Evolution of virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum using serial passage assays through susceptible cotton. *Phytopathology* 98:296-303.
- WHITE, T.J., BRUNS, T.D., LEE, S., y TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pgs. 315-322 en: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sninsky, y T.J. White, eds. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press. San Diego, CA.
- YARDEN, O., EBBOLE, D.J., FREEMAN, S., RODRIGUEZ, R.J., y DICKMAN, M.B. 2003. *Fungal biology and agriculture: Revisiting the field.* *Mol. Plant Microb. Interact.* 16:859-866.