

## DIVERSIDAD MICROBIANA EN LAS INTERACCIONES ENTRE LAS PLANTAS Y SUS PARÁSITOS

Rafael Manuel Jiménez Díaz

---

*Catedrático de Patología Vegetal*

*Premio Rey Jaime I a la Protección del Medio Ambiente*

*Fellow de la American Phytopathological Society*

*Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba;*

*e Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC*

*Apartado 4084, 14080 Córdoba*

*Correo electrónico: ag1jdir@uco.es*

### 1. Introducción: El escenario de estudio

Las enfermedades de las plantas son un componente importante en la producción agrícola, porque junto con las plagas de artrópodos y las infestaciones de malas hierbas constituyen un **factor reductor del rendimiento alcanzable** de los cultivos (i.e., el determinado por su potencial genético con las limitaciones que imponen los componentes de los ambientes de producción); y son el objeto de estudio de la Fitopatología (o Patología Vegetal), una ciencia integradora y aplicada que trata de su naturaleza, causa, control y aspectos socio-económicos. Sin embargo, la percepción social de la incidencia que tienen las enfermedades sobre el crecimiento vegetal y la producción de alimentos y fibras aún es escasa, a pesar de que los impactos sociales y económicos de ellas sobre los cultivos de plantas han sido compilados por diversos autores en textos excelentes (ej., 5,30,48).

No obstante, en numerosas ocasiones en el curso de la historia de la agricultura, el impacto de las enfermedades de las plantas sobre las sociedades ha trascendido su repercusión negativa sobre las cosechas. De hecho, en la historia de la Fitopatología existen numerosos ejemplos de enfermedades que han desempeñado un papel relevante en la historia de la Humanidad, porque han originado hambrunas en la población, devastación y ruina económica de los agricultores, desastres ecológicos, y cambios de hábitos en la sociedad; ej. Mildiu de la patata (*Phytophthora infestans*), el Fuego bacteriano de peral y manzano (*Erwinia amylovora*), el Mal de Panamá de la platanera (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), el Chancro

del castaño (*Cryphonectria parasitica*) y la Necrosis del maíz (*Cochliobolus herostrophus*). Entre 1845 y 1847, los ataques de Mildiu de la patata (Fig. 1) causaron en Irlanda devastación en los cultivos y miseria y hambrunas en la población, porque el consumo de este tubérculo era el componente principal, a veces único, de su dieta. Más de 1 millón de personas murieron de hambre y cerca de 1,5 millones emigraron a América del Norte, de manera que la población en dicho país se redujo de 8,2 millones de habitantes en 1841 a 6,5 millones en 1851 (1,30).



Figura 1. Extensa necrosis foliar en cultivo de patata (arriba) y podredumbre de tubérculos causados por Mildiu (*Phytophthora infestans*) (derecha).

El Fuego bacteriano de peral y manzano causado por *E. amylovora*, una bacteria endémica en las comunidades de rosáceas nativas de América del Norte, es también ejemplo de enfermedad devastadora; pero, en particular, es paradigma de enfermedad que resulta del encuentro entre plantas nativas de una zona geográfica con agentes fitopatógenos nativos de otra en que aquéllas son introducidas por vez primera (Fig.2). Este hecho es indicador de los riesgos que puede auspiciar la introducción de nuevos cultivos en áreas geográficas donde la especie vegetal y los patógenos que pueden atacarla no han evolucionado conjuntamente.



Figura 2. Manzano severamente afectado de necrosis causada por *Erwinia amylovora*.



Figura 3. Cultivo de platanera con elevada incidencia de Mal de Panamá (arriba) y síntomas característicos de la enfermedad (derecha).

El Mal de Panamá de la platanera (Fig. 3), causado por el hongo de suelo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* nativo de zonas tropicales del Sudeste Asiático, es referida como una de las enfermedades de mayor impacto económico y social en los países productores de plátano, probablemente la fruta más consumida en el mundo, y a su vez, es paradigma de cómo un cambio simple en la tecnología agrícola puede tener enorme trascendencia para la sanidad de un cultivo. La infección sistémica de la planta por el hongo y la propagación asexual de ella mediante nuevos rizomas ‘hijos’, han contribuido a que el patógeno y la enfermedad se hayan distribuido ampliamente en las zonas de cultivo de platanera en el mundo coincidiendo con la expansión del cultivo para la exportación a gran escala a los mercados mundiales (46). Una de las consecuencias más lamentables de la introducción de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en nuevas áreas geográficas, en rizomas de plataneras enfermas, ha sido la infestación prolongada del suelo y su subsiguiente inhabilitación para el



Figura 4. Chancros en troncos de castaño causados por *Cryphonectria parasitica*.



cultivo; de manera que durante años la producción de plátano estuvo unida a la búsqueda de nuevos suelos vírgenes y fértiles (5). Por ello, el Mal de Panamá es uno de los ejemplos más claros y convincentes de que el uso agrícola eficiente de suelos fértiles es puesto en riesgo por la introducción en ellos patógenos exóticos capaces de sobrevivir prolongadamente.

El Chancro del castaño causado por el hongo *C. parasitica* (Fig. 4) es uno de los ejemplos más dramáticos de la devastación que puede causar la introducción de agentes fitopatógenos exóticos en un área geográfica nueva en la que existen plantas susceptibles con las cuales no han co-evolucionado. Además, el Chancro del castaño es paradigma de enfermedades de importante impacto negativo sobre el medio ambiente, porque ha arrasado extensas áreas forestales en América del Norte y Europa. *C. parasitica*, presumiblemente nativo de China y Japón, fue introducido en Nueva York (EE UU) a principios del siglo xx mediante importación de plantones de *Castanea* spp. de origen asiático. Dicha introducción facilitó el encuentro de *C. parasitica* con un huésped muy susceptible, el castaño americano (*Castanea dentata*), y dio lugar a la devastación de bosques de éste en una zona de cerca de 3,5 millones de ha con una tasa de expansión de 37 km/año y la muerte de cerca de 3.500 millones de castaños en los 50 años siguientes a la introducción (2,3).

Finalmente, la Necrosis de la hoja del maíz causada por el hongo *C. herosrophus*, que originó pérdidas medias superiores al 50% de la cosecha esperada en amplias zonas maiceras del Centro y Sur de los EE UU en 1970 (51), es paradigma de la devastación que puede resultar por la conjunción de homogeneidad genética sin solución de continuidad en extensa áreas de cultivo del huésped, i.e., maíz híbrido portador del citoplasma androestéril Texas (Tms, de 'Texas male sterility') y la prevalencia de una nueva estirpe del patógeno específicamente adaptada a dicho citoplasma, que se denominó raza T (Fig. 5). Irónicamente, una indudable mejora tecnológica que auspicia la utilización del vigor híbrido en el maíz, facilitó que se produjera uno de los factores que determinan la severidad de las enfermedades de los cultivos: la abundancia y homogeneidad genética en la planta susceptible opera a favor de los patógenos mejor adaptados sobre el genotipo predominante.

Los ejemplos anteriores indican claramente que, tanto en el pasado como en el presente más inmediato, el desarrollo de enfermedades severas en los cultivos de plantas está mediado por factores antropogénicos, hasta el punto de haberse postulado que el potencial de pérdida de cosecha por enfermedades es especialmente alto en cultivos que tienen lugar en condiciones de productividad elevada (i.e, alta densidad, intensas prácticas de fertilización, riego, etc.) (42). De hecho, el desarrollo de enfermedades severas ha ido paralelo al de la intensificación de la producción agrícola en la agricultura moderna, entre cuyas características más relevantes a tal respecto son de destacar: (i) la insuficiente diversidad genética existente en cultivos y cultivares de plantas; (ii) la intensificación en el uso de ellos y su agregación en términos geográficos; y (iii) la extensión del monocultivo. Aún así, la agricultura ha de perseverar en su evolución para alcanzar mejoras tecnológicas y de productividad, porque debe hacer frente al reto de satisfacer la demanda de alimentos de la población mundial en crecimiento. En uno de los estudios más concienzudo y completo realizado hasta la fecha, que incluyó los ocho cultivos más relevantes para la alimentación y la industria (algodón, arroz, café, cebada, maíz, patata, soja, y trigo), se estimó que durante el periodo de 1988 a 1990 las enfermedades ocasionaron una reducción media anual del 12,4% de la cosecha alcanzable



Figura 5. Manchas necróticas extensas en hoja de maíz con citoplasma androestéril Texas causadas por la raza T de *Cochliobolus herostrophus*.

y 13,3 % del valor monetario de ésta, a la cual debe sumarse al menos 10% de pérdida post-cosecha (41). En el año 2004, Oerke y Dehne (42) publicaron una actualización de dichas estimaciones utilizando datos correspondientes al periodo de 1996 a 1998, y concluyeron que la pérdida media anual de cosecha ascendió al 12,6% de la cosecha alcanzable.

La magnitud de las pérdidas de cosecha referidas anteriormente puede repercutir sobre la disponibilidad de alimentos en el siglo XXI. Un análisis de las perspectivas globales de dicha disponibilidad estimó que la demanda global de cereales, raíces y tubérculos en el año 2020 se incrementará en 40% respecto de la correspondiente al año 1993; y que el aumento de la superficie cultivada contribuiría en menos del 20% al incremento de producción de aquéllos necesario para satisfacer dicha demanda (45). En consecuencia; la mayor demanda de alimentos agrícolas ha de ser satisfecha básicamente mediante mejoras en los rendimientos y la protección de éstos contra la incidencia de agentes nocivos. Sin embargo, no debe desestimarse que la mejora de productividad agrícola basada en cambios en las tecnologías de cultivo y de germoplasma vegetal puede estar sujeta a la incidencia de nuevas enfermedades o de la re-emergencia de otras que habían dejado de tener repercusión importante sobre las cosechas. Durante los últimos 10-15 años se han acentuado epidemias de enfermedades re-emergentes, de las que son ejemplo la Necrosis de la espiga de cebada y trigo causada por *Fusarium graminearum* y el Mildiu de la patata y tomate causado por *P. infestans* (16,35), que ilustran claramente la fragilidad de la producción agrícola ante enfermedades

severas aún en países donde supuestamente se dispone del mejor conocimiento y tecnologías para dicha producción. Los ataques de dichas enfermedades han causado pérdidas cuantiosas y la ruina de muchos agricultores en las regiones afectadas, que han causado conmoción en sus respectivas sociedades. En particular, los ataques de Necrosis de la espiga asolaron extensas zonas de cultivo de cebada de primavera, trigo blando y trigo duro en el cinturón cerealista de los EE UU durante el periodo de 1991 a 1995, originando pérdidas de 25 al 45% de las cosechas con un valor superior a 1.000 millones de dólares en una extensión de 4 millones de ha de cuatro Estados. La extrema severidad de dichos ataques fue favorecida por un ambiente excepcionalmente húmedo durante los meses de Junio y Julio del periodo de tiempo referido, en los que la precipitación acumulada duplicó a la normal acaecida en años anteriores. Además, a dicha severidad contribuyó significativamente la utilización de cultivares de trigo y cebada muy susceptibles, y la acumulación de grandes cantidades del patógeno en los restos de cultivos anteriores afectados como consecuencia de las prácticas de no-laboreo y monocultivo (35).

En términos generales, los ejemplos referidos indican que en la agricultura actual existen factores con gran potencial de influir negativamente sobre la Sanidad Vegetal, incluso en sociedades y áreas de cultivo en los que presumiblemente se dispone de los conocimientos y tecnologías de producción agrícola más avanzados. De hecho, la permanencia de tales factores confiere **vigencia y exigencia de innovación a la Ciencia Fitopatológica**, de manera que comprender su naturaleza e impedir que actúen en favor del desarrollo de epidemias severas en los cultivos, constituye un desafío importante para los profesionales de la Fitopatología. Uno de los aspectos más importantes de este desafío concierne al mejor conocimiento y comprensión de la diversidad microbiana asociada con las enfermedades de las plantas y del papel que dicha diversidad desempeña en el proceso patológico.

## 2. Diversidad microbiana asociada con el desarrollo de enfermedad en las plantas

El desarrollo de enfermedad en un cultivo es resultado de complejas interacciones entre las poblaciones de un agente primario, el patógeno, y la planta susceptible, moduladas por el ambiente en el que tienen lugar, que a menudo son esquematizadas en el popularmente conocido 'triángulo etiológico' (Fig. 6). Para interferir dicho desarrollo, los fitopatólogos basan sus intervenciones en medidas de carácter preventivo cuya utilización tiene que ser decidida antes del establecimiento de los cultivos y requieren la caracterización precisa del patógeno y las características del patosistema en cuestión. Desde que DeBary y Koch demostraran el papel causativo de hongos y bacterias en el desarrollo de las enfermedades, la identificación de los patógenos se ha basado en la caracterización morfológica de la especie y la subsiguiente evaluación de sus capacidades patogénicas huésped-específica o cultivar-específica mediante costosos bioensayos en condiciones controladas.

Durante los últimos 10-15 años, la aplicación de las tecnologías de análisis del DNA microbiano para la caracterización molecular de los agentes fitopatógenos ha dado lugar a cambios significativos en la forma de concebir su naturaleza y de valorar la estructura de sus poblaciones naturales. Por ejemplo, la variabilidad genética y molecular que dichas tecnologías han revelado en las poblaciones de hongos fitopatógenos de reproducción estrictamente asexual, ha dado lugar a que se planteen dudas sobre la validez de los criterios morfológicos que se han venido utilizando hasta ahora para la identificación de especies biológicas. Al mismo tiempo, el conocimiento que se ha generado respecto de dicha variabilidad ha favorecido el uso de un nuevo sistema para la identificación de especies fúngicas, basado en la concordancia de genealogías de varios genes nucleares (ej.,  $\beta$ -*tubulin*, *tef*, región ITS del rDNA, región IGS del rDNA, etc.) y

mitocondriales (*cox1*, *coxII* y su región espaciadora, mtSSU rDNA, etc.) (GCPSR, "Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition"), que es aplicable tanto a hongos con reproducción sexual conocida como a los de reproducción asexual estricta (50).

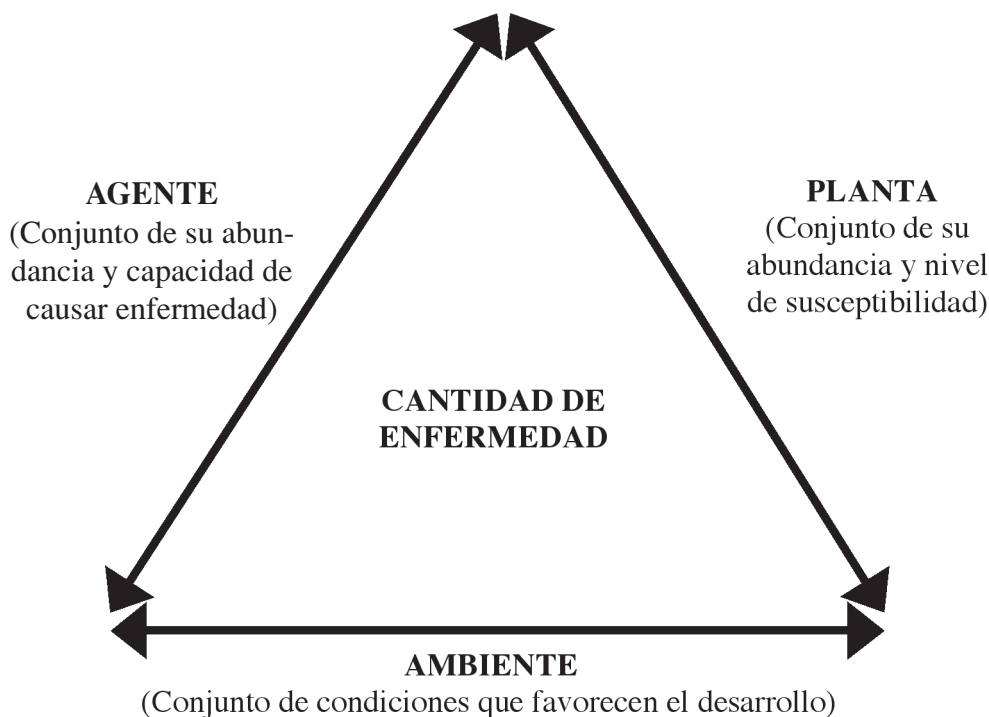


Figura 6. Esquema ilustrativo del triángulo etiológico.

El análisis filogenético mediante el sistema GCPSR ha dado lugar a la identificación de **especies filogenéticas crípticas** dentro de especies morfológicas (i.e., *grupos fúngicos morfológicamente indistinguibles para los que se puede inferir aislamiento reproductivo porque no manifiestan recombinación entre sí*). Por ejemplo, la utilización del sistema GCPSR en la especie morfológica *F. graminearum* (teleomorfo *Gibberella zae*) asociada a la Necrosis de la espiga de los cereales referida anteriormente, permitió diferenciar nueve especies crípticas distintivas coincidentes con otros tantos linajes evolutivos, que han sido denominadas: *Fusarium acaciae-mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. austro-americanum*, *F. boothi*, *F. brasiliicum*, *F. cortaderiae*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, y *F. graminearum* sensu stricto (que fue la denominación retenida para la especie más comúnmente asociada con la enfermedad) (39). Similarmente, en la morfoespecie *Fusarium solani* (teleomorfo *Nectria heamatococca*) se han diferenciado 30 especies filogenéticas crípticas, algunas de las cuales son idénticas a la especie biológica identificada anteriormente mediante compatibilidad sexual. Alternativamente, el análisis filogenético de secuencias génicas puede revelar importante información fitopatológica aún en ausencia de especiación. Un ejemplo de ello es el caso del hongo mitospórico *Colletotrichum acutatum*, que ha sido asociado con dos enfermedades de cítricos sintomatológicamente distintas denominadas 'Caída de frutos' del naranjo dulce y la mayoría de otros cítricos (PFD) y 'Antracnosis de la lima Key' (KLA) específica de dicha especie. El análisis conjunto de las secuencias de

la región ITS del rDNA nuclear y del intrón 2 del gen de la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa, de una población de aislados del hongo procedentes de cítricos en numerosos países en América del Norte, Central y del Sur, reveló la agregación de ellos en dos clades altamente correlacionadas con el tipo de enfermedad que causan los aislados comprendidos en ellas, de manera que los síndromes PFD y KAL son causados por linajes filogenéticos diferentes que son también biológicamente distinguibles (44).

Un caso de especial relevancia fitopatológica es la taxo-especie morfológica de reproducción estrictamente asexual *Fusarium oxysporum* (Fig. 7). Esta morfo-especie contiene numerosos clones no-patogénicos de plantas, y estirpes fitopatógenas agrupadas en más de 150 *formae speciales* (ff. sp.) que se caracterizan por su patogenicidad específica sobre especies botánicas o géneros de ellas. En la actualidad, *F. oxysporum* se concibe hoy como un complejo de especies en las que la evolución hacia el patogenismo en plantas en algunas *formae speciales* ha tenido lugar una sola vez y éstas son por lo tanto monofiléticas (ej., ff. sp. *albedinis*/palmera datilera, *ciceris*/garbanzo, *conglutinans*/col) (4,25), pero la mayoría de aquéllas han adquirido dicha capacidad en eventos múltiples e independientes y en consecuencia son polifiléticas (ej., *asparagi*/espárrago, *cubense*/platanera, *cucumerinum*/pepino; *dianthi*/clavel, *lactucae*/lechuga, *lini*/lino, *lycopersici*/tomate, *melonis*/melón, *phaseoli*/judía, *vasinfectum*/algodón, etc.) (4,40). El que una determinada *forma specialis* de *F. oxysporum* tenga origen monofilético o polifilético tiene importantes repercusiones sobre las estrategias de desarrollo y utilización de la resistencia al patógeno para el control de las enfermedades que causa. De hecho, historias evolutivas distintas en lugares geográficamente distantes confieren incertidumbre al empleo con éxito de un cultivar desarrollado como resistente contra las poblaciones del patógeno que predominan en un área evolutiva cuando se utiliza en otras áreas evolutivas diferentes. La polifilia en las *formae speciales* de *F. oxysporum* cuestiona por filogenéticamente equivoco la validez del concepto basado en patogenicidad huésped-específica y su utilidad predictiva de capacidades patogénicas, e indica que la selección de genotipos resistentes de la planta huésped para el desarrollo de cultivares resistentes debe ser llevada a cabo utilizando aislados del patógeno representativos de las diferentes clades a fin de asegurar la validez de la resistencia identificada.

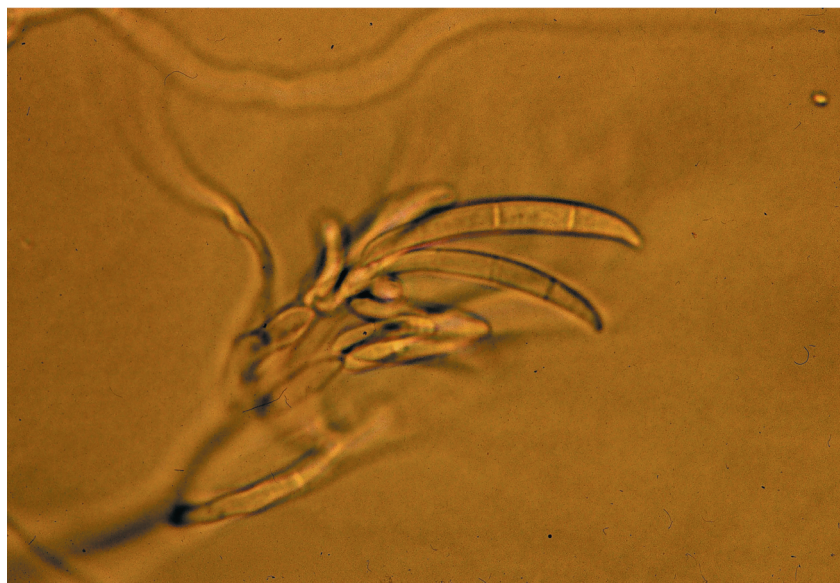


Figura 7. Fiálidas y macroconidias de características de *Fusarium oxysporum*.



Otros de los beneficios derivados de la aplicación de tecnologías de biología molecular a la Fitopatología conciernen al desarrollo de protocolos para la identificación rápida y exacta de los agentes fitopatógenos mediante detección de su DNA. Esta tecnología es particularmente útil para complejos de especies como *F. oxysporum*, cuyos miembros patogénicos (i.e., *formae speciales*) y no-patogénicos generalmente no pueden ser discriminados mediante análisis de secuencias de genes conservados. Puesto que las bases genéticas de la patogenicidad huésped-específica es todavía escasamente conocida, la caracterización de las diferentes *formae speciales* y razas de *F. oxysporum* se ha basado en la amplificación por PCR de transposones, o de marcadores SCARs seleccionados de diferencias en secuencias arbitrarias del DNA entre los subgrupos específicos identificadas mediante técnicas de genotipado (ej., RFLP, RAPD, AFLP) (33). Puesto que estos marcadores pueden estar ubicados en cualquier lugar en el genoma fúngico, la escasa disponibilidad de secuencias en las bases de datos dificulta la comparación con otras secuencias y para validar la robustez de los marcadores desarrollados es necesario contrastarlos utilizando una amplia colección de aislados y especies. Por ejemplo, durante los últimos años ha sido posible desarrollar en mi laboratorio marcadores SCARs específicos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (agente causal de la Fusariosis Vascular del garbanzo) y de sus razas patogénicas, así como de *Verticillium dahliae* (agente causal de las Verticilosis de la alcachofa, algodón, pimiento, y olivo en España) y de sus patotipos defoliante y no-defoliante de algodón y olivo; y mediante la utilización de dichos marcadores específicos en investigaciones de naturaleza epidemiológica se ha podido caracterizar y monitorizar la prevalencia y distribución de dichos patotipos y razas en la Península Ibérica y otras áreas de la Cuenca Mediterránea. Con este conocimiento, es posible ahora elegir los cultivares resistentes del huésped respectivo con la resistencia adecuada que agrónomicamente estén mejor adaptados a la zona de cultivo en cuestión, y mejorar con ello la utilización eficiente de las resistencias disponibles (21,22,38). La práctica eficiente de tales acciones era difícil hasta ahora, porque la información sobre la naturaleza y distribución de los patotipos y razas de los patógenos prevalentes en las áreas de cultivo debía ser obtenida de la caracterización patogénica de las poblaciones de los patógenos existentes en ella, mediante bioensayos en condiciones estandarizadas, costosos en tiempo y recursos físicos y humanos, utilizando cultivares diferenciadores raciales.

### **3. Diversidad genética en las poblaciones de los agentes fitopatógenos y su relación con la utilización eficiente de la resistencia huésped para el control de enfermedades de las plantas**

#### **3.1. Características genéticas y mecánicas de la resistencia a los agentes fitopatógenos**

En el curso de su evolución, las plantas han desarrollado mecanismos refinados para el reconocimiento molecular de factores que determinan la virulencia de los patógenos, así como para activar mecanismos defensivos contra la invasión de sus tejidos por ellos, que les confieren la capacidad de resistir a los ataques por enfermedades y les han permitido sobrevivir los estreses fisiológicos que éstas les causan. La utilización de dicha capacidad, mediante cultivares de la especie huésped genéticamente manipulados para mejorar su resistencia, es una de las estrategias más prácticas, eficientes y ambientalmente respetuosa para el control de enfermedades de plantas (Fig. 8). Sin duda, el uso de cultivares resistentes a enfermedades se intensificará en los próximos años con la extensión de las nuevas formas de agricultura. Por ello, desde hace unas décadas los fitopatólogos, genetistas, bioquímicos y, recientemente, los biólogos moleculares, han dedicado grandes esfuerzos en la investigación para desentrañar la regulación genética de la resistencia a enfermedades y los mecanismos mediante los cuales opera.



Figura 8. Selección de una colección de líneas de garbanzo por resistencia a la Fusariosis vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

La resistencia contra los agentes fitopatógenos puede ser expresada en el lugar y durante el proceso de infección, de manera que interfiriéndolo proporciona a la planta la mayor protección contra la enfermedad. Esta resistencia, denominada **completa** porque con ella se produce la mínima expresión de síntoma en la planta, ha sido la más estudiada y deseada por investigadores y agricultores. En la mayoría de los casos, este tipo de resistencia implica la muerte rápida y localizada de las células vegetales cercanas al lugar de invasión por el patógeno (i.e., **muerte celular hipersensible y programada**), es operativa solamente contra alguna(s) de las razas patogénicas del agente causal (i.e., es **raza-específica**), y es regulada por genes mayores en la planta que se corresponden con genes específicos de virulencia del patógeno en una **relación de gen-a-gen**. En esta relación, *a cada gen en la planta que determina la resistencia corresponde un gen complementario en el patógeno que determina su incapacidad de causar enfermedad (avirulencia) en aquella que lo posee* (14). En la mayoría de los casos en las interacciones gen-a-gen entre plantas y sus patógenos, la reacción de resistencia es determinada por la correspondencia entre un gen de resistencia dominante (*R*) en la planta y su complementario dominante de avirulencia (*Avr*) en el patógeno. Esto ha favorecido una interpretación molecular predominante del modelo gen-a-gen, en la que la proteína codificada por el gen de resistencia actúa como receptora de la proteína codificada por el gen de avirulencia correspondiente, que se une específicamente a ella en una relación análoga a la que caracteriza a receptor y ligando entre antígeno y anticuerpo. En este esquema, pues, los genes *R* actuarían como **genes de reconocimiento**, fruto del cual sería la activación de genes en la planta que codifican la expresión de respuestas defensivas inespecíficas contra el agente invasor (i.e., **genes defensivos**).

Desde que en 1993 se clonara el primer gen de resistencia raza-específica, se han clonado y caracterizado el producto codificado por más de 40 genes *R* contra bacterias, hongos, nematodos y virus fitopatógenos, a fin de demostrar el reconocimiento molecular postulado (51). Salvo por algunas excepciones, la mayoría de las proteínas codificadas por los genes de resistencia tienen dominios con numerosas repeticiones de leucina (LRRs) que están implicados en interacciones entre proteínas. Las proteínas *R* pueden ser clasificadas en cinco grupos principales, en tres de los cuales (i, ii, iii) dichas proteínas parecen estar ubicadas citoplásmicamente en la célula vegetal: (i) una serina-treonina kinasa que interacciona directamente con la proteína AvrPto de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en tomate; (ii) proteínas LRRs y un locus de unión a nucleótidos (NBS); (iii) proteínas que poseen receptores Toll (homólogo al existente en *Drosophila*) e interleukina-1; (iv) proteínas Cf de resistencia a *Cladosporium fulvum* en tomate, que poseen un dominio trans-membrana y un región LRR extracelular; y (v) la proteína codificada por el gen Xa21 de resistencia a *Xanthomonas oryzae* en arroz, que contiene un dominio serina-treonina kinasa intracelular y LRR extracelular (51). En dichos genes *R* son características destacables que: (i) plantas botánicamente distintas (ej., soja y tomate) pueden tener genes estructural o físicamente similares operativos contra patógenos relacionados; (ii) genes *R* en diferentes plantas efectivos contra distintos patógenos son similares y codifican proteínas con regiones o motivos de NBS o LRR característicos; y (iii) genes *R* efectivos contra un patógeno dado pueden operar similarmente contra insectos fitófagos (i.e., el gen *Mi* en tomate confiere resistencia contra el nemátodo *Meloidogyne incognita* y estirpes específicas del pulgón de la patata *Macrosiphum euphorbiae*).

La estructura y ubicación de las proteínas de genes *R* en los tres primeros grupos son coherentes con una supuesta actividad receptora de moléculas producidas por fitopatógenos intracelulares (ej., virus), o que colonizan intercelularmente los tejidos vegetales pero excretan factores de virulencia que son transportados al interior del citoplasma celular (ej. bacterias), contra los cuales dichos genes confieren resistencia. Por el contrario, los otros dos tipos de proteínas (iv, v), que también tienen dominios LRRs, están ubicadas extracelularmente sugiriendo que pueden tener una actividad receptora de moléculas producidas por patógenos que colonizan intercelularmente los tejidos vegetales. Sin embargo, los numerosos estudios realizados hasta ahora para confirmar dicha hipótesis han revelado sólo tres casos en los que tiene lugar la interacción directa receptor-ligando postulada, mientras que en la mayoría de los bioensayos que incluían las proteínas *R* y Avr se produjeron resultados negativos. Además, en algunos casos fue posible demostrar que la actividad como ligando de proteínas Avr tenía lugar en plantas carentes de genes *R*, sugiriendo que en las interacciones entre proteínas *R* y Avr pueden operar moléculas intermediarias. Ello ha dado lugar a una nueva hipótesis respecto de la interacción entre dichas moléculas, que propone que las proteínas *R* actúan como **proteínas 'guarda'**: i.e., las proteínas *R* protegen a proteínas vegetales que son dianas de los productos de los genes Avr, productos que en ausencia de genes *R* desempeñan un papel causativo de la enfermedad (37). Según la nueva hipótesis, la activación de los genes de defensa en la planta es consecuencia de la detección por parte de la proteína guarda (proteína *R*) del ataque a que se ve sometida su proteína vegetal protegida (i.e., la proteína diana del producto de virulencia). Esto es, la proteína *R* detecta la capacidad del producto de genes Avr de promover enfermedad, en lugar de reconocer a la propia proteína Avr. Por ejemplo, durante la infección de *Arabidopsis thaliana* por *Pseudomonas syringae*, los factores de virulencia (denominados **efectores**) producidos por la bacteria son transportados al interior de la célula vegetal mediante el sistema secretor tipo III codificado por el conjunto de genes *hrp* (que ya era conocido como mecanismo de secreción de factores de virulencia de los patógenos humanos *Salmonella* y *Yersinia*); sin embargo, dichos efectores no se asocian con las proteínas codificadas por los genes de resistencia *RPM1* o *RPS2*, sino que lo hacen a una proteína de la membrana celular vegetal recientemente identificada

como RIN4. Esta proteína RIN4 está físicamente co-localizada con las proteínas RPM1 y RPS2 (37), de manera que estas dos últimas proteínas de resistencia son activadas en respuesta a modificaciones de la proteína RIN4 mediadas por la acción de los efectores bacterianos. Aunque el *modelo de proteína guarda* no explica necesariamente todas las interacciones entre proteínas R y Avr, puede tener implicaciones importantes respecto de la forma en que han co-evolucionado los genes *R* y *Avr*. Por ejemplo, es razonable predecir que diferentes fitopatógenos puedan tener efectores con proteínas dianas comunes, de manera que las plantas han podido evolucionar proteínas R que, actuando como guarda de dianas generalizadas de diversos factores de virulencia, tienen la capacidad de reconocer una elevada cantidad de efectores de agentes fitopatógenos con un número relativamente bajo de genes de resistencia.

Durante la última década, los avances en genética molecular han dado lugar a progresos significativos en la comprensión de la estructura genética y molecular de los *loci* en los genomas vegetales implicados en la resistencia regulada gen-a-gen. Así, la exploración de dichos genomas con secuencias de genes *R* ha demostrado que estos genes están distribuidos en plantas de forma generalizada. Por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* contiene 149 genes que tienen homología con las secuencias LRR-NB (para las cuales no se ha documentado hasta ahora otra función que la de resistencia a enfermedades), de los cuales 109 constituyen 40 grupos de 2 a 8 genes y los 40 genes restantes comprenden copias únicas (38). Estos resultados confirman las predicciones avanzadas por estudios de genética clásica; y en conjunto indican que los genes de resistencia ocurren en *loci* simples con uno o varios alelos (series alélicas de resistencias específicas) (ej., 13 alelos en el *locus L* de resistencia a la Roya en el lino); o se componen de *loci* complejos que comprenden copias múltiples de secuencias estrechamente ligadas (ej., 22 secuencias en el *locus Dm3* de resistencia al Mildiu en la lechuga; 15 secuencias en el *locus M* de resistencia a la Roya en el lino), varias de las cuales pueden codificar la expresión de resistencias específicas. El número de copias en *loci R* complejos puede variar ampliamente entre genotipos de una especie vegetal, y la variación en dicho número (con la consiguiente generación de nuevos genes *R*) puede tener lugar mediante recombinación entre secuencias estrechamente ligadas (recombinación intragénica) o por eventos de recombinación entre secuencias repetitivas en regiones intergénicas (recombinación intergénica) (13).

Uno de los avances más notables en la comprensión de los mecanismos que gobiernan las interacciones entre las plantas y sus patógenos, se refiere a los procesos mediante los cuales son alertadas las respuestas defensivas tras el reconocimiento del agente invasor incompatible. La constatación de que las plantas expresan respuestas defensivas localizadas o sistémicas respecto del lugar de primera penetración, mediante cambios en las rutas de expresión y componentes de su metabolismo secundario, ha estimulado un inusitado interés en comprender los mecanismos implicados en ello. La expectativa de dicho conocimiento es que pueda ser utilizado para manipular la inducción e intensidad de las respuestas defensivas, bien mediante modificaciones (transformación) genéticas de la planta, bien por la estimulación artificial de ella a través de inductores químicos aplicados externamente.

En esa búsqueda, uno de los mayores logros ha sido elucidar que en la expresión de dichas respuestas defensivas intervienen dos rutas de transmisión de señales en la planta, que son mediadas, respectivamente, por fitohormonas como el ácido salicílico (SA) (y se denomina resistencia sistémica adquirida, SAR) o el binomio ácido jasmónico/etileno (JA/ETH) (y se denomina resistencia sistémica inducida, ISR). Mientras que la respuesta SAR está estrechamente ligada a la muerte de la célula vegetal, constituya ésta una reacción hipersensible o no; la respuesta ISR es mediada fundamentalmente por interacciones de tejidos radicales con agentes no-patogénicos que no resultan en muerte celular, necesariamente. Además, mientras que en las respuestas SAR e ISR están implicadas respectivamente las fitohormonas SA, y



JA y ETH, en la respuesta a estreses abióticos (ej., sequía, temperaturas inadecuadas, etc.) interviene el ácido absísico (ABA), que además está implicado en procesos de crecimiento y desarrollo vegetal como la formación, dormición y germinación de semillas, apertura estomática, etc. Dichas rutas de transmisión de señales fueron inicialmente consideradas independientes, pero estudios recientes sugieren que en las plantas tiene lugar un diálogo cruzado entre los mecanismos con que responden a la incidencia de factores de estreses bióticos (ej., enfermedades) y abióticos, y se ha propuesto que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tejidos vegetales representa un punto de convergencia importante entre las rutas de respuesta celular a ambos tipos de estreses (16).

### 3.2. Diversidad genética de las poblaciones de los agentes fitopatógenos y estabilidad de la resistencia huésped

El reconocimiento de los patógenos mediado por proteínas R representa un talón de Aquiles para las plantas, porque un gen *R* es inutilizado por la modificación del correspondiente factor de virulencia en el patógeno. De hecho, la eficiencia de los cultivares resistentes en el control de enfermedades se ve seriamente comprometida por la capacidad evolutiva de los patógenos, que da lugar a que en sus poblaciones naturales se establezcan variantes patogénicas (razas y patotipos) capaces de superar la expresión de resistencia en la planta. Este fenómeno es particularmente significativo con la resistencia completa regulada por relaciones gen-a-gen, de cuya 'superación' (anulación) han sido testigos agrónomos, fitopatólogos y genetistas durante los casi 100 años transcurridos desde el descubrimiento de la resistencia genética a patógenos en plantas y las razas patogénicas de éstos.

La co-evolución entre las plantas y sus patógenos que subyace en el sistema gen-a-gen y el reconocimiento molecular de éstos es descrita a menudo como dinámica y rápida, implicando con ello rápidos cambios alélicos en los genes *R* y *Avr*. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que algunos genes *R* pueden exhibir polimorfismos evolutivamente estables, de manera que los alelos cuya resistencia ha sido superada no son eliminados de las poblaciones de plantas huésped. De hecho, los resultados de dichos estudios cuestionan la conclusión asumida durante años de que los genes *R* superfluos tienen necesariamente un coste adaptativo para la planta, e indican que, por el momento, no hay bases suficientes para generalizar respecto de relaciones coste/beneficio de los genes *R*. En realidad, dicho balance coste/beneficio puede variar substancialmente según los genes y una diversidad de factores, como son la naturaleza de la variabilidad alélica en el gen, la disponibilidad de nutrientes para la planta y la respuesta de ésta en su desarrollo, las condiciones ambientales, etc. (37).

La posibilidad de desarrollar cultivares de plantas resistentes a determinadas enfermedades mediante procedimientos de mejora genética convencional o por ingeniería genética, no asegura necesariamente su utilización eficiente en la protección del rendimiento de los cultivos. Por el contrario, la utilización óptima y eficiente de dicha resistencia requiere conocimiento previo respecto de la historia y potencial evolutivo de la población del patógeno (cuya estructura de virulencia no siempre es considerada en el proceso de desarrollo de resistencias), independientemente de la estrategia empleada para desarrollarla (34). Puesto que el potencial evolutivo de un patógeno es reflejado por la estructura genética de sus poblaciones, el conocimiento de dicha estructura permite realizar inferencias sobre dicho potencial y tomar decisiones para optimizar la utilización de genes de resistencia al patógeno en el control de una enfermedad dada.

En los hongos fitopatógenos, la estructura genética de las poblaciones se ha estudiado mediante análisis de compatibilidad vegetativa y de diversidad en marcadores moleculares (ej., patrones de hibrida-

ción del ADN con secuencias repetitivas, AFLPs, RFLPs, etc.). La compatibilidad vegetativa (definida como la "capacidad genéticamente regulada de miembros de una especie fúngica de establecer anastomosis hifal y formar heterocariontes estables") restringe la heterocariosis entre miembros de la especie fúngica genéticamente diferentes porque es determinada por la homocigocis en cada uno de un conjunto de 7 a 11 loci (denominados loci *vic* por 'vegetative incompatibility') (17,32); de manera que los miembros de una especie que son compatibles entre sí constituyen grupos particulares denominados Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG, acrónimo del término en inglés 'Vegetative Compatibility Group') (31,32). En particular, el análisis de VCGs ha demostrado ser de gran utilidad para el análisis de diversidad en poblaciones de hongos fitopatógenos de reproducción estrictamente asexual como *V. dahliae* (agente causal de las Verticilosis) y las *formae speciales* de *F. oxysporum* (agentes causales de las Fusariosis Vasculares), porque en ellos el genoma es transmitido unitariamente y de forma completa de una generación a la siguiente, de manera que la pertenencia a un VCGs determina la única posibilidad de intercambio genético entre miembros de la especie. Consecuentemente, en dichos hongos, los VCGs podrían corresponder a una estructura clonal de las poblaciones, de forma que cada VCG constituye un grupo genéticamente aislado de los demás grupos, y entre ellos pueden existir diferencias en muchas características, incluyendo las de su patogenicidad en plantas y cultivares. Tal correlación entre asignación a VCG de los componentes de la población de un hongo fitopatógeno y sus atributos patogénicos ha atraído el interés de los fitopatólogos por su potencial de aplicación práctica en investigaciones epidemiológicas y el diagnóstico de enfermedades (31,32).

A título de ejemplo, diversos estudios en poblaciones de *V. dahliae* de diferentes cultivos y áreas geográficas han identificado globalmente cinco VCGs (VCG1, VCG2, VCG3, VCG4, y VCG6), en tres de los cuales (VCG1, VCG2, y VCG4) se pueden diferenciar dos subgrupos (denominados A y B). Investigaciones recientes indican que los miembros en cada grupo o subgrupo de compatibilidad son molecularmente similares, hasta el punto de que la agregación molecular de miembros de poblaciones del patógeno determinada mediante análisis de AFLPs se corresponde con la agrupación de ellos en VCGs (6). Además, mediante análisis filogenético de los marcadores AFLPs y de seis secuencias de DNA, incluyendo los genes de actina,  $\beta$ -tubulina, calmodulina, e histona-3, las regiones ITS1 y 2 del rDNA y una secuencia específica de *V. dahliae*, fue posible demostrar por primera vez que dichos VCGs constituyen dos linajes evolutivos diferentes (I, II); de manera que uno de ellos, el linaje I, incluye a VCG1A, VCG1B y un subgrupo molecular del VCG2B; mientras que el linaje II comprende dos grupos de VCGs relacionados entre sí, que incluyen a VCG2A y VCG4B de una parte y a VCG4A, VCG6 y otro grupo molecular del VCG2B de otra. Además, todos los VCGs estudiados son monofiléticos excepto el VCG2B que es de origen polifilético y contiene diversidad molecular que se correlaciona con diferente fenotipo de virulencia sobre cultivos como alcachofa y algodón (7). Aunque globalmente se han identificado cinco VCGs en *V. dahliae*, la diversidad de VCGs del hongo en un cultivo determinado de un área geográfica dada es considerablemente menor, y además puede existir correlación entre la pertenencia a VCG de los aislados del patógeno y su virulencia sobre dicho cultivo. En consecuencia, en cultivos y áreas geográficas determinadas los VCGs pueden ser marcadores genéticos de virulencia de valor predictivo para el diseño de rotaciones de cultivos o variedades en el área de estudio (19,24,49). Así, la población de *V. dahliae* que infecta alcachofa en la Comunidad Valencia se compone de cuatro VCGs pero más del 67% de los aislados pertenece a uno de ellos (VCG2B); y la que infecta olivo en Andalucía consta de tres VCGs con cerca del 80% de los aislados pertenecientes al VCG1A (19). Los aislados de *V. dahliae* VCG1A de algodón y olivo son más virulentos sobre ambos huéspedes que los del VCG1B; mientras que los del VCG2B superan en virulencia a los pertenecientes al VCG4B. Por el contrario, los aislados del VCG2B de alcachofa son más virulentos sobre dicho huésped que los de VCG1A y VCG2A, pero cuando dicha virulencia se determina en algodón, los aislados del VCG1A de alcachofa superan en virulencia a los de VCG2A y VCG2B del mismo huésped (19,24,26,47).

A diferencia de *V. dahliae*, la relación entre razas patogénicas y VCGs en las *formae speciales* de *F. oxysporum* es más compleja y depende de cada *forma specialis*. Así, mientras que en algunos casos dicha relación es relativamente simple y los aislados de una raza patogénica de áreas geográficas muy diversas pertenecen al mismo VCG (ej., las razas 2 de *F. oxysporum* f. sp. *apii*, 5 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, 3 de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*); en otras *formae speciales* un VCG puede contener más de una raza (ej., *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) o los aislados de una raza determinada pueden ser asignados a diferentes VCGs (ej., *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (10). La complejidad de las relaciones entre razas patogénicas y VCGs en *F. oxysporum* es coherente con el concepto de que la estructura clonal en una *forma specialis* de este complejo de especies puede ser de origen monofilético o, en su mayoría, polifilético. La interpretación más simple del origen monofilético de una *forma specialis* en *F. oxysporum* es que la adquisición de patogenicidad sobre su huésped específico debe haberse originado a partir de una pequeña población fundadora de miembros parásitos pero no patogénicos de la especie, y la subsiguiente variación en los fenotipos de virulencia debe proceder de la acumulación de mutaciones en el curso del tiempo que han tenido lugar en áreas de cultivo del huésped geográficamente aisladas (18,20). Por ello, se ha postulado que en una *forma specialis* monofilética de *F. oxysporum* las razas patogénicas que mantuvieran una estrecha relación filogenética derivarían una de otra, en un proceso secuencial de pasos discretos en la adquisición o pérdida de virulencia, en lugar de originarse de manera independiente (18).

Estudios sobre la filogenia de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* han hecho posible contrastar esta hipótesis y demostrar por vez primera que las razas de este patógeno han evolucionado siguiendo el proceso secuencial y discreto de adquisición o pérdida de virulencia antes referido (20). Para tal fin, la patogenicidad cultivar-específica de las razas del hongo sobre cada una de las líneas diferenciadoras raciales se superpuso sobre el árbol filogenético inferido de los linajes clonales raciales, a fin de minimizar el número de cambios necesarios y de inferir 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. El primer escenario de dicho supuesto 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 0, la menos virulenta y causante de Amarillez, y a partir de dicha raza habrían evolucionado posteriormente las razas más virulentas causantes de Marchitez, en un proceso secuencial y discreto a partir de una segunda raza primigenia desconocida. Comparativamente, el segundo escenario inferido en el estudio es más simple que el anterior, de manera que 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.

#### **4. Diversidad genética en las poblaciones de agentes microbianos útiles para el control biológico de enfermedades de las plantas**

La aplicación sobre las plantas de microorganismos no patogénicos es una de las estrategias más deseadas para el control ambientalmente respetuoso de enfermedades de plantas, no sólo por su valor intrínseco sino también por la acción complementaria que pueden tener sobre otras medidas de control (9). Gran parte de los avances sobre el control biológico de enfermedades durante las últimas décadas derivan de investigaciones desarrolladas para desvelar los mecanismos que operan en los denominados **suelos**

**supresivos** (i.e., *suelos naturales en los que la enfermedad se desarrolla en escasa extensión aunque en ellos exista inóculo abundante del patógeno y las condiciones ambientales sean favorables para su desarrollo*). En algunos de estos suelos, la capacidad de suprimir la enfermedad resulta de la acción de comunidades concretas de microorganismos antagonistas del patógeno, que son estimuladas y favorecidas por las plantas entre la miríada de microbiota que residen en el suelo como consecuencia de capacidades que ellas han desarrollado durante su evolución (8,28,29). Además, dichas comunidades se han adaptado ecológicamente para sobrevivir en la espermosfera y rizosfera vegetal, de manera que al colonizarlas de forma efectiva sus poblaciones alcanzan densidades suficientemente altas y metabólicamente activas en el tiempo para controlar al patógeno diana y proteger los loci de tejidos subterráneos de la planta susceptible de la invasión por el patógeno.

Entre la microbiota edáfica, los grupos potencialmente más importantes como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos del suelo son las rizobacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (52), porque su capacidad de superar en número y cantidad a cualquier otro organismo del suelo, de utilizar diferentes formas de nutrientes bajo condiciones diversas, y de multiplicarse con rapidez en respuesta a la disponibilidad de dichos nutrientes, las hace competidoras muy eficaces en los nichos vegetales subterráneos. Numerosos estudios han demostrado que en la supresión de enfermedades causadas por hongos de suelo por rizobacterias intervienen varios mecanismos de acción no mutuamente excluyentes: (i) la competición por C y N como nutrientes limitantes o señales químicas, por Fe<sup>3+</sup>, por loci favorables ricos en nutrientes, o por zonas de infección; (ii) la inhibición directa del patógeno por la acción de sustancias de naturaleza antimicrobiana (antibióticos, HCN, sideróforos, etc.); y (iii) la inducción de resistencia sistémica. Uno de los avances más significativos en las investigaciones sobre los mecanismos de control biológico de enfermedades de plantas mediante rizobacterias, ha sido la demostración inequívoca de que las *Pseudomonas* spp. productoras del antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI) son determinante primario de la supresividad inducible en ciertos suelos naturales contra el Mal del pie del trigo (causada por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) (53). La identificación y secuenciación de los genes implicados en la regulación y síntesis del 2,4-diacetilfloroglucinol, junto con la utilización de diversas técnicas moleculares, han llevado a constatar que en las poblaciones naturales de *Pseudomonas* PhI+ existe gran diversidad genética (12,28,29); y más importante aún, que dicha diversidad parece estar ligada a características que condicionan significativamente la eficacia de biocontrol que puede alcanzarse con ellas, como son fundamentalmente la supervivencia, la colonización rizosférica, y la interacción con poblaciones naturales de otros microorganismos en la rizosfera (12,28,29,36,43).

La importancia de identificar y comprender la diversidad genotípica existente en las poblaciones naturales de estas rizobacterias en los suelos de todo el mundo reside en una serie de hechos fundamentales: (i) distintos genotipos son enriquecidos (seleccionados) de forma diferencial durante el monocultivo de ciertas especies vegetales; (ii) los genotipos difieren en competencia rizosférica en un cultivo determinado; y (iii) la especie cultivada modula las interacciones y la competencia entre distintos genotipos. En el primero de los casos, aunque en un mismo suelo pueden coexistir varios genotipos de *Pseudomonas* PhI+, solamente algunos de ellos llegan a ser predominantes en él porque el monocultivo de una especie vegetal ejerce una presión diferencial que favorece el incremento de sólo los genotipos mejor adaptados a colonizar la rizosfera del cultivo en cuestión (27,28). El segundo de los hechos es resaltado porque hace posible la identificación de ciertos genotipos de *Pseudomonas* PhI+ que poseen una inusual y excepcional competencia rizosférica en varios cultivos (ej., el genotipo D en trigo, guisante y lino), mientras que lo más común es que ciertos genotipos de dichas rizobacterias parecen estar adaptados para colonizar exclusivamente cultivos determinados (ej., los genotipos F y J/lino, y el genotipo P/guisante) (27,29,43).



## 5. Conclusiones

El desarrollo de enfermedades en plantas es resultado de interacciones entre poblaciones de éstas con las del agente causal y comunidades microbianas asociadas con aquéllas o con el suelo donde se cultivan. En tal escenario, la aplicación de los avances en biología molecular a la investigación fitopatológica está promoviendo el estudio de la biología de poblaciones de los patógenos y de ecología microbiana hasta ahora dificultados en gran medida por la falta de metodologías adecuadas, y al mismo tiempo, contribuyendo a reevaluar algunos paradigmas etiológicos y de interacciones microbianas con plantas. Así, la unicidad etiológica conferida a taxones determinados está siendo reemplazada por la identificación de componentes crípticos en las poblaciones de ellos con capacidades patogénicas características. Asimismo, el estudio de la estructura genética de las poblaciones de los patógenos mediante metodologías de biología molecular, permite realizar inferencias sobre el potencial evolutivo de nuevas virulencias y optimizar la utilización de genes de resistencia al patógeno en el control de enfermedades. Similarmente, el análisis molecular de las comunidades bacterianas asociadas con las plantas ha revelado el papel de éstas en la configuración de la estructura de sus poblaciones y la posibilidad de seleccionar genotipos microbianos específicos eficientes para el control de enfermedades. No obstante, no es de descartar que en un futuro próximo la investigación en ecología microbiana mediante metodologías moleculares contribuya a reemplazar otros paradigmas fitopatológicos, y pueda revelar que en plantas, como ha sido recientemente demostrado en insectos, las comunidades microbianas asociadas con ellas pueden no sólo contribuir a su supresión sino ser, alternativamente, promotoras de enfermedad.

## 6. Referencias bibliográficas

1. Ainsworth, G.C. 1981. *Introduction to the History of Plant Pathology*. Cambridge Univ. Press. Londres, Reino Unido.
2. Anagnostakis, S.L. 1987. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79: 23-37.
3. Anagnostakis, S.L. 1988. *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. *Advances in Plant Pathol.* 6: 123-136.
4. Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.I.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroek, E.J.A., y Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90: 891-900.
5. Carefoot, G.L. y Sprott, E.R. 1967. *Famine on the Wind*. Rand McNally & Co. Chicago, EEUU.
6. 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.
7. 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.
8. Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Banger, G., y Kim, D.S. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4197-4201.

9. Cook, R.J. 1993a. Alternative disease management strategies. Pgs. 129-134 en: D.R. Buxton, R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen, y R.F. Wilson (eds.). International Crop Science I. Crop Science Society of America. Madison, EEUU.
10. Correll, J.C. 1991. The relationship between *formae speciales*, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81: 1061-1063.
11. De la Fuente L., Landa B. B., y Weller D. M. 2006a. Host crop affects rhizosphere colonization and competitiveness of 2,4-diacetyl-phloroglucinol producing *Pseudomonas* spp. Phytopathology 96: 751-762.
12. De la Fuente, L., Mavrodi D. V., Landa B. B., Thomashow L. S., y Weller D. M. 2006b. *phlD*-based genetic diversity and detection of genotypes of 2,4-diacetyl-phloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol. Ecol. 56: 64-78.
13. Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Pryor, A., y Ellis, G. 2000. Genetic analysis and evolution of plant disease resistance genes. Pgs. 88-107 en: M. Dickinson y J. Beynon (eds.). *Molecular Plant Pathology*. Annual Reviews Vol. 4. Sheffield Academic Press Ltd. Sheffield, Reino Unido.
14. Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9: 275-296.
15. Fry, W.E., y Goodwin, S.B. 1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. Plant Dis. 81: 1349-1357.
16. Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K, y Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling network. Current Opinion in Plant Biology 9: 436-442.
17. Glass N.L., Jacobson, D.J., y Shiu, P.K.T. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. Annu. Rev. Genet. 34: 165-186.
18. Gordon, T.R., y Martyn, R.D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 111-128.
19. Jiménez-Díaz, R.M., Mercado-Blanco, J., OlivaresGarcía, 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.
20. Jiménez-Gasco, M.M., Milgroom, M.G., y Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Stepwise evolution in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. Phytopathology 94: 228-235.
21. Jiménez-Gasco, M.M., Pérez-Artés, E., y Jiménez-Díaz, R.M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). Eur. J. Plant Pathol 107: 237-248.
22. Jiménez-Gasco, M.M., y Jiménez-Díaz, R.M. 2003. Development of a specific 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.
23. Jones, D.A. 2000. Resistance genes and resistance proteins. Pgs. 108-143 en: M. Dickinson y J. Beynon (eds.). *Molecular Plant Pathology*. Annual Reviews Vol. 4. Sheffield Academic Press Ltd. Sheffield, Reino Unido.

24. Katan, T. 2000. Vegetative compatibility in populations of *Verticillium*- an overview. Pgs. 77-94 en: E.C. Tjamos, R.C. Rowe, J.B. Heale, y D. Fravel (eds.). *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. APS Press. St. Paul, MN, EE UU.
25. Kistler, H.C. 2001. Evolution of host specificity in *Fusarium oxysporum*. Pgs 70-82 en: B.A Summerell, J.F. Leslie, D Beckhouse, W.L. Bryden, y L.W. Burgess (eds.). *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press. St Paul, MN, EE.UU.
- 26 Korolev, N., Katan, J, y Katan, T. 2000. Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology* 90: 529-536.
- 27 Landa, B. B., Mavrodi, D. V., Thomashow, L. S., y Weller, D. M. 2003. Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 93: 982-994.
28. Landa, B. B., Mavrodi, O. V., Raaijmakers, J. M., McSpadden-Gardener, B. B., Thomashow, L. S., y Weller, D. M. 2002. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3226-3237.
29. Landa, B. B., Mavrodi, O. V., Schroeder, K. L., Allende-Molar, R., y Weller, D. M. 2006. Enrichment and genotypic diversity of *phlD*-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 351-368.
30. Large, E.C. 1940. *The Advance of the Fungi*. Jonathan Cape. Londres, Reino Unido.
31. Leslie, J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127-150.
32. Leslie, J.F. 1996. Fungal vegetative compatibility-promises and prospects. *Phytoparasitica* 24: 3-6.
33. Lievens, B., Rep, M, y Thomma, P.H.J. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Manag. Sci.* DOI:10.1002/ps.1564.
34. MacDonald, B.A., y Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.
35. MacMullen, M.P., Jones, R., y Gallenberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81: 1340-1348.
36. Mavrodi, D. V., Mavrodi, O. V., McSpadden-Gardener, B. B., Landa, B. B., Weller, D. M., y Thomashow, L. S. 2002. Identification of differences in genome content among *phlD*-positive *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5170-5176.
37. McDowell, J.M. y Simon, S.A. 2006. Recent insights into *R* gene evolution. *Mol. Plant Pathol.* 7: 437-448.
38. Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Parrilla-Araujo, S., y Jiménez-Díaz, R.M. 2003. 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.
39. O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., y Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between 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.

40. O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., y Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2044-2049.
41. Oerke, E.-C., Weber, A., Dehne, H.-W., y Schönbeck, F. 1994. Conclusions and perspectives. Pgs. 742-770 en: E.-C. Oerke, H.-W. Dehne, F. Schönbeck, y A. Weber, (eds.). *Crop Production and Crop Protection*. Elsevier. Amsterdam, Holanda.
42. Oerke, E.-C., y Dehne, H.-W. 2004. Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.* 23: 275-285.
43. Okubara, P. A., Kornoely, J. P., y Landa, B. B. 2004. Rhizosphere colonization of hexaploid wheat by *Pseudomonas fluorescens* strains Q8r1-96 and Q2-87 is cultivar-variable and associated with changes in gross root morphology. *Biol. Control* 30: 392-403.
44. Peres, N.A., MacKenzie, S.J., Prever, T.L., y Timmer, L.W. 2008. Postbloom fruit drop of citrus and Key lime are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 98: 345-352.
45. Pinstrup-Andersen, P. 2001. The future world food situation and the role of plant diseases. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0425-01.
46. Ploetz, R.C (ed.). 1990. *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press. St. Paul. MN, EEUU.
47. Rowe, R.C. 1995. Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups. *Phytoparasitica* 23: 31-38.
48. Schumann, G.L. 1991. *Plant Diseases: Their Biology and Social Impact*. APS Press. St. Paul. MN, EEUU.
49. Talbot, N.J. 2004. Emerging themes in plant-pathogen interactions. Pgs. 1-26 en: N.J. Talbot (ed.). *Plant-Pathogens Interactions*. Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido.
50. 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.
51. Ullstrup, A. 1972. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10: 37-50.
52. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-417.
53. Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden-Gardener B. B., y Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 309-348.