

Capítulo 8

Aplicaciones de metodologías moleculares y biotecnológicas en la investigación sobre las enfermedades de cultivos en la Agricultura Sostenible

Jiménez Díaz RM^{1,2}, Castillo Castillo, P², Jiménez Gasco MM³, Montes Borrego M², Navas Cortés JA², Olivares García C¹, Palomares Rius JE², Landa del Castillo B B²

¹Dep. Agronomía, Campus de Rabanales, Edificio C4 'Celestino Mutis', Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba;
²Dep. Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apartado 4084, 14080 Córdoba, ³Dep. Plant Pathology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA. Tel: 95 499221; Fax: 957499252; ¹CE: <ag1jdir@uco.es>

RESUMEN

Las enfermedades son un componente de significación en la producción agrícola actual porque pueden reducir el rendimiento potencial o causar devastación en los cultivos de plantas; y la extensión y severidad de sus ataques va unida a los cambios que se están produciendo en los sistemas de manejo que dan lugar a mejoras en el rendimiento o modificaciones en los ambientes de producción. El control eficiente de las enfermedades requiere necesariamente la determinación exacta, rápida e informativa de su etiología, incluyendo la evaluación de la historia y potencial evolutivo en las poblaciones del agente causal, así como de la composición y diversidad de la microbiota beneficiosa asociada con el crecimiento vegetal, que hagan posible la aplicación eficiente de las acciones de prevención en que se fundamenta el manejo sostenible de dichas enfermedades. Las tecnologías de base molecular y biotecnológica ofrecen una excelente oportunidad para mejorar nuestras capacidades para satisfacer dichos requisitos. En este trabajo se ilustran tales oportunidades utilizando como ejemplo los resultados alcanzados por el Grupo AGR136 'Sanidad Vegetal' durante el desarrollo de programa de investigación llevados a cabo sobre enfermedades importantes en la agricultura andaluza.

Palabras clave: análisis filogenéticos, AFLPs, antagonismo microbiano, VCG, QRT-PCR, concordancia de genealogías génicas, *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne* spp., PGPR, *Peronospora* spp., *Pratylenchus* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium* spp.

Introducción

Las enfermedades de las plantas son consecuencia de procesos interactivos complejos entre un agente causal primario (el patógeno) y una planta susceptible en el marco de un ambiente adecuado; y a la vez componentes importantes de la producción agrícola porque tienen el potencial de reducir significativamente el rendimiento alcanzable de los cultivos, en una magnitud que es determinada por su naturaleza y etiología así como por la fisiología y ecología de estos últimos. En uno de los estudios más completos y concienzudos de los realizados hasta ahora sobre pérdidas causadas por enfermedades en los cultivos, un grupo de investigadores de la Universidad de Bonn ha estimado que las pérdidas originadas globalmente por enfermedades en los ocho cultivos más relevantes para la alimentación y la industria, que en conjunto ocupan la mitad de la superficie cultivada en el mundo, alcanzaron durante 1988-1990 una reducción media anual del 12,4% de la cosecha alcanzable y del 13,3 % del valor monetario de ésta. Diez años más tarde, los mismos investigadores concluyeron que la pérdida media anual de cosecha causada por enfermedades en los mismos cultivos ascendió al 12,6% de la cosecha alcanzable durante el periodo 1996-1998.

El Grupo AGR136 "Sanidad Vegetal" está comprometido con el desarrollo de innovaciones en el conocimiento y

tecnologías sobre estrategias y medidas de lucha eficientes para el control de enfermedades de cultivos importantes para la agricultura andaluza.

Durante los últimos 10 años, el Grupo AGR136 ha centrado sus programas de investigación en enfermedades de adormidera, alcachofa, algodón, garbanzo, olivo, remolacha azucarera y vid que son causadas por hongos, nematodos y oomicetos que residen en el suelo e infectan tejidos subterráneos de la planta reduciendo su eficiencia en la absorción de agua y nutrientes. Ejemplos de ellas son: mildiu de la adormidera (causado por *Peronospora arborescens*); verticilosis de alcachofa, algodón y olivo (*Verticillium dahliae*); fusariosis vascular del garbanzo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*); podredumbre blanca de la remolacha azucarera (*Sclerotium rolfsii*); lepra de la remolacha azucarera (*Physoderma leproides*); nematodos lesionadores de raíces de garbanzo y olivo (*Pratylenchus* spp.); nematodos noduladores de raíces de garbanzo, olivo y vid (*Meloidogyne* spp.); y Nematodos del tallo y bulbos de ajos y remolacha azucarera (*Ditylenchus dipsaci*).

Los programas de investigación del Grupo se plantean en el escenario de la Agricultura Sostenible y se asientan sobre las bases para el manejo integrado de enfermedades (IPM), que incluye fundamentalmente: (i) la identificación y caracterización precisa del agente

causal y de sus variantes patogénicas; (ii) la utilización eficiente de cultivares resistentes al patógeno; (iii) la utilización de material vegetal de siembra y plantación certificado libre de infección; y (iv) la protección de dicho material mediante agentes de control biológico. Como consecuencia de ello, los objetivos generales de nuestros programas de investigación son: (i) la caracterización molecular del patógeno y sus fenotipos de virulencia; (ii) la caracterización de la estructura genética y filogenia de las poblaciones de los patógenos y microbiota nativas de biocontrol; (iii) la detección y cuantificación del patógeno y sus fenotipos de virulencia *in planta* y suelo; y (iv) la identificación y aplicación de agentes microbianos para el control biológico de las enfermedades. Las tecnologías de base molecular o biotecnológica que empleamos para la consecución de estos objetivos incluyen: a) la tipificación de los hongos fitopatógenos en Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG); b) el desarrollo de marcadores moleculares diagnósticos basados en la PCR; y c) análisis de AFLPs, hibridación de ADN con sondas de secuencias repetitivas, microsatélites, RAPDs, QRT-PCR, rep-PCR, SNPs, análisis filogenéticos de secuencias génicas y concordancia de genealogías génicas, etc.

Caracterización molecular del patógeno y de sus fenotipos de virulencia

Una de las contribuciones más notables de las tecnologías de base molecular al estudio de la etiología de enfermedades en plantas concierne la capacidad que proporcionan de diferenciar especies filogenéticas (i.e., crípticas) dentro de especies morfológicas de los agentes fitopatógenos, especialmente cuando se pueden establecer correlaciones entre propiedades biológicas de relevancia fitopatológica con la naturaleza molecular del taxón en estudio. Un ejemplo de ello son los resultados de nuestro reciente estudio acerca de la etiología del mildiu de la adormidera en España, en el que el uso de iniciadores especie-específicos en ensayos PCR ha permitido diferenciar dos especies de oomicetos, *Peronospora arborescens* y *P. cristata*, que solapan en características morfológicas de uso taxonómico y son referidas como agentes de la enfermedad en diversos países, para las que nuestros resultados demuestran que son filogenéticamente diferentes. En correspondencia con resultados de otros estudios de oomicetos fitopatógenos, la distinción filogenética de ambas especies abre la posibilidad de que sus poblaciones difieran en fenotipos de virulencia sobre adormidera resistente o en sensibilidad a materias activas fungicidas de utilidad en el control de la enfermedad, entre otras características.

Otro ejemplo de ganancia neta en investigaciones etiológicas proporcionada por abordajes de base molecular es ilustrado por el éxito en el desarrollo de un protocolo de ensayo PCR específica mediante el cual se puede diagnosticar en horas y sin ambigüedad la infección de garbanzo por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Sin el concurso de dicha tecnología, el diagnóstico de la fusariosis vascular del garbanzo requería que, tras el aislamiento del supuesto agente de la planta enferma en cultivo puro, se llevaran a cabo inoculaciones

experimentales del huésped costosas en tiempo y recursos. Este nuevo proceso diagnóstico es especialmente relevante si la *forma specialis ciceris* es monofilética, puesto que la existencia de polifilia en ella cuestionaría la validez de dicho concepto fitopatogénico basado exclusivamente en la especificidad de las relaciones planta-patógeno.

Las ventajas que proporciona el diagnóstico etiológico de base molecular trascienden la factibilidad y rapidez con que puede ser llevado a cabo, porque también hace posible el análisis en extenso de la estructura de virulencia que existe en las poblaciones naturales de los agentes fitopatógenos, si se dispone de marcadores moleculares específicos de los diversos fenotipos de virulencia (i.e., patotipos y razas patogénicas) de ellos. El conocimiento a priori de dicha estructura hace posible optimizar la toma de decisiones en la elección de genotipos de la planta huésped resistentes a las razas y patotipos del patógeno diana predominantes en un área de cultivo. En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, las investigaciones en el Grupo AGR136 dieron lugar al desarrollo de protocolos PCR-específica con los que se identifican sin ambigüedad las razas 0, 1A, 5 y 6 del patógeno. La disponibilidad de esta tecnología diagnóstica raza-específica ha permitido determinar la distribución de dichas razas en la Cuenca Mediterránea y California utilizando un elevado número de aislados recolectados por los autores o proporcionados por laboratorios colaboradores, cuyo manejo habría sido impracticable mediante bioensayos convencionales de patogenicidad cultivar-específica realizados en condiciones controladas.

Similarmente, en nuestro programa de investigación sobre la epidemiología y control de la Verticilosis del algodón y olivo hemos desarrollado protocolos PCR-específica con los que es posible diferenciar la naturaleza defoliante (D) o no-defoliante (ND) de los aislados de *V. dahliae*. Posteriormente, el proceso diagnóstico de dichos patotipos fue mejorado mediante el diseño de protocolos de PCR mutiplexada, en el que una tripleta de iniciadores hace posible confirmar simultáneamente el taxón *V. dahliae* e identificar el patotipo de los aislados en un solo ensayo; así como de iniciadores internos en las secuencias de los amplicones producidos por los primeros protocolos que son útiles para ensayos de PCR anidada ("nested"). La disponibilidad de esta tecnología diagnóstica patotipo-específica ha permitido demostrar la extensa distribución del patotipo D altamente virulento en las zonas olivareras de Andalucía; así como monitorizar en el tiempo la distribución espacial del patotipos D en un olivar intensivo, según un proceso contagioso originado por la dispersión de hojas infectadas caídas de árboles enfermos.

Estructura genética y relaciones filogenéticas en poblaciones de agentes fitopatógenos

La utilización eficiente y durable de cultivares resistentes a agentes fitopatógenos es comprometida por la historia y potencial evolutivo de ellos, a su vez indicada por la estructura genética de sus poblaciones. Las

investigaciones del Grupo AGR136 sobre estos aspectos se han centrado en *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y *V. dahliae*, dos hongos de reproducción estrictamente asexual en los que la variación genética es consecuencia fundamentalmente de la acumulación secuencial de mutaciones. Análisis de concordancia de genealogías en intrones de genes altamente conservados en los genomas fúngicos, utilizando una muestra de aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* representativa de la diversidad geográfica y patogénica de sus poblaciones, indica que esta *forma specialis* es monofilética. Además, un subsiguiente análisis filogenético de los patrones de hibridación del ADN de dichos aislados con secuencias repetitivas de ADN del hongo, ha indicado que cada una de las ocho razas del patógeno identificadas hasta ahora (designadas razas 0, 1A, B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) constituye un linaje monofilético. Finalmente, la superposición de la virulencia de cada raza sobre cultivares diferenciadores resistentes en la filogenia inferida, según una estrategia que minimiza el número de cambios necesario para ello, sugiere que dicha virulencia ha sido adquirida siguiendo un patrón secuencial de ganancias y pérdidas discretas a partir de razas antepasadas conocidas actualmente o ya extintas.

Para estudiar la estructura genética de las poblaciones de *V. dahliae* hemos combinando el análisis de la estructura de éstas en VCG con el de la diversidad molecular de dichas agrupaciones genéticas. Un VCG se compone de aislados de una especie fúngica que pueden formar heterocariontes estables mediante anastomosis hifal entre sí pero no con miembros de otros VCG. Esta capacidad es determinada por la homocigosis alélica entre aislados compatibles en cada uno de un número de genes independientes que varía de 8 a 12 según las especies fúngicas; y en hongos cuya reproducción es estrictamente asexual, los miembros de VCG diferentes están genéticamente aislados entre sí. La compatibilidad vegetativa (o somática) se puede estudiar mediante la demostración *in vitro* de crecimiento prototrófico, a partir de mutantes espontáneos auxotróficos sobre la utilización de Nitrato que crecen enfrentados en un medio mínimo que contiene Nitrato como única fuente de nitrógeno.

Un estudio de 109 aislados de *V. dahliae* obtenidos de alcachofa en la Comunidad Valenciana indicó que entre ellos predomina el VCG2B (69%) seguido del VCG2A (29%); y otro estudio sobre alrededor de 700 aislados de olivo de olivo en Andalucía demostró que el 80% de ellos es del VCG1A. En ambos casos, la asignación a VCG de un aislado se puede correlacionar con sus propiedades biológicas, ya que los del VCG2B son los más virulentos sobre alcachofa y los del VCG1A son defoliantes sobre olivo. Posteriormente, el análisis AFLP de un total 210 aislados del hongo obtenidos de alcachofa, algodón y olivo de diferentes países en la Cuenca Mediterránea, California y China, que fueron clasificados en los VCG1A, VCG1B, VCG2A, VCG2B y VCG4B, demostró que los aislados de un subgrupo de VCG son molecularmente similares entre sí, hasta el punto de que la agrupación de ellos por similitud molecular está correlacionada con su asignación a VCG. Dichos subgrupos de VCG variaron en diversidad molecular, siendo la variabilidad mayor en los

VCG2B y VCG2A. Un análisis filogenético de los AFLPs y de las secuencias de seis genes conservados, individualmente o de forma combinada, indicó que los VCG constituyen tres linajes clonales y que todos los VCG son monofiléticos, excepto el VCG2B que es polifilético.

La secuenciación de genes del ADN ribosómico incluyendo las regiones 18S, ITS y D2-D3 del 28S en poblaciones de determinados nematodos fitoparásitos, y el establecimiento de relaciones filogenéticas con otras especies próximas de ellos, ha hecho posible la identificación precisa de especies de nematodos no descritas en Europa en cultivos de gran interés agronómico (ej., *Meloidogyne arenaria* vs lechuga, *Meloidogyne javanica* vs patata, *Ditylenchus dipsaci* vs remolacha), así como la descripción de nuevas especies (ej., *Dolichodorus mediterraneus* sp. n., *Meloidogyne dunensis* sp. n., *Paralongidorus litoralis* sp. n.).

Detección del patógeno y sus fenotipos de virulencia *in planta* para la certificación del material vegetal libre de infección

El uso de los iniciadores especie-específicos diseñados para la identificación de *P. arborescens*, y de un protocolo de extracción de ADN total de calidad PCR de diversos tejidos de la planta huésped, hizo posible poner a punto un procedimiento para la detección *in planta* del patógeno en raíces, hojas, tallo, cápsulas y semillas de adormidera. Mediante el uso de dicho procedimiento, fue posible demostrar la naturaleza sistémica de la infección de adormidera por *P. arborescens* en el desarrollo de mildiu y que el patógeno infecta las semillas producidas en plantas enfermas. Además, la utilización de semillas infectadas para siembra en suelo no infestado por el patógeno demostró que la infección de la semilla es efectiva en producir plántulas enfermas, y consecuentemente en producir inóculo secundario que puede ser diseminado por el viento y extender la enfermedad en un cultivo.

La detección temprana, rápida y consistente de la infección de plantas de olivo por los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) de *V. dahliae* es, entre otras, una acción clave para desarrollar con éxito una estrategia de control integrado de la Verticilosis del olivo, cuya aplicación para la certificación de material de plantación como libre del patógeno ayudaría a prevenir la utilización de material de olivo infectado.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un protocolo de análisis molecular basado en el uso de iniciadores PCR específicos de los patotipos D y ND y un protocolo de PCR anidada, que produce la amplificación simultánea de marcadores específicos de los patotipos D y ND. El procedimiento es efectivo en la detección rápida e inequívoca de los dos patotipos individual o conjuntamente, tanto en plantas de vivero inoculadas artificialmente como en árboles adultos infectados de forma natural procedentes de plantaciones comerciales. Asimismo, el procedimiento ha permitido constatar que en condiciones naturales se puede producir la coinfección de

una planta por los dos patotipos del patógeno, que fue posteriormente corroborada mediante inoculaciones artificiales.

Además, mediante el uso de la tecnología QRT-PCR hemos podido cuantificar la biomasa de *V. dahliae* en tejidos de olivo infectados y demostrado que la cantidad de ADN de *V. dahliae* presente en diferentes genotipos de olivo infectados está correlacionada en mayor medida con el nivel de susceptibilidad de los mismos al patógeno que con la virulencia del patotipo del hongo. Por otra parte, la cantidad de ADN del patógeno en tejidos infectados alcanzó su máximo antes de que los síntomas de la enfermedad alcanzaran su máxima expresión en genotipos susceptibles, siendo siempre menor la cantidad de ADN del patógeno en tallos que en raíces. Nuestros resultados demuestran que la técnica QRT-PCR es una excelente herramienta tanto para monitorizar la colonización de los tejidos de olivo por *V. dahliae*, como para evaluar la resistencia o tolerancia de genotipos de olivo a la Verticilosis, lo que sería de una inestimable ayuda en programas de mejora de resistencia a esta enfermedad.

Identificación y aplicación de agentes microbianos para el control de enfermedades

Uno de los retos más relevantes que afronta la Fitopatología en la actualidad concierne la demanda social de que el control de las enfermedades que afectan a los cultivos se realice mediante prácticas y tecnologías ambientalmente respetuosas. A tal fin, una de las estrategias de preferentes es la utilización de agentes microbianos, bien por sí solos (*control biológico*, *biocontrol*) o conjuntamente con otros medios de lucha (*control integrado*). El control biológico es definido como la reducción de la cantidad de inóculo de un agente fitopatógeno o de su capacidad de causar enfermedad mediante las actividades de uno o más organismos (excluido el hombre), incluyendo cultivares resistentes de la planta huésped. En términos generales, los resultados prácticos de la aplicación de agentes de biocontrol de enfermedades en los ambientes de producción agrícola adolecen de variabilidad e inconsistencia, que en gran parte resultan de la extensión en que la actividad de los agentes de biocontrol es influida por diversos factores, incluyendo las condiciones ambientales y los componentes de los patosistemas en que son aplicados.

Un componente importante de los programas de investigación del Grupo AGR136 es la identificación de agentes microbianos eficientes en el biocontrol de enfermedades de significación para la agricultura andaluza, y la valoración de los efectos que pueden tener los componentes etiológicos de los patosistemas de estudio sobre dicha eficiencia, como por ejemplo la densidad de inóculo del patógeno, la susceptibilidad de la planta huésped, o la temperatura en la que interaccionan patógeno-planta y agente de biocontrol.

Los resultados de nuestras investigaciones indicaron primeramente que aislados no patogénicos de *F. oxysporum* que habitan la rizosfera de garbanzo, son

eficientes en reducir la severidad de fusariosis vascular en los cvs. ICCV4 y PV61 cuando se aplican a la semilla de garbanzo en suelo infestado con 500 clamidosporas de la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* /g de suelo y condiciones óptimas para la enfermedad; pero dicha eficiencia es comprometida por densidades de inóculo del patógeno de 1000 clamidosporas /g de suelo o superiores.

Similarmente, en investigaciones subsiguientes identificamos aislados de *Pseudomonas fluorescens* de la rizosfera de garbanzo que, aún no siendo antagonistas del patógeno in vitro resultaron eficientes en el control de la fusariosis vascular en garbanzos "PV 61" mediante tratamientos conjuntos de semilla y suelo infestado con la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Sin embargo, el efecto de biocontrol sólo se alcanzó con densidades de inóculo iguales o inferiores a 250 clamidosporas del patógeno/g de suelo, y a temperaturas de 20 y 30°C que fueron subóptimas para el desarrollo de la enfermedad. En la misma línea, aislados de *P. fluorescens* de la rizosfera de olivo resultaron eficientes en la protección parcial del sistema radical de plantones de olivo "Picual" contra la infección por el patotipo D de *V. dahliae*, y la extensión de supresión de la enfermedad no estuvo correlacionada con la actividad antagonista de dichos aislados contra el patógeno in vitro. Los resultados de ambos estudios indican que la magnitud del biocontrol conferido por agentes microbianos puede ser variable (30-80%) y no necesariamente completa, e inciden sobre otros de los aspectos que contribuyen a las limitaciones prácticas del biocontrol, i.e., la presunción de que el antagonista contra el patógeno in vitro está necesariamente correlacionado con su eficiencia de biocontrol in vivo.

Los resultados anteriores sobre el biocontrol de la fusariosis vascular del garbanzo con aislados no patogénicos de *F. oxysporum* indicaron que, además de la densidad de inóculo del patógeno, también influye sobre la eficacia de biocontrol la naturaleza del cultivar de garbanzo. Así, el nivel de biocontrol fue mayor y más consistente en el cv. PV61 que en el cv. ICCV4, aunque ambos cultivares fueron igualmente susceptibles a la enfermedad y su espermosfera y rizosfera resultaron colonizados en similar extensión por el agente de biocontrol. Investigaciones posteriores utilizando otros agentes de biocontrol (i.e., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Trichoderma harzianum*) aplicados individual o conjuntamente a la semilla o a ésta y al suelo en condiciones favorables para el desarrollo de la fusariosis, confirmaron que la extensión de biocontrol de la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* depende del cultivar de garbanzo, y la eficiencia de biocontrol fue siempre mayor en "PV 61" que en "ICCV 4", independientemente del microorganismo aplicado y de la extensión en que éste colonizó la rizosfera de la planta.

Estudios sobre la naturaleza de la supresividad al mal del pie del trigo causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, inducible en ciertos suelos cultivados, han demostrado que en éstos existen aislados de *Pseudomonas* spp. capaces de producir el antibiótico

diacetilfluoroglucinol (PhID) que actúan como determinantes primarios de dicha supresividad, y que además están implicadas en la supresividad natural de otros suelos a enfermedades de etiología fúngica diversa. En dichos estudios se han desarrollado diferentes técnicas basadas en la PCR que facilitan la selección dirigida y específica de aislados de *Pseudomonas phID+*, así como su cuantificación tanto en el suelo como en la rizosfera de las plantas, que han resultado muy útiles para monitorizar las poblaciones de dichas bacterias y facilitar su aislamiento y posterior selección como agentes de biocontrol. Asimismo, la utilización de diversas técnicas moleculares (ej., RFLP, BOX-PCR, ARDRA, análisis filogenéticos del gen *phID* implicado en la síntesis de PhID, etc) ha demostrado que existe gran diversidad genética en las poblaciones naturales de estas bacterias en todo el mundo (más de 30 genotipos identificados hasta ahora), y constatado que dicha diversidad genética está correlacionada con distintas características implicadas en la eficacia de biocontrol (ej., supervivencia, colonización rizosférica, interacción con microbiota nativa de la rizosfera, y cierta especificidad de plantas huésped).

Perspectivas futuras

En el programa de investigación que desarrolla en la actualidad el Grupo AGR136 se incluyen líneas de trabajo fruto de colaboraciones en curso con los Grupos de investigación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba que lideran los Profs. M. Tena Aldave y J. Muñoz Blanco, que incluyen abordajes de genómica funcional en las interacciones entre los patotipos D y ND de *V. dahliae* y clones de olivo y acebuches; y de proteómica en las interacciones entre cultivares de garbanzo y *Meloidogyne artiellia* (el nematodo nodulador de cereales y leguminosas), o razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Los objetivos de dichas líneas son avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en los procesos de patogénesis y resistencia en los sistemas modelos de estudio.

Agradecimientos

Las investigaciones del Grupo AGR136 referidas en este trabajo fueron financiadas por proyectos de: Fundación Areces; Ministerio de Educación y Ciencia (AGR89-0533-CO2-01, AGF92-0910-CO2-01, AGF93-0740-CO2-01, AGF95-0985-CO2-01, OLI96-2131, AGF97-14791, FD97-0763-CO3-01, 1FD97-1322-CO4-02, AGL2000-1444-CO2-01, AGL 2003-00640, AGL 2004-01231, HF2004-0096, y AGL2005-00751); Unión Europea (AGRE-CT90-0051, ERB CT96-2015, y QLK5-CT1999-01523); y Junta de Andalucía (Grupo PAI AGR-136).

Referencias

- Castillo P, Landa BB, Navas-Cortés JA, Vovlas N, Jiménez-Díaz RM (2006): First report of *Meloidogyne arenaria* infecting lettuce in southern Spain. *Plant Dis* 90:975-975.
- Castillo P, Nico AI, Azcón-Aguilar C, Del Río Rincón C, Calvet C, Jiménez-Díaz RM (2006): Protection of olive planting stocks against parasitism of root-knot nematodes by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Pathol* 55: 705-713.
- Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-García C, Valverde-Corredor A, Jiménez-Díaz RM (2006): Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent AFLP and PCR markers. *Phytopathology* 96:485-495.
- Collins A, Mercado-Blanco J, Jiménez-Díaz RM, Olivares C, Clewes E, Barbara DJ (2005): Correlation of molecular markers and biological properties in *Verticillium dahliae* and the possible origins of some isolates. *Plant Pathol* 54: 549-557.
- De la Fuente L, Mavrodi DV, Landa BB, Thomashow LS, Weller DM (2006): *phID*-based genetic diversity and detection of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 64-78.
- De la Fuente L, Landa BB, Weller DM (2006): Host crop affects rhizosphere colonization and competitiveness of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 96, 751-762.
- Jiménez-Díaz RM, Olivares-García C, Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Giménez-Jaime A, García-Jiménez J, Armengol J (2006): Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. *Phytopathology* 96: 288-298.
- Jiménez-Gasco MM, Pérez-Artés E, Jiménez-Díaz RM (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.
- Jiménez-Gasco MM, Jiménez-Díaz RM (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 MM, Milgroom MG, Jiménez-Díaz RM (2002): Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Pathol* 51: 72-77.
- Jiménez-Gasco MM, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM (2004): *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* / *Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *Int. Microbiol.* 7: 95-104.
- Jiménez-Gasco MM, Milgroom MG, Jiménez-Díaz RM (2004): Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 94: 228-235.
- Jiménez Guirado D, Murillo-Navarro RM, Liébanas G, Landa BB, Castillo P (2007): Morphological and molecular characterisation of a new awl nematode, *Dolichodorus mediterraneus* sp. n. (Nematoda: Dolichodoridae), from Spain. *Nematology* 9:189-199.
- Korolev N, Pérez-Artés E, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Katan, J, Katan, T, Jiménez-Díaz RM (2001): Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae*

- from cotton in Spain and Israel Eur J Plant Pathol 107: 443-456.
- Landa BB, Montes-Borrego M, Muñoz-Ledesma FJ, Jiménez-Díaz RM (2007): Phylogenetic analysis of downy mildew pathogens of opium poppy and PCR-based in-plant and seed detection of *Peronospora arborescens*. Phytopathology 97:1380-1390.
- Landa BB., Navas-Cortés JA, Hervás A, Jiménez-Díaz RM (2001): Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria Phytopathology 91: 807-816.
- Landa BB, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM (2004) Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control Phytopathology 94: 946-960.
- Landa BB, Mavrodi OV, Raaijmakers JM, McSpadden-Gardener, BB, Thomashow LS, Weller DM (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.
- Landa BB, De Werd HAE, McSpadden-Gardener BB, Weller DM (2002) Comparison of three methods for monitoring populations of different genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere Phytopathology 92: 129-137.
- Landa BB, Mavrodi DV, Thomashow LS, Weller DM (2003) Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. Phytopathology 93, 982-994.
- Landa BB, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM (2004) Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of Fusarium wilt of chickpea. Plant Pathol 53: 341-352.
- Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, Allende-Molar R, Weller DM (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.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Pérez-Artés E, Jiménez-Díaz, RM (2002): Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. Eur J Plant Pathol 108: 1-13.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Pérez-Artés E, Jiménez-Díaz RM (2001): Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. Plant Pathol 50: 609-619.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Parrilla-Araujo S, Jiménez-Díaz RM (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.
- Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Parrilla-Araujo S, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM (2003): Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. Physiol Mol Plant Pathol 63: 91-105.
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Hervás A, Jiménez-Díaz RM (2004): Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. Biol Control 30: 474-486.
- Navas-Cortés J, Landa BB, Mercado-Blanco J, Trapero-Casas JL, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz, RM (2008): Spatio-temporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree-density olive orchard in Southern Spain. Phytopathology 98: 167-180.
- Palomares Rius JE, Vovlas N, Troccoli A, Liébanas G, Landa BB, Castillo P (2007): A new root-knot nematode parasitizing sea rocket from Spanish Mediterranean coastal dunes: *Meloidogyne dunensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae). J Nematol 39:190-192.
- Palomares Rius JE, Subbotin SA, Vovlas N, Landa BB, Castillo P (2007): Description and molecular characterisation of *Paralongidorus litoralis* sp. n. and *P. paramaximus* Heyns, 1965 (Nematoda: Longidoridae) from Spain. Nematology 10: 87-110.
- Pérez-Artés E, Mercado-Blanco J, Ruz-Carrillo AR, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM (2005): Detection of the defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in artificial and natural soils by nested PCR. Plant Soil 268: 349-356.
- Vovlas, N, Landa, BB, Liébanas, G, Handoo, ZA, Subbotin SA, Castillo P (2006): The cystoid nematode *Meloidoderita kirjanovae* (Nemata: Sphaeronematidae) from Southern Italy. J Nematol 38:376-382.
- Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, De La Fuente L, Blouin-Bankhead S, Allende-Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DM, Thomashow LS (2007): Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in plant defense. Plant Biol 9:4-2.