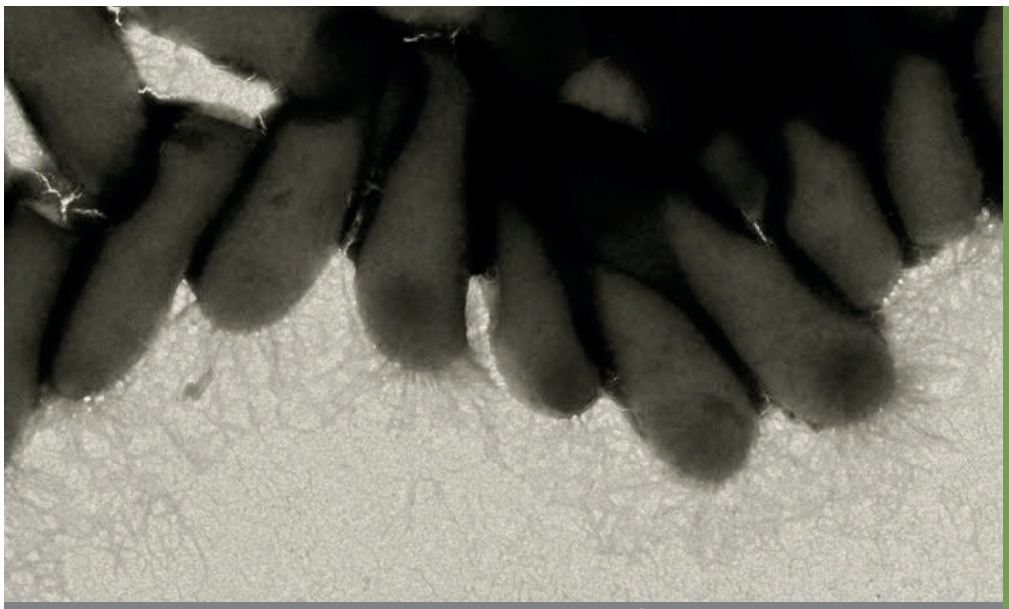

Foto al microscopio de barrido de células de *Xylella fastidiosa* (M. Román Écija).

Avances en el conocimiento sobre los organismos fitopatógenos y su repercusión en la Fitopatología en los últimos 35 años

Blanca B. Landa

Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Córdoba.

Mariano Cambra Álvarez

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Departamento de Virología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología (Profesor de Investigación jubilado).

Pablo Castillo

Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Córdoba.

Carolina Escobar Lucas

Departamento de Ciencias Ambientales, Facultad de CC. del Medio Ambiente y Bioquímica, Universidad de Castilla la Mancha, Toledo.

Fernando García-Arenal

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA/CSIC y Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid.

Rafael M. Jiménez Díaz

Catedrático de Patología Vegetal. Departamento de Agronomía. ETSIAM, Universidad de Córdoba (Catedrático emérito).

María Milagros López

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Departamento de Bacteriología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología (Profesora de Investigación jubilada).

Emilio Montesinos

Instituto de Tecnología Agroalimentaria, Centro de Innovación y Desarrollo en Sanidad Vegetal (CIDSAV), Universidad de Girona.

Jesús Murillo

Universidad Pública de Navarra, Edificio de Agrobiotecnología, Mutilva Baja, Navarra.

Vicente Pallás

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universitat Politècnica de València

Juan Emilio Palomares Rius

Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Córdoba.

Los pasados 35 años han sido testigos de importantes avances en el conocimiento sobre los organismos fitopatógenos, demasiado numerosos y diversos en naturaleza para poder resumirlos en unas páginas. Muchos de dichos avances han estado mediados por el desarrollo de nuevas metodologías, instrumentos y protocolos de estudio, en particular los concernientes a las tecnologías de análisis y secuenciación del ADN que comenzaron con su amplificación mediada por una ADN polimerasa termoestable (PCR) –y sus posteriores derivados: PCR cuantitativa, en tiempo real, digital, etc. Estos avances continuaron con el uso de las plataformas de secuenciación masiva para el análisis de los genomas de estos organismos, incluso a partir de la matriz vegetal que infectaban sin necesidad de su aislamiento, así como el uso de diversas tecnologías -ómicas para el análisis masivo de la expresión diferencial de genes (genómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica). Todo ello ha tenido profundas repercusiones, por ejemplo, sobre la taxonomía y relaciones filogenéticas de estos organismos fitopatógenos, la comprensión de la regulación genética de la patogenicidad y de los factores (efectores) de virulencia, la resistencia a la infección en la planta. Asimismo, las tecnologías de observación microscópica y el uso de genes que codifican proteínas fluorescentes de diferentes propiedades espectrales han propiciado una mejor compresión de los procesos de infección (Deal, 2011).

En las siguientes secciones del artículo se presentan algunos avances ilustrativos seleccionados por expertos para cada uno de los grandes grupos de organismos fitopatógenos: hongos, oomicetos, bacterias, virus y nematodos. Cabe decir que muchos de los avances presentados para cada organismo fitopatógeno son aplicables a todos los demás. Si bien, con objeto de no incurrir en reiteraciones, y extendernos en exceso, se ha intentado, en la medida de lo posible, seleccionar avances con aspectos diferenciadores.

/ Hay pocas materias activas específicas para el control de las bacteriosis, y solo los compuestos cúpricos y algunos bioplaguicidas microbianos o botánicos están autorizados en la UE /

Bacterias fitopatógenas

La importancia de las bacteriosis en la agricultura española —incluyendo bacterias con pared, fitoplasmas y espiroplasmas— se ha venido incrementando, tanto en el número de estos microorganismos descritos en España —77 especies y patovares (25 nuevas en los últimos 14 años), según la nueva edición del catálogo de Patógenos de Plantas descritos en España de la SEF (en preparación)—, como en las pérdidas que causan, fundamentalmente debidas a patógenos sometidos a erradicación, como *Erwinia amylovora* en frutales de pepita, *Ralstonia solanacearum* en patata y tomate, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en frutales de hueso y almendro, o *Xylella fastidiosa* en almendro, vid y plantas ornamentales y forestales. Su introducción se ha debido al incremento del comercio global, los insuficientes controles fitosanitarios en frontera, y la existencia de una certificación sanitaria ineficiente del material vegetal propagado en la UE (Jiménez-Díaz y López, 2019; Jiménez-Díaz y col., 2023). Para evitar algunas introducciones, la legislación sobre organismos nocivos se ha actualizado en la UE y en el Reglamento 2016/2031 (modificado por los Reglamentos 2019/1702 y 2021/2285), se establecen cuatro categorías de plagas reguladas. Entre las plagas cuarentenarias que la UE considera prioritarias, aparecen dos bacterias y un fitoplasma, bien porque no están presentes en la UE como '*Candidatus* Liberibacter spp.' (huanglongbing o *greening* de los cítricos) o, si lo están, porque su extensión es limitada, como '*Candidatus* Phytoplasma vitis' (flavescencia dorada de la vid) y *X. fastidiosa* (causante de la muerte súbita, seca y acorchado en varios centenares de huéspedes).

El conocimiento exacto de la etiología de las bacteriosis es fundamental para su manejo estratégico y sostenible en los ecosistemas agrarios. Sin embargo, el diagnóstico y la identificación están vinculados a la taxonomía bacteriana, en continua evolución, como demuestran los frecuentes cambios de nomenclatura en las últimas tres décadas (Parker y col., 2019). Las nuevas herramientas moleculares permiten el análisis de los orígenes de epidemias y de la diversidad, y la secuenciación posibilita también la identificación de patógenos en ausencia de características fenotípicas distintivas, así como su detección sin necesidad de aislamiento (Bull y Koike, 2015). Los análisis genómicos se están convirtiendo en la piedra angular de distintos estudios (Straub y col., 2021) y el del microbioma de plantas es cada vez más utilizado para identificación y diseño de estrategias innovadoras de control (Trivedi y col., 2020). El desarrollo y optimización de nuevas técnicas han favorecido los protocolos integrados de diagnóstico como los de la EPPO[1], o de la International Plant Protection Convention (IPPC) de la FAO[2]. Están validados y basados en la utilización complementaria de técnicas de aislamiento, serológicas, moleculares y de patogenicidad para un diagnóstico, detección e identificación precisos. Pero aún estamos lejos de conseguir métodos rápidos, de bajo coste y que permitan procesar números de muestras elevados y con gran fiabilidad.

Las bacterias son microorganismos simples y con un genoma haploide y pequeño, por lo que su fácil manipulación y la disponibilidad de patosistemas modelo han dado lugar a múltiples descubrimientos en Fitopatología, entre los que podemos destacar dos: la identificación y caracterización de las bases moleculares de la inmunidad vegetal (Jones y Dangl, 2006; Locci y col., 2023) y la capacidad de transformar eucariotas genéticamente (Hellens y col., 2000).

Los primeros genes de avirulencia (ahora, genes de efectores) se clonaron de las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris* antes del final de la década de 1980 y se confirmó la relación específica gen de avirulencia (*avr*)-gen de resistencia en bacterias (Lovelace y col., 2023). La identificación de genes avr con diversas actividades —inducción o supresión de la reacción de hipersensibilidad, participación en virulencia y patogenicidad—, desveló que la gama de huéspedes de las bacterias fitopatógenas podría estar determinada por la acción conjunta de estos genes. La inhibición de las respuestas de defensa por efectores bacterianos clarificó su papel en la patogénesis a la vez que permitió diseccionar las bases moleculares de la respuesta inmune de la planta. La clonación del primer gen de resistencia —el gen *Pto*, que reconoce el producto de *avrPto* de *P. syringae* pv. tomato— (Martin y col., 1993) supuso un importante salto cualitativo y ha conducido a una explosión de conocimientos sobre los mecanismos moleculares de la resistencia vegetal (Adachi y Kamoun, 2022).

La investigación acumulada sobre el plásmido tumorigénico de *Agrobacterium tumefaciens* y bacterias relacionadas, ha permitido la transformación

[1] https://gd.eppo.int
[2] https://www.ippc.int

genética rutinaria de plantas —mono y dicotiledóneas—, de levaduras y de hongos filamentosos, así como la infección de plantas con virus mediante agroinfección. Ello ha contribuido a un formidable avance de la investigación y a la posibilidad de generar organismos transgénicos de interés para la humanidad (Hooykaas, 2023).

Ambos avances están permitiendo la obtención de variedades de interés agrícola, aunque en parte debido a las restricciones sobre utilización de transgénicos, todavía no se han llegado a obtener las variedades resistentes que serían necesarias para lograr la gestión integrada de los principales patógenos bacterianos de cultivos estratégicos para nuestro país. Sin embargo, como se indica en la sección de virología, las nuevas técnicas de edición genética (p. ej. CRISPR Cas9) podrían contribuir a alcanzar este objetivo.

El conocimiento de la epidemiología de diversas bacteriosis ha permitido desarrollar modelos de predicción del riesgo de infección en función de datos agroclimáticos (González-Domínguez y col., 2023). Así, se han validado modelos clásicos y nuevos, como los de fuego bacteriano, chancro bacteriano del kiwi, o bacteriosis del almendro y melocotonero. Varios modelos están ya disponibles en estaciones de avisos y se aplican para la ubicación temporal de los tratamientos con fitosanitarios, pero también para estudios epidemiológicos, de vigilancia, o incluso para simular los efectos del cambio climático.

Hay pocas materias activas específicas para el control de las bacteriosis, y solo los compuestos cúpricos y algunos bioplaguicidas microbianos o botánicos están autorizados en la UE. En general, como su eficacia es moderada o baja, es necesario desarrollar nuevos productos fitosanitarios de acuerdo con la normativa vigente (Directiva 2009/108, Reglamento 2009/1702) y la política de reducción progresiva de los mismos en la UE. Lo cierto es que todavía no disponemos de métodos de control eficaces para la mayoría de las bacteriosis. El control biológico -mediante hongos y bacterias antagonistas, algunos autorizados en la UE- ha demostrado una eficacia limitada, aunque históricamente se ha implementado ya en el control de algunas bacteriosis como el fuego bacteriano (Köhl y Ravensberg, 2021). Lo contrario ocurre con el control biológico de los tumores causados por varias especies de *Agrobacterium* y de *Rhizobium*, y la muy efectiva -pero no autorizada en la UE- cepa K1026. Los avances prácticos han sido escasos en otras enfermedades, aunque actualmente se están haciendo esfuerzos en el desarrollo de consorcios microbianos, como son las denominadas comunidades sintéticas o 'SynComs'.

Síntomas de Verticilosis causados por *Verticillium dahliae* en olivo (J. A. Navas).

Hongos y oomicetos fitopatógenos

Las investigaciones moleculares y de otra índole realizadas durante los últimos 35 años han reubicado a los organismos llamados "hongos" en uno de los nuevos reinos Mycota (Fungi), Chromista (= Straminipila) o Protozoa. La aceptación generalizada del reconocimiento de taxones según el criterio de monofilia (clados) revelada por análisis filogenéticos multilocus, propició una clasificación filogenética de Mycota de amplio consenso que incluye órdenes y taxones de rango superior con un subreino y seis *phyla* (Hibbett y col., 2007), así como cambios en la clasificación de los organismos incluidos tradicionalmente en la Clase Oomycetes, que ahora constituyen el *phylum* Oomycota del Reino Chromista (Cavalier-Smith, 2018).

La posibilidad de amplificar y secuenciar genes culminó en el asentamiento del concepto de especie filogenética (Matute y Sepúlveda, 2019), basada en el análisis filogenético de las secuencias de varios genes codificadores de proteínas, conservados e independientes, y en la delimitación de las especies fúngicas mediante los abordajes denominados de concordancia genealógica (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*, GCPSR) y coalescencia *Coalescence-based Species Delimitation* (CBSD) (Matute y Sepúlveda, 2019). La identificación de especies filogenéticas mediante GCPRS ha constatado que muchas especies de Mycota (*v. gr.*, *Gibberella fujikuroi*, *G. zeae*, etc.) y Oomycota (*v. gr.*, *Bremia lactucae*, *Peronospora arborescens*, etc.) constituyen verdaderos complejos de especies (O'Donnell y col., 2004; Voglmayr, 2008). Desentrañar la composición de los complejos de morfoespecies en especies filogenéticas y determinar las propiedades biológicas y fitopatológicas que subyacen en ellas puede tener importantes repercusiones fitopatológicas. Además, el análisis GCPRS de morfoespecies ha contribuido a la identificación de numerosas especies crípticas. Por ejemplo, en el género *Verticillium*: (i) la morfoespecie *Verticillium albo-atrum* comprende las especies crípticas *V. alfalfae* y *V. nonalfalfae* -que difieren en patogenicidad-, y *V. albo-atrum s. str*. descrita originalmente infectando patata; y (ii) la morfoespecie *V. tricorpus* se ha dividido en las especies crípticas *V. isaacii*, *V. klebahnii* y *V. tricorpus s. str.*, de las que solo *V. tricorpus* es patógenico (Inderbitzin y Subbarao, 2014). La delimitación precisa de las

Romeo®
FUNGICIDA

¡Romeo, dame fuerzas, y la fortaleza me dará remedio!

Fungicida biológico inductor de defensas naturales en la planta

KENOGARD
CULTIVAMOS LA INVESTIGACION · 研究深耕

especies fúngicas es crítica para: (i) el establecimiento de cuarentenas y otras normas reguladoras; (ii) la definición y selección de resistencia al patógeno; (iii) la preservación de la biodiversidad; (iv) la especificación de organismos para biocontrol; y (v) la producción de antibióticos y patentes, entre otros.

Finalmente, la amplificación, secuenciación y comparación del ADN de genes conservados también puso de manifiesto incongruencias derivadas de la nomenclatura dual anamorfo-teleomorfo que incidían negativamente sobre la Fitopatología y la Micología, que motivaron la cesación de este sistema nomenclatural convencional para promover una nomenclatura unitaria bajo el concepto *One Fungus*: *One Name* (Un Hongo: Un Nombre) que es efectiva con fecha 1 de enero de 2013 y que ha sido bien acogida de forma generalizada, pero no unánime (Wingfield y col., 2012).

Los mencionados avances metodológicos también han revelado que los genomas de hongos y oomicetos fitopatógenos comprenden cromosomas que se encuentran conservados en todos los miembros de una especie, o que solo están presentes en algunos aislados de ella y se denominan cromosomas accesorios o condicionalmente prescindibles (Mehrabi y col., 2017). Sin embargo, estos últimos cromosomas presentan la singularidad de codificar importantes funciones biológicas, que les confieren ventajas adaptativas en hábitats determinados, tales como su patogenicidad sobre ciertas plantas o su crecimiento saprofito en condiciones particulares. Recientemente, los cromosomas prescindibles se han denominado linaje-específicos o cromosomas de patogenicidad para referir su relación con la especialización patogénica de las *formae speciales* (ff. spp.), como las del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (Ma y col., 2010), y la patogenicidad o virulencia de *V. alfalfae* y *V. dahliae* (Inderbitzin y col., 2014).

La factibilidad de secuenciación masiva ha impulsado la secuenciación de los genomas de hongos y oomicetos a fin de comprender los mecanismos por los que se genera variación en ellos. En la actualidad se dispone del genoma completo de más de 1.000 hongos y oomicetos representativos de 320 familias, fruto del proyecto "1000 *Fungal Genomes Project*" (Araujo y Sampaio-Maia, 2018). La comparación de algunos de dichos genomas ha llevado a concluir que, contrariamente a parásitos y simbiontes, los genomas de hongos y oomicetos tienden a una evolución convergente hacia genomas de gran tamaño expandidos por una proliferación de ADN repetitivo. Además, dichos genomas expandidos presentan una arquitectura compartimentada en la que: (i) ciertas regiones contienen un escaso número de genes pero son ricas en ADN repetitivo y transposones, y albergan el mayor número de genes que codifican los efectores que determinan la patogenicidad y virulencia; y (ii) otras regiones contienen la mayor proporción de dotación génica, en particular los genes que codifica las funciones necesarias para el crecimiento y la supervivencia, y son pobres en ADN repetitivo y transposones.

A los mencionados avances se unen: (i) la constatación de que entre hongos –y oomicetos- no relacionados taxonómicamente, o que no se reproducen sexualmente, se produce con frecuencia transferencia horizontal de genes o cromosomas, así como hibridaciones interespecíficas, que desempeñan un papel importante en la emergencia de nuevos patógenos y enfermedades (Feurtey y Stukenbrock, 2018; Mehrabi y col; 2017; Möller y Stukenbrock, 2017); (ii) la prevalencia de polifilia entre las ff. spp. de *F. oxysporum* (Baayen y col., 2000); (iii) el desarrollo de razas patogénicas en las ff. spp. de *F. oxysporum* a partir de miembros no patogénicos o de razas preexistentes, que pueden ser de distinto origen evolutivo o, alternativamente, ser monofiléticas y haber evolucionado unas de otras siguiendo un proceso secuencial y discreto de adquisición o pérdida de patogenicidad (Jiménez-Gasco y col, 2004); (iv) la utilidad de los Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCGs) para el estudio de la diversidad genotípica en las poblaciones de hongos fitopatógenos de estructura clonal –como las ff. spp. de *F. oxysporum* y *V. dahliae*-, porque dichos VCGs están correlacionados con linajes clonales y pueden estar relacionados con la virulencia o la gama de plantas susceptibles y, por lo tanto, servir de marcador con fines diagnósticos (Milgroom y col., 2014); y (v) la extensión de relaciones endofitas entre hongos y plantas que constituyen un refugio de biodiversidad, e incluyen especies entomopatógenas como *Beauveria bassiana* y agentes de control biológico del género *Trichoderma*, especies fúngicas de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* colonizadoras micotoxigénicas de plantas forrajeras, y miembros de las ff. spp. de *F. oxysporum* y *V. dahliae* en plantas no susceptibles o malas hierbas -denominadas "portadores asintomáticos"- que actúan como reservorios en los que los patógenos pueden completar su ciclo vital, incrementar sus poblaciones y generar variación patogénica en ausencia de la planta susceptible (Malcolm y col., 2013; Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

No obstante, las luces que trascienden de los avances antes descritos son ensombrecidas por eventos que continúan planteando incertidumbres sobre la Fitopatología en particular y la Sanidad vegetal en general, ejemplos relevantes de los cuales son las numerosas introducciones transfronterizas de hongos y oomicetos fitopatógenos exóticos propiciadas por el continuado incremento del comercio internacional de semillas, plantas y productos vegetales, y la reducción en la exigencia de certificación sanitaria del material vegetal, que han dado lugar a epidemias devastadoras en cultivos alimentarios y masas forestales y generado conmoción social: *Hymenoscyphus fraxineus* (necrosis regresiva de las ramas del fresno), *Phythophthora ramorum* (muerte súbita de *Quercus* spp.), *Pyricularia oryzae* patotipo Triticum y *Puccinia graminis-tritici* (necrosis de la espiga del trigo), y la raza 4 Tropical de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (mal de Panamá de la platanera Cavendish) (Carvajal-Yepes y col., 2019; McDonald y Stukenbrock, 2016). Así, en España, según la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), en el periodo 2010-2022 se han descrito 175 especies de hongos y oomicetos no registradas previamente, que pudieron estar asociados a la importación de plantas vivas de países de la UE y extra-UE, que solo en el año 2015

Sistema MinION de secuenciación de tercera generación, utilizado para la obtención del genoma de aislados de bacterias y hongos (M. P. Velasco).

alcanzaron un total de 35.000 t. de plantas vivas de países de la UE y extra-UE.

Nematodos fitoparásitos

Los nematodos fitoparásitos están presentes en todos los suelos agrícolas y naturales del mundo, aunque su presencia en los mismos, no indica necesariamente un daño en el cultivo, a no ser que estén a altas densidades y que sobrepasen la densidad del umbral de daño para el mismo. Sin embargo, algunos grupos son importantes por su potencial patogenicidad, entre los que destacan los nematodos formadores de nódulos de la raíz (*Meloidogyne* spp.) y los formadores de quistes (*Heterodera* spp. y *Globodera* spp.), que son los grupos de mayor impacto. En menor medida otros grupos, incluyendo transmisores de virus (algunas especies de *Longidorus* spp., *Paralongidorus* ssp. y *Xiphinema* spp.) y otros géneros (*Pratylenchus*, *Radopholus*, o *Rotylenchulus*) pueden también llegar a causar daños en ciertos cultivos y zonas geográficas específicas (Jones y col., 2013). La complejidad del manejo de los nematodos fitoparásitos radica en que son animales (más parecidos fisiológicamente a los seres humanos y a otros organismos pluricelulares que a otros patógenos como bacterias, virus, y hongos), por lo que las medidas químicas que se han venido utilizando tradicionalmente en su control suelen ser muy tóxicas y, por lo tanto, tener mayores consecuencias para los consumidores y el medio ambiente.

Un aspecto importante de estos organismos es que la mayoría de las especies solo se pueden identificar mediante estudios morfológicos en adultos. Sin embargo, la similitud morfológica entre algunas especies, y la existencia de especies crípticas (especies indistinguibles morfológicamente) tiene importantes implicaciones fitopatológicas para su diagnóstico, especialmente en las especies transmisoras de virus o para el uso de variedades resistentes. Además, la presencia en muestras de suelo de únicamente formas de supervivencia (huevos o quistes) y/o juveniles, dificultan su diagnóstico.

Unos de los avances más importantes en el estudio de estos organismos ha sido el uso de herramientas de biología molecular. En el diagnóstico de especies se han ampliado las metodologías de diagnóstico clásicas, basadas hasta hace poco tiempo en caracteres morfológicos de ejemplares adultos, y diferentes isoformas de enzimas. A ese respecto, la nueva Taxonomía Integrativa está basada en la combinación de caracteres morfológicos-morfométricos con otras herramientas genómicas. Entre ellas, cabe destacar el análisis filogenético de secuencias conservadas de algunos marcadores moleculares nucleares (ADN ribosómico) y mitocondriales (principalmente gen COI). La inclusión de estas nuevas herramientas ha supuesto un paso importante en el aumento de sensibilidad, rapidez del diagnóstico y en la descripción de nuevas especies, permitiendo separar especies crípticas. La disponibilidad de estos marcadores en bases de datos de acceso

libre (NCBI u otras) ha permitido el diagnóstico específico mediante estas herramientas, y además han permitido el diseño de técnicas diagnósticas para la identificación específica de especies (basadas en PCR convencional o cuantitativa, LAMP…) ampliando la identificación a muestras de suelo, huevos y formas juveniles. Sin embargo, hay que tener presente que hay frecuentes errores de identificación en las secuencias depositadas en las bases de datos y no todos los marcadores moleculares son igual de eficientes en la identificación de diversos grupos (Palomares-Rius *y* col., 2017). Por ello, en los últimos años, se está realizando un importante esfuerzo en obtener marcadores moleculares de los *topotipos* (ejemplares de la población original usada en la descripción de la especie) de las especies descritas, que permitirá dilucidar complejos de especies y especies crípticas.

Uno de los principales hitos en la Nematología ha sido la secuenciación y la caracterización funcional de genes del nematodo modelo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Posteriormente, se obtuvieron los primeros genomas casi simultáneamente de los nematodos formadores de agallas en la raíz, *Meloidogyne incognita* (Abad y col., 2008) y *M. hapla* (Opperman y col., 2008), aunque la secuenciación del genoma del primer nematodo formador de quistes (*Globodera pallida*) fue bastante posterior (Cotton y col. 2014). A partir de estos hitos se han secuenciado especies tan importantes como *Bursaphelenchus xylophilus*, *Globodera rostochiensis*, *Pratylenchus coffeae* etc. Es importante reseñar, que las comparaciones con las secuencias previas obtenidas de *C. elegans* no han simplificado el estudio de los efectores (proteínas y otras moléculas que interactúan con la planta para beneficio del nematodo), ya que muchas de estas moléculas son específicas de cada grupo de nematodos. Además, algunos de estos efectores se ha demostrado que provienen de intercambios horizontales de genes entre diferentes grupos de organismos (bacteria-nematodo y hongo-nematodo) como las celulasas que utilizan para migrar dentro de los tejidos vegetales y otros que

Tomates con agallas *Meloidogyne javanica* (Carolina Escobar y Marta Barcala).

son miméticos de compuestos vegetales. Sin embargo, el conocimiento de las secuencias genómicas, así como la identificación de marcadores moleculares, junto con nuevas herramientas genómicas, está permitiendo el estudio genético de poblaciones, lo que puede ayudarnos a comprender su dispersión y las vías de introducción.

Las nuevas herramientas de secuenciación masiva han permitido conocer más en detalle la íntima interacción entre los nematodos fitoparásitos y las plantas. Uno de los primeros genomas que constituyó un hito en muchos campos de la Fitopatología, y también en la interacción planta-nematodo, fue la secuenciación del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Meinke y col., 1998). Esto, junto con la primera demostración en los años 90 de que varios grupos relevantes de nematodos podían completar su ciclo vital en esta planta, supuso un gran avance en el conocimiento de las bases moleculares de la interacción planta-nematodo ya que se han usado colecciones de líneas mutantes en diversos genes de *Arabidopsis* (Escobar y col., 2015). A esto hay que añadir, que las raíces de *Arabidopsis* tienen pocas capas celulares, lo que ha facilitado la observación detallada a nivel celular de las estructuras de alimentación que forman los nematodos del género *Meloidogyne* spp. por microscopia convencional y confocal. Una de las grandes referencias para los nematólogos del estudio de los primeros estadios de parasitismo en video mediante microscopía óptica de contraste en *Arabidopsis*, procede del grupo de Wyss y col. (1992). Posteriormente, se han desarrollado técnicas de fenotipado estandarizadas para estas estructuras basadas en microscopia confocal (ej. Cabrera y col., 2015). Asimismo, las técnicas transcriptómicas en combinación con la biología celular mediante la microdisección por láser, o la microaspiración de las células de alimentación inducidas por los nematodos del género *Meloidogyne* spp. y *Heterodera* spp., han permitido análisis muy sensibles que han aumentado en gran medida el conocimiento sobre los cambios transcripcionales que ocurren particularmente en estas células (células gigantes y sincitios) (ej. Barcala y col., 2010). Estos conocimientos podrán permitir en un futuro próximo la aplicación de nuevas herramientas de control sostenibles basadas por ejemplo en ARN de doble cadena (dsRNA) o la edición genómica (CRISPR/Cas9) para modificar la función de genes del nematodo o genes de la planta importantes para el mantenimiento de la interacción compatible.

Otro aspecto interesante que destacar respecto al control de nematodos, principalmente desde la prohibición del bromuro de metilo, es el desarrollo y uso más generalizado de variedades y patrones resistentes a diversos grupos de nematodos (por ejemplo, patrones de diversas solanáceas e híbridos de *Prunus*). Muchas de estas obtenciones han ayudado a la disminución de daños y están ampliamente representados

Compartiendo la pasión por la tierra

en los catálogos de las empresas de semillas y viveros.

Respecto a la Nematología española, se ha conseguido la creación y consolidación de importantes grupos de investigación que estudian la interacción planta-nematodo y su interacción con el medio ambiente, estudio de nematodos de cuarentena, el desarrollo-evaluación de técnicas para su manejo en campo, estudio de nuevos compuestos naturales y antagonistas biológicos, y la caracterización molecular de especies para su diagnóstico inequívoco. Sin embargo, nuevos retos están presentes que se deben abordar en el futuro, como son una agricultura con menos insumos y con una importante reducción de los nematicidas disponibles, la concienciación ambiental de los consumidores, que piden productos con menores residuos, así como la posibilidad de la introducción o diseminación de especies invasivas, entre ellas *M. enterolobii* o *B. xylophilus*, para las cuáles hay menos herramientas de control disponibles (por ejemplo, plantas resistentes).

Virus y viroides fitopatógenos

Cuando la revista Phytoma salió a la luz en 1988 la Virología estaba experimentando un cambio radical a nivel conceptual y metodológico. Tan solo unos años antes, el grupo de P. Ahlquist de la Universidad de Wisconsin-Madison había desarrollado los primeros clones infecciosos para un virus de ARN y sentado las bases para el inicio de la implementación de la genética reversa en virología y posibilitado el progresivo trasvase de una ciencia más descriptiva a una definitivamente más funcional. No menos importante fue la primera demonstración por parte del grupo de R. Beachy en la Universidad de St. Louis, en colaboración con Monsanto, de que un gen derivado del patógeno, la proteína de la cápsida viral expresado como transgen en plantas, era capaz de conferir resistencia a la infección, lo que consolidó un nuevo concepto en los mecanismos de resistencia a las infecciones virales. Pero lo que sin duda significó un antes y un después no solo en el campo de la virología sino en la ciencia en general fue la publicación en *Science*, en el mismo año en el que aparecía el primer número de Phytoma, de un artículo del bioquímico K. Mullis en el que describía la amplificación enzimática del ADN mediada por una ADN polimerasa termoestable (PCR). Solo un año después, en 1989, se introdujo el termociclador automatizado, lo que supuso un cambio de paradigma en la virología básica y los campos de la detección y diagnóstico viral.

La década de 1990 trajo tres avances tecnológicos que han sido esenciales para el desarrollo de una virología funcional. Por un lado, la clonación en 1992 y la posterior expresión en organismos vivos en 1994 de la proteína verde fluorescente de la medusa *Aequorea aequorea*, lo que ha permitido un extraordinario progreso en el conocimiento de los aspectos celulares y moleculares de las interacciones virus-huésped o anfitrión. Por otra parte, la incorporación de técnicas "ómicas" (incluyendo la genómica, proteómica y metabolómica) permitió abordar desde una nueva perspectiva la respuesta de las plantas frente a los virus, posibilitando la identificación de patrones comunes de respuesta y poder elaborar estrategias generalistas inespecíficas para el control de las enfermedades.

Otro avance decisivo en el que la virología ha tenido un papel absolutamente relevante ha sido el descubrimiento del fenómeno del silenciamiento de ARN, que tuvo lugar al observar que en ciertos escenarios la resistencia mediada por secuencias del patógeno era debida al ARN y no a la proteína, tal y como puso de manifiesto el equipo de W.G. Dogherty de la Universidad de Oregón en 1992. Este silenciamiento está mediado por pequeños ARN derivados del propio patógeno, descubiertos por D. Baulcombe de la Universidad de Cambridge, que provienen de la acción secuencial de diferentes RNasas a partir de la molécula de ARN de doble cadena (dsARN). Esta fue identificada como molécula activadora de la respuesta del huésped por A. Z. Fire y C.C. Mello, que estaban interesados en una línea de investigación encaminada a anular la expresión de un determinado gen mediante la tecnología del ARN 'antisentido'. El silenciamiento de ARN mediado por dsARN constituye una línea de investigación actual muy prometedora para el control de las principales enfermedades de etiología viral en plantas.

El estudio de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de virus, y de su evolución, experimentó también un desarrollo explosivo. La demostración en 1978 de la heterogeneidad genética de poblaciones clonadas del fago Qβ, publicada en Cell por E. Domingo, entonces en la Universidad de Zúrich, permitió aplicar a las poblaciones de virus la teoría de la cuasiespecies. El desarrollo de esta área ha sido posible por la automatización y abaratamiento de los procesos de determinación de secuencias de nucleótidos en los años 1990 y, sobre todo, por las técnicas de secuenciación masiva y métodos informáticos para su análisis. Los enfoques metagenómicos han permitido disociar la identificación y detección de virus de su papel como patógenos de cultivos, y descubrir la gran riqueza de virus en comunidades de plantas silvestres. También han permitido demostrar que a menudo los virus son comensales

/ Otro avance decisivo en el que la virología ha tenido un papel absolutamente relevante ha sido el descubrimiento del fenómeno del silenciamiento de ARN /

o incluso mutualistas facultativos de las plantas, potenciando la tolerancia a situaciones de estrés como, por ejemplo, la sequía. Estos avances hacen posible estudiar la epidemiología y la evolución de los virus a nivel del ecosistema, para entender y prevenir nuevas emergencias, un tema candente en la actualidad.

Ya bien entrado en el siglo XXI, E. Charpentier y J. Doudna publicaron un artículo en *Science* en el que describían un método de edición genómica basado en un sistema de defensa adaptativo que usan las bacterias para defenderse de los bacteriófagos que había sido propuesto casi 20 años antes por Francis Mojica de la Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante. Este sistema de defensa se basa en la incorporación por parte de la bacteria a su genoma de secuencias de los fagos invasores dispuestas a modo de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) que actúan como sistema inmune bacteriano que puede ser manipulado para editar un genoma determinado. Recientemente se ha demostrado la utilidad y versatilidad de los virus de plantas como vectores de expresión de los componentes de esta maquinaria de edición genómica, lo que los hace unas herramientas muy apropiadas no solo para el control de las principales enfermedades de plantas, sino para la mejora de caracteres agronómicos de interés.

Desde el punto de vista de la producción agrícola, en los últimos 35 años, los virus han sido el segundo grupo de patógenos por la importancia económica de las pérdidas de producción ocasionadas en España. En esta etapa, la virología y la tecnología relacionada han adquirido un desarrollo notable, partiendo del uso casi exclusivo del diagnóstico visual, plantas indicadoras, electroforesis y microscopía electrónica, y se ha caracterizado sucesivamente por: i) el apogeo de las técnicas ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), producción y uso de anticuerpos monoclonales específicos, ii) las técnicas de hibridación y de amplificación molecular por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), especialmente de la PCR en tiempo real (cuantitativa), iii) el desarrollo de la viroidología, con una marcada contribución española debida al grupo de R. Flores, IBMCP (CSIC-UPV), iv) la aplicación de la secuenciación masiva (*Deep Sequencing*) y notables avances en bioinformática y de las tecnologías "ómicas".

/ Los virus han sido el segundo grupo de patógenos por la importancia económica de las pérdidas de producción ocasionadas en España /

En este periodo, epidemias importantes de virus causaron cuantiosos daños directos e indirectos, debidas fundamentalmente a: i) *Citrus tristeza virus*-CTV, que provocó la muerte de 45 millones de árboles injertados sobre el patrón naranjo amargo y el cambio total de la citricultura, ii) el virus de la sharka o viruela del ciruelo, *Plum pox virus*-PPV, que generó un coste medio de manejo estimado en 8,8 millones de euros/año en el período 1995-2020, iii) nuevas especies y genotipos de virus en España, especialmente en tomate, cultivo hortícola más importante, como el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*-CMV), virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*-TSWV), complejo de especies del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*-TYLCV), el virus del enanismo ramificado del tomate (*Tomato bushy stunt virus*-TBSV), virus del mosaico del pepino dulce, (*Pepino mosaic virus*-PepMV), el del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*-TToV), y tobamovirus en pimiento, entre otros. También ha sido significativo el creciente número de virus de ADN transmitidos por especies vectores de mosca blanca.

El papel de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) en estos 35 años

Respondiendo a los avances anteriores y a los crecientes problemas causados por bacterias, hongos y oomicetos, nematodos y virosis, la SEF ha publicado varios libros en los que estos organismos fitopatógenos han sido protagonistas, y en los que se trata del diagnóstico, las bases epidemiológicas y la gestión integrada de las enfermedades que causan: *Enfermedades de las cucurbitáceas en España* (1994), *Patología vegetal* (1996), *Enfermedades de los frutales de pepita y hueso* (2000), *Enfermedades de los cítricos* (2000), *Herramientas biotecnológicas en fitopatología* (2008), *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado* (2010), *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides* (2016), *Enfermedades de plantas causadas por bacterias* (2018), *Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España* (2019). Puede encontrarse más información, y enlaces para la descarga de algunos de estos libros, en la página de la SEF[3].

Tristemente, durante este periodo la SEF ha sufrido las pérdidas importantes e irreparables como fueron la de los compañeros fitopatólogos, socios de la SEF y maestros: A. Alfaro, M. Arias, A. Bello, R. Flores Pedauyé, A. Gómez-Barcina, F. Jiménez-Millán, D. López Abella, E. Mateo-Sagasta, C. Noval Alonso, J. Romero Cano, M. Rubio Huertos y J.A. Torés, entre otros muchos, que desde algún sitio nos seguirán iluminando. Sin ellos, la Fitopatología en España hubiera sido, sin duda, otra muy distinta.

[3] http://sef.es/publicaciones-SEF

Bibliografía

Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.-M. y col. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. Nature Biotechnology 26, 909-915. DOI: 10.1038/nbt.1482.

Adachi, H., Kamoun, S. 2022. NLR receptor networks in plants. Essays in Biochemistry 66: 541-549

Araujo, R., y Sampaio-Maia, B. 2018. Fungal genomes and genotyping. Adv. Appl. Microbiol.102: 23-81. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.10.003

Baayen, R.P., O´Donnell, K., Bonants, P.J.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroeck, E.J.A., y Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing root rot and wilt diseases. Phytopathology 90:891-899.

Barcala, M., García, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., García-Casado, G., Solano., Fenoll, C y Cscobar, c. 2010. Early transcriptomic events in microdissected Arabidopsis nematode-induced giant cells. Plant Journal. 61:698- 712.

Sijmons, P. C., Grundler, F. M., von Mende, N., Burrows, P. R., Wyss, U. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. Plant Journal, Plant Journal 1,245-254. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04098.x

Bull, C. T., Koike, S. T. 2015. Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology 53: 157-180.

Caenorhabditis elegans Sequecing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science 11, 2012-2018. DOI: 10.1126/science.282.5396.2012.

Cavalier-Smith, T. 2018. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. Protoplasma 255:297-357. DOI: 10.1007/s00709-017-1147-3

Cabrera, J., Díaz-Manzano, FE., Barcala, M., Arganda-Carreras, I., de Almeida-Engler, J., Engler, G., Fenoll, F., Escobar, C. (2015). Phenotyping nematode feeding sites: Three dimensional reconstruction and volumetric measurements of giant cells induced by root-knot nematodes in Arabidopsis. New Phytologist 206, 868-880. doi: 10.1111/nph.13249.

Carvajal-Yepes, M., Cardwell, K., Nelson, A., y col. 2019. A global surveillance system for crop diseases: Global preparedness minimizes the risk to food supplies. Science 364: 1237-1239. DOI: 10.1126/science.aaw1572.

Deal, R.B. 2011. Grand challenge. Accelerating discovery through technology development. http://www.frontiersin.org/technical_advanced_in_plant_science/10.3389/fpls.2011.00.

Escobar, C and Fenoll, C. Advances in Botanical Research- Plant Nematode Interactions. (2015). 73, 1-421.

Feurtey, A., y Stukenbrock, E.H. 2018. Interspecific gene exchange as a driver of adaptive evolution in fungi. Annu. Rev. Microbiol. 72:377–98.

González-Domínguez, E., Caffi, T., Rossi, V., Salotti, I., Fedele, G. 2023. Plant disease models and forecasting: changes in principles and applications over the last 50 years. Phytopathology 113: 678-693.

Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends in Plant Science 5: 446-451.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorff, S., y col. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol. Res. 111: 509-547.

Hooykaas, P. J. J. 2023. The Ti plasmid, driver of *Agrobacterium p*athogenesis. Phytopathology 113: 594-604.

Inderbitzin, P., y Subbarao, K.V. 2014. *Verticillium* systematics and evolution: How confusion impedes Verticillium wilt management and how to resolve it. Phytopathology 104: 564-574.

Inderbitzin, P., Thomma, B.P.H.J., Klosterman, S.J. y Subbarao, K.V. 2014. *Verticillium alfalfae* and *V. dahliae*, agents of Verticillium wilt diseases. Págs. 65-97, en: R.A. Dean y col., eds. Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens. Springer-Verlag, Berlin. doi:10.1007/978-3-662-44056-8_4.

Jiménez-Díaz, R. M., López, M. M. 2019. Libro Blanco de la Sanidad Vegetal en España. UCOPress. Editorial Universidad de Córdoba, Córdoba.

Jiménez-Díaz, R. M., López, M. M., R., A. 2023. La Sanidad Vegetal en la agricultura y la silvicultura. Retos y perspectivas para el siglo XXI. Real Academia de Ingeniería de España, Madrid.

Jiménez-Gasco, M.M., Milgroom, M.G., y Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. Phytopathology 94:228-235.

Jones, J. D. G., Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. Nature 444: 323-329.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J. y col., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14, 946-961. DOI: 10.1111/mpp.12057.

Köhl, J., Ravensberg, W. 2021. Microbial bioprotectants for plant disease management. Burleigh Dodds Science Publishing, London

Bial Micro

Bioactivador metabólico

Activación de los mecanismos naturales de defensa
Elevada dinamización del flujo de savia
Incremento del vigor vegetativo

Sin residuos,
sin plazo de seguridad.

BIAGRO

SHC

Locci, F., Wang, J., Parker, J. E. 2023. TIR-domain enzymatic activities at the heart of plant immunity. Current Opinion in Plant Biology 74: 102373.

Lovelace, A. H., Dorhmi, S., Hulin, M. T., Li, Y., Mansfield, J. W., Ma, W. 2023. Effector identification in plant pathogens. Phytopathology 113: 637-650.

Ma, L.J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., y col. 2013. *Fusarium* pathogenomics. Annual Rev. Microbiol. 67: 399-416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650.

Malcolm, G.M., Kuldau, G.A., Gugino, B.K., y Jiménez-Gasco, M.M. 2013. Hidden host plant associations of soilborne fungal pathogens: An ecological perspective. Phytopathology 103: 538-544.

Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., Tanksley, S. D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262: 1432-1436.

Matute, D.R., y Sepúlveda, V.E. 2019. Fungal species boundaries in the genomics era. Fungal Genet. Biol. 131: 103249. doi:10.1016/j.fgb.2019.103249.

McDonald, B.A., y Stukenbrock, E.H. 2016. Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. Phil. Trans. R. Soc. B 371: 20160026.http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0026.

Mehrabi, R., Gohari, A.M., y Kema, G.H.J. 2017. Karyotype variability in plant-pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 55: 483–503.

Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science 282, 662– 665. DOI: 10.1126/science.282.5389.662.

Milgroom, M.G., Jiménez-Gasco, M.M, Olivares-García, C., Drott, M.T., y Jiménez-Díaz, R.M. 2014. Recombination between clonal lineages of the asexual fungus *Verticillium dahliae* detected by genotyping by sequencing. PLOS ONE 9 (9): e106740.

Möller, M., y Stukenbrock, E.H. 2017. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. Nature Rev. Microbiol. 15: 756-771.

O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., y Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genet. Biol. 41:600-623.

Opperman, C. H., Bird, D. M., Williamson, V. M. y col. 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 105, 14802-14807. DOI: 10.1073/pnas.0805946105.

Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Subbotin, S. A., Castillo, P. 2017. The utility of mtDNA and rDNA for barcoding and phylogeny of plant-parasitic nematodes from Longidoridae (Nematoda, Enoplea). Scientific Reports 7, 10905. DOI:10.1038/s41598-017-11085-4.

Parker, C. T., Tindall, B. J., Garrity, G. M. 2019. International code of nomenclature of prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 69: S1-S111.

Porras-Alfaro, A., y Bayman, P. 2011. Hidden fungi, emerging properties: Endophytes and microbiomes. Annu. Rev. Phytopathol. 49:291-315.

Straub, C., Colombi, E., McCann, H. C. 2021. Population genomics of bacterial plant pathogens. Phytopathology 111: 23-31.

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., Singh, B. K. 2020. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nature Reviews Microbiology 18: 607-621.

Voglmayr, H. 2008. Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. Eur. J. Plant Pathol. 122 3-18.

Wingfield, M.J., de Beer, Z.W., Slippers, B., Wingfield, B.D., Groenewald, J.Z., Lombard, L., y Crous, P.W. 2012. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13: 604–613. doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00768.X.

Wyss, U., Grundler, F. M. W., & Münch, A. (1992). The parasitic behavior of second stage juveniles in *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematologica 38, 98-111.