PONENCIA MAGISTRAL

# Nuevas perspectivas en la taxonomía, variabilidad y ecología en *Verticillium* y sus implicaciones en el control de las Verticilosis

**Rafael M. Jiménez-Díaz** (Catedrático Emérito de Patología Vegetal; Fellow de la American Phytopathological Society; Académico Correspondiente de la Reales Academias de Doctores de España; de Ciencias, Bellas Letras y Nobles Artes de Córdoba; y de Ciencias, Bellas Artes y Buenas Letras "Luis Vélez de Guevara". Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3; e Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. ag1jidir@uco.es).

La investigación científico-técnica sobre las Verticilosis realizada durante la última década revela sin ambigüedad que la taxonomía, filogenia, ecología y variabilidad de las especies de *Verticillium* implicadas en el desarrollo de dichas enfermedades son más complejas que las concebidas hasta ahora, y determinan que su control deba ser necesariamente mediante la aplicación de estrategias de gestión integrada, así como que la eficiencia de estas estrategias depende de que sean practicadas por profesionales técnicamente especializados y formados para incorporar en los esquemas de decisión los nuevos conocimientos y tecnología desarrollados por la investigación.

## INTRODUCCIÓN

**Las Verticilosis son micosis vegetales causadas por especies de reproducción estrictamente asexual del género *Verticillium*, a las que colectivamente se las considera en la actualidad paradigma de enfermedades importantes por el elevado número de plantas a las que pueden afectar gravemente en extensas áreas de clima templado del planeta, que incluyen desde numerosas especies herbáceas anuales, cultivadas o arvenses, a leñosas perennes cultivadas o forestales (Klosterman y col., 2009). Recientemente se ha estimado que las pérdidas anuales de cosecha ocasionadas por las Verticilosis alcanzan un valor global de 3.000 millones de euros en los veinte cultivos más afectados, incluyendo algodón y olivo (M. Siebold y A. V. Tiedemann, no publicado; citado en Depotter y col. 2016). En España, las Verticilosis son de importancia en cultivos de alcachofa, algodonero, pimiento y olivo, y comienzan a ser diagnosticadas en almendro, mango y pistacho, entre otros (Bejarano-Alcázar y col. 1996; Jiménez-Díaz y col., 2006; 2011).**

**Además de por la importancia de los ataques, las Verticilosis se caracterizan por la dificultad de su control derivada de la complejidad de su patogénesis que, entre otros aspectos, es determinada por: i) la capacidad de los agentes causales de persistir prolongadamente en el suelo mediante estructuras especializadas (i.e., clamidosporas, microesclerocios, y micelio oscuro y toruloso); ii) la diversidad genética y patogénica existente en las poblaciones de ellos; iii) el confinamiento del patógeno en el xilema durante la fase patogénica en la planta huésped; y (iv) la facilidad de su dispersión entre y dentro de los cultivos en semillas o material propagativo infectados, así como mediante el agua de riego, suelo o restos de cultivos infestados. Todo ello determina que el control de las Verticilosis haya de ser llevado a cabo necesariamente mediante estrategias de gestión integrada que combinen la aplicación de medidas de lucha antes y después de la siembra o plantación, incluyendo: i) la evaluación de riesgos y elección del lugar de plantación; ii) la utilización de material vegetal certificado libre de infección; iii) la reducción del inóculo primario en el suelo infestado; iv) la protección del material de plantación sano de la infección por el inóculo residual o aportado de nuevo por los medios de dispersión; v) el uso de cultivares o patrones resistentes; y vi) prácticas de cultivo que minimicen el incremento de la población del patógeno en el suelo, y obvien condiciones favorables para la infección de la planta y el desarrollo de la enfermedad.**

**Durante la última década, se han producido importantes novedades en el conocimiento de la taxonomía, filogenia, variabilidad y ecología de las especies de *Verticillium* que pueden incidir significativamente sobre la eficiencia de las medidas de lucha y gestión integrada de las Verticilosis, alguna de las cuales se discuten a continuación.**

## Innovaciones taxonómicas en *Verticillium*

Hasta el año 2007, la etiología de las Verticilosis comprendía cinco especies de *Verticillium* cuya identificación se ha basado fundamentalmente en el tipo de estructura especializada de supervivencia que forman en tejidos infectados y en medios de cultivo: i) *V. albo-atrum* (micelio melanizado y torulosos); ii) *V. dahliae* (microesclerocios); iii) *V. longisporum* (microesclerocios); iv) *V. nubilum* (clamidosporas); y v) *V. tricorpus* (las tres estructuras), (más la especie *V. nigrescens*, que también forma clamidosporas y ha sido transferida al género *Gibellulopsis*). Sin embargo, estudios recientes de filogenia molecular basados en cinco genes conservados y más de 200 aislados de *Verticillium* spp. representativos de las cinco especies primigenias han elevado a 10 el número de especies de *Verticillium*, de las cuales nueve, incluyendo cinco nuevas especies, son monofiléticas y haploides (*V. albo-atrum, V. alfalfae*, *V. dahliae*, *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. nubilum*, *V. nonalfalfae*, *V. tricorpus* y *V. zaregamsianum*) y una, *V. longisporum*, es un híbrido anfidiploide que comprende tres linajes fruto de tres eventos de hibridación entre cuatro parentales haploides, de los cuales dos son genotipos de *V. dahliae* y otros dos son especies desconocidas, nunca encontradas, que se han denominado Especie A1 y D1 (Inderbitzin y col., 2011a,b). El análisis del taxón *V. albo-atrum* inicial ha dado lugar a dos nuevas especies, *V. alfalfae* y *V. nonalfalfae*, que forman micelio melanizado y son morfológicamente indistinguibles entre sí (y en consecuencia son especies crípticas), mientras que la denominación *V. albo-atrum* se reserva para aislados de un linaje diferente que forma micelio melanizado y microesclerocios, y que corresponde a la descripción original de la especie. Similarmente, el taxón inicial *V. tricorpus* se ha dividido en tres especies, *V. isaacii*, *V. klebahnii* y *V. tricorpus*, también indistinguibles morfológicamente entre sí, que forman clamidosporas, micelio melanizado y microesclerocios. *V. zaregamsianum* es morfológicamente distintiva del resto de las especies, porque en cultivo forma microesclerocios y un micelio amarillo que confiere tonalidad amarillo/anaranjada a la colonia (coloración que también forman *V. albo-atrum*, *V. isaacii* y *V. klebahnii*).

De las diez especies de *Verticillium*, *V. dahliae* es la de más amplio espectro patogénico y extensa distribución mundial. Comparada con ella, *V. albo-atrum, V. alfalfae* y *V. nonalfalfae* tienen una distribución más restringida, en áreas de clima fresco y húmedo y son patogénicamente más especializadas, incluyendo patata (*V. albo-atrum*), alfalfa (*V. alfalfae*) y algodón, apio, espinaca, lúpulo, patata, petunia, tomate y *Alianthus altissima* (*V. nonalfalfae*) (Inderbitzin y Subbarao, 2014). *V. longisporum* es patogénica de plantas de la familia *Brassicaceae*, excepto brócoli, pero el cultivo más grave y extensamente afectado es la colza oleaginosa (Depotter y col. 2016). *V. klebahnii* y *V. zaregamsianum* son patogénicas de alcachofa y lechuga, *V. tricorpus* es patógenico de lechuga, patata y tomate, y *V. isaacii* y *V. nubilum* son especies no patogénicas (Inderbitzin y Subbarao, 2014; Inderbitzin y col., 2011a,b,; Usami y col., 2010).

La existencia de especies crípticas, la similitud en la morfología de los microesclerocios utilizados hasta ahora para la identificación de las especies de *Verticillium* que no lo son (i.e., *V. dahliae*, *V. longisporum* y *V. zaregamsianum*) y la inestabilidad de la formación de microesclerocios e hifas amarillentas en cultivos repetidos, determinan que la etiología de las Verticilosis se deba llevar a cabo mediante protocolos de ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para análisis del ADN fúngico (Inderbitzin y col., 2013; Tran, y col., 2013).

## La ecología *Verticillium dahliae* y sus repercusiones en el manejo de las Verticilosis

*Verticillium dahliae* es la económicamente más importante de las especies fitopatógenas de *Verticillium*, por su capacidad de causar enfermedad severa en cerca de cuatrocientas especies de dicotiledóneas herbáceas de cultivo extensivo u hortícola, o arvenses, así como leñosas cultivadas, ornamentales o forestales, algunas de las cuales son ejemplos de Verticilosis emergentes (ej., las Verticilosis de la coliflor, la lechuga y el pimiento) (Atallah y col., 2011; EFSA PLH Panel, 2014; Klosterman y col., 2009). Además, *V. dahliae* puede desarrollar infecciones endofíticas, asintomáticas, en numerosas plantas mono o dicotiledóneas, cuya repercusión en la epidemiología y control de las Verticilosis está recibiendo atención creciente y se comentan en lo que sigue (Malcolm y col., 2013; Frederick y col., 2017).

Conceptualmente, las Verticilosis son enfermedades monocíclicas, cuyo desarrollo es mediado por la cantidad inicial de propágulos viables del patógeno existentes en el suelo al establecer el cultivo, junto con la eficiencia de dicho inóculo determinada por la susceptibilidad de la planta, la virulencia de la (s) estirpe (s) predominante y la favorabilidad del ambiente edáfico y aéreo. Dicho inóculo inicial, en el caso de las causadas por *V. dahliae*, son microesclerocios (ms), cuyo número en los suelos agrícolas es incrementado por el uso continuado de plantas huésped en las rotaciones de cultivo y las infestaciones del suelo con plantas arvenses antes referidas. Por ejemplo, el monocultivo de algodón 'Acala SJ-2' en California dio lugar a un incremento de 13-15 ms/g suelo/año (Huisman y Ashworth, 19769, un solo tallo de patata puede aportar hasta 90.000 ms (Slattery, 1981), y un olivo infectado por el patotipo defoliante de *V. dahliae* (ver más adelante) puede aportar hasta 11 kg de hojas infectadas/año, con una media de 1.200 ms/g de hoja (Jiménez Díaz, no publicado). Similarmente, un estudio reciente sobre el potencial de malas hierbas mono y dicotiledóneas de aportar al suelo inóculo de estirpes de *V. dahliae* patógenas de solanáceas, ha estimado que incluso sin desarrollar síntomas y dependiendo de la estirpe del hongo, las gramíneas arvenses aportaron una media de 11,5 a 26,6 ms/g de tallo, los bledos y cenizos de 10,9 a 12,5 ms/g y las solanáceas de 33,0 a 87,7 ms/g, cifras que no están muy alejadas de las que se desarrollaron en berenjena (14,1 y 27,6 ms/g) y patata (186,5 y 66,2. ms/g) (Frederick y col., 2017). Todo ello señala la necesidad de eliminar las poblaciones de plantas arvenses huésped y realizar rotaciones con plantas no susceptibles, como prácticas de cultivo que minimicen el incremento del inoculo del patógeno en el suelo, porque la incidencia de Verticilosis en cultivos susceptibles guarda relación con la densidad inicial de microesclerocios/g de suelo (si bien ésta varía con el cultivo). Así, son necesarios 110 ms/g suelo para que se desarrolle una cantidad significativa (10-15%) de Verticilosis en lechuga (Atallah y col., 2011), pero 10 ms/g suelo son suficientes para una incidencia de Verticilosis de 50% en alcachofa y coliflor, y bastan 0,5 ms/g suelo para ocasionar la misma incidencia en tomate y 2 ms/g suelo para el 100% de enfermedad en fresa (EFSA PLH Panel, 2014).

La relación de la incidencia de Verticilosis con la densidad inicial de inóculo de *V. dahliae* en el suelo ha propiciado el desarrollo de protocolos para el análisis de suelo, de aplicación para la evaluación de riesgos y elección del lugar de plantación, que se basan en la identificación de las colonias de microesclerocios formadas en medios de cultivo semiselectivos sobre los que se distribuyen muestras de suelo seco (tamizado seco, o método Andersen) o en suspensión acuosa (tamizado húmedo) (Butterfield y DeVay, 1977; Harris y col., 1993; Kabir y col., 2004). Estos protocolos se han utilizado ampliamente para fines de investigación, pero no así en la práctica común con vistas a la toma de decisiones, y su empleo

requiere un cierto nivel de especialización y experiencia en el operador porque la similitud en la morfología de los microesclerocios de las varias especies que los forman puede dar lugar a confusión y error en la estimación de la densidad de inóculo real de *V. dahliae* (Inderbitzin y col., 2011a; Termorshuizen y col., 1998). Estas insuficiencias están propiciando el desarrollo de protocolos moleculares más rápidos e informativos para la detección y cuantificación de *V. dahliae* en el suelo, basados en ensayos PCR (ej., Bilodeau y col. 2012; Debode y col.; 2011; Tzelepis y col., 2017), que sólo en algunos casos han sido validados respecto de la relación del inóculo cuantificado con el potencial de enfermedad, que es lo que determina su utilidad predictiva y para análisis de riesgo (Wei y col., 2015).

La disponibilidad de protocolos moleculares para la detección y cuantificación de *V. dahliae* en planta (ej., Gramaje y col., 2013) también ha ayudado a valorar la extensión y significación de la dispersión global y transmisión de este patógeno en semillas (ej., algodón, berenjena, cártamo, espinaca, girasol, lechuga, lino, tomate, etc., así como plantas arvenses) y en material propagativo asexual (ej., crisantemo, olivo, patata, rosa, etc.) y, en consecuencia, a señalar la absoluta necesidad de asegurar la sanidad del material de siembra y plantación mediante programas de inspección y certificación sanitaria como medida de lucha clave en la gestión integrada de las Verticilosis (EFSA PLH Panel, 2014; Jiménez-Díaz y col., 2012). La extensión y severidad de la Verticilosis de la lechuga en California es un ejemplo singular de lo anterior y de la significación de las semillas infectadas de cultivos de rotaciones en la importancia de las Verticilosis. Un estudio de lotes de semillas de lechuga representativos de los comercializados mundialmente concluyó que la tasa de infección por *V. dahliae* (prevalencia < 18%, incidencia < 5%) era insuficiente para explicar el desarrollo epidémico de la Verticilosis de la lechuga (Atallah y col., 2011), Por el contrario, estudios similares de lotes de semillas de espinaca indicaron una prevalencia de 89% de lotes infectados con una incidencia media de 18,5% en un intervalo de 0,3-84,8%, y demostraron que el uso de dichas semillas en cultivos que precedieron a los de lechuga y se desarrollaron sin enfermedad es el determinante fundamental de las epidemias de Verticilosis en los cultivos de lechuga subsiguientes (Short y col., 2015).

## Variabilidad genética y patogénica en *Verticillium dahliae*

Aunque *V. dahliae* se caracteriza por una patogenicidad inespecífica, sus poblaciones tienen una estructura clonal en la que subyace virulencia adaptativa sobre huéspedes preferentes. Dicha estructura clonal se estableció primero mediante Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG1 a VCG6) molecularmente diferenciados, cuyos miembros forman heterocariontes estables por anastomosis hifal (Collado-Romero y col, 2006). Subsiguientemente, la clonalidad en *V. dahliae* se ha confirmado sin ambigüedad mediante análisis de genotipado por secuenciación (GBS) y de polimorfismos en un solo nucleótido (SNPs), que han dado lugar a la identificación de linajes clonales correlacionados con los VCGs (denominados 1A, 1B, 2A, $2B^{334}$, $2B^{824}$, $2B^{R1}$, 4A, 4B y 6). Dichos linajes se originaron inicialmente por recombinación y posterior selección por adaptación a huéspedes preferentes, seguido de la expansión clonal de los genotipos mejor adaptados, ambas presumiblemente favorecidas por la intensificación agrícola (Collado-Romero y col, 2008; Milgroom y col., 2014; Milgroom y col. 2016).

Sobre la estructura de linajes clonales existen superpuestos dos tipos de variación genética y patogénica en *V. dahliae*: a) los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND), y b) las razas patogénicas 1 y 2. Los patotipos D y ND se caracterizan, respectivamente, por la capacidad de sus miembros de originar o no un síndrome de defoliación en algodón, olivo y okra, y de mostrar virulencia diferencial sobre otros huéspedes (i.e., el patotipo D es altamente virulento sobre lino y sandía, y moderadamente virulento sobre alcachofa, berenjena, girasol, y tomate; mientras que el ND muestra un espectro de virulencia contrario al referido para el D). Además, el patotipo D está circunscrito en el linaje 1A, mientras que el ND existe distribuido en los ocho linajes restantes. Un estudio de genómica de poblaciones utilizando una amplia muestra de aislados de los linajes 1A (D) y 1B (ND) de algodón y olivo de diversa procedencia geográfica, indica que el linaje 1A se originó en algodón en el sudoeste de los EE UU y que su distribución actual en la cuenca mediterránea es resultado de al menos cinco introducciones en eventos fundadores independientes, que tuvieron lugar desde poblaciones primigenias relativamente diversas tras una rápida expansión clonal de la población original del linaje que emergió como patógeno altamente virulento en algodón. El patotipo D fue diagnosticado por primera vez en España en 1984, en cultivos de algodón de la provincia de Sevilla, y en la actualidad se encuentra extendido en olivares de toda Andalucía, siendo predominante respecto del ND en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla (Jiménez-Díaz y col., 2011). Esta amplia distribución determina que el patotipo D haya de ser diana principal en la gestión integrada de la Verticilosis del olivo, cuya dificultad es ahora incrementada por el mayor potencial de inóculo del patotipo D comparado con el ND, y por su virulencia sobre cultivares de olivo resistentes al patotipo ND (Jiménez-Díaz y col., 2012).

Las razas 1 y 2 de *V. dahliae* se definieron inicialmente en poblaciones simpátricas que infectan girasol, lechuga y tomate. La raza 1 se caracteriza por ser no-patogénica sobre cultivares que tienen el gen *Ve1* de resistencia y por poseer el gen de *Ave1* de avirulencia sobre dicho gen de resistencia (del que es deficiente la raza 2). El gen *Ve1* codifica una proteína receptora que reconoce el producto del gen *Ave1* de avirulencia en el hongo (denominado efector y que a su vez es factor de virulencia en plantas sin *Ve1*), dando lugar a la expresión de mecanismos defensivos que determinan del fenotipo de resistencia a la raza 1 (de Jonge y col., 2012). La raza 2 es patogénica sobre plantas portadoras del gen *Ve1* (puesto que en la planta infectada no se produce el reconocimiento molecular al carecer del gen efector), así como en cultivos en los que no consta uso de *Ve1*.

Investigaciones recientes han revelado que las relaciones entre patotipos, razas y linajes de *V. dahliae* son complejas (Jiménez-Díaz y col., 2017). En efecto, todos los aislados de la raza 1 son del linaje 2A y viceversa, comparten la misma secuencia del gen *Ave1* específico de ella y son del patotipo ND. La pertenencia a un solo linaje y secuencia única del *Ave1* es consistente con la hipótesis de que la raza 1 evolucionó una sola vez (ie., monofilética) mediante la adquisición el gen *Ave1*, putativamente por transferencia horizontal de plantas (de Jonge y col., 2012). Por el contrario, la raza 2 es compleja porque comprende siete linajes (1A, 1B, $2^{B334}$, $2B^{824}$, $2B^{R1}$, 4A y 4B) y los patotipos D y ND de algodón y olivo. Los aislados de D de algodón y olivo son de la raza 2 y linaje 1A; y los ND son de la raza 2 y linajes $2B^{824}$ o 4B, o de la raza 1 y linaje 2A.

En resumen, la variación patogénica en *V. dahliae* puede ser explicada más adecuadamente por la emergencia de los fenotipos de virulencia en términos de linajes clonales específicos, que por la información derivada de investigaciones correlativas cuyos resultados varían dependiendo de las poblaciones específicas muestreadas, y las correlaciones entre fenotipos y marcadores deben ser concebidos en el contexto de dicha estructura clonal en orden a comprender de forma completa la variación patogénica en este fitopatógeno. Más aún, el contexto de linajes clonales en *V. dahliae* es crucial para poder extender nuestro conocimiento sobre el papel de las infecciones endófitas de huéspedes alternativos, en la biología, ecología y epidemiología de *V. dahliae* y sus implicaciones en la gestión integrada de las Verticilosis que causa.

**Agradecimientos:** Las investigaciones del autor referidas en el texto han sido financiadas por los proyectos: P10-AGR 6082 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junat de Andalucía, y AGL2011-24935 (proyecto Vertigen) del Ministerio de Economía y Competitividad de España, co-financiados por fondos FEDER de la UE.

## BIBLIOGRAFÍA


Atallah, .ZK., Hayes, R.J., Subbarao, K.V., 2011. Fifteen years of Verticillium wilt of lettuce in America's salad bowl: A tale of immigration, subjugation, and abatement. Plant Dis. 95 : 784-92.

Bejarano-Alcázar, J. Blanco-López, M.A., Melero-Vara, J.M., y Jiménez-Díaz, R.M. 1996. Etiology, importance, and distribution of Verticillium wilt of cotton in southern Spain. Plant Dis. 80: 1233-1238.

Bilodeau, G.J., Koike, S.T., Uribe, P., y Martin, F.N. 2012. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. Phytopathology 102: 331-343.

Butterfield, E.J., y Devay, J.E. 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. Phytopathology 67: 1073-1078.

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 fluorescent AFLP and PCR markers. Phytopathology 96: 485-495.

Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., y Jiménez-Díaz, R.M. 2008. Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. Phytopathology 98: 1019-1028.

Debode, J., van Poucke, K., Franca, S.C., y col. 2011. Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and real-time polymerase chain reaction. Plant Dis 95: 1571–1580.

Depotter, J.R.L., Deketelaere, S., Inderbitzin, P., y col. 2016. *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts. Mol. Plant Microb. Interact. 17: 1004–1016.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Verticillium dahliae* Kleb. EFSA Journal 2014;12(12): 3928, 54 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3928.

Frederick, Z.A., Cummings, T.F., y Johnson, D.A. 2017. Susceptibility of weedy hosts from Pacific Northwest potato production systems to crop-aggressive isolates of *Verticillium dahliae*. Plant Dis. http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0055-RE.

Gramaje, D., Pérez-Serrano, V., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., y Landa, B.B. 2013. A comparison of real-time PCR protocols for the quantitative monitoring of asymptomatic olive infections by *Verticillium dahliae* pathotypes. Phytopathology 103: 1058-1068.

Harris, D.C., Yang, J.R., y Ridout, M.S. 1993. The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil. Plant Pathol. 42: 238-250

Huisman, O.C., y Ashworth, Jr., L.J. 1976. Influence of crop rotation on survival of *Verticillium albo-atrum* in soils. Phytopathology 66: 987-981.

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., Bostock, R.M., Davis, R.M., y col. 2011a. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. PLoS ONE 6: e28341.

Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., y Subbarao, K.V. 2011b. The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. PLoS ONE 6: e18260.

Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., y Subbarao, K.V. 2013. Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assays. PLoS ONE 8: e65990.

Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Mercado-Blanco, J., Collado-Romero, M., y col. 2006. Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern-central Spain. Phytopathology 96: 288-298.

Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Landa, B.B., Jiménez-Gasco, M.M, y Navas-Cortés, J.A. 2011. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. Phytopathology 101: 304-315.

Jiménez–Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, M.M., y col. 2012. Verticillium wilt: A major threat to olive production. Current status and future prospects for its management. Plant Dis. Feature Article 96: 304-329.

Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Trapero-Casas, J.L., Jiménez-Gasco, M.M, y col. 2017. Variation of pathotypes and races and their correlations with clonal lineages in *Verticillium dahliae*. Plant Pathol. 66: 651-666.

de Jonge, R., van Esse, H.P., Maruthachalam, K. y col. 2012. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 5110–511.

Kabir, Z., Bhat, R.G., y Subbarao, K.V. 2004. Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. Plant Dis 88: 49–55.

Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., y Subbarao, K.V. 2009. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. Annu. Rev. Phytopathol. 47: 39-62.

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.

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.

Milgroom, M.G., Jiménez-Gasco, M.M, Olivares-García, y Jiménez-Díaz, R.M. 2016. Clonal expansion and migration of a highly virulent, defoliating lineage of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 106: 1038-1046.

Short, D.P.G., Gurung, S.; Koike, S.T. y col. 2015. Frequency of *Verticillium* species in commercial spinach fields and transmission of *V. dahliae* from spinach to subsequent lettuce crops. Phytopathology 105: 80–90.

Slattery, R.J. 1981. Inoculum potential of *Verticillium* infested potato cultivars. Amer. Pot. J. 58: 135-142.

Termorshuizen, A.J., Davis, J.R., Gort, G., y col. 1998. Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. App. Environ. Microbiol. 64: 3846–3853.

Tran, V., Braus-Stromeyer, S.A., Timpner, C., y Braus, G.H. 2013. Molecular diagnosis to discriminate pathogen and apathogen species of the hybrid *Verticillium longisporum* on the oilseed crop *Brassica napus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 4467-4483.

Usami, T., Kanto, T., Inderbitzin, P., y col. 2010. *Verticillium tricorpus* causing lettuce wilt in Japan differs genetically from California lettuce isolates. J Gen Plant Pathol. DOI 10.1007/s10327-010-0282-x.

Wei, F., Fan, R., Dong, H.-T., y col. . 2015. Threshold microsclerotial inoculum for cotton Verticillium wilt determined through wet-sieving and real-time quantitative PCR. Phytopathology 105: 220-229.

Tzelepis, G., Bejai1, S., Sattar, M.N., y col. 2017. Detection of *Verticillium* species in Swedish soils using real-time PCR. Arch Microbiol, DOI 10.1007/s00203-017-1412-z.