

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Variabilidad genética y patogénica de poblaciones argentinas  
de *Phytophthora sojae*, agente causal de la podredumbre de  
raíz y base del tallo de la soja (*Glycine max*)**

**Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas**

**Autora: Ingeniera Agrónoma Marcela Edith Gally**

**Directora: Dra. Silvia Edith Lopez**

**Directora Asistente: Ing. Agr. M.Sc Dora Barreto**

**Lugares de trabajo: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA),  
Facultad de Agronomía (UBA) e INTA-Castelar.**

**25 de Agosto de 2005**

## Agradecimientos

A Silvia Lopez por su excelente predisposición, por confiar en mí, por tener siempre una palabra de aliento y ayudarme a emprender una tarea tan difícil-

A Doris Barreto, porque me he formado con ella en el estudio de enfermedades de la soja, por todo lo que pasamos juntas en las recorridas “buscando Phytophthora” y por todo lo que me enseñó.

A Marcela Ramos por su inapreciable ayuda en mi introducción al mundo molecular y por su asesoramiento.

A Diana Dokmetzian, al igual que Marcela, por su ayuda “molecular” y por sus consejos.

A Terry Anderson por sus consejos y por proporcionarme las cepas de Canadá y las semillas de las líneas diferenciales.

A Laura Ferreyra por su excelente predisposición para atender mis consultas.

A Andre y Ceci por tantos almuerzos compartidos en el “fragor” del trabajo y por tanto cariño.

A Mercedes por su inmenso cariño y sus permanentes palabras de aliento.

A Bruna por su calidez y predisposición.

Quiero agradecer en general a todos los investigadores de los laboratorios 5, 6, 7, 8, 69 y 70 porque me he sentido muy bien recibida en un ámbito al cual no pertenecía y fue muy satisfactorio para mí compartir todo este tiempo con ellos.

A Leonor Calot, mi directora de tesis de grado, mi gran amiga, siempre presente en mi memoria..

Agradezco la financiación de este trabajo a la UBA y al INTA, que a través de diversos proyectos han hecho posible el desarrollo del mismo.

A mis hijos Angeles y Santiago, que son el motor de mi vida, y que “ya no pueden escuchar más hablar de la tesis”, les agradezco la paciencia y la comprensión.

A mis padres, Juan Carlos Gally y Edith Melczer, por todo lo que me enseñaron y por todo lo que me quieren y porque ellos me inculcaron la importancia del estudio.

*A Angeles y Santi, por el inmenso amor que les tengo.*

**El presente trabajo fue financiado por proyectos subsidiados por el INTA y la Facultad de Agronomía de la UBA.**

## RESUMEN

*Phytophthora sojae* causa la podredumbre de la raíz y base del tallo de la soja, una de las enfermedades más importantes de *Glycine max*. El patógeno infecta en cualquier momento del ciclo del cultivo y causa la muerte de plantas, lo cual representa severos daños. En el mundo existen muchas razas de *P. sojae* de variada virulencia que infectan cultivares con diferentes genes de resistencia (*Rps*). En Argentina, la raza 1 (virulenta sobre *Rps* 7) ha sido siempre prevalente pero últimamente han aparecido nuevos patotipos. Los objetivos de este estudio fueron detectar variación patogénica en poblaciones argentinas de *P. sojae* y caracterizar la variabilidad genética a través de métodos moleculares. Se obtuvieron treinta y dos aislamientos de plantas enfermas y de muestras de suelos infestados de diferentes localidades de las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos, principal zona productora de soja de Argentina. La virulencia de los aislamientos fue determinada a través de inoculación de hipocótilos de líneas diferenciales de soja. La variabilidad genética fue evaluada mediante la metodología de marcadores RAPD. Se utilizaron 20 “primers” de la serie PROMEGA en las amplificaciones. Los resultados indicaron que la raza 1 y la 13 fueron prevalentes en las poblaciones estudiadas y se encontraron 4 nuevas razas. Se comprobó por primera vez en nuestro país el quiebre de la resistencia provista por el gen *Rps* 1k, ampliamente utilizado en planes de mejoramiento genético. Se seleccionaron siete “primers” a partir de los cuales se obtuvieron 50 bandas analizables, 45 de ellas polimórficas, indicando alta variabilidad. El análisis a través de RAPD permitió detectar variabilidad entre aislamientos aún de la misma raza o fórmula de virulencia, pero los resultados no tuvieron relación con el origen geográfico de las cepas o con la virulencia. Se confirmó la existencia de variabilidad patogénica y genética en Argentina.

## SUMMARY

*Phytophthora sojae* causes root and stem rot of soybean, one of the most important diseases of *Glycine max*. The pathogen infects any time in the cycle of the crop and causes the death of plants with severe damages. There are many races with variable virulence in the world able to infect cultivars with different resistance genes (*Rps*). In Argentina race 1 (virulent on *Rps* 7) has always been prevalent but new pathotypes have arisen lately. The objectives of this study were to detect pathogenic variation of populations of *P. sojae* in Argentina and to characterize genetic variability by molecular methods. Thirty two isolates were collected from diseased soybean plants and infested soil samples from different localities of Santa Fe, Buenos Aires, Córdoba and Entre Ríos provinces, the main soybean production area in Argentina. Virulence of the isolates was determined by hypocotyledonal inoculation of differential soybean isolines. Genetic variation was evaluated by means of RAPD markers. DNA was amplified with 20 PROMEGA decanucleotides primers. Results indicate that race 1 and 13 were prevalent and four new races are reported. Resistance gene *Rps* 1k, widely used in breeding programmes, was defeated for the first time in Argentina. Seven primers resulted in fifty amplified fragments, and forty five were polymorphic, indicating high variability. RAPD analysis detected variability between isolates even of the same race or virulence pattern, but results were not related with geographic origin or virulence. Pathogenic and genetic diversity of populations of *P. sojae* from Argentina was confirmed.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	1
I. EL CULTIVO DE SOJA EN ARGENTINA	2
II. ENFERMEDADES DE LA SOJA EN ARGENTINA	3
III. PODREDUMBRE DE RAÍZ Y TALLO DE LA SOJA	6
III.1. Impacto económico	7
III.2. Síntomas	9
IV. EL PATÓGENO	10
IV.1. Características morfológicas de <i>P. sojae</i>	11
IV.2. Fisiología de <i>P. sojae</i>	12
V. CICLO DE LA ENFERMEDAD Y EPIDEMIOLOGÍA	15
VI. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A <i>P. sojae</i>	17
VII. VARIABILIDAD PATOGENICA: RAZAS FISIOLÓGICAS	19
VIII. DINÁMICA POBLACIONAL	22
IX. EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE POBLACIONES DE HONGOS Y OOMYCETES FITOPATÓGENOS	28
X. TÉCNICA DE RAPD ("Random amplified polymorphic DNA")	30
X.1. Fundamento de la técnica	31
X.2. Empleo de la técnica de RAPD en estudios poblacionales y taxonómicos de Hongos y Oomycetes	33
<b>OBJETIVOS</b>	38
<b>HIPÓTESIS</b>	38
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	39
INTRODUCCIÓN	40
I. AISLAMIENTO DE <i>Phytophthora sojae</i>	40
I.1. Aislamiento a partir de suelos	41
I.2. Aislamiento a partir de plantas enfermas	42
I.3. Medio de cultivo VA	42

II.	CARACTERIZACIÓN DE VIRULENCIA	43
II.1.	Preparación del inóculo	43
II.2.	Crecimiento de las plántulas	43
II.3.	Inoculación	44
II.4.	Evaluación de resultados	44
II.5.	Líneas diferenciales utilizadas	44
II.6.	Tratamiento estadístico de los datos de virulencia	45
II.6.1.	Construcción de la matriz básica de datos	45
II.6.2.	Coefficiente de asociación	46
II.6.3.	Análisis de agrupamiento, fenograma y coeficiente de correlación cofenética	46
II.6.4.	Análisis de ordenamiento	46
III.	ANÁLISIS MOLECULAR	47
III.1.	Crecimiento vegetativo	47
III.1.1.	Cepas utilizadas	47
III.1.2.	Medio y condiciones de cultivo	47
III.1.3.	Cosecha de micelio y medición	48
III.2.	Técnica DE RAPD	48
III.2.1.	EXTRACCIÓN DE ADN	48
III.2.2.	Estimación de la concentración de ADN	50
III.2.3.	Composición de soluciones utilizadas en la técnica de RAPD	51
III.2.4.	Amplificación. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
III.2.4.a.	Preparación de la mezcla	52
III.2.4.b.	"Primers utilizados	53
III.2.4.c.	Visualización de los fragmentos amplificados	53
III.2.5.	Tratamiento estadístico de los datos RAPD	54
III.2.5.a.	Construcción de la matriz básica de datos	54



III.2.5.b. Coeficientes de asociación	54
III.2.5.c. Análisis de agrupamiento, fenograma y coeficiente de correlación cofenética	56
III.2.5.d. Análisis de ordenamiento	57
<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
I. AISLAMIENTO DE <i>P. sojae</i>	59
II. CARACTERIZACIÓN DE VIRULENCIA	60
II.1. Determinación de razas y fórmulas de virulencia	60
II.2. Construcción de matriz básica de datos y fenograma de virulencia	62
II.3. Análisis de ordenamiento	69
III. ANÁLISIS MOLECULAR	71
III.1. Crecimiento vegetativo de <i>P. sojae</i>	71
III.2. Caracterización molecular	76
III.2.1. Bandas analizables	76
III.2.2. Matriz básica de datos	77
III.2.3. Matrices de similitud	77
III.2.4. Análisis de ordenamiento	79
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>94</b>

# Introducción

---

## I. EL CULTIVO DE SOJA EN ARGENTINA

La soja, *Glycine max* (L) Merr. es actualmente la principal especie cultivada de la Argentina, teniendo en cuenta los niveles de producción, industrialización y exportación de granos, aceite y harina. A partir del comienzo del cultivo a gran escala a principios de los 60, el área sembrada ha aumentado progresivamente, pero el mayor incremento se produjo en las últimas dos décadas.

En la campaña 2002/2003 se produjeron 35,5 millones de toneladas de granos a partir de una superficie sembrada de 12,7 millones de hectáreas, con un rendimiento promedio de 2,8 toneladas por hectárea. El área sembrada en la campaña 2003/2004 fue de 14,5 millones de hectáreas, y la producción fue de 34,8 millones de toneladas. La gran expansión continúa debido a los fuertes incrementos de siembra en zonas marginales del área óptima del cultivo, tales como el sur del área pampeana y el norte del país. De esta forma, el total nacional cultivado con soja creció un 12,9 % respecto al ciclo agrícola precedente (SAGPyA, 2004).

La producción de granos en general, para la campaña 2004/2005 alcanzaría un récord absoluto superando las 80 millones de toneladas, de los cuales casi la mitad sería aportado por la soja. El área sembrada con soja fue de 14,7 millones de hectáreas, la mayor superficie sembrada en la historia de la Argentina con esta oleaginosa. La misma representa el 56% del total del área sembrada de cultivos extensivos anuales en el país. El valor de las exportaciones de soja y derivados comprende el 43% del total exportado del complejo agrícola y el 20% de las exportaciones totales de Argentina (Cuniberti y Herrero, 2005).

La producción de soja creció un 217% en sólo 8 años, pasando de 12,6 millones de toneladas en el período 1996/97 a los 38,85 millones de toneladas en la presente campaña.

La distribución por regiones, según datos de la campaña 2002/2003 indica que el 82,7 % de la producción argentina se concentra en el norte de la Región Pampeana

(Córdoba, centro y sur de Santa Fe, norte de Buenos Aires y noreste de La Pampa), 11,8% en la Región del NEA (Entre Ríos, Chaco, Corrientes, Misiones, Formosa, este de Santiago del Estero) y 5,5 % en la Región del NOA (Tucumán, Salta, Jujuy, noroeste de Santiago del Estero y sudeste de Catamarca). Las principales provincias productoras son Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba, las cuales concentran el 74% del área sembrada y el 80% de la producción (Ploper, 2004).

Prácticamente la totalidad de los productos del complejo soja, semilla, pellets y aceite, se destinan al mercado mundial, con más de cien países como destinos. Argentina es el principal exportador de aceite y harina, contribuyendo con el 41 % y el 36,5 % del mercado mundial, respectivamente (Rossi, 2004).

## **II. ENFERMEDADES DE LA SOJA EN ARGENTINA**

La introducción de una especie en una nueva región, aún cuando presente condiciones edáficas y climáticas óptimas para su cultivo, implica un riesgo desde el punto de vista sanitario por los patógenos potenciales que puedan afectar a dicha especie. Durante los primeros años de cultivo, la soja casi no tuvo problemas sanitarios y prácticamente la única enfermedad de importancia económica fue la podredumbre de tallos y vainas causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. Este ascomycete es patógeno de numerosos hospedantes, incluidos otros cultivos extensivos como el girasol. Posteriormente fueron apareciendo enfermedades transmitidas por semillas y pudriciones radiculares causadas por diversos hongos cuyo habitat natural es el suelo.

En la actualidad, aproximadamente 40 enfermedades afectan al cultivo y algunas de ellas se tornan limitantes para la producción según las condiciones climáticas de la región y los sistemas de cultivo locales. La prevalencia y severidad de enfermedades ha aumentado notablemente desde inicios de la década de los 90 (Vallone y Giorda, 1997; Ploper, 1999). Se estima que en la actualidad las pérdidas por enfermedades en el cultivo de soja representan anualmente en Argentina entre 8 y 10 % de la producción (Wrather *et al*, 2001 y Vallone, 2002). Las principales causas de este incremento pueden atribuirse a la combinación del monocultivo de soja con la siembra directa y a la uniformidad genética de los cultivares usados. Con respecto al primer factor, la siembra de soja cada año con permanencia del rastrojo del cultivo anterior en superficie brinda condiciones óptimas para el desarrollo y supervivencia de hongos y oomicetes. Los patógenos necrotróficos continúan desarrollando en los tejidos muertos en los cuales forman estructuras reproductivas, generalmente sexuales. Las esporas sexuales de algunos biotróficos, como las oosporas de *Peronospora manshurica* (Naumov.) Syd., causante del mildiu, tienen mayor viabilidad protegidas por los tejidos muertos. Por el contrario la rotación de cultivos o la roturación del suelo, lleva a la mineralización total de los residuos de cosecha previa a la siembra nuevamente del mismo hospedante, interrumpiendo así el crecimiento exponencial del inóculo en los campos de cultivo. Los propágulos formados o protegidos en el rastrojo encuentran en el nuevo cultivo en implantación el hospedante apropiado para iniciar la etapa patogénica. Pero el monocultivo alentado por el alto precio internacional de la soja, y la siembra

directa impulsada por los innegables beneficios edáficos que implica, son prácticas que se han impuesto actualmente en la Argentina.

Por otra parte, la siembra de material genético de alta uniformidad, una o unas pocas variedades de destacadas características agronómicas en zonas de gran extensión, ha ejercido marcada presión selectiva, contribuyendo a la expansión de determinadas patologías.

Las enfermedades más importantes de la soja en la Argentina y en el mundo son causadas por hongos y oomycetes. Sin embargo no se debe ignorar la creciente importancia de las bacteriosis en nuestro país, en especial el tizón y la pústula bacteriana. Con respecto a las virosis, si bien se han detectado varias, la de mayor prevalencia en Argentina es el mosaico común de la soja, causado por el Soybean Mosaic Virus.

Es posible agrupar a las enfermedades de la soja de mayor importancia económica en nuestro país en aquellas que causan pudriciones radiculares y enfermedades de fin de ciclo, abarcando estas últimas las que manifiestan síntomas foliares y otras con síntomas principalmente en tallos y vainas.

Con respecto al primer grupo las de mayor prevalencia son la podredumbre de raíz y tallo causada por *Phytophthora sojae* (Kaufmann y Gerdemann) y el síndrome de la muerte repentina por *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (Mart.) Sacc., y, en años secos y cálidos la podredumbre carbonosa por *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goidanich) (Ploper, 2004).

En los últimos años se ha detectado creciente importancia de la podredumbre marrón del tallo causada por *Phialophora gregata* Allington y D. W. Chamberlain, y de podredumbre de raíces y corona por diversas especies del género *Fusarium*. *Rhizoctonia solani* J.G. Khün causa también podredumbre de raíces, muchas veces con presencia de un cancro en la base del tallo, síntomas que conducen a la muerte de las plantas que se observan en manchones en el campo.

En cuanto a las enfermedades que causan manchas foliares y reducción del área fotosintética, las más difundidas son la mancha marrón causada por *Septoria glycines* Hemmi y el tizón morado por *Cercospora kikuchii* (Mastsumoto & Tomoyasu) M.W. Gardner, la cual presenta síntomas también en vainas y semillas. Esta última es probablemente la enfermedad de fin de ciclo que más creció en las últimas campañas. El tizón bacteriano causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* y la pústula bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, también son de amplia difusión en todas las áreas sojeras del país, causan manchas foliares y desprendimiento de tejido necrosado. Además hay numerosas enfermedades que afectan el follaje, debiéndose destacar, a partir de su aparición en la campaña 2001/2002 la roya de la soja causada por *Phakopsora pachyrizi* Syd. y P. Syd. (Rossi, 2003). Esta enfermedad ha causado epidemias en las provincias del NEA y NOA en la campaña 2003/2004 y se ha expandido hacia la Región Pampeana en la campaña 2004/ 2005. Sin embargo, los daños no fueron severos debido a su

aparición en estados fenológicos tardíos cuando los componentes del rendimiento estaban definidos (Carmona *et al*, 2005).

Otra enfermedad no incluida en los grupos anteriores, pero que debe mencionarse debido a la magnitud de los daños que causa cuando se presenta, es el cancro causado por *Diaporthe phaseolorum* (Cooke y Ellis) Sacc., variedades *meridionalis* y *caulivora*. Se trata de un hongo de dispersión aérea que provoca lesiones en los tallos y ramificaciones causando la muerte de las mismas, e inclusive de toda la planta, cuando la necrosis se hace circular.

### **III. PODREDUMBRE DE RAÍZ Y TALLO DE LA SOJA**

La podredumbre de la raíz y la base del tallo de la soja causada por *Phytophthora sojae* Kaufmann y Gerdemann fue observada por primera vez como una enfermedad de etiología desconocida en Estados Unidos: en Indiana, en 1948 y en Ohio, en 1951. El agente causal fue aislado en Ohio y Carolina del Norte en 1954 (Suhovecky y Schmitthenner, 1955; Skotland, 1955) y caracterizado inicialmente como *P. cactorum* (Herr, 1957) y poco después como *P. sojae* (Kaufmann y Gerdemann, 1958).

La enfermedad ha sido registrada hasta el momento en la Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Francia, Hungría, Italia, Japón, Nueva Zelanda, Pakistan, la ex Unión Soviética y todas las regiones sojeras de Estados Unidos (Costamilan *et al*, 1996).



En nuestro país fue observada por primera vez por Hartwig y posteriormente por Martínez e Ivancovich en la década del 70 en el sur de Santa Fe y norte de Buenos Aires (Martínez e Ivancovich, 1979). En 1989 fue observada nuevamente por Schmitthenner y el patógeno fue aislado e identificado por Barreto *et al* (1991). Hasta 1992 se detectó solamente en forma de focos aislados en el partido de Pergamino, norte de Buenos Aires (Barreto *et al*, 1991 y 1995).

A partir de 1993 comenzó a observarse un progresivo incremento en la prevalencia de esta enfermedad, como sucedió con otras patologías, y se detectó en diversas localidades del norte de la Región Pampeana, y posteriormente en otras zonas del país, tales como Entre Ríos y el NOA: Salta y Tucumán (Barreto *et al*, 1998; Ploper *et al*, 1999; Vallone *et al*, 1999). Actualmente se presenta en forma no restringida y ha pasado a ser una enfermedad epidémica.

### **III.1. Impacto económico**

Después de la aparición de la enfermedad en Ohio, Estados Unidos, en la década de los 50, se desarrollaron cultivares resistentes que proporcionaron control efectivo hasta 1972. A partir de ese momento, el incremento progresivo de las poblaciones de nuevas razas determinó una segunda ola epidémica con un pico en 1978, con 50% de campos afectados y una reducción de rendimiento promedio de 536 kg/ha (Schmitthenner y Walker, 1979). Al mismo tiempo ocurrieron severas pérdidas en 200.000 hectáreas en el valle de Mississippi (Kilen, 1977). Estimaciones posteriores indicaron que aproximadamente 5 millones de hectáreas fueron infectadas en la región norte central y 3 millones de hectáreas en otras regiones de Estados Unidos, con pérdidas de hasta 100 % en algunos campos (Schmitthenner *et al*, 1989). La enfermedad puede ocasionar disminución de densidad de plantas por fallas en la implantación del cultivo y pérdidas completas de producción en cultivares susceptibles sembrados en suelos arcillosos e inundables (Schmitthenner, 1985).

En Australia, la enfermedad fue declarada como ampliamente distribuida en el estado de Queensland, con pérdidas normalmente menores a 20 %, llegando en algunos campos a provocar la muerte del 50 al 90 % de las plantas (Rose *et al*, 1982). En cultivares no protegidos por fungicidas se registraron pérdidas de hasta 72 % en la etapa de implantación del cultivo (Ryley *et al*, 1989).

En Canadá, en ensayos experimentales, se comprobaron pérdidas de 96,8% comparando el rendimiento de parcelas tratadas con el fungicida específico metalaxyl con el de parcelas no tratadas (Anderson y Buzzell, 1982; Tooley y Grau, 1984c).

En Argentina se citan valores de incidencia de la enfermedad de hasta 60% en el partido de Pergamino, Buenos Aires, y hasta 70% en Marcos Juárez, Córdoba (Vallone *et al*, 1999).

La severidad de las pérdidas depende de la susceptibilidad del cultivar, cantidad de lluvias caídas, tipo de labranza y textura y compactación del suelo. La podredumbre es más severa en suelos pobremente drenados, arcillosos, compactados, con saturación de agua por períodos prolongados y lluvias continuas. Además, los sistemas de labranza conservacionista ampliamente difundidos en los últimos años, han determinado un incremento en los daños causados por la enfermedad. En Ohio, Estados Unidos, se registró la presencia de cepas virulentas sobre un mayor número de genes de resistencia en campos con labranza reducida (Dorrance *et al*, 2003). Entre las condiciones que han provocado el aumento de la enfermedad en Argentina se agrega a las mencionadas anteriormente la difusión del riego por aspersión.

La soja es el único hospedante de importancia económica de *P. sojae*, aunque también ha sido aislado de lupino y espárrago.

### **III.2. Síntomas**

*Phytophthora sojae* puede infectar la planta durante todo el ciclo del cultivo. Los síntomas tempranos son: podredumbre de semillas y damping off de pre y pos emergencia los cuales ocurren comúnmente en suelos que sufren anegamiento poco después de la siembra. Los síntomas en plántulas de mayor tamaño dependen de la susceptibilidad y tolerancia del cultivar. En los de mayor susceptibilidad los tallos se observan húmedos, las hojas amarillentas y las plántulas se marchitan y mueren. En los más tolerantes hay podredumbre de algunas raíces pero las plántulas permanecen vivas.

En las plantas adultas el síntoma más conspicuo es una lesión de color pardo oscuro que rodea totalmente el tallo y avanza desde la superficie del suelo generalmente hasta el cuarto o quinto entrenudo y contrasta con el color verde de los tejidos sanos (Figura 1). Además hay podredumbre de la raíz principal, desintegración de raíces laterales y amarillamiento de hojas (Figura 2a). El resultado final es el marchitamiento y muerte de las plantas, que se observan necrosadas y con las hojas adheridas a los tallos (Figura 2b). Este es el síntoma más evidente en el campo, frecuentemente en períodos de escasa disponibilidad de agua, a causa de la disminución de la eficiencia de absorción y traslocación de la planta enferma (Figura 2b). Como sucede con la mayoría de las enfermedades causadas por patógenos cuyo hábitat natural es el suelo, los síntomas suelen presentarse localizados en determinados sectores del lote, en manchones o en tramos del surco de siembra, debido a la dispersión limitada de los propágulos (Figura 2c).

En cultivares tolerantes el síntoma más evidente en plantas adultas es la podredumbre de raíces secundarias y la decoloración de la raíz principal. En algunos casos puede observarse una lesión unilateral en el tallo. De todas formas, aún en cultivares susceptibles, los daños son menores cuando las plantas se encuentran en etapas avanzadas del ciclo.

## IV. EL PATÓGENO

*P. sojae* es el agente etiológico de la podredumbre de raíz y tallo de la soja. El origen del microorganismo no se ha dilucidado. Se cree que posiblemente sea el centro-oeste de Estados Unidos, como patógeno de leguminosas nativas (Jones y Johnson, 1969).

### Taxonomía

Reino: Straminipila

Phylum: Oomycota

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Sinónimos:

*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* T.L. Kuan y Erwin.

*Phytophthora sojae* f. sp. *glycines* Faris et al.

*Phytophthora megasperma* var. *sojae* Hildebr.

Inicialmente la etiología de la enfermedad fue atribuida a *Phytophthora cactorum* (Herr, 1957). Posteriormente se caracterizó el patógeno como *Phytophthora sojae* (Kaufmann y Gerdemann, 1958). Hildebrand (1959) consideró que era una variedad de *Phytophthora megasperma* a la cual denominó var. *sojae* por su similitud morfológica con otras variedades de la especie patógenas sobre otros hospedantes. En 1980 se cambió la categoría de variedad a forma especial, ya que las diferencias en tamaño de los oogonios con respecto a cepas que atacaban otros hospedantes no se consideraron suficientes para diferenciarlo como variedad, y se lo denominó *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Kuan y Erwin, 1980). Wilcox y Mircetich

(1987) confirmaron la especialización pero coincidieron con Kaufmann y Gerdemann en que el patógeno debía ser considerado como una especie distinta. Finalmente, en 1989 se lo volvió a denominar *Phytophthora sojae* (Faris *et al*, 1989). Hansen y Maxwell (1991) confirmaron a través de estudios moleculares la identidad de esta especie, conjuntamente con la de *P. medicaginis* y *P. trifolii*.

#### **IV.1. Características morfológicas de *P. sojae***

Las hifas de *P. sojae* son cenocíticas cuando jóvenes formándose con la edad septos adventicios (Figura 3a). El ancho promedio de las hifas es de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , con un rango de 2 a 9  $\mu\text{m}$ . Frecuentemente presentan ensanchamientos y tienen constricciones leves en la base de las ramificaciones, las cuales suelen ser en ángulo recto (Kaufmann y Gerdemann, 1958).

Los esporangióforos son simples y determinados con esporangios típicamente terminales, obpiriformes, no papilados, de 32 a 53  $\mu\text{m}$  de ancho y 42 a 65  $\mu\text{m}$  de largo (Figura 3b). Típicamente los esporangios son de proliferación interna, formando nuevos apicalmente a partir de los viejos. Germinan directamente emitiendo tubos germinativos, o indirectamente, formando zoosporas. Ocasionalmente las zoosporas quedan retenidas en el esporangio y al germinar dentro de éste, el tubo germinativo atraviesa la pared del esporangio.

Las zoosporas son ovoides a reniformes, aplanadas lateralmente. Poseen dos flagelos, uno corto dirigido hacia delante y otro 4 a 5 veces más largo dirigido hacia la parte posterior. El contacto con una superficie sólida desencadena el enquistamiento, tanto en condiciones naturales como artificialmente por agitación o agregado de cationes bi o trivalentes. El cisto frecuentemente germina inmediata y directamente, formando un tubo germinativo que en general da origen a un apresorio cuando contacta una superficie sólida. Ocasionalmente el cisto produce zoosporas secundarias y raramente forma un esporangio.

*P. sojae* es una especie homotática. Los anteridios son diclinos y generalmente paráginos, aunque a veces pueden observarse anfígenos. Los oogonios miden de 29 a 58  $\mu\text{m}$  de diámetro, son esféricos o subesféricos y de paredes delgadas (Figura 4a-d). Luego de la fecundación entre un anteridio y un oogonio se desarrolla la oospora (Figura 4e). Ésta posee una doble pared gruesa, lisas tanto la externa como la interna. El citoplasma es granuloso, con un cuerpo esférico refractivo en el centro, un gránulo de reserva bien desarrollado y un par de cuerpos pelúcidos en la capa externa. La germinación ocurre luego de la fusión de los cuerpos pelúcidos, que dejan de ser observables y las paredes de la oospora se adelgazan, se reabsorbe el cuerpo refractivo central y la oospora adquiere apariencia de esporangio. Al germinar puede formar un esporangio (Figura 3c) o micelio (Hartman *et al*, 1999).

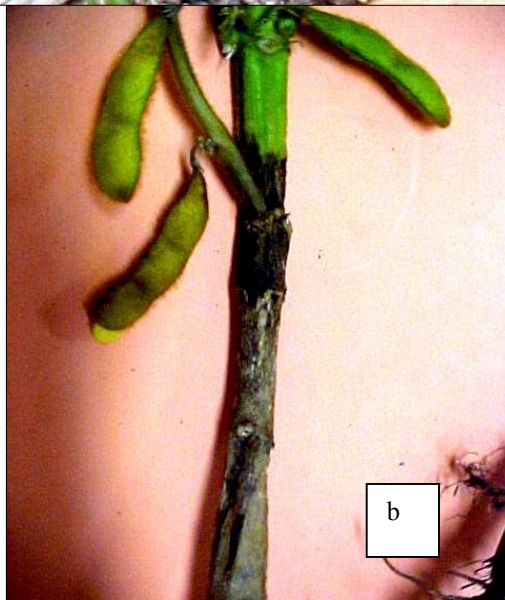
#### **IV. 2. Fisiología de *P. sojae***

La temperatura óptima para el crecimiento vegetativo de la mayoría de los aislamientos de *P. sojae* es de 25 a 28 °C (Hartman *et al*, 1999).

En cuanto a los requerimientos nutricionales se debe destacar que las *Pythiaceae* son heterótrofas para los esteroides, los cuales deben ser incorporados al medio de cultivo, no solo para promover el crecimiento vegetativo, sino para estimular la reproducción tanto asexual como sexual (Elliott, 1983; Hendrix, 1970; Nes, 1974) . La tiamina es la única vitamina que debe incorporarse al medio para el crecimiento de las especies de *Phytophthora* (Cameron, 1966; Roncadori, 1965). Como fuente de carbono, las mejores son sacarosa y glucosa. Con respecto a la fuente de nitrógeno, si bien la mayoría de las especies de *Phytophthora* responden en forma similar a la incorporación de amonio o nitratos, algunas como *P. fragariae* y *P. infestans* no crecen en un medio con nitratos, y por el contrario, *P. sojae* crece mejor en un medio con nitratos que con amonio (Hohl, 1975). Los macroelementos esenciales son: azufre,



**Figura 1: Síntoma típico en la base del tallo, 1a: planta en el campo con podredumbre basal, 1b: detalle de lesión, 1c: lesión basal y sistema radicular podrido**





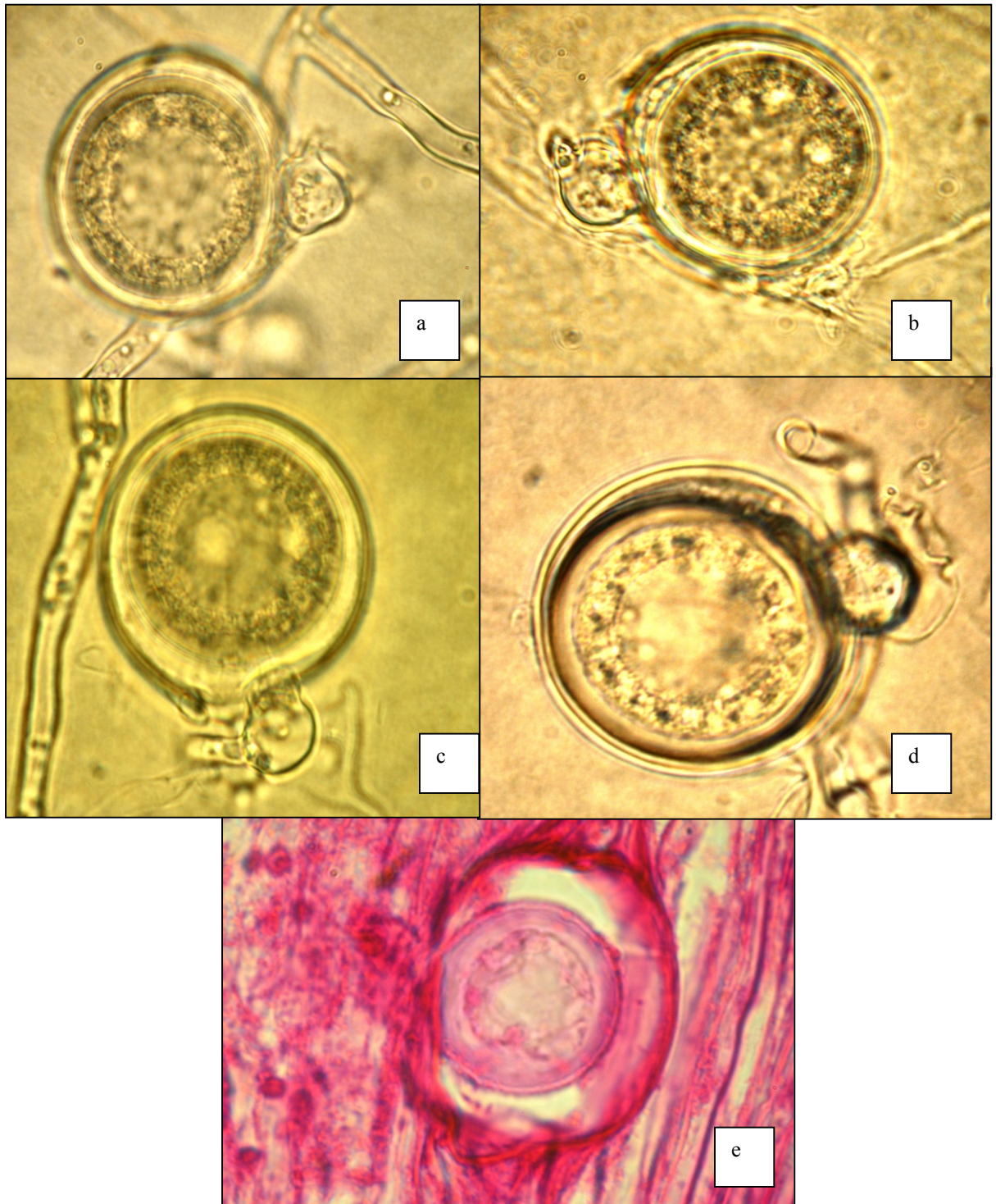


**Figura 2. Planta afectadas por *Phytophthora sojae*, 2a. amarillamiento de hojas, 2b. marchitamiento, planta muerta con las hojas adheridas al tallo, 2c. muerte de plantas enfermas un surco.**





**Figura 3a. hifa con septos adventicios, 3b. esporangio, 3c. formación de un esporangio a partir de una oospora**



**Figuras 4a a 4d: . Anteridios (a) y oogonios (o) desarrollando en medio V8, 4e. oospora en el tejido de la raíz enferma.**

fósforo, potasio, calcio y magnesio, y los microelementos: hierro, cobre, manganeso, zinc y molibdeno (Hohl, 1975).

Los esporangios se forman generalmente en o cerca de la interfase aire-sustrato.

El factor que más influye en la formación de esporangios es el potencial agua. Niveles cercanos al 100% y de potencial mátrico cercanos a 0% son altamente predisponentes para la producción de esporangios en el género *Phytophthora* (Ribeiro, 1983). Potenciales mátricos de  $-0.05$  a  $-0.1$  bares determinan una reducción en el número de esporangios de *P. megasperma*, mientras que a  $-2.8$  bares cesa su formación (Pfender, 1977). También pueden ser inducidos *in vitro* en medio agarizado sólido tras sucesivos lavados con agua.

Otros factores que afectan el proceso son:

**Nutrición:** La formación de esporangios aumenta con bajo nivel nutricional en el medio, como la siembra en extractos diluïdos de poroto lima, V8 o de tejidos vegetales, o la transferencia de una porción de la colonia directamente a medio acuoso.

**Esteroles:** La presencia de esteroles en bajas concentraciones estimula el crecimiento miceliano, la reproducción asexual y la formación de estructuras reproductivas sexuales.

**Luz:** La formación de esporangios es estimulada por la luz, en rangos de 315-475 nm.

**Aireación:** La baja disponibilidad de  $O_2$  atmosférico y el aumento del tenor de  $CO_2$  limita la formación de esporangios (Mitchell y Zentmyer, 1971).

**Edad del cultivo:** El micelio juvenil de *P. sojae* por ejemplo, de un día de cultivo, produce 4 veces más de esporangios, en un medio de bajo nivel nutricional, que el micelio de 5 días de edad (Eye *et al.*, 1978).

**Cationes:** Algunos cationes, como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $K^+$ , estimulan la formación de esporangios (Halsall y Forrester, 1977, Kennedy y Erwin, 1961).

Los esporangios germinan indirectamente a través de la formación de zoosporas o directamente, dependiendo este fenómeno principalmente de la temperatura. La

temperatura óptima es de 25 °C para la germinación directa, y 20 °C para la producción de zoosporas (Hartman *et al.*, 1999). Generalmente los esporangios diferencian y liberan las zoosporas en presencia de agua libre y a temperaturas inferiores a las óptimas para el crecimiento vegetativo del oomycete.

La movilidad de las zoosporas en medio líquido puede durar desde minutos a varias horas y generalmente es mayor con bajas temperaturas. También influyen las reservas lipídicas de la zoospora, con altos niveles de reserva la movilidad puede prolongarse por más tiempo (Bimpong, 1975). Las fuentes exógenas de nutrientes no afectan el período de movilidad, aunque algunos exudados radiculares ejercen un efecto de quimiotaxis, promoviendo el acercamiento de las zoosporas a las superficies infectibles.

*P. sojae* produce anteridios y oogonios que desarrollan abundantemente en agar harina de maíz, agar papa dextrosado o agar V8. Los factores que afectan en mayor medida la formación de las oosporas son: luz, esteroides y relación carbono-nitrógeno.

Con respecto a la luz, a diferencia de lo que ocurre con la reproducción asexual, el proceso de formación de oosporas se estimula en la oscuridad (Harnish, 1965; Brasier, 1969). Los esteroides son fundamentales para la formación de anteridios y oogonios, así como para otros procesos vitales. Relaciones carbono-nitrógeno elevadas generalmente favorecen la formación de oosporas (Elliott, 1983).

Las oosporas pueden germinar alrededor de 30 días después de su formación. La germinación puede ser incrementada por bajos niveles de nutrientes, luz y exudados radiculares. La temperatura óptima para la formación y germinación de oosporas es de 24 ° C (Hartman *et al.*, 1999).

## **V. CICLO DE LA ENFERMEDAD Y EPIDEMIOLOGÍA**



El inóculo primario de la enfermedad está constituido por las oosporas del hongo (Athow, 1985), las cuales se forman en grandes cantidades en las raíces de las plantas susceptibles y tolerantes. Las oosporas pueden sobrevivir varios años en el suelo sin el hospedante, sin embargo poseen poca habilidad competitiva para colonizar los tejidos muertos y el suelo. A pesar de ello, se comprobó que rotaciones de 4 años con cultivos no hospedantes no eliminan al patógeno del suelo (Schmitthenner, 1985), debido a la presencia de las oosporas. Éstas pueden ser detectadas a través de la técnica de “baiting” ó tejidos trampa, ya sea utilizando discos de hojas o plántulas (Canaday y Schmitthenner, 1982).

Las oosporas al germinar producen esporangios o hifas, las cuales a su vez producen esporangios. Éstos pueden germinar directamente o producir zoosporas. Las zoosporas constituyen los principales propágulos infectivos de las raíces (Athow, 1985). Los suelos deben estar inundados o por lo menos saturados de agua para que se puedan producir zoosporas, las cuales se diseminan a través del agua libre, ya que el movimiento de los flagelos solo les permite nadar hasta 1 cm. Las zoosporas son atraídas por genisténa y otros exudados isoflavonoides presentes en la rizósfera y la espermatósfera. Con respecto a la temperatura, si bien suelos frescos son favorables para la infección, ésta ocurre aún con temperaturas del suelo de hasta 25 °C (Grau, 1985) y es pobre con temperaturas inferiores a 15 °C. Suelos arcillosos, con labranza reducida (Schmitthenner, 1985), o sometidos a prácticas de manejo que aumenten la compactación (Gray y Pope, 1986; Moots *et al*, 1988) aumentan la severidad de la enfermedad ya que los suelos se mantienen más húmedos y fríos. Cuando las zoosporas alcanzan la superficie de las raíces se enquistan, germinan y penetran. Las hifas crecen intercelularmente en los tejidos radiculares e intracelularmente en las células del hipocótilo (Hartman *et al*, 1999). También forman haustorios de apariencia irregular a lobulada (Stoessel *et al*, 1981) La colonización de la corteza es similar en cultivares resistentes y susceptibles las primeras horas posteriores a la penetración, luego cesa en el caso de las plantas resistentes en las cuales el hongo no es capaz de

alcanzar los tejidos vasculares. Ciertos mecanismos y procesos previos a la infección y aún inmediatamente posteriores, son comunes en las interacciones entre la planta de soja y una raza virulenta o avirulenta (Klarman y Corbett, 1974; Ristaino y Rissler, 1983; Stossel et al, 1980; Ward et al, 1989). Por ejemplo la atracción de las zoosporas por parte de la superficie de la raíz u otros órganos (Mehotra, 1970), el enquistamiento, germinación y la invasión inicial intercelular de los tejidos del hospedante. El tubo germinativo es capaz de penetrar la cutícula y los tejidos epidérmicos intactos. Cuando la raza es avirulenta, una vez transcurrida la etapa de invasión inicial que dura entre 2 horas y 3 horas después de la inoculación, se produce la muerte de las células afectadas, como una reacción de hipersensibilidad (Ward et al, 1989). Por el contrario, cuando la raza es virulenta sobre el cultivar, se establece una relación de compatibilidad patógeno-hospedante y no se produce muerte de las células invadidas en las primeras etapas de la infección, aproximadamente durante las primeras 7 horas. Esta etapa se caracteriza por la formación de haustorios y las hifas intracelulares se rodean de citoplasma del hospedante. La muerte de los tejidos enfermos se produce en etapas más avanzadas de la enfermedad como resultado de la maceración causada por la colonización por parte del patógeno (Klarman y Corbett, 1974; Stossel et al, 1980, 1981).

La enfermedad se comporta esencialmente como monocíclica, ya que, si bien hay formación de esporangios sobre la superficie de raíces enfermas, este inóculo secundario no incrementa los daños porque las plantas adquieren mayor tolerancia con la edad. Se sabe que los niveles de inóculo primario son suficientes para desencadenar la epidemia (Miller *et al*, 1997).

No hay evidencia de que el patógeno se transmita por semillas. Se conoce un solo registro de aislamiento a partir de semillas (Kovics, 1981), por lo cual se considera que es extremadamente rara su infección por parte de *P. sojae*.

## VI. GENETICA DE LA RESISTENCIA A *P. sojae*

Existen dos tipos de resistencia a *P. sojae*: la resistencia específica o monogénica, la cual se encuadra dentro de la clásica teoría gen por gen (Ellingboe, 1983), y la resistencia parcial o poligénica.

En la resistencia específica, el desencadenamiento de la infección está determinado por la interacción gen por gen entre pares de genes dominantes de avirulencia (*Avr*) en el patógeno y de resistencia (*Rps*) en el hospedante (De Witt, 1992; Keen, 1990). Cuando los genes de avirulencia del patógeno son específicos con respecto a los de resistencia en el hospedante (por ejemplo *Avr1a* y *Rps1a*), la reacción es incompatible y la planta se comporta como resistente. De lo contrario, la reacción es compatible y la infección es exitosa (Tyler *et al.*, 1995).

Existen 13 alelos de resistencia *Rps* en 7 loci: *Rps* 1 con 5 alelos: *Rps* 1a, *Rps* 1b, *Rps* 1c, *Rps* 1d y *Rps* 1k (Bernard *et al.*, 1957); *Rps* 2 (Kilen *et al.*, 1974); *Rps* 3 con los 3 alelos: *Rps* 3a, *Rps* 3b y *Rps* 3c (Mueller *et al.*, 1978); *Rps* 4 (Athow *et al.*, 1980); *Rps* 5 (Buzzell y Anderson, 1981); *Rps* 6 (Athow y Laviolette, 1982) y *Rps* 7 (Anderson y Buzzell, 1992). En los últimos años se intensificó la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia en germoplasma de China y Corea del Sur (Kyle *et al.*, 1998; Lohnes *et al.*, 1996, Dorrance y Schmitthenner, 2000). En 2003 se detectó un nuevo locus resistente en una introducción de Corea del Sur, al que se denominó *Rps* 8 (Burnham *et al.*, 2003), lo cual determina que el número total de alelos de resistencia ascienda actualmente a 14 en 8 loci.

Este tipo de resistencia específica o monogénica, es durable a pesar de su estrecha base genética, debido a la naturaleza de las enfermedades causadas por hongos de suelo, dinámica de la infección, producción de inóculo y diseminación

limitada en el medio edáfico. La duración de este tipo de resistencia para esta enfermedad es de 8 a 15 años en promedio para cada alelo (Schmitthenner, 1985).

Respecto a los genes de avirulencia del patógeno, que interactúan con los Rps en las reacciones de resistencia específica, Shan et al (2004) lograron clonar recientemente el locus Avr1b, y detectaron que en realidad tiene 2 genes a los que denominaron Avr1b-1 y Avr1b-2, los cuales determinan avirulencia sobre cultivares de soja con el gen Rps1b. Avr1b-1 determina la formación de ARNm que codifica una pequeña proteína la cual desencadena una reacción de hipersensibilidad. Esta proteína por sí sola, aún sintetizada por una levadura (*Pichia pastoris*), es capaz de desencadenar la reacción en cultivares resistentes. Experimentos posteriores de los mismos autores detectaron la presencia de otro gen al que denominaron Avr1b-2 requerido para la acumulación de mRNA codificado por Avr1b-1. Los mismos investigadores descubrieron que el gen Avr1k, que determina avirulencia en cultivares de soja con el gen de resistencia Rps1k, fue mapeado en el mismo intervalo que el Avr1-b.

La resistencia específica está basada principalmente en la producción de fitoalexinas (gliceolina) cuando los cultivares se enfrentan a razas del patógeno a las cuales son resistentes (Hahn et al, 1984; Schmitthenner y Walker, 1979). Sin embargo, hay otros mecanismos, como la deposición de callosa en las raíces, que pueden estar involucrados en la reacción de resistencia (Ebel y Grisebach, 1988). La acumulación de gliceolinas no se ha relacionado, en cambio, con la tolerancia (Olah et al, 1985).

La resistencia general, de campo, cuantitativa (o tolerancia según Dorrance, 2004) es altamente heredable, efectiva para todas las razas del patógeno y más duradera que la resistencia específica (Buzzell y Anderson, 1982; Schmitthenner, 1985; Tooley y Grau, 1982; Walker y Schmitthenner, 1984). Reduce la tasa de infección a través de sus diversos componentes: menor número de sitios de infección, lesiones menos extendidas, mayor período de latencia, menor formación de esporas y menor



tasa de colonización de los tejidos. Este último elemento es el principal responsable de la tolerancia a *P. sojae* (Parlevliet, 1979; Tooley y Grau 1982, 1984a, 1984b). Los genotipos son susceptibles al patógeno pero hay escasa o nula pérdida de rendimiento (St. Martin *et al*, 1994). Las desventajas de este tipo de resistencia a *P. sojae* son: susceptibilidad al damping-off (Schmitthenner y Walker, 1979) y pérdidas sustanciales de rendimiento en presencia de alta densidad de inóculo en condiciones climáticas y edáficas favorables para el patógeno y monocultivo de soja en siembra directa (Dorrance, 2003). En condiciones favorables para el patógeno se registraron diferencias de rendimiento con respecto a la resistencia específica de hasta alrededor de 25% (Schmitthenner, 1985).

La combinación de la selección por resistencia parcial o de campo, con la incorporación de genes *Rps*, es decir la utilización conjunta de ambos tipos de resistencia se propone como óptima para el control de la enfermedad (Buzzell y Anderson, 1982).

## **VII. VARIABILIDAD PATOGENICA: RAZAS FISIOLÓGICAS**

Existen más de 45 razas fisiológicas o patotipos de *P. sojae* que difieren en su capacidad de infectar cultivares con los distintos genes *Rps*. Las razas se determinan a través de la inoculación de líneas diferenciales de soja conteniendo los genes de resistencia *Rps*. Los alelos más utilizados en la determinación de razas son: *Rps* 1a, *Rps* 1b, *Rps* 1c, *Rps* 1d, *Rps* 1k, *Rps* 3a, *Rps* 6 y *Rps* 7. La inoculación se realiza a través de la inserción de un macerado de micelio y oosporas en una herida practicada en el hipocótilo. Entre 2 y 5 días después de la inoculación se registra la reacción como resistente o susceptible. En el primer caso se produce una reacción de hipersensibilidad

y cicatrización de la herida causada por la inoculación. En los cultivares susceptibles se produce el colapso y la muerte de las plántulas.

Los estudios sobre razas fisiológicas de *P. sojae* se inician en la década del 50 en Indiana, Ohio y Carolina del Norte con la identificación del gen de resistencia *Rps1* y su incorporación a cultivares comerciales (Harosoy 63 y Amsoy 71). Nuevos genes de resistencia *Rps* fueron incorporándose a medida que se fue quebrando la resistencia de los ya conocidos por la aparición de nuevos patotipos. Por ejemplo, en una prospección entre 1978 y 1980 en la misma región se detectaron como prevalentes las razas 3, 7 y 9. En 1991 además de éstas se detectaron 18 razas, todas virulentas sobre el gen *Rps* 1k, el cual había resultado efectivo desde su introducción en programas de mejoramiento en 1981 (Schmitthenner *et al*, 1994).

Algunos patotipos cuya virulencia no coincide exactamente con la descrita para determinada raza se designan actualmente por su fórmula de virulencia, la cual indica sobre cuales genes *Rps* son virulentos. En el cuadro 1 se detalla la fórmula de virulencia de las razas 1 a 45. En algunos casos los autores han utilizado genes adicionales en las determinaciones, además de los 8 tradicionales, especificados en el mismo cuadro.

En Argentina, la primera raza identificada fue la 1, a partir de 46 aislamientos de plantas y suelos obtenidos en el período 1989-1992 en la zona de Pergamino, provincia de Buenos Aires (Barreto *et al*, 1995). En 1996 fue detectada la raza 4 a partir de suelos (Barreto *et al*, 1997). El 75 % de los aislamientos obtenidos entre 1993 y 1997 de la Región Pampeana correspondió a la raza 1, un aislamiento de la localidad Los Molinos, provincia de Santa Fe a la raza 4 y el 24 % diversas fórmulas de virulencia que impidieron categorizarlos en razas conocidas (Barreto *et al*, 1998). Posteriormente, en la campaña 1997-1998, el 53% de los aislamientos correspondieron a la raza 1 del patógeno (Gally *et al*, 1999).

**Cuadro1.** Fórmulas de virulencia correspondientes a 45 razas fisiológicas, caracterizadas sobre 8 genes de resistencia Rps, incluyendo 5 adicionales en algunos casos.

Raza	Fórmula de virulencia sobre 8 genes Rps: 1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a, 6 y 7	Virulencia sobre genes Rps adicionales: 2, 3b, 3c, 4 y 5
1 <sup>a</sup>	7	
2 <sup>a</sup>	1b, 7	
3 <sup>a</sup>	1a, 7	
4 <sup>a</sup>	1a,1c, 7	
5 <sup>a</sup>	1a,1c, 6, 7	
6 <sup>a</sup>	1a,1d, 3a, 6, 7	
7 <sup>a</sup>	1a, 3a, 6,7	
8 <sup>a</sup>	1a,1d, 6, 7	
9 <sup>a</sup>	1a, 6, 7	
10 <sup>a</sup>	1b, 3a, 7	
11 <sup>a</sup>	1b, 6, 7	
12 <sup>a</sup>	1a,1b,1c,1d,1k, 3a	
13 <sup>a</sup>	6, 7	
14 <sup>a</sup>	1c, 7	
15 <sup>a</sup>	3a, 7	
16 <sup>a</sup>	1b,1c,1k	
17 <sup>a</sup>	1b, 1d, 3a, 7	
18 <sup>a</sup>	1c	
19 <sup>a</sup>	1a,1b,1c,1d,1k, 3a	
20 <sup>a</sup>	1a,1b,1c,1k, 3a, 7	
21 <sup>a</sup>	1a, 3a, 7	
22 <sup>a</sup>	1a, 1c, 3a, 6, 7	4, 5
23 <sup>a</sup>	1a,1b, 6, 7	
24 <sup>a</sup>	1b, 3a, 6, 7	
25 <sup>a</sup>	1a,1b,1c,1k, 7	
26 <sup>b</sup>	1b,1d, 3a, 6, 7	
27 <sup>c</sup>	1b,1c,1k, 3a, 6, 7	
28 <sup>d</sup>	1a,1b,1k, 7	

---

29 <sup>d</sup>	1a,1b,1k, 6, 7	
30 <sup>d</sup>	1a,1b,1k, 3a, 6, 7	
31 <sup>d</sup>	1b,1c,1d,1k, 6, 7	
32 <sup>d</sup>	1b,1k, 6, 7	
33 <sup>e</sup>	1a,1b,1c,1d,1k	5
34 <sup>e</sup>	1a,1k, 7	
35 <sup>f</sup>	1a,1b,1c,1d,1k	2, 3b, 5
36 <sup>f</sup>	3a, 6	
37 <sup>f</sup>	1a, 1c, 3a, 7	3b, 3c, 4, 5
38 <sup>g</sup>	1a,1b,1c,1d,1k, 3a, 6, 7	
39 <sup>g</sup>	1a,1b,1c,1k, 3a, 6, 7	
40 <sup>h</sup>	1a,1c,1d,1k, 7	
41 <sup>e</sup>	1a,1b,1d,1k, 7	
42 <sup>e</sup>	1a,1d,3a,7	
43 <sup>e</sup>	1a,1c,1d,7	
44 <sup>e</sup>	1a,1d, 7	
45 <sup>e</sup>	1a,1b,1c,1k, 6, 7	

---

<sup>a</sup> Ward, E.W.B, 1990.

<sup>b</sup> Keeling (no publicado), en Hartman *et al*, 1999.

<sup>c</sup> Wagner, R.E. y Wilkinson, H.T. 1992.

<sup>d</sup> Schmitthenner *et al*, 1994.

<sup>E</sup> Abney *et al*, 1997.

<sup>f</sup> Forster *et al*, 1994.

<sup>g</sup> Henry, R.N. y Kirkpatrick, T.L., 1995.

<sup>h</sup> Yang *et al*, 1996.

Fuente: Hartman *et al*, 1999.

## VIII. DINAMICA POBLACIONAL

Las poblaciones de patógenos evolucionan adaptándose a cambios en el medio ambiente, los cuales son constantes en el caso de las plantas cultivadas: nuevas variedades resistentes, rotación de cultivos, irrigación, aplicación de fungicidas y fertilizantes, etc. Los diversos sistemas de cultivo imponen una selección fuertemente dirigida y las estrategias de control deben orientarse a una población y no a un individuo si pretenden ser efectivas. Existe un gran reservorio de diversidad genética en las poblaciones de *P. sojae*, sin embargo no se sabe exactamente como fue originada (Forster *et al*, 1994). Entre los factores que contribuyen a los cambios genéticos dentro de las poblaciones, los principales son: mutación, sistemas de apareamiento (mating systems), deriva de genes, migración y selección (Mc Donald, 1997).

La mutación representa la fuente primaria de variación. Por ejemplo, en *Phytophthora infestans* se detectaron un número considerable de mutaciones tanto en ADN nuclear como mitocondrial, a partir del linaje clonal US-1 (Goodwin *et al*, 1994 y 1995). En *P. sojae* se detectaron altas tasas de cambio debido a mutaciones. Por ejemplo a partir de aislamientos de USA que tenían el mismo patrón genético (detectado con RFLP) pudieron diferenciarse 7 razas, 6 de las cuales probablemente derivaron de la raza 1 por mutaciones (Forster *et al*, 1994). El 95% de 85 aislamientos australianos presentaron el mismo RFLP y es probable que sean descendientes clonales de una introducción ocurrida a fines de la década del 70. Si bien la raza 1 fue aparentemente el fenotipo inicial, surgieron 4 nuevas razas probablemente por mutación y selección luego de la migración del clon a Australia (Drenth *et al.*, 1995).

La migración representa una fuerte fuerza evolucionaria que tiene un efecto notorio sobre las poblaciones de diversas especies de *Phytophthora* (Goodwin, 1997). La incorporación de genes por migración solo es efectiva cuando los individuos migrantes se establecen y reproducen en la nueva población. El efecto que producen esos nuevos genes depende del grado de diferenciación entre las poblaciones. Cuando

la migración se produce hacia territorios previamente no ocupados, la población que migra se denomina fundacional, y como generalmente su base genética es estrecha, la deriva génica suele ser importante. Por este motivo la estructura genética de las poblaciones fundacionales es generalmente muy diferente de la población original, fuente inicial de la migración (Goodwin, 1997).

La dispersión a grandes distancias de distintas especies de *Phytophthora* se realiza principalmente a través plantas infectadas o partes de las mismas. Las oosporas resisten condiciones extremas y permanecen viables en tejidos secos y suelo.

La migración de *P. infestans*, especie heterotálica causante del tizón tardío de la papa, ha sido objeto de diversas investigaciones. Originaria de México, es llevada a Estados Unidos mediante el transporte de tubérculos, y de allí en 1844-1845 a Europa, por la introducción de un solo clon proveniente de Estados Unidos (Goodwin *et al*, 1994). La primera aparición de la enfermedad en Estados Unidos y Europa fue en forma de focos puntuales debido a que el “pool” genético de la migración inicial fue pequeño (Bourke, 1964). Además, al introducirse un solo tipo de apareamiento: A1, se imposibilitó la reproducción sexual del patógeno. Sin embargo, debido a que los cultivares de papa utilizados en esa época eran muy susceptibles y a las características de la reproducción asexual de este oomycete (principalmente breve período de latencia y facilidad de dispersión de los esporangios a través del aire), es probable que las epidemias causantes de la hambruna en Irlanda hayan sido originadas por la migración de ese único clon desde Estados Unidos (Goodwin, 1997). De Europa pasó a Africa, Asia y América del Sur (Cox *et al*, 1960). A fines de la década del 70 se produce una nueva migración de Estados Unidos a Europa, y en 1981 se detecta la introducción de genotipos con tipo de apareamiento A2 (Hohl *et al*, 1984), lo cual determina la aparición de recombinantes sexuales (Drenth *et al*, 1993 y 1994; Sujkowski *et al*, 1994).

Las especies homotálicas de *Phytophthora*, por ejemplo *P. sojae*, están particularmente adaptadas al transporte en tejido hospedante. Este patógeno no presenta las posibilidades de dispersión aérea ni las características epidemiológicas del causante del tizón tardío de la papa, ya que su dispersión es en el suelo y generalmente la enfermedad se comporta como monocíclica. Sin embargo las introducciones tienen garantizada la reproducción sexual del oomycete y las oosporas pueden formarse en cualquier tejido susceptible infectado, aún en tejidos resistentes. Poco se conoce de la migración de *P. sojae* a partir de su probable centro de origen: Estados Unidos, a excepción de las investigaciones realizadas en Australia (Drenth *et al*, 1995).

Recombinación sexual. Las especies de *Phytophthora* son homotálicas o heterotálicas. Estas últimas requieren la interacción de cepas de dos tipos de apareamiento para el inicio de la reproducción sexual. *P. sojae* es una especie homotálica. La autocompatibilidad determina el aumento progresivo de homocigosis en la población. Una población autofértil establecida durante varias generaciones en un territorio debería ser prácticamente homocigota (Goodwin, 1997). Sin embargo algunas investigaciones indicaron la posibilidad de cruzamientos *in vitro*, aunque bajos (alrededor de 5%), entre cepas de *P. sojae* de distinta virulencia, que determinaron la aparición de recombinantes (Bhat y Schmitthenner, 1993; Tyler *et al*, 1995; Whisson *et al*, 1994). En condiciones de campo la recombinación sexual podría jugar un rol importante en la geneación y mantenimiento de la diversidad genética de este patógeno (Whisson *et al*, 1994). Además, May *et al* (2003) lograron obtener híbridos interespecíficos a partir del cruzamiento entre *P. sojae* y *P. vignae*, otra especie homotálica. Las cepas resultantes inoculadas en los hospedantes naturales, soja y garbanzo, fueron patogénicas pero su virulencia menor que la de las parentales. No hay datos del alcance de estos procesos en condiciones naturales.

Recombinación parasexual y heterocariosis. Hay evidencias de recombinación parasexual *in vitro*, tanto para *P. sojae* como para algunas especies heterotálicas

(Lucas *et al*, 1990; Shattock y Shaw, 1976). Long y Keen (1977) lograron generar heterocariontes a través del cultivo dual de mutantes auxotróficos complementarios, y demostraron la segregación de la progenie sexual. Sin embargo su frecuencia de formación fue muy baja. Layton y Khun (1988a y b) lograron la formación de heterocariontes de dos razas diferentes de *P. sojae* a través de la fusión de protoplastos. Además comprobaron la formación de heterocariontes en la planta de soja inoculada con 2 razas diferentes (Layton y Khun, 1989).

Los principales eventos de la recombinación parasexual: formación de heterocariontes, cariogamia de heterocariontes, crossing-over mitótico, y pérdida de cromosomas extra, ocurren raramente en la naturaleza, aún en organismos haploides en los que estos procesos fueron detectados por primera vez y en los que se estimó que el crossing over mitótico es de 500 a 1000 veces menos frecuente que el meiótico (Pontecorvo, 1956). En consecuencia los procesos parasexuales no explicarían la mayor parte de los cambios observados en las poblaciones de *Phytophthora*, que se atribuirían principalmente a mutaciones (Goodwin, 1997). Sin embargo, en algunos hongos fitopatógenos, una ínfima proporción de recombinación asexual, puede tener efectos significativos en la estructura de la población (Milgroom, 1995; Zeigler *at al*, 1997; Kohli y Khon, 1998).

La deriva genética es el cambio al azar de las frecuencias alélicas en una población de una generación a otra. En poblaciones de *Phytophthora* se debe principalmente a dos causas: reducciones estacionales del tamaño de la población patogénica debido a condiciones ambientales desfavorables, y a efectos fundacionales de la migración (Goodwin, 1997). Una vez que el patógeno se ha establecido y se reproduce en el destino de la migración, las fluctuaciones estacionales parecen ser la principal causa de la deriva. La reducción de la población se acentúa en períodos en que el hospedante cultivado no está presente, lo cual es más acentuado en patógenos de cultivos anuales, como *P. sojae*. Sin embargo, *P. sojae* tiene la ventaja de poder sobrevivir como oospora en restos de tejidos en el campo, o en el suelo, sin necesidad



de requerir la presencia de otros clones, ya que es homotálico. No obstante, la duración del período de rotaciones y el sistema de labranza utilizado influyen en la densidad poblacional. Por ejemplo, rotaciones cortas (de 2 años) o siembra directa (permanencia de los restos del cultivo anterior en la superficie del suelo) producirían un incremento de la población frente a las condiciones contrarias (rotaciones largas y roturado del suelo).

Selección. El destino de los genes nuevos que son introducidos por migración o mutación en una población depende principalmente de la selección. Si las variantes introducidas presentan alta adaptabilidad, su frecuencia aumentará notablemente, mientras que si su adaptabilidad es baja tenderán a desaparecer (Goodwin, 1997). Este proceso se acentúa en los patosistemas que involucran especies cultivadas, debido principalmente a la implementación de sistemas de control basados en resistencia genética específica. En el caso de *P. sojae*, el desarrollo de cultivares resistentes determina una fuerte presión de selección sobre la población del Oomycete que conduce a cambios abruptos en la misma. La presencia de cultivares con genes de resistencia *Rps* genera presión selectiva a favor de nuevas razas del patógeno que han perdido los correspondientes genes *Avr* de avirulencia ya sea por deleciones parciales o totales (Lauge y De Wit 1999; Orbach *et al.* 2000) o mutaciones puntuales (Joosten *et al.* 1994). La evolución de las poblaciones del patógeno en el mundo, ha respondido a la incorporación de nuevos genes *Rps* en los cultivares comerciales. En Australia, desde la detección inicial de la raza 1 en 1979 (Pegg *et al.*, 1980) y la 15 en 1980, no se detectaron nuevas razas hasta 1990 en que se aisló la 4, posiblemente en respuesta a la gran dispersión de 2 cultivares resistentes a las razas 1 y 15 (Drenth *et al.*, 1996). Análisis moleculares a través de RFLP detectaron muy bajo nivel de variabilidad entre aislamientos australianos obtenidos entre 1979 y 1993, y entre éstos y aislamientos de Estados Unidos, lo cual indicaría el bajo nivel de variación inicial de la población fundacional de *P. sojae* en Australia, producto de una migración de Estados Unidos (Drenth *et al.*, 1995).

## **IX. EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE POBLACIONES DE HONGOS Y OOMYCETES FITOPATÓGENOS**

El desarrollo de técnicas moleculares, basadas en el polimorfismo de proteínas y ácidos nucleicos, ha facilitado la investigación en gran variedad de disciplinas incluidas la fitopatología y la micología. Durante los primeros años, el uso de aloenzimas fue la metodología más difundida. En los últimos años la atención se ha focalizado en la molécula de ADN, sobre todo para estudios de diversidad genética y relación entre organismos, para lo cual se aplican técnicas basadas principalmente en dos estrategias: hibridación ó amplificación de determinados fragmentos de ADN (Weising *et al*, 1995).

Los métodos que se basan en la hibridación involucran el corte del ADN genómico con enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos resultantes por tamaño, y la hibridación con una sonda con una secuencia complementaria de ADN conocida, la cual permite detectar polimorfismos. La técnica de hibridación más utilizada basada en esta metodología es la de RFLP (“restriction fragment length polymorphisms”). Las muestras de ADN son digeridas con una endonucleasa y los fragmentos separados por electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa, previa tinción con un pigmento ADN-específico (bromuro de etidio).

Los métodos basados en la amplificación de ADN se basan en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (“polimerase chain reaction”). Involucran la amplificación, mediante el uso de una polimerasa termoestable, de determinadas secuencias de nucleótidos seleccionadas por la utilización de “primers” (oligonucleótidos) específicos o generales, la subsecuente separación electroforética de los fragmentos amplificados por tamaño y la observación de polimorfismos en geles a través de la tinción de los mismos.

Para ambas estrategias hay numerosas variantes técnicas, con diferentes niveles de complejidad y costos.

Los métodos moleculares se aplican en Fitopatología principalmente en el diagnóstico y en estudios poblacionales de patógenos.

En Oomycetes fitopatógenos hay varios ejemplos de utilización de técnicas moleculares. Panabieres *et al* (1989) utilizaron RFLP para diferenciar especies de *Phytophthora*. La especie más estudiada es probablemente *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío de la papa y el tomate, acerca de la cual se han encarado diversos estudios moleculares orientados principalmente al tipo de apareamiento (es una especie heterotálica), la diversidad genética y la dinámica de poblaciones. En este último aspecto, Goodwin *et al* (1994) analizaron la variabilidad genética de más de 300 aislamientos de *P. infestans* de 20 países y determinaron que un solo linaje clonal domina la mayoría de las poblaciones del mundo, y que la mayor parte de las variaciones surgieron por mutación o recombinación mitótica.

*P. sojae* se consideró durante muchos años como integrante del complejo *P. megasperma*, compuesto en su totalidad por especies homotálicas y con características morfológicas similares, excepto algunas leves diferencias en el tamaño de las oosporas (Hansen y Hamm, 1983). Anteriormente a la aplicación de métodos moleculares las especies del complejo se diferenciaron por su rango de hospedantes y se caracterizaron como variedades o formas especiales (Kuan y Erwin, 1980; Pratt, 1981; Irwin y Dale, 1982). Los primeros estudios isoenzimáticos permitieron establecer diferencias entre las variedades (Elliott y Maxwell, 1984). Hansen *et al* (1986), lograron diferenciar seis grupos en relación a la patogenicidad y los patrones de bandas proteicas. *P. megasperma* f.sp. *glycinea* correspondió al grupo SOY, patógeno específico de *Glycine max* (soja), y el de mayor especificidad del grupo. Los primeros estudios de ADN en *P. megasperma* se realizaron a través de RFLP de ADN

mitocondrial de cepas aisladas de soja, alfalfa, cerezo y manzano, y permitieron diferenciar tres especies de *Phytophthora* previamente consideradas formas especiales de *P. megasperma*: *P. sojae*, *P. medicaginis* y *P. trifolii* (Forster *et al.*, 1987; Hansen y Maxwell, 1991). Investigaciones posteriores sobre *P. sojae* se concentraron en la variación intraespecífica y en la comparación de poblaciones de orígenes diversos. Whisson *et al.* (1992) utilizaron sondas al azar de *P. sojae* para estudiar la relación genética entre 5 aislamientos de Australia y 5 de Estados Unidos. Se identificaron dos sondas con alta capacidad de diagnóstico multilocus (fingerprinting). La alta diversidad obtenida en los aislamientos de Estados Unidos y la estrecha relación de este grupo con el de los aislamientos australianos condujeron a los autores a sugerir que los australianos derivan de una introducción desde los Estados Unidos. Una caracterización posterior de 84 aislamientos de Australia y 15 de Estados Unidos por su virulencia y por RFLP permitió nuevamente inferir que la población de *P. sojae* de Australia se estableció a partir de una introducción de Estados Unidos y que las nuevas razas surgieron por mutación (Drenth *et al.*, 1995). Meng *et al.* (1999) analizaron la patogenicidad y la variación genética entre aislamientos del patógeno de Estados Unidos obtenidos durante 1994 y 1995, a través de la técnica de RAPD.

## **X. LA TÉCNICA DE RAPD (Random amplified polymorphic DNA)**

A partir del revolucionario desarrollo de la técnica de PCR por Saiki *et al.* (1988) surgieron diversas variantes basadas en la amplificación de ADN. Una de ellas consiste en la amplificación al azar de segmentos de ADN polimórficos (RAPDs) a partir de “primers” cortos de secuencia arbitraria. Este método fue desarrollado a principios de la década de los 90 por Williams *et al.* (1990) y Welsh y Mc Clelland (1990).

RAPD es un método altamente sensible para detectar polimorfismos distribuidos azarosamente en el genoma, es por eso que se aplico generalmente a estudios intraespecíficos o de especies emparentadas.

## **X.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA**

La técnica de RAPD se basa en la de PCR tradicional, diferenciándose de ella en las características de los “primers” o cebadores que son utilizados.

Los pasos de la técnica, al igual que para PCR, comprenden básicamente la desnaturalización del ADN, con la consiguiente apertura de las cadenas del ácido nucleico; la hibridación (“annealing”) del primer o iniciador a la secuencia complementaria en distintos lugares de la cadena de ADN molde, y la elongación del tramo seleccionado por el primer, es decir de aquellos segmentos de ADN en los que las secuencias complementarias al primer se encuentren a una distancia que pueda ser amplificada por PCR (entre 100 y 1300 pares de bases aproximadamente). En esta etapa actúa una enzima termoestable (Taq polimerasa) ya que la temperatura óptima del proceso es de 72°C. Los desoxirribonucleótidos trifosfato se unen al extremo 3' del primer y el fragmento comprendido entre los extremos 5' de ambos iniciadores es completamente duplicado.

Este ciclo de 3 pasos es repetido de 25 a 50 veces y resulta en la amplificación exponencial de los fragmentos de ADN duplicados.

En el caso de la PCR se utilizan 2 “primers” específicos para el ADN a investigar, o al menos con alto grado de especificidad. En el caso de RAPD se utiliza un solo primer por vez, el cual es un oligonucleótido no específico, de aproximadamente 10 pares de bases de cualquier secuencia. Los “primers” no deben hibridar consigo mismos y deben tener un 50 % de bases guanina (G) y citosina (C), para soportar la temperatura de desnaturalización.

Los productos de la amplificación se resuelven en geles de agarosa o policrilamida a los cuales se les agrega bromuro de etidio para posibilitar su visualización con luz ultravioleta. Se obtiene un patrón de bandas para cada primer y para cada individuo analizado. La presencia o ausencia de bandas (por falta de hibridación del primer por ejemplo por una mutación) será interpretada como un polimorfismo.

Los polimorfismos detectados a través de RAPDs pueden ser resultado de varios tipos de eventos (Weising *et al*, 1994):

- la inserción de un segmento de ADN entre los dos sitios de pegado del primer puede resultar en que el segmento sea muy largo y no sea amplificado.
- La delección de un fragmento de ADN que comprende uno de los sitios de hibridación.
- La sustitución de un nucleótido puede afectar la hibridación.
- La delección o inserción de un fragmento de ADN entre los sitios de hibridación puede resultar en un cambio en la longitud del segmento amplificado.

Es raro encontrar cambios en la longitud, generalmente las diferencias se deben a presencia o ausencia de una banda para cada uno de los alelos. Esta distribución es típicamente dominante y basta con que el fragmento esté en uno de los alelos para que se amplifique (Weising *et al*, 1994). Williams *et al* (1990) y Fritsch y Rieseberg (1992) encontraron que el 95% de las bandas generadas por RAPDs se comportan como marcadores dominantes, y el 5% restante como codominantes (pueden distinguirse los dos alelos del heterocigota). Echt *et al* (1992) no encontraron codominancia.

Las principales desventajas de la técnica de RAPD son:

- Falta de repetibilidad. Diversos factores pueden influir en la obtención de patrones consistentes y fácilmente reproducibles, por ejemplo la concentración y pureza del ADN, la concentración de cloruro de magnesio, los nucleótidos, los “primers”, las temperaturas de los diferentes procesos, y las características del termociclador (Ellsworth *et al.*, 1993; Penner *et al.* 1993). En los últimos años, la estandarización de reacciones ha mejorado la repetibilidad de los resultados (Backman, 1997).

- Herencia dominante. Esta característica de los marcadores RAPD impide distinguir los individuos homocigotas de los heterocigotas, lo cual proporciona menor información que los marcadores codominantes.

Las grandes ventajas de esta técnica se basan principalmente en:

- Utiliza pequeñas cantidades de ADN
- No requiere tecnología sofisticada.
- No es necesaria información previa de la secuencia de ADN a analizar.
- Un gran número de loci pueden ser muestreados de manera rápida.
- Relativamente poco costosa.

## **X.2. EMPLEO DE LA TECNICA DE RAPD EN ESTUDIOS POBLACIONALES Y TAXONÓMICOS DE HONGOS Y OOMYCETES.**

La técnica de RAPDs se ha utilizado en los últimos años para estudios poblacionales, intraespecíficos o de especies emparentadas, de hongos y oomycetes

fitopatógenos. La capacidad de detectar variabilidad aún dentro de categorías inferiores a especie, tales como variedad o forma especial ha determinado la difusión de la aplicación de esta metodología.

Diversas especies del género *Colletotrichum*, causantes de antracnosis en numerosos hospedantes, han sido estudiadas a través de RAPD. Mills *et al.*(1992) estudiaron la variación molecular de una colección de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Encontraron variación aún entre aislamientos de un mismo hospedante, logrando en algunos casos establecer grupos relacionados con el origen geográfico y el hospedante. Valliancourt y Hanau (1992) lograron distinguir aislamientos de *Colletotrichum graminicola* de dos formas especiales, asociadas a maíz y sorgo. Sicard *et al* (1997) aplicaron la técnica de RAPD en combinación con pruebas de virulencia sobre cultivares diferenciales, al estudio de aislamientos de *C. lindemuthianum* aislados de poroto originarios de México, Perú y Argentina y determinaron que las poblaciones de los dos últimos países derivan de las mexicanas.

Wolfe *et al.* (1992) encontraron variabilidad a través de RAPDs, aún dentro de la categoría de forma especial en el hongo causante del oidio de la cebada: *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, y utilizando solamente tres “primers”. También se uso esta metodología para el estudio poblacional de *Uncinula necator*, causante del oidio de la vid, y se obtuvieron agrupamientos de cepas relacionados con el origen geográfico de las mismas, lo cual permitió sugerir a los autores un estrecho rango de diseminación del patógeno (Délye *et al.*, 1995).

También se distinguieron con esta metodología diferentes patrones genéticos entre aislamientos de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* relacionados con el tipo de apareamiento de las cepas (Crowhurst *et al*, 1991). Grajal-Martin *et al* (1993) utilizaron esta metodología para caracterizar razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* y encontraron alta variabilidad aún dentro de cada raza.



Voigt *et al* (1995) lograron diferenciar a través de RAPD *Fusarium moniliforme* (estado perfecto *Giberella fujikuroi*), causante de una importante enfermedad en arroz, de otros *Fusarium* de la sección *Liseola*. Asimismo diferenciaron grupos intraespecíficos relacionados con el tipo de apareamiento de las cepas.

Pioli *et al* (2002) estudiaron enfermedades de la soja causadas por el complejo de hongos *Diaporthe-Phomopsis* en Argentina. Distinguieron a través de RAPD y estudios morfológicos cuatro grupos correspondientes a *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, ambas causantes del cancro del tallo; *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* y *Phomopsis longicolla*, causantes de tizón de tallos y vainas y podredumbre de semillas. Además, encontraron diferencias entre aislamientos de cada variedad aún solo con el uso de dos “primers” que generaron bandas reproducibles.

Diversos estudios han utilizado la técnica de RAPD en varias especies del género *Phytophthora*.

*Phytophthora infestans* es una de las especies del género a la cual más se han aplicado los marcadores RAPD para el estudio de poblaciones. Punja *et al.* (1998) encontraron alto nivel de diversidad en la especie entre aislamientos de British Columbia, Canadá, posteriormente corroborada por Mahuku *et al.* (2000) a través de la misma técnica. Daayf *et al.* (2001) lograron distinguir los tipos de apareamiento A1 y A2 entre cepas de Canadá y detectar variabilidad aun dentro de cada grupo. Peters *et al.* (2001) analizaron a través de esta técnica nuevas poblaciones emergentes en Canadá *a posteriori* de la introducción del tipo de apareamiento A2. Carlisle *et al.* (2001) determinaron escasa variabilidad entre aislamientos de Irlanda del Norte, los cuales se diferenciaron de los de Gran Bretaña y los de Europa continental. La variación genética de la descendencia asexual de dos cepas de *Phytophthora infestans* fue analizada por RAPD y AFLP (amplified fragment length polymorphisms) encontrándose un nivel

considerable de variabilidad genética inherente derivada de una sola capa parental (EISamen *et al.*, 2003).

Faleiro *et al.* (2004) caracterizaron la variabilidad genética de *P. capsici*, *P. citrophthora* y *P. palmivora*, causantes de podredumbre parda del cacao. Lograron diferenciar las tres especies y validaron el uso de la técnica como una herramienta para el estudio de la diversidad genética intraespecífica. Asimismo se utilizó RAPD como herramienta adicional, además de características morfológicas y culturales, para diferenciar tres especies de *Phytophthora* causantes de podredumbre de la base del tomate: *P. capsici*, *P. cryptogea* y *P. nicotianae* en el sur de Italia (Panne *et al.*, 2000). La técnica se aplicó además en estudios poblacionales de otras especies de *Phytophthora* tales como *P. parasitica* var. *nicotianae*, patógeno de tabaco (Luo Wen Fu *et al.*, 2000), *P. megakarya* en cacao (Nyasse *et al.*, 1999), *P. quercina* en roble (Jung *et al.*, 1999), *Phytophthora cinnamomi* de diversos hospedantes (Linde *et al.*, 1999), y *P. nicotianae* var. *parasitica*, *P. capsici*, *P. palmivora* and *P. meadii*, de caucho y cítricos (Zheng y Ward, 1998).

En relación al complejo *P. megasperma*, Whisson *et al.* (1993) utilizaron RAPD conjuntamente con otras técnicas moleculares para establecer las relaciones genéticas entre *P. megasperma* f.sp. *glycinea*, *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* y *P. megasperma* f. sp. *trifolii* y *P. vignae*, y concluyeron que representan especies diferentes.

El uso de RAPD ha permitido además confirmar la recombinación sexual in vitro de dos cepas de *P. sojae* y estudiar la segregación de los genes de avirulencia en la descendencia (Whisson *et al.*, 1994).

Meng *et al.* (1999) estudiaron poblaciones de *P. sojae* de Indiana, Iowa y Minnesota a través de la determinación de las razas y el uso de marcadores RAPD. Distinguieron 4 grupos de aislamientos y encontraron variación genética dentro de las diferentes razas, pero no pudieron establecer relación entre los grupos y el origen geográfico de las cepas. Wang *et al.* (2003) analizaron la diversidad genética de

aislamientos de China y de Estados Unidos a través de RAPD, y obtuvieron 12 grupos genéticos.

May *et al* (2003) utilizaron la técnica de RAPD para detectar híbridos interespecíficos entre *P. sojæ* y *P.vignæ*.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Analizar la diversidad genética y patogénica de poblaciones argentinas de *P. sojae*.

### Objetivos específicos

- Aislamiento de *P. sojae* de diversas localidades de la Región Pampeana
- Determinación de la virulencia de los aislamientos
- Análisis molecular de la variabilidad intraespecífica a través de RAPD

## HIPOTESIS

1. *P. sojae* es un patógeno variable actualmente en Argentina.
2. La variabilidad patogénica y genética de *P. sojae* está relacionada con el origen geográfico de las cepas.
3. Es posible estudiar la diversidad genética intraespecífica de *P. sojae* a través de RAPD.

# Materiales y métodos

---

## INTRODUCCIÓN

Entre 1998 y 2001 se realizaron prospecciones en cultivos comerciales y campos experimentales de soja del N de Buenos Aires, S de Santa Fe y SO de Córdoba, con el objetivo de realizar un muestreo de plantas enfermas y suelos para la obtención de aislamientos de *P. sojae*. Dichas prospecciones se realizaron en el marco de los Proyectos UBACyT TG03 “Estrategias de manejo para las enfermedades de mayor difusión actual en los cultivos de soja y cereales de invierno” y AG 063 “Etiología e importancia de las podredumbres de raíz y tallo de la soja, con especial referencia a *Phytophthora sojae*” ambos dirigidos la Ing. Agr. M. Sc. Dora Barreto. Las localidades de los muestreos se detallan en la Figura 5, y están ubicadas en la principal zona de producción de soja del país.

El muestreo se dirigió a lotes con presencia de plantas marchitas en manchones, y con las hojas adheridas los tallos, en los cuales se buscaron plantas adyacentes con síntomas típicos de *P. sojae*.

Además de las cepas aisladas localmente, se incluyeron en este estudio 2 aislamientos de Canadá, uno de Essex (CA1A4) y otro de Ottawa (CA9826), suministrados por el Dr Terry Anderson del Agriculture and Agrifood Research Center, de Ontario.

### I. AISLAMIENTO DE *Phytophthora sojae*

La mayoría de las especies de *Phytophthora* son de difícil aislamiento, debido a su crecimiento lento en medios de cultivo, requerimientos específicos y baja capacidad competitiva con respecto a otros Oomycetes, como especies de *Pythium*, hongos saprófitos y bacterias.

Por los motivos enunciados se requieren técnicas y medios de cultivo especiales para obtener colonias puras de *P. sojae*, tanto a partir de muestras de suelos como de tejidos enfermos.

### **I.1. Aislamiento a partir de suelos**

Se recolectaron muestras de suelo de diversos lotes en sitios con presencia de plantas con síntomas de la enfermedad. Se secaron al aire y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

*P. sojae* fue aislado de las muestras a través del método de plantas trampa o “baiting” (Schmitthenner *et al.*, 1994) modificado por Barreto *et al.* (1995). Se trata de un método indirecto en el que se utilizan plántulas de soja como “trampa” para captar el inóculo presente en el suelo y a partir de las cuales posteriormente es aislado el patógeno.

Se sembraron 6 a 8 semillas de soja de los cultivares Sloan o Williams (susceptibles a todas las razas) en macetas de 10 cm de diámetro conteniendo el suelo supuestamente infestado. Una vez que los cotiledones asomaron sobre la superficie, generalmente 48 horas después de la siembra, se inundaron las macetas colocando en recipientes con agua hasta el nivel de la superficie del suelo. Se mantuvieron inundadas durante 1 a 2 días . Posteriormente se desechó el exceso de agua y se mantuvieron los suelos a capacidad de campo.

Se recolectaron las plántulas emergidas con síntomas de podredumbre basal acuosa y se efectuaron los aislamientos en medio VA con inhibidores (Schmitthenner *et*

al., 1994) en cámara de flujo laminar. Luego se repicaron a cajas de Petri con medio VA sin inhibidores, y posteriormente a tubos en estría para su almacenamiento.

## **I.2. Aislamiento a partir de plantas enfermas**

Se recolectaron plantas vivas con podredumbre en la base del tallo, y con la parte superior del mismo aún verde, y se mantuvieron en recipientes con enfriadores y posteriormente en heladera a 4 - 6 °C.

Para proceder al aislamiento se removió la epidermis del tallo en el margen superior de la zona afectada y se efectuaron cortes radiales de 0,2 a 0,5 cm de tejido vascular, los cuales fueron asépticamente sembrados en cámara de flujo laminar, por debajo del medio de cultivo (VA con inhibidores). La técnica descrita evita la contaminación bacteriana de los cultivos, ya que se forma una burbuja de aire alrededor del trozo sembrado, las hifas atraviesan el medio, mientras, que las bacterias, de escasa multiplicación dentro del agar, quedan dentro de la burbuja.

Los extremos hifales que emergieron sobre la superficie del medio fueron transferidos a cajas con VA sin inhibidores para su purificación y posteriormente a tubos en estría para su almacenamiento.

## **I.3. Medio de cultivo VA**

El medio VA se utilizó como medio basal para el aislamiento, almacenamiento y producción de inóculo para las pruebas de patogenicidad.

### **Composición:**



40 ml de jugo V8  
1 g de sacarosa  
0,6 g de CO<sub>3</sub>Ca  
0,2 g de extracto de levadura  
0,01 g de colesterol  
20 de agar  
1 l de agua bidestilada

Los inhibidores que se agregaron al medio VA para aislar al patógeno fueron:

0,02 g de PCNB (pentacloronitrobenceno)  
0,01 g de cloramfenicol  
0,1 g de sulfato de estreptomicina

## **II. CARACTERIZACIÓN DE VIRULENCIA**

### **II.1. Preparación del inóculo**

Se utilizaron cultivos de *P. sojæ* de 10 a 12 días, crecidos en medio VA semisólido (1,2 % de agar). Para homogeneizar el inóculo los cultivos fueron pasados a través de una jeringa hipodérmica con aguja de 8 mm (Olah *et al.*, 1985).

### **II.2. Crecimiento de las plántulas**

Las semillas fueron pre-germinadas en bandejas de plástico sobre papel de filtro húmedo por 2 días y luego transferidas a macetas de plástico de 10cm de diámetro,

conteniendo una mezcla de suelo fértil y perlita (1:2, v/v), a razón de 10 por maceta. Las plántulas crecieron en una cámara climática con 16 hs de luz y 25-28°C. Las macetas fueron regadas con solución nutritiva Hoagland, 24 horas después del transplante y luego con agua destilada.

### **II.3. Inoculación**

Las plántulas se inocularon en estado fenológico vegetativo cotiledonar, Vc (Fehr y Caviness, 1977) mediante el método de herida al hipocótilo., efectuándose una incisión debajo del nudo cotiledonar sobre la que se colocó 0,1 ml de inóculo (Olah *et al.*, 1985). Luego se cubrieron con bolsas de polietileno transparentes humedecidas durante 24 horas con el fin de mantener la humedad relativa cercana a 100 % durante las primeras etapas de la patogénesis. La temperatura durante todo el período de incubación se mantuvo entre 21°C y 25°C (noche/día).

### **II.4. Evaluación de resultados**

La evaluación de los resultados se realizó de 3 a 5 días después de la inoculación, de acuerdo con la metodología de Anderson y Buzzell (1992).

Se consideraron susceptibles aquellas líneas diferenciales en las que el 70 % o más de plántulas se marchitaron y murieron. Se observó un colapso de los hipocótilos en el nivel de la lesión causada por la inoculación, quedando las plántulas dobladas hacia abajo (Figura 6a y b).

Se clasificaron como resistentes las líneas en las cuales el 70 % o más de plántulas permanecieron vivas, con síntomas de lesión restringida y reacción de hipersensibilidad (Figura 6a).



Figura 5. Zona de muestreo con detalle de las localidades relevadas



**Figura 6. Plántulas de soja inoculadas con *P. sojae* por el método de inyección al hipocótilo. 6a. al frente plantas susceptibles (colapsadas), detrás plantas resistentes. 6b. detalle de lesión en hipocótilo en plántulas inoculadas susceptibles**

## II.5. Líneas diferenciales utilizadas

En el Cuadro 2 se detallan las líneas diferenciales de soja utilizadas con sus respectivos genes de resistencia *Rps*.. Asimismo se indican tres líneas susceptibles universales, con los genes recesivos de resistencia *rps-rps*, usadas indistintamente en las determinaciones.

Todas las líneas diferenciales fueron suministradas por el Dr Terry Anderson del Agriculture and Agrifood Research Center, de Ontario, Canadá, y fueron multiplicadas en la Facultad de Agronomía UBA y en el INTA Castelar. A excepción de la variedad Corsoy 79 que es originaria de Estados Unidos, las demás son de Canadá.

**Cuadro 2.** Líneas diferenciales utilizadas y genes de resistencia correspondientes

Línea diferencial	Gen de resistencia
Haro 12	<i>Rps</i> 1a
Haro13	<i>Rps</i> 1b
Corsoy 79	<i>Rps</i> 1c
Haro 16	<i>Rps</i> 1d
Haro 15	<i>Rps</i> 1k
Haro 3272	<i>Rps</i> 3a
Haro 6272	<i>Rps</i> 6
Harosoy	<i>Rps</i> 7
Williams, Sloan, Haro (1-7)1	<i>rps-rps</i>

## II.6. Tratamiento estadístico de los datos de virulencia

### II.6.1. Construcción de la matriz básica de datos

En la construcción de la matriz básica de datos se utilizaron 8 caracteres correspondientes a los genes *Rps* utilizados para la evaluación de virulencia. Los estados de caracteres se codificaron como 1, en el caso de virulencia y 0 en el caso de avirulencia.

Las unidades taxonómicas operativas (OTUs) estuvieron constituidas por los aislamientos de *Phytophthora sojae*. La matriz básica de datos se confeccionó registrando el estado de cada carácter para cada OTU.

#### **II.6.2. Coeficientes de asociación**

Para el análisis de los datos se utilizó el coeficiente de asociación de Dice (ver detalle en el punto IV.2.5.b.). La matriz de similitud resultante se usó para el análisis de agrupamiento y ordenamiento.

#### **II.6.3. Análisis de agrupamiento, fenograma y coeficiente de correlación cofenética**

En el análisis de la matriz de similitud se utilizó el método de medias aritméticas no ponderadas UPGMA (Unweighted pair-group method using the arithmetic average), a través del programa NTSYS-PC versión 1.8 (Rohlf, 1993) Se obtuvo un fenograma mostrando las relaciones de similitud entre los OTUs, y se calculó el coeficiente de correlación cofenética (ver detalle en punto IV.2.5.c).

#### **II.6.4. Análisis de ordenamiento**

La matriz de similitud se analizó por el método de Coordenadas Principales (Gower, 1966) con el fin de realizar un análisis de ordenamiento a través del programa NTSYS-PC. Se generó un gráfico en el que las relaciones entre los aislamientos, según su virulencia, quedaron representadas en espacio tridimensional

### III. ANALISIS MOLECULAR

#### III.1. Crecimiento vegetativo

Con el fin de homogeneizar el momento de extracción de ADN se realizó un estudio de crecimiento del patógeno y se trazaron curvas de crecimiento en medio líquido.

**III.1.1. Cepas utilizadas.** Se utilizaron 7 aislamientos de *P. sojae* de diverso origen geográfico (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Origen geográfico de las cepas utilizadas

Aislamiento	Localidad	Provincia
504	Hughes	Santa Fe
210	Marcos Juárez	Córdoba
195	Villa Elisa	Córdoba
211	Marcos Juárez	Córdoba
168	Marcos Juárez	Córdoba
89	Pergamino	Buenos Aires
282	Pergamino	Buenos Aires

#### III.1.2. Medio y condiciones de cultivo

Las cepas se cultivaron en medio líquido VA. Se dispusieron dos series de erlenmeyers en cámara de cultivo New Brunswick G-27, a 23 °C con luz continua provista por 4 tubos fluorescentes de 20 W, una en forma estática con 25 ml de medio por erlenmeyer, y la otra en agitación constante a 125 rpm, con 35 ml . El inóculo se obtuvo de bordes de colonias de 10 días, sembradas en VA sólido (20 % agar-agar).



### **III.1.3. Cosecha de micelio y medición**

La estimación del crecimiento vegetativo en cada punto de la curva se realizó mediante la medición del peso seco del micelio. El mismo fue cosechado a intervalos regulares (48 y 72 horas) por filtración en embudo Buchner a presión reducida a través de papel de filtro Whatman GP, lavado con agua bidestilada y secado en estufa a 70 °C hasta peso constante. Se tomó el promedio de dos repeticiones para cada momento de cosecha.

## **III.2. TÉCNICA DE RAPDS**

### **III.2.1. Extracción de ADN**

El ADN genómico fue extraído a partir de cultivos del *P. sojae* de 5 días de crecimiento (punto IV), a través del método de Dellaporta *et al.* (1983). Los cultivos se hicieron en erlenmeyers de 125 ml con 35 ml de medio VA en cámara de cultivo a 23 °C, sin agitación, y se cosechó el micelio por filtración al vacío.

Para cada aislamiento, el micelio fue triturado en nitrógeno líquido con mortero y posteriormente mezclado con 500µl de buffer de extracción. Luego se agregaron 35µl de SDS 20 % a la mezcla y se incubó la suspensión en baño térmico a 65 °C durante 10 minutos. Se agregaron 175µl de acetato de potasio 5M y se enfrió en hielo durante 20 minutos.

La mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos, y el sobrenadante se colocó en nuevos tubos enfriados, donde se agregaron 250µl de fenol y 250µl de cloroformo isoamílico. Previa agitación, se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm durante

15 minutos. Con extremo cuidado, se recogió la fase superior, con la cual se repitió el paso anterior.

Con el fin de precipitar los ácidos nucleicos se agregaron 50µl de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 1ml de etanol absoluto y se mezcló suavemente.

La solución se mantuvo a -20°C hasta el día siguiente, por motivos operativos. El protocolo recomienda un mínimo de 30 minutos a dicha temperatura.

Se sometió a centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y una vez secado al aire, se agregó 1ml de etanol al 70 %, despegando el precipitado con golpecitos suaves, para centrifugar nuevamente a 13.000 rpm 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el "pellet" se secó en estufa a 37°C.

Se redisolvió en 100µl de agua bidestilada estéril (dejando reposar y luego dando golpecitos suaves hasta que no se viera el precipitado).

Con el fin de remover el ARN se agregaron 2µl de ARNasa (10mg/ml) y se incubó la muestra en baño térmico a 65°C durante 30 minutos.

Nuevamente el ADN fue precipitado con el agregado de 50µl de acetato de sodio y 1ml de etanol, se mezcló suavemente y se mantuvo la suspensión 30 minutos a -20 °C, luego de lo cual se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.

Se desechó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70 % y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado al aire.

El producto final se redisolvió en 200µl de agua destilada estéril, alternando agitación suave mediante golpecitos y reposo hasta disolución completa, y se fraccionó para su conservación en freezer a -20°C.

### **III.2.2. Estimación de la concentración de ADN**

Entre 3 y 5 $\mu$ l de cada muestra se sembraron en geles de agarosa al 0.8% (en buffer TAE 50x) con 15 $\mu$ l de bromuro de etidio (para 375 ml de buffer). Para el cálculo de concentración se utilizó un marcador de ADN estándar, el fago Lambda, digerido con EcoR1 y HindIII (ver preparación de marcador).

El gel se colocó en cuba de electroforesis con buffer TAE 1X y se dejó correr a 100V (de negativo a positivo) entre 6 y 8 cm. Luego se observó con transiluminador UV y se fotografiaron las bandas. Se estimó la concentración de ADN de las muestras a través de la comparación de las bandas de las mismas con las del fago marcador.

### **Preparación de las muestras a cuantificar**

Para obtener la cantidad necesaria para la siembra de cada calle, se mezclaron de 3 ó 5 $\mu$ l de muestra de ADN y 2 $\mu$ l de buffer loading, y se agregó agua destilada estéril hasta completar 12 $\mu$ l. Se homogeneizó 40 veces hasta disolución completa.

### **Preparación del marcador**

Se preparó el doble de volumen para la siembra de 2 calles: se mezclaron 2 $\mu$ l de fago con 2 $\mu$ l de buffer 6x Dye y 20 $\mu$ l de agua destilada estéril.

### **III.2.3. Preparación de soluciones empleadas en las técnicas de RAPDs**

TAE 50x

242 gr de Tris

57,1 ml de ácido acético glacial

200 ml 0,25 EDTA pH8

llevar a 1000 ml

TRIS ClH 1M pH 8

121 gr de Tris

agua destilada 750 ml

llevar la solución a 1000ml

EDTA 0,25 M pH 8

93,06 gr de EDTA. 2 H<sub>2</sub>O

750 ml de agua destilada

**TE (10mM Tris-1mM EDTA pH 8)**

1 ml de 1M Tris pH 8

0,4 ml de EDTA 0,25 M pH 8

llevar a 100 ml

**SDS 20% (Lauryl sulfato sodium salt)**

Buffer de extracción de ADN

50 ml de Tris 1M pH 8 (50mM EDTA)

100 ml EDTA 0,25 M pH 8 (50mM EDTA)

14,61 gr ClNa (58,44 P.M.)

completar a 500 ml

**III.2.4. Amplificación. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para la amplificación se utilizó un volumen total por tubo eppendorf de 50µl, compuesto por 10µl de muestra de ADN de cada aislamiento y 40µl de la siguiente mezcla: “primers”, nucleótidos (DNTPs), buffer, cloruro de magnesio, TAQ polimerasa y agua destilada estéril (ver preparación de la mezcla).

Los tubos se colocaron en un termociclador Techne Gene E, con la siguiente programación:

- 1 ciclo de 6 minutos a 94 °C
- 45 ciclos de 1 minuto a 94 °C y 2 minutos a 72 °C
- 1 ciclo de 6 minutos de extensión final a 72 °C

#### **III.2.4.a. Preparación de la mezcla**

Las cantidades señaladas a continuación son para la preparación de 20 tubos eppendorf.

“Primer” : 200µl (4µl de “primer” + 196µl de agua destilada estéril)

DNTPs: 100µl (2µl de cada uno de los 4 DNTPs + 192µl de a.d.e., se usó la mitad)

Buffer TAQ(10mM tris-HCl, pH 9 at 25°C, 50mMKCl, 0.1% Triton X-100): 100µl

Cl<sub>2</sub>Mg : 120µl

Agua destilada estéril.: 270µl

TAQ: 10µl

#### **III.2.4.b. “Primers” utilizados**

Se probaron arbitrariamente 20 primers de las series A y B de Promega, a partir de los cuales se seleccionaron 7 que dieron bandas analizables consistentemente, cuya composición se detalla en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Primers seleccionados y secuencia de bases de los mismos.

Primer	Secuencia de bases
A1	5' CCC AAG GTC C 3'
A2	5' GGT GCG GGA A 3'
A3	5' AAG ACC CCT C 3'
A5	5' CAC CAG GTG A 3'
A6	5' GAG TCT CAG G 3'
A10	5' ACG GCG TAT G 3'
B6	5' GTG ACA TGC C 3'

#### **III.2.4.c. Visualización de los fragmentos amplificados**

A cada muestra amplificada se le agregaron 2 ul de loading buffer que contiene colorantes para marcar el frente de corrida en el gel y se sembró en geles de agarosa al 1,4 % (3,5 gr de agarosa en 250 ml de buffer TAE 1x) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml).

Además se sembró en una de las calles el marcador de peso molecular Lambda para calcular el peso molecular de cada fragmento amplificado.

El gel se colocó en una cuba de electroforesis con buffer TAE 1X (Tris-EDTA-ácido acético) y se sometió a 50 V durante tres horas aproximadamente. Se ubicó el polo positivo hacia la parte inferior del gel de manera que el ADN, cargado

negativamente, se desplace hacia abajo a través del gel. De esta se separaron por tamaño los diferentes fragmentos amplificados.

Las bandas resultantes de la corrida se observaron en transiluminador bajo luz UV (312 nm) y se fotografiaron para su posterior análisis con película Kodak de 100 asas y con cámara digital Mavica.

### **III.2.5 Tratamiento estadístico de los datos RAPD**

#### **III.2.5.a. Construcción de la matriz básica de datos**

En la construcción de la matriz básica de datos se utilizaron 50 caracteres correspondientes al total de bandas encontradas. Los estados de caracteres se codificaron como 1, en el caso de presencia de banda y 0 en el caso de ausencia.

Las unidades taxonómicas operativas (OTUs) estuvieron constituidas por los aislamientos de *P. sojae*. La matriz básica de datos se confeccionó registrando el estado de cada carácter para cada OTU.

#### **III.2.5.b. Coeficientes de asociación**

El parecido o similitud entre OTUs (aislamientos) es cuantificable a partir del cálculo de coeficientes de similitud, los cuales pueden ser de distancia, de correlación o de asociación (Crisci y Armengol, 1983).

Para el análisis de los datos se seleccionaron diversos coeficientes de asociación, los cuales miden las coincidencias y las diferencias en los estados de caracteres entre dos OTUs y permiten el procesamiento de datos binarios. Los coeficientes de correlación no dan buenos resultados con datos doble estado (Crisci y Armengol, 1983).

Los coeficientes de asociación obtenidos a partir de la matriz básica de datos fueron: Simple Matching (SM), Jaccard (J) y Dice o de Sorensen (SD) (Sneath y Sokal, 1973). Se utilizó el programa NTSYS-PC versión 1.8 (Rohlf, 1993). A continuación se desarrollan las fórmulas respectivas, considerando que un carácter en este caso es cada una de las bandas resultado de la amplificación, y donde:

a: número de bandas presentes entre dos cepas comparadas.

b: número de bandas presentes en una y en la otra no.

c: número de bandas ausentes en una y en la otra no.

d: número de bandas ausentes en las dos cepas.

$$SMC = \frac{a + d}{a + b + c}$$

$$J = \frac{a}{a + b + c}$$

$$SD = \frac{2a}{2a + b + c}$$



Los coeficientes de Jaccard y de Dice no consideran la ausencia de un carácter en ambos OTUs que son comparados (d) como un elemento a favor de la similitud. El coeficiente de Dice confiere, además, mayor peso a las coincidencias (a).

Las matrices de similitud resultantes de la aplicación de los coeficientes se usaron para el análisis de agrupamiento y ordenamiento.

### **III.2.5.c. Análisis de agrupamiento, fenograma y coeficiente de correlación cofenética**

En el análisis de la matriz de similitud se utilizó el método de medias aritméticas no ponderadas UPGMA (“Unweighted pair-group method using the arithmetic average”) a través del programa NTSYS-PC. Se obtuvieron fenogramas en los cuales pueden observarse gráficamente las relaciones de similitud entre los OTUs.

La representación bidimensional de las relaciones de similitud en fenogramas implica en mayor o menor medida una distorsión de los datos con respecto a las matrices de similitud que los originan. Con el objetivo de medir dicha distorsión y seleccionar el coeficiente de asociación se

calculó el coeficiente de correlación cofenética ( $r$ ) para cada uno de ellos (Sokal y Rohlf, 1962). Los valores de  $r$  se obtuvieron a partir de la comparación de las matrices de similitud y las matrices cofenéticas (que surgen de los valores exactos del fenograma) a través del programa NTSYS-PC. Valores de  $r$  superiores a 0,8 indican escasa distorsión entre las matrices y por lo tanto alta correlación entre la matriz de similitud y el fenograma resultante a partir de ella (Sneath y Sokal, 1973).

#### **III.2.5.d. Análisis de ordenamiento**

La matriz de similitud se analizó por el método de Coordenadas Principales (Gower, 1966) con el fin de realizar un análisis de ordenamiento a través del programa NTSYS-PC. Se generó un gráfico en el que las relaciones entre los OTUs quedaron representadas en espacio tridimensional.

# Resultados

---

## I. AISLAMIENTO DE *P. sojae*

Se obtuvo un total de 32 aislamientos de *P. sojae*, 18 a partir de plantas enfermas y 14 de suelos, de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos.

En el Cuadro 5 se detallan para cada aislamiento la localidad y provincia de origen, el año de recolección y se especifica si fue aislado de planta o de suelo.

**Cuadro 5.** Localidad, fecha y origen de los aislamientos (P: planta -S: suelo)

Nº de cepa	Localidad	Provincia	año	origen
15	Manuel Ocampo	Buenos Aires	1998	P
21	Manuel Ocampo	Buenos Aires	1998	P
34	Manuel Ocampo	Buenos Aires	1998	P
36	Manuel Ocampo	Buenos Aires	1998	P
49	Bigand	Santa Fe	1998	P
52	Marcos Juárez	Córdoba	1998	P
55	Marcos Juárez	Córdoba	1998	P
62	Manuel Ocampo	Buenos Aires	1998	S
64	Manuel Ocampo	Buenos Aires	1998	S
75	Marcos Juárez	Córdoba	1998	P
89	Pergamino	Buenos Aires	1998	P
123	Pergamino	Buenos Aires	1999	P
126	Manuel Ocampo	Buenos Aires	1999	P
149	Godeken	Santa Fe	1999	P
153	Pergamino	Buenos Aires	1999	P
165	Rafael Obligado	Buenos Aires	1999	S
168	Marcos Juárez	Córdoba	1999	S
174	Pergamino	Buenos Aires	1999	S
175	Pergamino	Buenos Aires	1999	S
177	Godeken	Santa Fe	1999	S
178	Rafael Obligado	Buenos Aires	1999	S

180	Godeken	Santa Fe	1999	P
211	Marcos Juárez	Córdoba	2000	S
282	Pergamino	Buenos Aires	2000	P
370	Los Molinos	Santa Fe	2000	S
500	Hughes	Santa Fe	2000	S
501	Hughes	Santa Fe	2000	P
502	Hughes	Santa Fe	2000	P
503	Hughes	Santa Fe	2000	S
504	Hughes	Santa Fe	2000	S
505	Hughes	Santa Fe	2000	S
600	Gualeguaychú	Entre Ríos	2001	P

## II. CARACTERIZACION DE VIRULENCIA

### II.1. Determinación de razas y fórmulas de virulencia

Los resultados de las inoculaciones realizadas sobre las 8 líneas diferenciales y los testigos susceptibles universales se detallan en el Cuadro 6.

A partir de dichos resultados se obtuvieron las fórmulas de virulencia de los aislamientos, la mayoría de las cuales se ajustaron a razas fisiológicas previamente descritas en el mundo (Cuadro 7). Dentro de las poblaciones argentinas analizadas en este estudio, el 44% de los aislamientos correspondió a la raza 1 y el 25 % a la raza 13. Además se detectaron la raza 4, descrita con anterioridad y las razas 2, 9, 17 y 44 por primera vez en Argentina, así como 5 fórmulas de virulencia que no concuerdan con raza alguna caracterizada previamente (Cuadro 1).

**Cuadro 6.** Resultado de las inoculaciones de las líneas diferenciales y los testigos universales

Línea Aislamiento	Haro 12	Haro 13	Haro 14	Haro 16	Haro 15	Haro 3272	Haro 6272	Harosoy	Williams
	Rps 1a	Rps 1b	Rps 1c	Rps 1d	Rps 1k	Rps 3a	Rps 6	Rps 7	Sloan H (1-7)1 rps-rps
15	S	R	R	S	S	R	R	S	S
21	R	R	R	R	R	R	R	S	S
34	R	R	R	R	R	R	R	S	S
36	R	R	R	R	R	R	R	S	S
49	R	S	R	R	R	R	R	S	S
52	R	R	R	R	R	R	S	S	S
55	R	S	R	S	R	S	R	S	S
62	R	R	R	S	R	R	S	S	S
64	S	R	R	S	R	R	R	S	S
75	R	R	R	R	R	S	S	S	S
89	R	R	R	R	R	R	R	S	S
123	R	R	R	R	R	R	S	S	S
126	R	R	R	R	R	R	S	S	S
149	S	R	R	R	R	R	S	S	S
153	R	R	R	R	R	R	S	S	S
165	R	R	R	R	R	R	S	S	S
168	R	S	R	S	R	R	S	S	S
174	R	R	R	R	R	R	R	S	S
175	R	R	R	R	R	R	S	S	S
177	R	R	R	R	R	R	S	S	S
178	S	S	R	S	R	R	S	S	S
180	R	R	R	R	R	R	S	S	S
211	R	R	R	R	R	R	R	S	S
282	R	R	R	R	R	R	R	S	S
370	S	R	S	R	R	R	R	S	S
500	R	R	R	R	R	R	R	S	S
501	R	R	R	R	R	R	R	S	S
502	R	R	R	R	R	R	R	S	S
503	R	R	R	R	R	R	R	S	S
504	R	R	R	R	R	R	R	S	S
505	R	R	R	R	R	R	R	S	S
600	R	R	R	R	R	R	R	S	S
CA98-26	R	S	R	S	R	S	S	S	S
CA1A-4	S	R	S	S	S	R	R	S	S

R: resistente, más de 70 % de plántulas vivas  
S: susceptible

**Cuadro 7.** Fórmulas de virulencia y razas correspondientes a cada aislamiento

<b>Aislamiento</b>	<b>Fórmula de virulencia</b>	<b>Raza fisiológica</b>
15*	1a, 1d, 1k, 7	-
21	7	1
34	7	1
36	7	1
49	1b, 7	2
52	6, 7	13
55	1b, 1d, 3a, 7	17
62*	1d, 6, 7	-
64	1a, 1d, 7	44
75*	3a, 6, 7	-
89	7	1
123	6, 7	13
126	6, 7	13
149	1a, 6, 7	9
153	6, 7	13
165	6, 7	13
168*	1b, 1d, 6, 7	-
174	7	1
175	6, 7	13
177	6, 7	13
178*	1a, 1b, 1d, 6, 7	-
180	6, 7	13
211	7	1
282	7	1
370	1a, 1c, 7	4
500	7	1
501	7	1





165	0	0	0	0	0	0	1	1
168	0	1	0	1	0	0	1	1
174	0	0	0	0	0	0	0	1
175	0	0	0	0	0	0	1	1
177	0	0	0	0	0	0	1	1
178	1	1	0	1	0	0	1	1
180	0	0	0	0	0	0	1	1
211	0	0	0	0	0	0	0	1
282	0	0	0	0	0	0	0	1
370	1	0	1	0	0	0	0	1
500	0	0	0	0	0	0	0	1
501	0	0	0	0	0	0	0	1
502	0	0	0	0	0	0	0	1
503	0	0	0	0	0	0	0	1
504	0	0	0	0	0	0	0	1
505	0	0	0	0	0	0	0	1
600	0	0	0	0	0	0	0	1
CA98-26	0	1	0	1	0	1	1	1
CA1A-4	1	0	1	1	1	0	0	1

0: Avirulento  
1: Virulento

A partir de dicha matriz se obtuvo un fenograma (Figura 7) a través del coeficiente de Dice (de alto coeficiente de correlación cofenética) para posibilitar la visualización gráfica de la variabilidad patogénica en las poblaciones estudiadas.

A partir de dicha matriz se obtuvo un fenograma (Figura 6) a través del coeficiente de Dice (de alto coeficiente de correlación cofenética) para posibilitar la visualización gráfica de la variabilidad patogénica en las poblaciones estudiadas.

En el fenograma de la Figura 7 se distinguen dos grupos (G). En el G1, un subgrupo está constituido por los aislamientos 15, 64, 370, y CA1A-4 con diferentes fórmulas de virulencia pero con comportamiento coincidente frente a los genes 1a, 1b, 3a y 6. En el otro subgrupo, los aislamientos 55, 62, 168, 178 y CA98-26 coinciden frente a los genes 1c, 1d y 1k.

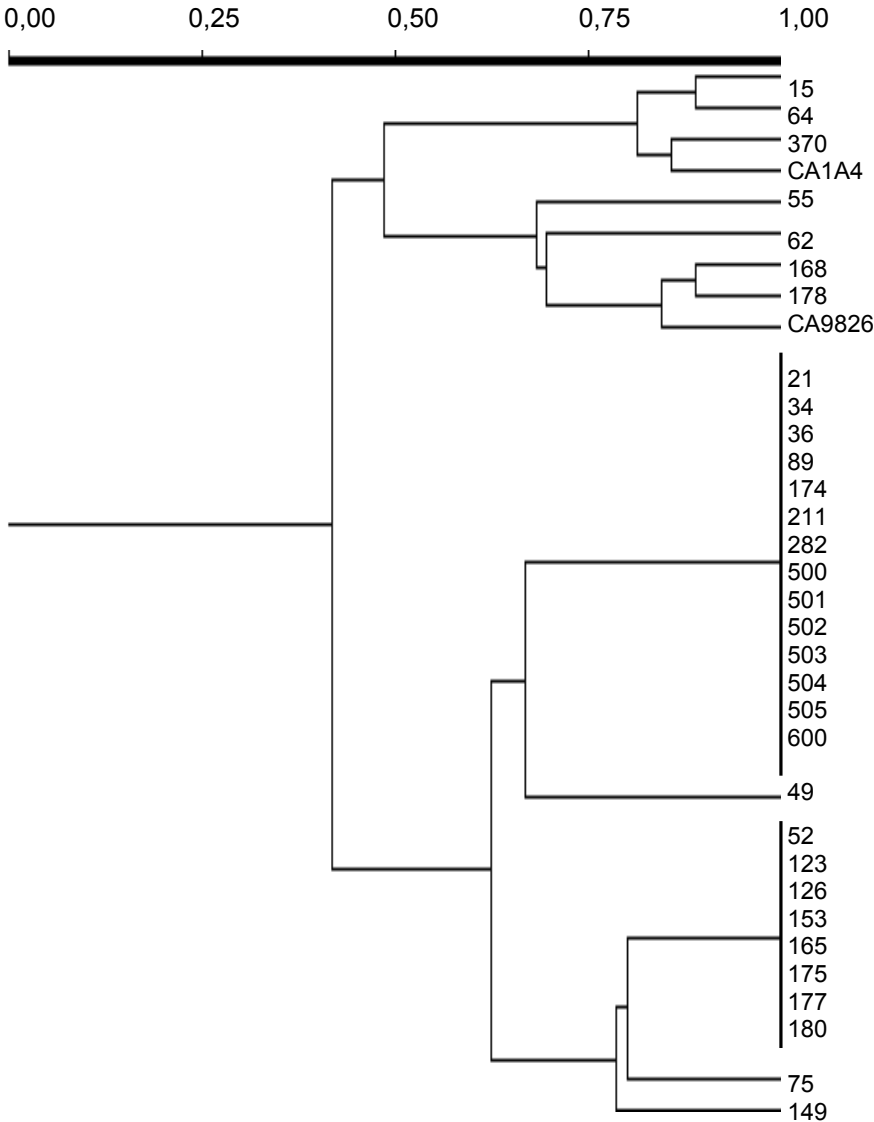
Los aislamientos 62, 168 y 178, no se ajustan a razas previamente descritas, pero todos ellos son virulentos sobre el gen *Rps* 1d; al igual que el 9826 de Canadá. Los aislamientos 370 y 64, correspondientes a las razas 4 y 44 se relacionan por igual

reacción a los genes 1a, 1b, 1k, 3a y 6, con la cepa 1A-4 de Canadá. El 55, raza 17, con el aislamiento 98-26 de Canadá por su comportamiento frente a los genes 1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a.

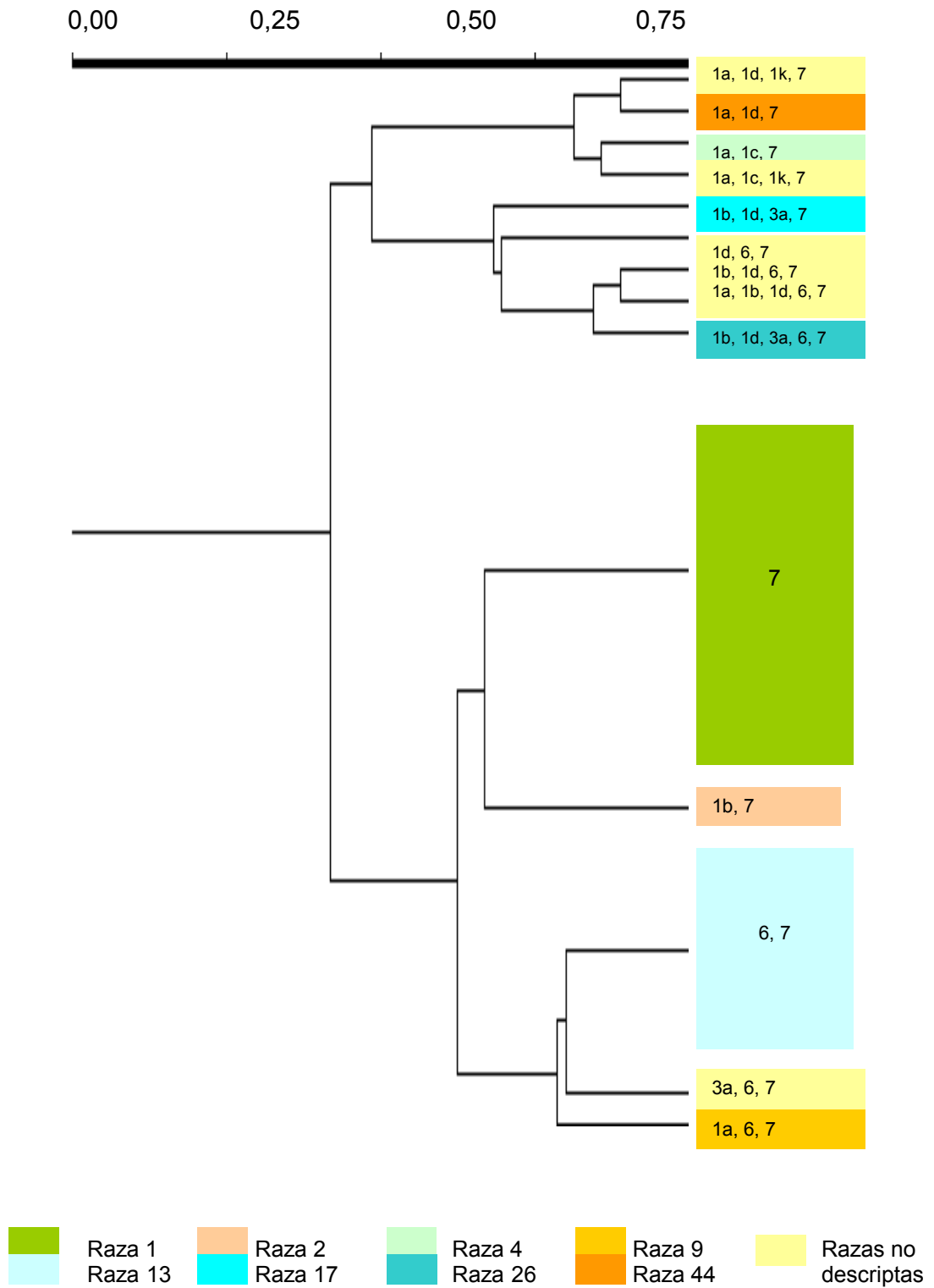
El G2, más numeroso, está constituido por 2 subgrupos (SG). El SG1 conformado por los 14 aislamientos de raza 1 y un OTU aislado correspondiente a la raza 2. El SG 2 está integrado mayoritariamente por aislamientos virulentos solamente sobre los genes 6 y 7 (raza 13) y sobre estos mismos genes más el gen 3a (aislamiento 75) y 1a (aislamiento 149, caracterizado como raza 9).

En el fenograma de la Figura 8, en el que se indica la virulencia de las cepas) se destaca la prevalencia de los aislamientos clasificados como raza 1 y en segundo término los de la raza 13. El resto de los aislamientos correspondieron a diferentes fórmulas de virulencia, incluidos los de Canadá, diferentes aún entre sí aunque incluidos en el mismo grupo. La figura 9 incluye el origen geográfico de los aislamientos.

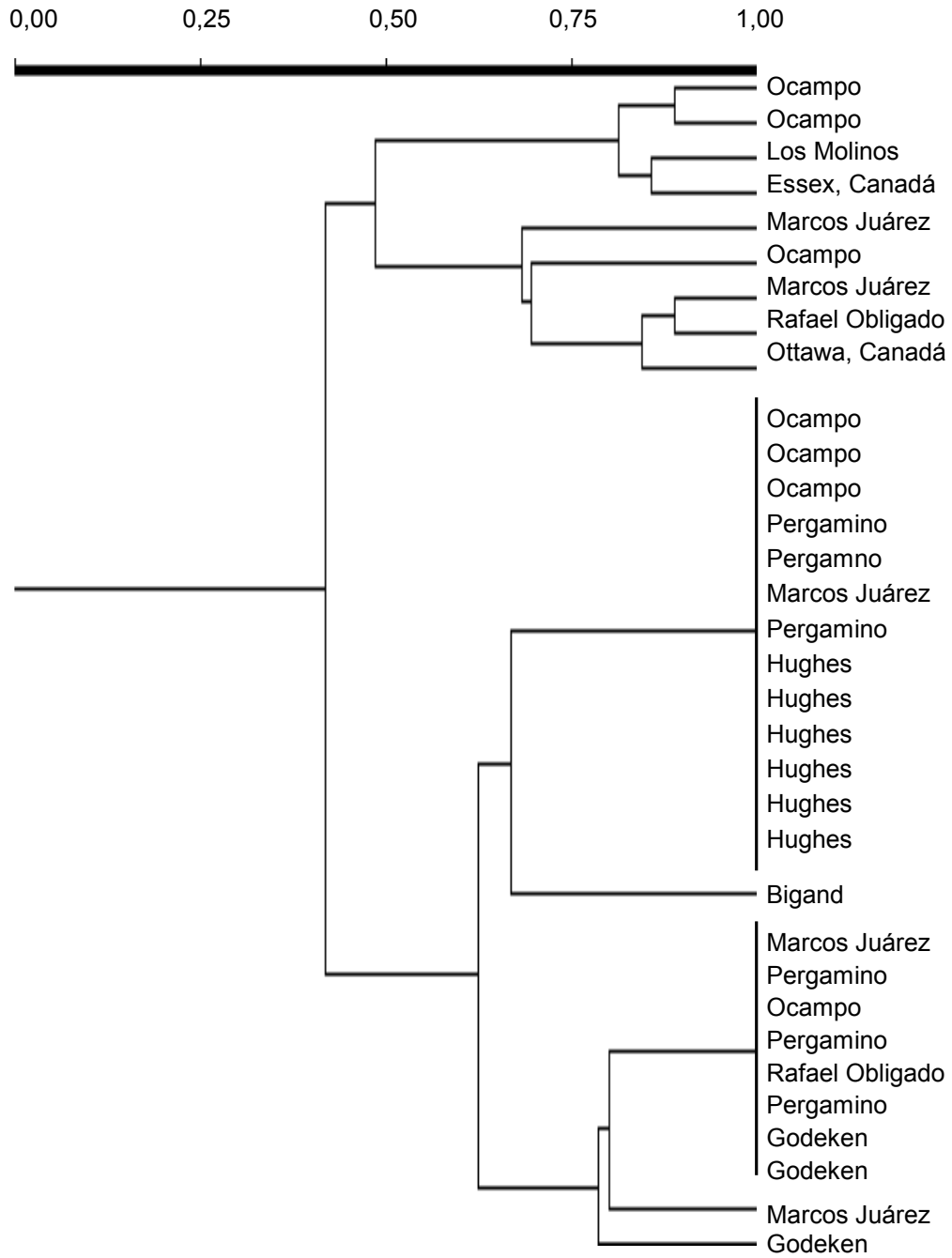
**Figura 7.** Fenograma obtenido por el coeficiente de Dice a partir de los datos de virulencia



**Figura 8.** Fenograma obtenido por el coeficiente de Dice a partir de los datos de virulencia, en el que figura la virulencia de los aislamientos.



**Figura 9.** Fenograma obtenido por el coeficiente de Dice a partir de los datos de virulencia, en el que figura la virulencia de los aislamientos.



### II.3. Análisis de ordenamiento

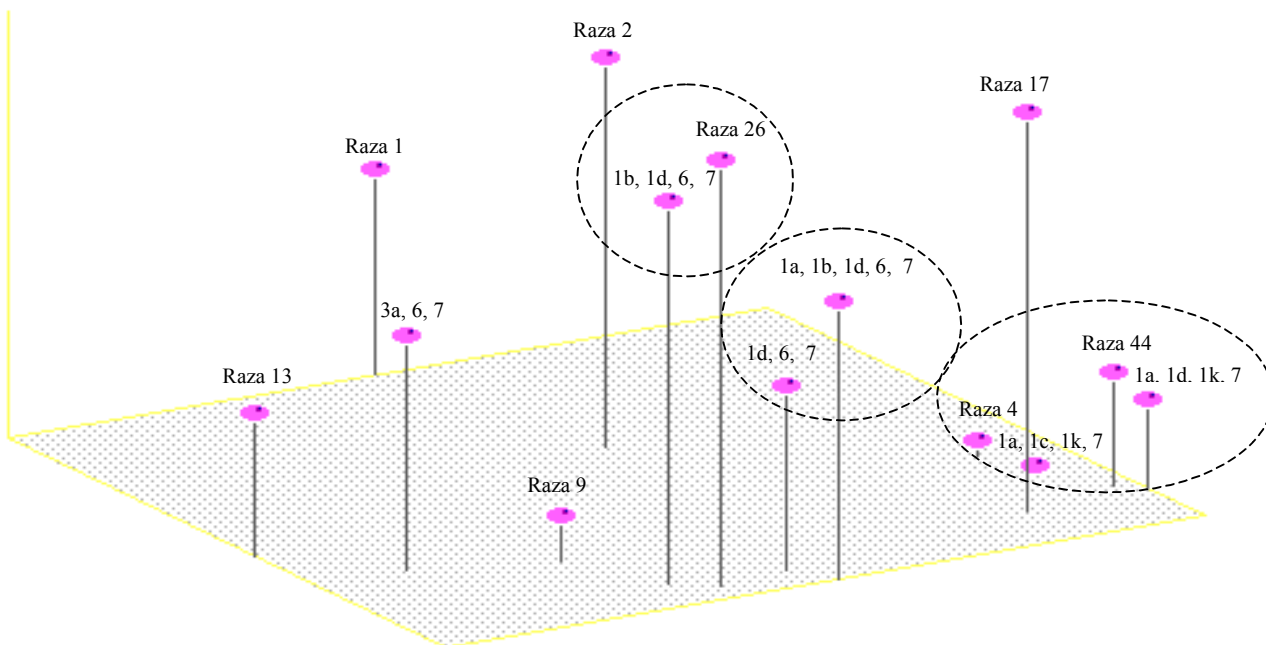
La Figura 10 representa el ordenamiento espacial de los aislamientos utilizados en el estudio según su raza ó fórmula de virulencia, obtenido a través del método de las coordenadas principales. En el esquema se distinguen 14 unidades ya que los aislamientos con el mismo patrón de virulencia quedan representados en una sola unidad.

Se observa gran dispersión en el espacio tridimensional de las diversas fórmulas de virulencia, con un acercamiento en los tres ejes en los siguientes casos, esquematizados en la figura con líneas de puntos:

- Aislamientos 168, de Marcos Juárez, Córdoba (virulencia 1b, 1d, 6, 7) y CA9826, de Ottawa, Canadá (raza 26, virulencia 1b, 1d, 3a, 6, 7).
- Aislamientos 178, de Rafael Obligado, Bs. As. (virulencia 1a, 1b, 1d, 6, 7) y 62, de Manuel Ocampo, Bs. As. (virulencia 1d, 6, 7).
- Un grupo constituido por los aislamientos 370, de Los Molinos, Santa Fe (raza 4, virulencia 1a, 1c, 7), 64 (raza 44, virulencia 1a, 1d, 7), 15 (1a, 1d, 1k, 7), ambos de Manuel Ocampo y CA1A4, de Essex, Canadá (virulencia 1a, 1c, 1k, 7).

La dispersión observada refleja la gran variación en virulencia de los aislamientos argentinos. Los aislamientos de Canadá, si bien presentaron diferentes fórmulas de virulencia, entre sí y con respecto a los argentinos, se agruparon entre estos en el esquema tridimensional. Estos resultados concuerdan con los observados en los fenogramas (Figuras 7, 8 y 9).

**Figura 10.** Diagrama de ordenamiento de los aislamientos según razas ó fórmulas de virulencia que no se ajustan a razas descriptas



**Referencias:** Aislamientos correspondientes a cada raza o fórmula de virulencia

Raza 1: 21, 34, 36, 89, 174, 211, 282, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 600

Raza 13: 52, 123, 126, 153, 165, 175, 177, 180. Raza 2: 49. Raza 4: 370.

Raza 9: 149. Raza 17: 55. Raza 26: CA9826. Raza 44: 64

1b, 1d, 6, 7: 168

3a, 6, 7: 75

1a, 1b, 1d, 6, 7: 178

1d, 6, 7: 62

1a, 1d, 1k, 7: 15

1a, 1c, 1k, 7: CA1A4

### III. ANALISIS MOLECULAR

#### III. 1. CRECIMIENTO VEGETATIVO DE *P. sojae*

El crecimiento de *P. sojae* en medio líquido fue de tipo disperso en condiciones estáticas, mientras que en agitación se formaron “pellets” esféricos.

En el Cuadro 9 se indican el día de máximo crecimiento y los valores de peso seco máximo alcanzados para cada aislamiento en condiciones estáticas y de agitación. Todos los aislamientos mostraron un desplazamiento del día de máximo crecimiento en estático.

**Cuadro 9.** Día de máximo crecimiento y valores máximos de peso seco en condiciones estáticas y de agitación

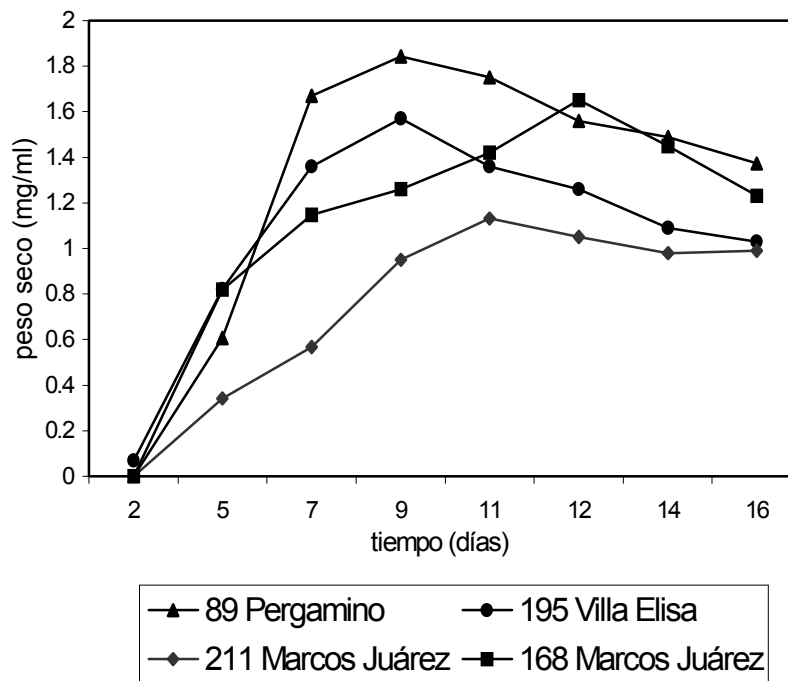
Aislamiento	Cultivo estático		Cultivo en agitación	
	Día de máximo crecimiento	Máximo peso seco (mg/ml)	Día de máximo Crecimiento	Máximo peso seco (mg/ml)
89	9	1.8	7	1.8
195	9	1.6	7	1.5
211	11	1.2	9	1.2
168	12	1.6	9	1.6
282	7	0.65	5	0.8
504	9	0.7	7	0.6
210	12	0.8	5	0.8



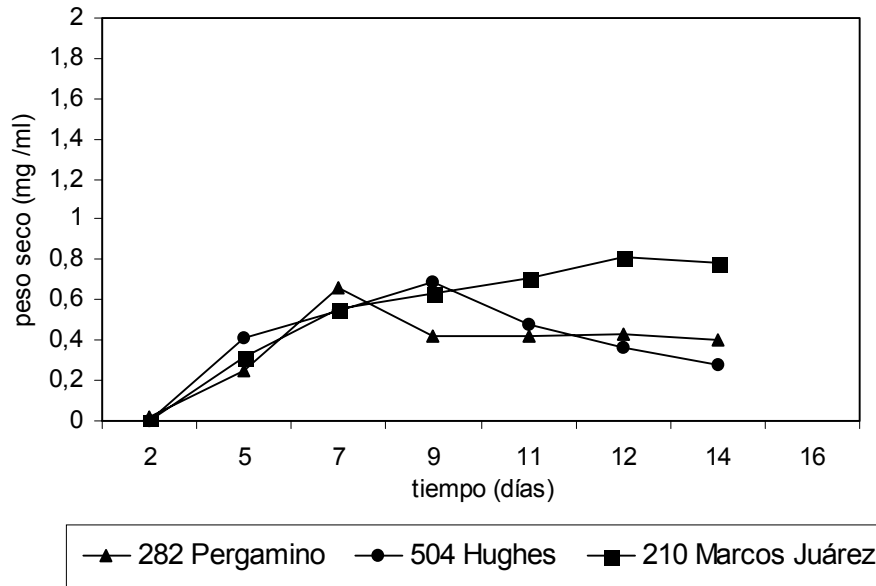
En las figuras 11 y 12 se representan las curvas de crecimiento en condiciones estáticas y en las figuras 13 y 14 en agitación.

En condiciones estáticas el aislamiento 282 mostró el máximo crecimiento el día 7 (Figura 12); los aislamientos 89, 195 y 504 el día 9 (Figuras 11 y 12), 211 el día 11 (Figura 11) y 168 y 210 el día 12 (Figuras 11 y 12).

**Figura 11.** Crecimiento de los aislamientos 89, 211, 195, 168 en condiciones estáticas



**Figura 12.** Crecimiento de los aislamientos 282, 504 y 210 en condiciones estáticas

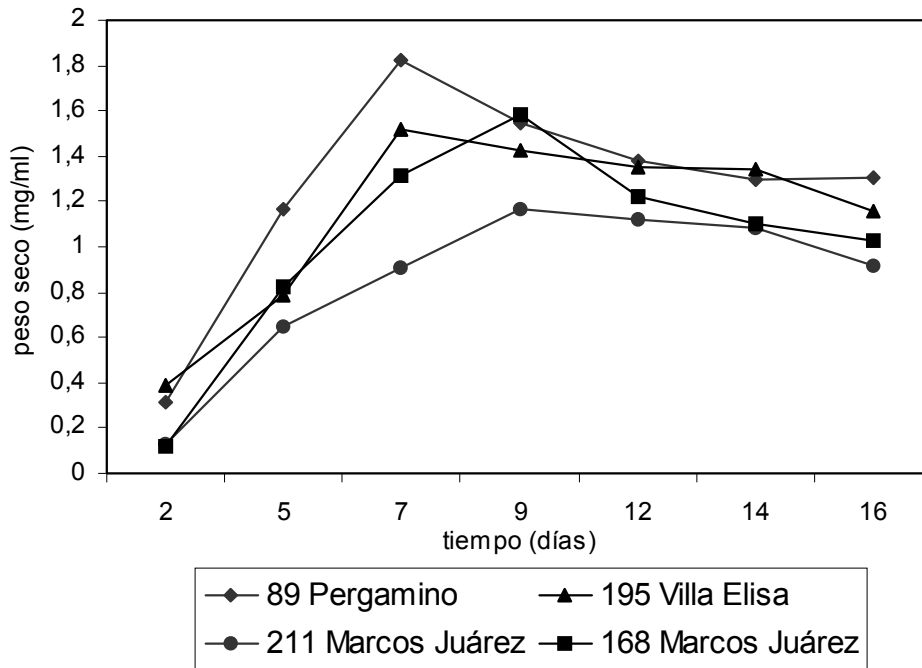


En agitación los aislamientos 282, 504 y 210 alcanzan el máximo crecimiento alrededor del día 5 (Figura 14), los aislamientos 89 y 195 el día 7 y el 211 y el 168 el día 9 (Figura 13).

El máximo valor de peso seco obtenido fue de alrededor de 1.8 mg/ml de medio de cultivo y correspondió al aislamiento 89, mientras que el mínimo valor alcanzado fue cercano a 0.6 mg/ml de medio para el aislamiento 504.

Las diferencias en el patrón de crecimiento detectadas no estuvieron relacionadas con el origen geográfico de las cepas.

**Figura 13.** Crecimiento de las aislamientos 89, 211, 195, 168 en agitación



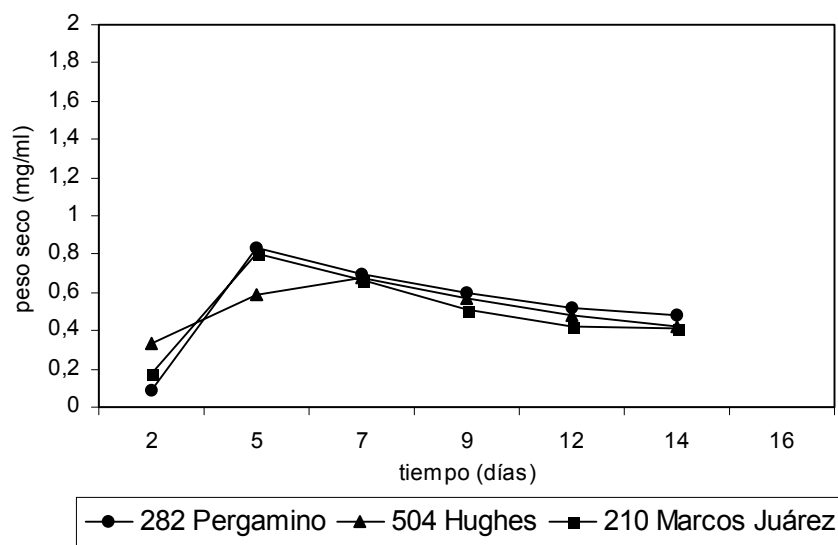
Los aislamientos 282 y 210 mostraron un período lag corto en agitación (Figura 14). El resto de los aislamientos mostraron un período lag más prolongado tanto en agitación como en estático.

No se observaron diferencias importantes en los valores de peso seco obtenidos para cada uno de los aislamientos en condiciones de agitación y en condiciones estáticas (Cuadro 9).

Después de alcanzar el máximo crecimiento todos los aislamientos ingresaron en una fase de autólisis gradual no observándose fase estacionaria (Figuras 11 a 14). La cosecha del micelio entre el sexto y séptimo día de la siembra, en condiciones

estáticas, y entre el cuarto y quinto día en agitación, permite obtener el máximo peso seco evitando la autólisis.

**Figura 14.** Crecimiento de los aislamientos 282, 504 y 210 en agitación



Se decidió cultivar los aislamientos en condiciones estáticas, ya que facilitaba la molienda del micelio en nitrógeno líquido, y se estandarizó la cosecha del mismo el quinto día de cultivo.

## III. 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

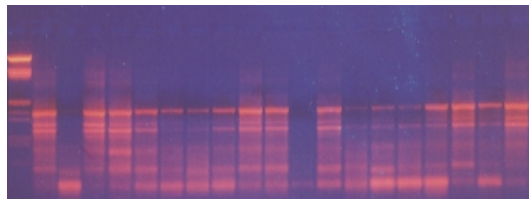
### III.2.1. Bandas analizables.

A partir de los "primers" seleccionados se obtuvieron 50 bandas analizables, de las cuales 45 resultaron polimórficas.

En las Figuras 15 pueden observarse algunas fotografías de los geles obtenidos a partir de los primers seleccionados.

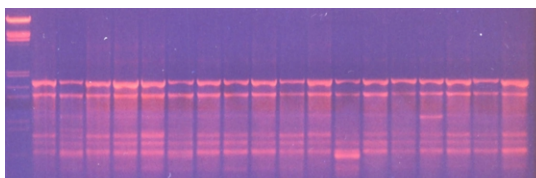
**Figura 15.** Fotografías de geles de amplificación con presencia de bandas polimórficas

Primer A 6



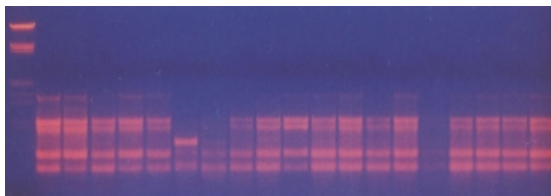
λ 505 503 502 501 500 36 21 282 370 370 178 149 15 64 62 168 55 180 49

Primer A 3



λ 505 503 502 501 500 36 21 282 370 178 149 15 64 62 168 55 180 49

Primer A 10



λ CA CA 89 600 211 210 200 199 504 34 177 75 52 165 126 175 174 153 123  
14 9826

### III.2.2. Matriz básica de datos

Se confeccionó la matriz básica de datos con los datos de presencia o ausencia de las bandas detectadas en los diferentes aislamientos para los primers seleccionados (Cuadro 10).

### III.3. Matrices de similitud

Las matrices de similitud se confeccionaron a partir de los coeficientes de asociación de Dice, Simple Matching y Jaccard.

A través de la técnica UPGMA se obtuvieron los fenogramas correspondientes y se calcularon los coeficientes de correlación cofenética,  $r$ . Todos los  $r$  fueron altos indicando baja distorsión. El más bajo fue el de Jaccard con 0.82. A pesar de que Dice y Simple Matching tuvieron el mismo  $r$  de 0,84, se seleccionó el de Dice ya que presentó mejor agrupamiento de OTUs (Figura 16).

El análisis de agrupamientos reveló que la mayoría de los aislamientos se concentraron en un gran grupo cuyo origen de ramificación se localiza en el valor 0,87 del coeficiente de similitud de Dice (G1). Un segundo grupo (G2) estuvo integrado por tres aislamientos de diferente virulencia: 126, 503 y 178, y un aislamiento, el número 15 (único de los argentinos virulento sobre el gen *Rps 1k*), quedó aislado del resto. Esta cepa originaria de Ocampo (provincia de Buenos Aires) presentó los índices de similitud más bajos, con un valor mínimo de 0,688 con respecto a la 503 (raza 1, originaria de Hughes, Santa Fe).

Solo 2 pares de cepas presentaron un índice de similitud de 1, es decir tuvieron idénticos patrones de bandas: 211 con 505 (ambas correspondientes a la raza 1), y la

174 con la 153 (razas 1 y 13 respectivamente).

El G1 presentó 2 subgrupos (SG). El SG1 compuesto por 21 aislamientos distribuidos en 2 conjuntos, un núcleo (aislamientos 89, raza1, y 52, raza 13) y 2 cepas aisladas: 123 y CA9826. Cinco aislamientos de la raza 1 (600, 211, 505, 502 y 501), de uno de los conjuntos del SG1, presentaron el mayor índice de similitud, superior a 0,977. Estas cepas de igual virulencia son de diferente origen geográfico (Figuras 17 y 18).

Los aislamientos de Canadá presentaron menor índice de similitud entre sí que con algunas cepas argentinas. El aislamiento CA1A4 presentó un índice más bajo de 0,73 con respecto al aislamiento 15, a pesar de que ambos son virulentos sobre el gen *Rps* 1k, y el valor más alto fue de 0,972 con respecto al 502. La otra cepa de Canadá, CA9826, presentó valores de similitud extremos de 0,72 y 0,93, con respecto a las cepas 503 y 600 respectivamente.

Las razas 1 y 13 estuvieron presentes en los dos subgrupos del G1 y en el G2.

Las razas 2 (aislamiento 49), 9 (149) y 26 (CA1A4) se ubicaron en el SG1 del G1, y las razas 4 (370), 17 (55) y 44 (64) en el SG2.

Teniendo en cuenta las pocas coincidencias señaladas entre virulencia y análisis molecular, no pudo establecerse relación entre ambos parámetros.

Tampoco hubo relación entre el agrupamiento y el origen geográfico de las cepas (Figura 18).

#### **III.4. Análisis de ordenamiento**

La Figura 19 representa el ordenamiento de los aislamientos según el método de las

coordenadas principales. Si bien la relación entre los aislamientos es semejante a la obtenida en el fenograma, la esquematización tridimensional de la dispersión permite distinguir 5 grupos, representados en la figura con líneas de puntos.

El grupo I concuerda con el conjunto 1 del SG1 del G1, con 6 aislamientos muy cercanos y uno (el 49) algo alejado. El aislamiento CA1A4, de Canadá, quedó muy cercano en las tres dimensiones a las cepas 505, 211 y 502.

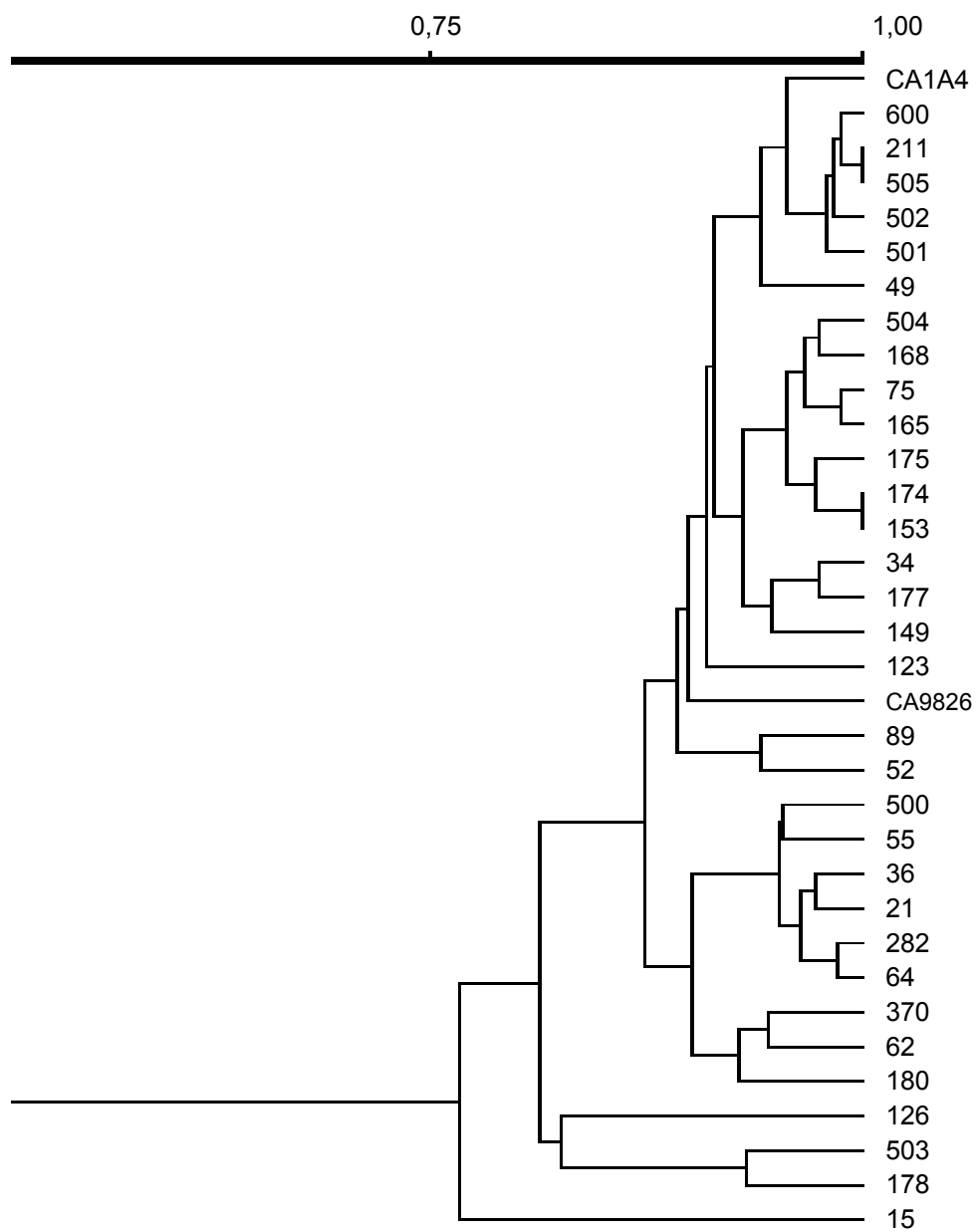
El grupo II concuerda con el conjunto 2 del SG1 del G1 y el grupo III corresponde al conjunto 1 del SG2.

El grupo IV corresponde al conjunto 2 del SG2, pero además quedó incluido el aislamiento 15 que en la representación bidimensional quedaba aislado.

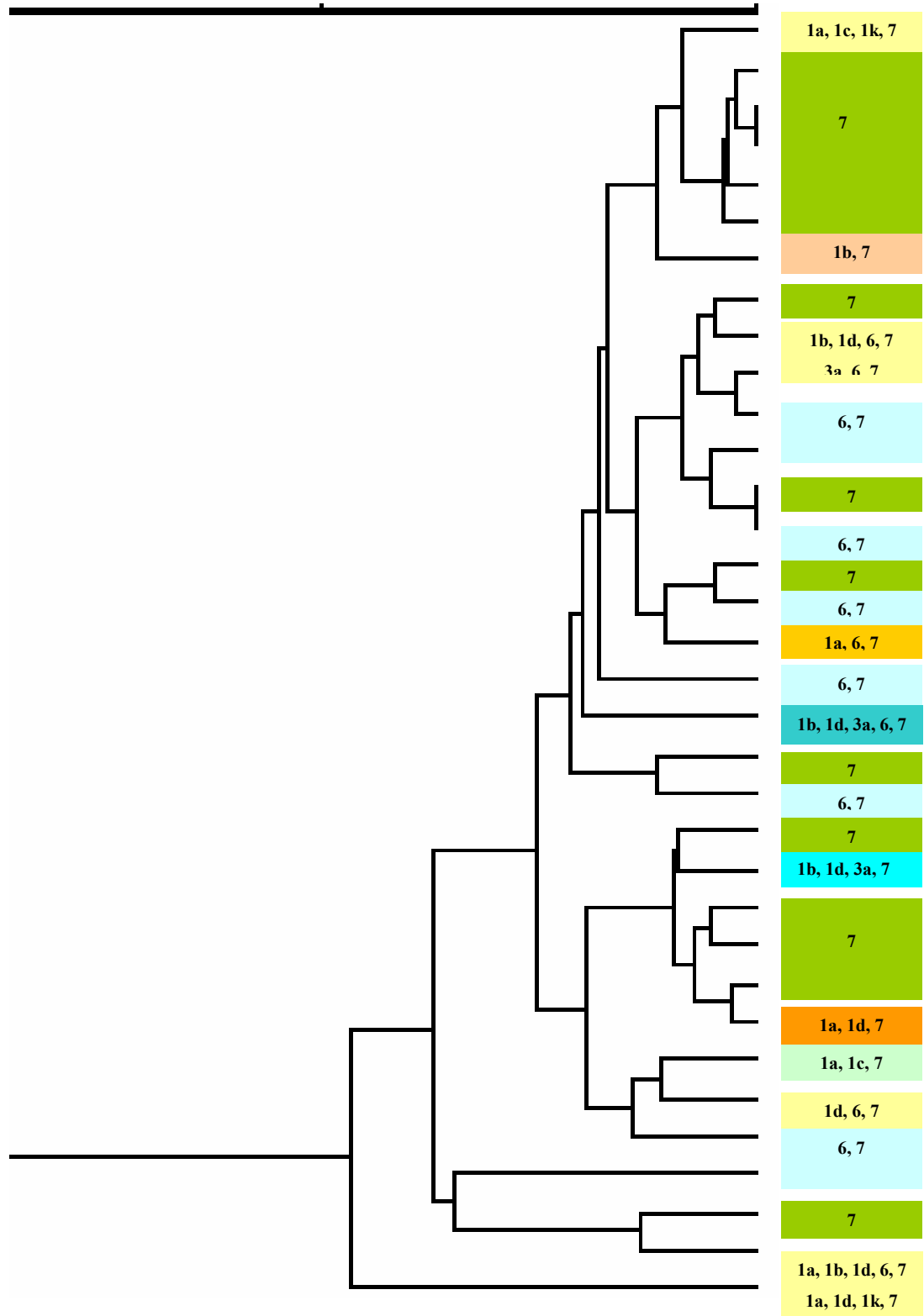
Por último, el grupo V concuerda exactamente con el G2 del fenograma. Este grupo, conformado solo por tres aislamientos que difieren entre sí en el origen y la fórmula de virulencia, presenta marcada diferencia en uno de los ejes (vertical) respecto al resto de los grupos. En el fenograma también se observa esa separación con respecto al G1 que concentra la mayoría de los aislamientos y con respecto al 15.



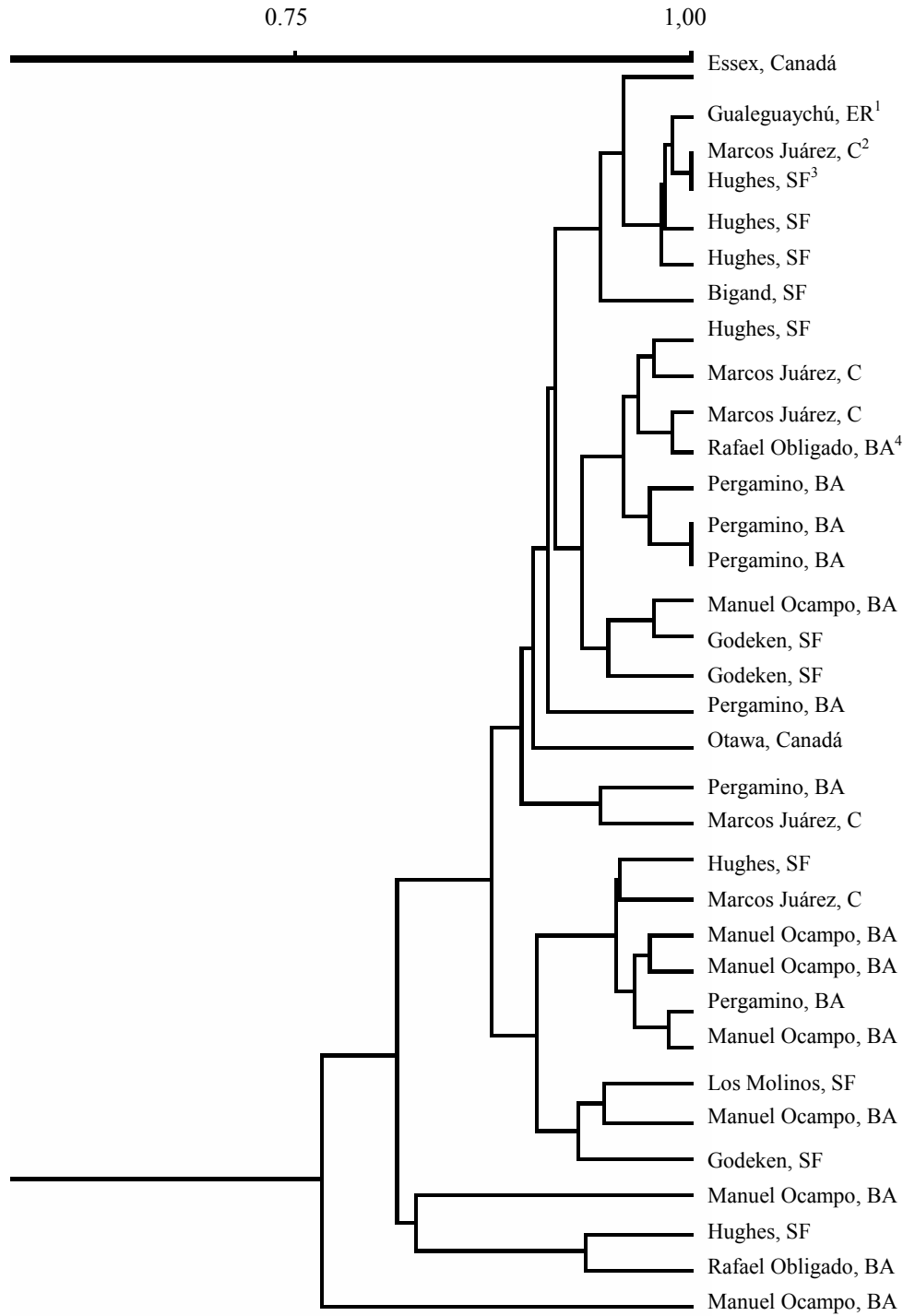
**Figura 16.** Fenograma obtenido a partir de los datos de los marcadores RAPDs a través del coeficiente de Dice



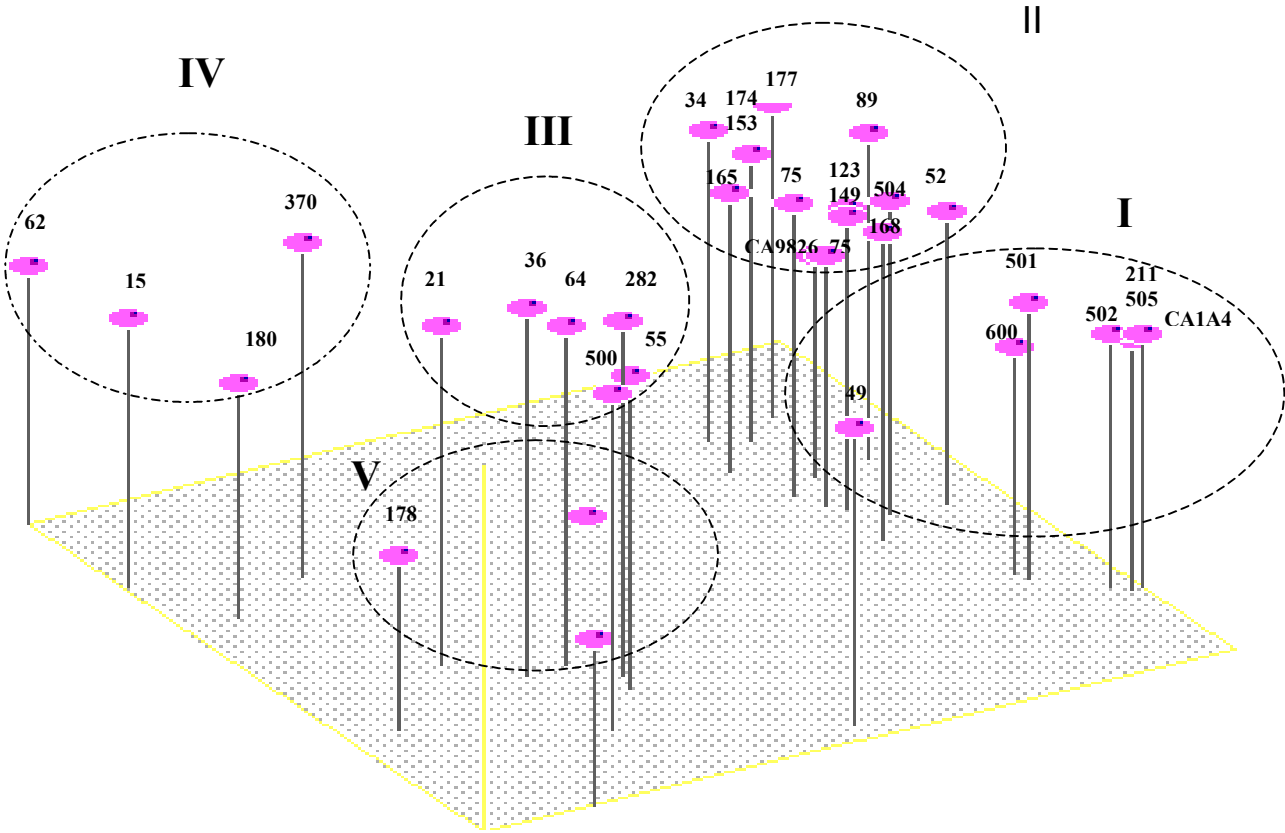
**Figura 17.** Fenograma de similitud obtenido a partir de los datos de los marcadores RAPDs a través del coeficiente de asociación de Dice, indicando la fórmula de virulencia de los aislamientos



**Figura 18.** Fenograma obtenido a partir de los datos de los marcadores RAPDs a través del coeficiente de asociación de Dice, indicando el origen geográfico de los aislamientos



**Figura 19.** Diagrama de ordenamiento de los aislamientos según los marcadores RAPDs a través del método de coordenadas principales



# Discusión y conclusiones

Existe un reservorio de diversidad genética de *P. sojae* en el suelo, su habitat natural, pero no se conoce exactamente el origen de dicha variabilidad (Forster *et al*, 1994). La misma se manifiesta en diversos caracteres, como por ejemplo, la virulencia, o la velocidad del crecimiento de las cepas, y puede corroborarse a través de marcadores moleculares, estén ligados o no a dichos rasgos.

Con respecto a la virulencia, la mayor diversidad patógena se localiza en el suelo, ya que las cepas que están desarrollando dentro de las plantas y causando enfermedad, representan una selección de dicha diversidad, con genotipos compatibles con el del cultivar infectado. Schmitthenner (1994) obtuvo a partir de suelos un gran número de aislamientos de *P. sojae* de diversa virulencia, no descripta anteriormente, y estableció que existe, en dicho habitat, una amplia variedad de fenotipos virulentos del patógeno, frente a los cuales la mayoría de los genes *Rps* no son efectivos. En este estudio, fueron aislados de suelos 3 de los 5 aislamientos con nuevas fórmulas de virulencia no identificadas previamente como razas (62, 168 y 178), así como los aislamientos correspondientes a las razas 4, 17 y 44, y algunos de los clasificados como raza 1 y 13.

Si bien se desconocen exactamente los mecanismos que originaron la variabilidad existente, es probable que los procesos actuantes hayan sido inicialmente mutación, migración y deriva génica, y en segundo término recombinación sexual y parasexual, y que sobre todos ellos haya actuado la selección. La influencia de cada uno de estos procesos ya ha sido abordada en la Introducción de esta Tesis (“Dinámica de Poblaciones”), pero es necesario recordar que a pesar de la naturaleza homotética de *P. sojae*, lo cual presupondría un alto grado de homocigosis en las poblaciones (Tyler *et al*, 1995), diversos autores comprobaron el cruzamiento entre diferentes patotipos *in vitro* (Bhat and Schmitthenner, 1993; Tyler *et al*, 1995). Whisson *et al* (1994), y establecieron que la recombinación sexual podría jugar un rol importante en la generación y mantenimiento de la diversidad genética en el campo. Según Forster *et al* (1994) la recombinación de genes de avirulencia durante el proceso sexual en *P. sojae* tiene gran influencia en el surgimiento de nuevas razas fisiológicas.

Por el contrario, la recombinación parasexual, también comprobada *in vitro* (Long and Keen, 1977, Layton and Khun, 1989), tendría menor importancia, ya que los

procesos involucrados en ella presentan muy baja frecuencia en condiciones naturales. Además, las esporas sexuales, oosporas, sobreviven más tiempo que las asexuales en ausencia de la planta hospedante, lo cual implica una ventaja adaptativa de las poblaciones sexuales en relación a las asexuales (Goodwin, 1997), y por lo tanto una mayor trascendencia en el tiempo de los cambios originados por las recombinaciones sexuales, aunque su frecuencia sea baja.

La presión selectiva es probablemente el factor más importante que modifica las poblaciones de patógenos en sistemas cultivados, ya que el cultivo extensivo de cultivares con determinados genes de resistencia, favorece el incremento de las poblaciones de *P. sojae* presentes en el suelo capaces de infectar dichos genotipos. La presencia en el patógeno del gen de avirulencia específico genera reacciones incompatibles y no se desencadena la enfermedad. Esto determina que esos patotipos no puedan reproducirse dentro de las plantas enfermas y generar mayor cantidad de inóculo, lo cual representa una desventaja con respecto a las cepas que son capaces de infectar.

En los últimos años hubo una tendencia de incremento de la variabilidad patogénica de las poblaciones de *P. sojae* en Argentina. La primer raza determinada fue la 1, virulenta sobre el gen *Rps 7* (Barreto *et al*, 1991), la cual ha prevalecido desde entonces. Posteriormente, fueron clasificados como raza 1 el 100% de los aislamientos originarios de Pergamino obtenidos entre 1982 y 1992 (Barreto *et al*, 1995), el 76 % originarios de la Región Pampeana. en el período 1993-1997 (Barreto *et al*, 1998) y el 53 % de la misma región en la campaña 1997-1998 (Gally *et al*, 1999).

En el presente estudio, el 43 % de los aislamientos analizados, aislados desde 1998 a 2001, correspondieron a la raza 1, lo cual indica, que, si bien sigue prevaleciendo esta raza, el incremento de variabilidad patogénica de *P. sojae* continua en aumento.

La raza 13, virulenta sobre los genes *Rps* 6 y *Rps* 7, presentó la mayor frecuencia después de la 1. Dicha raza no había sido detectada con anterioridad a 1998, y, sin embargo, en este estudio 8 cepas correspondieron a la misma.

Los restantes aislamientos correspondieron todos a diferentes patotipos, 5 de ellos se clasificaron como razas 2, 4, 9, 17 y 44 (todas excepto la 4 no habían sido citadas previamente en Argentina). Además, 4 aislamientos argentinos y uno de Canadá presentaron fórmulas de virulencia no descritas previamente como razas y probablemente representen nuevas razas. Si bien numerosos autores hacen referencia a más de 55 razas de *P. sojae*, solamente se han publicado las fórmulas de virulencia de 45 (ver Cuadro 1 de la Introducción). Por este motivo no se ha asignado en el presente trabajo un número de raza determinado a los aislamientos con fórmulas de virulencia no descritas con anterioridad. Además, la descripción de la virulencia como fórmula en vez de por un número representativo de una raza, tiene la ventaja de proporcionar información acerca de los genes de resistencia quebrados por el aislamiento en cuestión.

Los resultados obtenidos permiten aseverar que, desde 1998, han surgido en Argentina nuevos patotipos, a pesar de lo cual en las poblaciones analizadas en este estudio sigue siendo prevaleciendo la raza 1.

En otras regiones del mundo la virulencia de *P. sojae* ha evolucionado en forma similar en relación a la detección inicial de la raza 1 y su prevalencia decreciente en el tiempo, con surgimiento de nuevos patotipos.

En Ohio, Estados Unidos, donde la enfermedad fue detectada por primera vez en el mundo, *P. sojae* es actualmente un patógeno altamente variable. Sin embargo, desde 1951, cuando fue identificado inicialmente, hasta 1972, solo se había determinado la raza 1. El primer gen de resistencia que se incluyó en los programas de mejoramiento genético fue el *Rps* 1a. Cuando adquirieron difusión los cultivares de soja resistentes, a partir de 1972, y hasta 1979, se detectaron las razas 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (Schmitthenner *et al*, 1994). Posteriormente se incorporó el gen *Rps* 1c para reemplazar



al 1a, lo cual determinó un incremento de las razas 4 y 5, virulentas sobre ambos genes. El tercer ciclo de incorporación de resistencia se inició con el gen *Rps1k*, resistente a 21 razas del patógeno, como fuera anteriormente mencionado. En 1981 ya fueron aislados del suelo fenotipos de *P. sojae* compatibles (virulentos sobre *Rps1k*) (Hobe, 1981).

Anderson and Buzzell, (1992) establecieron que los flujos de variación de frecuencia de razas pueden ser parcialmente explicados por las variaciones de los genotipos de los cultivares de soja resistentes recomendados, y de esta forma explicaron el aumento de la frecuencia de las razas 1, 3, 4 y 5 desde 1973 hasta 1989, y la disminución de las razas 6 y 9 en el mismo período en el condado de Essex, Canadá. Uno de los aislamientos originarios de Canadá utilizados en este estudio, el CA9826, originario de Essex, correspondió a la raza 26 (1b, 1d, 3a, 6, 7), y el otro, CA1A4, presentó la fórmula de virulencia 1a, 1c, 3a, 6, 7, no descrita como raza previamente. Ambos patotipos no se detectaron en las poblaciones argentinas.

El carácter de resistencia a *Phytophthora sojae* comenzó a incluirse en programas de mejoramiento en Argentina a partir de inicios de la década de los 80 y se siguió un esquema semejante al usado en Estados Unidos. En 1984 se incorporaron los genes *Rps 1a* y *Rps 1c* y en 1991 el gen *Rps 1k* (Rossi y Nari, 1995). Sin embargo, no es posible establecer una relación directa entre los genes introducidos en los cultivares comerciales con los nuevos patotipos detectados, probablemente porque los cultivares con determinados genes de resistencia *Rps* no han tenido una difusión generalizada en nuestro país como ha ocurrido en Estados Unidos o Canadá. Rossi y Nari (1995) analizaron 42 cultivares comerciales de mayor difusión en Argentina y determinaron que solo 5 poseían el gen *Rps1-k*, 3 el *Rps1-c* y 3 el *Rps1-a*, los 31 restantes no poseían genes de resistencia. Vallone y Salinas (2002) determinaron posteriormente que el 43% de los cultivares comerciales utilizados en la campaña 2001/2002 poseían genes de resistencia. Es decir, que ha aumentado la disponibilidad de cultivares resistentes lo

cual podría determinar en el futuro el incremento de poblaciones virulentas sobre los mismos.

Hasta el momento, el gen *Rps* 1k es el más utilizado en el mundo en programas de mejoramiento por su resistencia a 21 razas (Mc Blain and Schmitthenner, 1991). En este estudio se comprueba, por primera vez en Argentina, el quiebre de la resistencia provista por este gen, por parte del aislamiento 15 originario de Pergamino, provincia de Buenos Aires, cuya fórmula de virulencia es: 1a, 1d, 1k, 7.

Con respecto a las diferencias de crecimiento detectadas en el cultivo "in vitro", tanto el peso seco máximo alcanzado como el tiempo transcurrido hasta alcanzar el crecimiento máximo, indican la existencia de variabilidad en cuanto a la velocidad de crecimiento y la capacidad de producir biomasa frente a las mismas condiciones de cultivo. La declinación de la velocidad de crecimiento probablemente es causada por el envejecimiento del medio, el consumo exhaustivo de los nutrientes que se tornan limitantes y la acumulación de productos de deshecho. Las diferencias en la tasa de crecimiento de las cepas y el peso máximo alcanzado representan otro indicio de variabilidad dentro de la especie.

Los análisis moleculares llevados a cabo en este trabajo han permitido analizar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. sojae* estudiadas, independientemente de su origen y virulencia. La metodología de RAPD resultó útil para detectar variación intraspecífica, aún entre aislamientos de la misma raza. No pudo establecerse relación entre los marcadores moleculares y la virulencia de los aislamientos ya que no se encontraron fragmentos RAPD específicamente ligados a virulencia en este estudio. Tampoco hubo relación entre los marcadores RAPD y el origen geográfico de los aislamientos. Más aún, los aislamientos de Canadá presentaron alto grado de similitud entre sí pero mayor aún con algunos aislamientos, lo cual sugiere una base genética común.

Los resultados obtenidos pueden compararse con los de Meng *et al* (1999) quienes también encontraron diversidad genética de *P. sojae* aún entre aislamientos de la misma raza, pudiendo distinguir 4 grupos a través de RAPDs. Sus resultados también demostraron que aislamientos de la misma raza tuvieron patrones de bandas diferentes y tampoco encontraron relación con el origen geográfico de los mismos.

Wang *et al* (2003) analizaron la diversidad genética de 75 aislamientos de China y 11 de Estados Unidos a través de marcadores RAPD utilizando 13 primers. Ellos también encontraron alta diversidad intraespecífica: de 78 fragmentos amplificados, 68 fueron polimórficos (87.2%), mientras que en este estudio, de 50 bandas analizadas, 45 resultaron polimórficas (90%). En el trabajo de Wang *et al*, los aislamientos se ordenaron en 12 grupos genéticos, la mayoría de ellos concentrados en un grupo, que incluyó 44 de China y 10 de Estados Unidos. Entre los aislamientos de China encontraron alta variabilidad, pero las diferencias genéticas no estuvieron relacionadas con los genes de virulencia ni el origen geográfico. Atribuyen la diversidad a grandes variaciones genéticas ocurridas durante años de interacción entre las poblaciones de *P. sojae* y los cultivares comerciales de soja en diferentes áreas de China.

Existen numerosos antecedentes de estudios entre polimorfismos de ADN y origen geográfico cuyos resultados indican falta de relación entre dichos parámetros.

Entre los factores que afectan los estudios de polimorfismos se encuentran el número de muestras seleccionadas y tipo de organismo estudiado (Pujol *et al*, 2002). Pero es importante tener en cuenta además que la selección aleatoria de oligonucleótidos utilizados como primers para la amplificación en el método RAPD, así como la falta de recursos para la utilización de un elevado número de primers, dificultan la obtención de relaciones directas entre virulencia y polimorfismos.

Los resultados obtenidos indican que existe variabilidad en las poblaciones argentinas de *P. sojae*, detectada tanto por características patogénicas a través de inoculaciones diferenciales, como por marcadores RAPD. Éstos, no solo permitieron detectar diversidad genética intraespecífica sino entre cepas de la misma raza. Por lo tanto se corroboran las hipótesis 1. y 3. planteadas inicialmente. La segunda hipótesis ha sido refutada ya que no se encontró relación entre razas o marcadores moleculares y origen geográfico de los aislamientos.

Es importante resaltar algunas conclusiones que surgen de los resultados de este trabajo:

*Phytophthora sojae* es actualmente un patógeno altamente variable en Argentina, con nuevos patotipos presentes en la Región Pampeana.

La caracterización de los aislamientos según su virulencia, a través del método de inoculación de cultivares diferenciales con los genes de resistencia *Rps* es apropiado para el análisis de la composición de las poblaciones de *P. sojae*., ya que debe considerarse que el conocimiento de la virulencia de las cepas locales es esencial para encarar planes de mejoramiento genético de soja.

Los marcadores moleculares obtenidos a través de la metodología de RAPD resultan de utilidad para la detección de variación intraespecífica y aún intrarracial, pero sus resultados no pueden correlacionarse con la virulencia, a menos que en el futuro se detecten fragmentos RAPD específicos para genes de avirulencia del patógeno.

# Bibliografía

---

- ABNEY, T.S.; MELGAR, J.C.; RICHARDS, T.L.; SCOTT, D.H.; GROGAN, J. y YOUNG, J. 1997. New races of *Phytophthora sojae* with *Rps1d* virulence. *Plant Disease* 81: 653-655.
- ANDERSON, T.R. y BUZZELL, R.I. 1982. Efficacy of metalaxyl in controlling *Phytophthora* root and stalk rot of soybean cultivars differing in field tolerance. *Plant Disease* 66 (12): 1144-1145.
- ANDERSON, T.R. y BUZZELL, R.I. 1992. Inheritance and linkage of de *Rps7* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean. *Plant Disease* 76: 958-959.
- ATHOW, K.L. y LAVIOLETTE, F.A. 1982. *Rps6*, a major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* in soybean. *Phytopathology* 72:1564-1567
- ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A.; MUELLE, E.H. y WILCOX, J.R. 1980. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean. *Phytopathology* 70: 977-980.
- ATHOW, K.L. 1985. *Phytophthora* root rot of soybean. In: Shibles, R.,ed. *Proceedings, World Soybean Research Conference III*. Boulder, USA: Westview Press, 575-581.
- BACKMAN, K. 1997. Molecular markers in plant ecology. *New Phytologist* 126: 403-418.
- BARRETO, D.; ANDERSON, T.; GALLY, M.; GRIJALBA, P. 1998. "Evaluation of *Phytophthora sojae* from Argentine soybean fields". *Proceedings 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Edimburgo, Escocia*. Vol. 1: 6.
- BARRETO, D.; GALLY, M.E. y GRIJALBA, P. 1997. Razas de *Phytophthora sojae* en la Región Pampeana (Argentina) en un intervalo de 8 años. *Actas IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. Montevideo(Uruguay). Página 219.
- BARRETO, D.; GRIJALBA, P.; GALLY, M.; VALLONE, S. Y PLOPER, D. 1998. Prevalencia de *Phytophthora sojae* en la Región Pampeana Norte (Argentina). Caracterización de razas y reacción de cultivares. *Fitopatología Brasileira* 23 (1): 54-57.
- BARRETO, D.; STEGMAN, B. Y FORTUGNO, C. 1991. *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*: Detección y virulencia del patógeno. En *Actas Primera Reunión Nacional de Oleaginosas*, pp 304-311.

- BARRETO, D.; STEGMAN, B. Y FORTUGNO, C. 1995. Races of *Phytophthora sojae* in Argentina and reaction of soybean cultivars. *Plant Disease* 79: 599-600.
- BERNARD, R.L.; SMITH, P.E.; KAUFMANN, M.J. y SCHMITTHENNER, A.F. 1957. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean *Agronomy Journal* 49:391.
- BHAT, R.G. y SCHMITTHENNER, A.F. 1993. Genetic crosses between physiological races of *Phytophthora sojae*. *Experimental Mycology* 17: 122-129.
- BIMPONG, C.E. 1975. Changes in metabolic research and enzyme activities during zoospore motility and cyst germination in *Phytophthora palmivora*. *Canadian Journal of Botany* 53: 1411-1416.
- BOURKE, P.M.A. 1964. Emergence of potato blight, 1843-46. *Nature (Lond.)* 203: 805-808.
- BRASIER, C.M. 1969. The effect of light and temperature on reproduction in vitro in two tropical species of *Phytophthora*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52: 105-113.
- BURNHAM, K.D.; DORRANCE, A.E.; FRANCIS, D.M.; FIORITTO, R.J. y ST. MARTIN, S.K. 2003. *Rps 8*, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. *Crop Science* 43: 101-105.
- BUZZELL, R.I. y ANDERSON, T.R. 1981. Another major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean. *Soybean Genet. Newsl.* 8:30-33.
- BUZZELL, R.I. y ANDERSON, T.R. 1982. Plant loss response of soybean cultivars to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* under field conditions. *Plant Dis.* 66:1146-1148.
- CANADAY, C.H. y SCHMITTHENNER, A.F. 1982. Isolating *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* from soil with a baiting method that minimizes *Pythium* contamination. *Soil biology and biochemistry* 14 (1): 67-68.
- CARLISLE, D.J.; COOKE, L.R. y BROWN, A.E. 2001. Phenotypic and genotypic characterisation of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology* 107(3): 291-303.
- CAMERON, H.R. 1966. Variability in the genus *Phytophthora*. Effects of vitamins on growth. *Phytopathology* 56: 812-815.
- CARMONA, M; GALLY, M.E. Y LOPEZ, S.E. 2005. Asian Soybean Rust: Incidence, Severity, and Morphological Characterization of *Phakopsora pachyrhizi* (*Uredinia* and *Telia*) in Argentina. *Plant Disease* 89: 109.

COSTAMILAN, L.M.; BONATE, E.R.; URBEN, A.F.; MATSUOKA, K. Y VANETTI, C.A. 1996. Ocorrencia de *Phytophthora sojae* no Brasil. Fitopatologia Brasileira 21:395.

COX, A.E. y LARGE, E.C. 1960. Potato blight epidemics throughout the world. U.S. Department Agriculture. Agricultural Handbook 174.

CRISCI, J. V. y LOPEZ ARMENGOL, M.F. 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D.C. 128pp

CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T. RIKKERINK, E.H y TEMPLETON, M.D. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. Current Genetics 20: 391-396.

CUNIBERTI, M. y HERRERO, R. 2005. CALIDAD INDUSTRIAL DE LA SOJA EN LA REGION CENTRAL DEL PAIS. Laboratorio Industrial de Calidad de Cereales y Oleaginosas. INTA- Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez.

DAAYF, F.; PLATT, H.W.; MAHUKU, G. y PETERS, R.D. 2001. Relationships between pathotypes and RAPDs, Gpi-allozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. American Journal of Potato Research 78(2): 129-139.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J. y HICKS, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.

DELYE, C.; CORIO-COSTET, M.F. y LAIGRET, F. 1995. A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. 1995. Experimental Mycology 19: 234-237.

DE WIT, P.J.G.M. 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 30: 391-418.

DORRANCE, A.E. 2003. Effect of partial resistance on *Phytophthora* stem rot incidence and yield of soybean in Ohio. Plant Disease 87: 308-312.



DORRANCE, A.E. 2004. *Phytophthora sojae* : Is it time for a new approach ? [http/ APS net feature Pathogen Population Genetics and Breeding for Disease Resistance.htm](http://APS.net/feature/Pathogen%20Population%20Genetics%20and%20Breeding%20for%20Disease%20Resistance.htm)

DORRANCE, A.E.; MC CLURE, S.A. y DE SILVA, A. 2003. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* in Ohio soybean fields *Plant Disease* 87 (2): 139-146

DORRANCE, A.E. y SCHMITTHENNER, A.F. 2000. New sources of resistance to of *Phytophthora sojae* in the soybean plants introductions. *Plant Disease* 84: 1303-1308.

**DORRANCE, A.E. y ST MARTIN, S. 2000. *Phytophthora sojae*: Is it time for a new approach?. APS feature Pathogen Population Genetics and Breeding for Disease Resistance.htm.**

DRENTH, A.; GOODWIN, S.B.; FRY, W.E. y DAVIDSE, L.C. 1993. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphisms. *Phytopathology* 83. 1087-1092.

DRENTH, A.; TAS, I.C.Q. y GOVERS, F. 1994. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 100: 97-107.

DRENTH, A.; WHISSON, S.C.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.; OBST, N.R. y RYLEY, M.J. 1995. The evolution of races of *Phytophthora sojae* in Australia. *Phytopathology* 86: 163-169.

EBEL, J. Y GRISEBACH, H. 1988. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Trends in Biochemical Sciences*, 13(1): 23-27.

ELLINGBOE, A.H. 1983. Genetical aspects of interaction between plant hosts and their soilborne pathogens. *Phytopathology* 73: 941-944.

ELLIOTT, C.G. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. Páginas 71-80 en : *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D.C. Erwin, S. Bartnicki-García, y P.H. Tsao, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 392 pp.

ELLIOTT, C.K. y MAXWELL, D.P. 1984. Evaluation of isozymes for the identification of isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* 74: 866.

ELLSWORTH, D.L.; RITTENHOUSE, K.D.; HONEYCUTT, R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Bio Techniques* 14: 214-217.

EL-SAMEN, A.; SECOR, G.A. y GUDMESTAD, N.C. 2003. Genetic variation among asexual progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers. *Plant Pathology* 52(3): 314-325.

ETCH, C.S.; ERDHAL, L.A. y McCOY, T.J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84-87.

EYE, L.L.; SNEH, B. y LOCKWOOD, J.L. 1978. Factors affecting zoospore production by *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Phytopathology* 68: 1766-1768.

FALEIRO, F.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; ROCHA, C.S.S.; DANTAS NETO, A.; FLORES, A.B.; BAHIA, R.C.S. y FALEIRO, A.S.G. 2004. Caracterizao e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauero com base em marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 29: 303-306.

FARIS, M.A.; SABO, F.E; BARR, D.J. y LIN, C.S. 1989. The systematics of *Phytophthora sojae* and *Phytophthora megasperma*. *Canadian Journal of Botany* 67: 1442-1447.

FEHR, W. R. & C.E. CAVINESS. Stages of soybean development. Special Report 80. Iowa State University, Ames, Iowa. 11 p. 1977.

FORSTER, H.; KINSCHERF, T.G.; LEONG, S.A. y MAXWELL, D.P. 1987. Molecular analysis of the mitochondrial genome of *Phytophthora*. *Current Genetics* 12: 215-218.

FORSTER, H.; TYLER, B.M. y COFFEY, M.D. 1994. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7: 780-791.

FRITSCHÉ, P. y RIESEBERG, L.H. 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature (London)*: 359: 633-636.

GALLY, M.; GRIJALBA, P. Y BARRETO, D. 1999. "Investigación sobre *Phytophthora sojae* (campaña 1997/98): Relevamiento, aislamiento y prueba de material genético". *Actas X Jornadas Fitosanitarias Argentinas, San Salvador de Jujuy, abril de 1999, pág 48.*

- GIZEN, M; FORSTER, H.; COFFEY, M.D y TYLER, B.M. 1996. Cosegregation of Avr4 and Avr6 in *Phytophthora sojae*. Canadian Journal of Botany 74 (5): 800-802.
- GOODWIN, S.B.; COHEN, B.A. y FRY, W.E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11591-11595.
- GOODWIN, S.B; SUJKOWISKI, L.S. y FRY, W.E. 1995. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. Phytopathology 85: 473-479.
- GOODWIN, S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. Phytopathology 87 (4): 462-473.
- GOWER, J.C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika 53: 325-338.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C. J. y MUEHLBAUER, F.J. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*. Phytopathology 83: 612-614.
- GRAU, C.R. 1985. Assessment and control of *Phytophthora* root and stem rot of soybean. In: Proc. Annu. Soybean Res. Conf. 15. Washington, D.C., USA: American Seed Trade Association, 54-65.
- GRAY, L.E. y POPE, R.A. 1986. Influence of soil compactation on soybean stand yield and *Phytophthora* root rot incidence. Agronomy journal, 78(1): 189-191.
- HAHN, M.G., BONHOFF, A. Y GRISEBACH, H. 1984. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fu? soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Plant Physiology, 77(3): 591-601.
- HALSALL, D.M. y FORRESTER, R.I. 1977. Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. Effects of calcium, magnesium, potassium and iron ions. Canadian Journal of Microbiology 23: 994-1001.
- HANSEN, E.M.; BRASSIER, C.M.; SHAW, D.S. y HAMM, P.B. 1986. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma*: evidence for emerging biological species groups. Trans. Br. Mycol. Soc. 87: 557-573.
- HANSEN, E.M. y HAMM, P.B. 1983. Morphological differentiation of host-specialized groups of *Phytophthora megasperma*. Phytopathology 73: 129-134.

- HANSEN, E.M. y MAXWELL, D.P. 1991. Species of the *Phytophthora megasperma* complex. *Mycologia* 83: 376-381.
- HARNISH, W.N. 1965. Effect of light on production of oospores and sporangia in species of *Phytophthora*. *Mycologia* 57: 85-90.
- HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. y RUPE, J.C. Editores. 1999. Compendium of Soybean Diseases, APS Press, 100 páginas.
- HENRY, R.N. y KIRKPATRICK, T.L. 1995. Two new races of *Phytophthora sojae*, causal agent of Phytophthora rot and stem rot of soybean, identified from Arkansas soybean fields. *Plant Disease* 79:1074.
- HERR, L.J. 1957. Factors affecting a root rot of soybeans incited by *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology* 47: 15-16.
- HENDRIX, J.W. 1970. Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annual Review of Phytopathology* 8: 111-130.
- HILDEBRAND, A.A. 1959. A root and stalk rot of soybeans caused by *Phytophthora megasperma* Drechsler var. *sojae*. *Canadian Journal of Botany* 37: 927-959.
- HOBE, M.A. 1981. Pathogenic variability of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* isolated from northwest Ohio soybean soils. M.S. Thesis. Ohio State University, Columbus.
- HOHL, H.R. 1975. Levels of nutritional complexity in *Phytophthora*: Lipids, nitrogen sources and growth factors. *Phytopathol. Z.* 84: 18-33.
- HOHL, H.R. y ISELIN, K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* with A2 mating type behaviour. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83:529-530.
- IRWIN, J.A.G. y DALE, J.L. 1982. Relationships between *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea, lucerne and soybean. *Australian journal of Botany* 30: 199-210.
- JONES, J.P. y JOHNSON, H.W. 1969. Lupine, a new host for *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Phytopathology* 59: 504-507.
- JOOSTEN, M.H.A.J.; COZIJNSEN, T.J. y de WIT, P.J. 1994. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature (London)* 367(6461): 384-386.
- JUNG, T., COOK, D.E.L., BLASCHKE, H., DUNCAN, J.M. y OSSWALD, W. 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological*

KAUFMANN, M.J. y GERDEMANN, J.W. 1958. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae*. *Phytopathology* 48: 201-208.

KEEN, N.T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetic* 24: 447-463.

KENNEDY, B.W. y ERWIN, D.C. 1961. Some factors influencing sporangium formation of *Phytophthora* species isolated from lucerne in certain salt solutions. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 44: 291-297.

KILEN, T.C. 1977. Genetic system for control of *Phytophthora* rot of soybeans. In: *Proc. Annu. Soybean Res. Conference 7*. Washington, D.C., USA: American Seed Trade Association, 9-15.

KILEN, T.C.; HARTWIG, E.E. y KEELING, B.L. 1974. Inheritance of a second major gene for resistance of *Phytophthora* root in soybean. *Crop Science* 14: 260-262.

KLARMAN, W.L. y CORBETT, M.K. 1974. Histopathology of resistant and susceptible soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Phytopathology* 64: 971-975.

KOHLI, Y. Y KOHN, L.M. 1998. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genet. Biol.* 23: 139-149.

KOVICS, G. 1981. Occurrence of *Phytophthora* rot of soybeans in Hungary. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 16 (1/2): 129-132.

KUAN, T.L. y ERWIN, D.C. 1980. Formae speciales differentiation of *Phytophthora megasperma* isolates from soybean and alfalfa. *Phytopathology* 70: 333-338.

KYLE, D.E.; NICKELL, C.D.; NELSON, R.L. y PEDERSEN, W.L. 1998. Response of soybean accessions from provinces in southern China to *Phytophthora sojae*. *Plant Dis.* 82:555-559.

LAUGE, B. y DE WIT, P.J. 1999. Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genetics and Biology* 24 (3): 285-297.

LAYTON, A.C. y KUHN, D.N. 1988a. The virulence of interracial heterokaryons of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology* 78: 961-966.

- LAYTON, A.C. y KUHN, D.N. 1988b. Heterokaryon formation by protoplast fusion of drug resistant mutants in *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Experimental Mycology 12: 180-194.
- LAYTON, A.C. y KUHN, D.N. 1989. In planta formation of heterokaryons of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Phytopathology 78(7): 961-966.
- LEITZ, R.A.; HARTMAN, G.L.; PEDERSON, W.L. y NICKELL, C.D. 2000. Races of *Phytophthora sojae* in Illinois. Plant Disease 84:487.
- LINDE, C., DRENTH, A. y WINGFIELD. 1999. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. European Journal of Plant Pathology 105(7): 667-680.
- LOHNES, D.G.; NICKELL, C. D. y SCHMITTHENNER, A. F. 1996. Origin of soybean alleles for *Phytophthora* resistance in China. Crop Sci. 36:1689-1692.
- LONG, M. y KEEN, N.T. 1977. Evidence for heterokaryosis in *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathology 67: 670-674.
- LUO, W.F., YANG, Y.I., ZHANG, Z.G. y ZHANG, T.Y. 2000. Genetic relationships of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* analysed by RAPD. Mycosystema 19(1): 39-44.
- LUCAS, J.A.; GREER, G.; OUDEMANS, P.V. y COFFEY, M.D. 1990. Fungicide sensitivity in somatic hybrids of *Phytophthora capsici* obtained by protoplast fusion. Physiol. Mol. Plant Pathology 36: 175-187.
- MAHUKU, G.; PETERS, R.D.; PLATT, H.W. y DAAYF, F. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994 to 1996. Plant Pathology 49 (2): 252-260.
- MARTINEZ, C. e IVANCOVICH, A. 1979. Presencia de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* en la pampa húmeda. En: Actas Reunión Técnica Nacional de Soja, VII. Santa Fe, Argentina.
- MAY, K.J.; DRENTH, A. y IRWIN, J.A.G. 2003. Interspecific hybrids between the homothallic *Phytophthora sojae* and *Phytophthora vignae*. Australasian Plant Pathology 32(3): 353-359.
- Mc BLAIN, B.A. AND SCHMITTHENNER, A.F. 1991. Evaluations of recurrent selections for *Phytophthora* tolerance. Ohio State University, Ohio Agric. Res. Dev Ctr. Research Bulletin 1187.

- Mc DONALD, B.A. 1997. Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens. *Phytopathology* 87(4): 448-453.
- MEHOTRA, R.S. 1970. Techniques for demonstrating accumulation of zoospores of *Phytophthora* species of root in soil. *Canadian Journal of Botany* 48: 879-882.
- MENG, X.Q.; SOEMAKER, R.C. y YANG, X.B. 1999. Analysis of pathogenicity and genetic variation among *Phytophthora sojae* isolates using RAPD. *Mycological Research* 103(2): 173-179.
- MILGROOM, M.G. 1995. Population biology of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Canadian Journal of Botany* 73: S311- S319.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S. y BROWN, A.E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR, *FEMS Microbiol. Lett.* 98: 137-144.
- MILLER, S.A.; MADDEN, L.V. y SCHMITTHENNER, A.F. 1997. Distribution of *Phytophthora* spp. in field soils determined by immunoassay. *Phytopathology* 87:101-107.
- MITCHELL, D.J. y ZENTMYER, G.A. 1971. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on sporangium and oospore formation by *Phytophthora* species. *Phytopathology* 61: 807-812.
- MOOTS, C.K.; NICKELL, C.D. y GRAY, L.E. 1988. Effect of soil compaction on the incidence of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. *Plant Disease* 72 (10): 896-900.
- MUELLER, E.H.; ATHOW, K.L. y LAVIOLETTE, F.A. 1978. Inheritance of resistance to four physiologic races of *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Phytopathology* 68: 1318-1322.
- NES, W.R. 1974. Role of sterols in membranes. *Lipids* 9: 596-612.
- NYASSE, S., GRIVET, L., RISTERUCCI, A.M., BLAHA, G., LANAUD, C. Y DESPREAUX, D. 1999. Diversity of *Phytophthora megakarya* in Central and West Africa revealed by isozyme and RAPD markers. *Mycological Research* 103(10): 1225-1234.
- OLAH, A.F.; SCHMITTHENNER, A.F. y WALKER, A.K. 1985. Glyceollin accumulation in soybean lines tolerant to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology*, 75(5): 542-546.

- ORBACH, M.J.; FARRALL, L.; SWEIGARD, J.A.; CHUMLEY, F.G. y VALENT, B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell* 12 (11): 2019-2032.
- PANABIÈRES, F.; MARAIS, A.; TRENTIN, F.; BONNET, P. y RICCI, P. 1989. Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species. *Phytopathology* 79: 1105-1109.
- PANNE, A., AGOSTEO, G.E., CACCIOLA, S.A. 2000. *Phytophthora* species causing crown and root rot of tomato in southern Italy. *Bulletin-OEPP* 30(2): 251-255.
- PARLEVIET, J. E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17:203-222.
- PEGG, K.G.; KOCHMAN, J.K. y VOCK, N.T. 1980. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* in Queensland. *Austr. Plant Pathol.* 9:15.
- PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, K.; KIM, W. DOMIER, L.KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G. MOLNER, S. y FEDAK, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth. Applie* 2: 341-345.
- PETERS, R.D.; FORSTER, H.; PLATT, H.W.; HALL, R. y COFFEY, M.D. 2001. Novel genotypes of *Phytophthora* infestans in Canada during 1994 and 1995. *American Journal of Potato Research* 78(1): 39-45.
- PFENDER, W.F.; HINE, R.B. y Stanghellini, M.E. 1977. Production of sporangia and release of zoospores by *Phytophthora megasperma* in soil. *Phytopathology* 67: 657-663.
- PIOLI, R.N.; MORANDI, E.N.; MARTINEZ, M.C. LUCCA, F. TOZZINI, A. BISARO, V. y HOPP, E.H. 2002. Morphologic, molecular and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology* 93: 136-146.
- PLOPER, L.D. 1999. Management of economically important diseases of soybean in Argentina. p 269-280. En: H. Kauffman (ed.) *Proceedings Worls Soybean Research Conference VI*. Chicago, Illinois, USA. 4-7 August 1999. Superior Printing. Champaign, Illinois, USA.



PLOPER, L.D. 2004. Economic importance of and control strategies for the major soybean diseases in Argentina. En Proceedings World Soybean Research Conference VII. Foz de Iguazu, Brasil. p 606-614.

PLOPER, L.D.; GONZALEZ, V. y RAMALLO, N.V. 1999. Presencia de *P. sojae* en lotes de soja de Tucumán y Salta. Avance Agroindustrial 77: 16-19.

PONTECORVO, G. 1956. The parasexual cycle in fungi. Annual Review Microbiolog., 10: 393-400.

POONPOLGUL, S. ; KOSITRATANA, W. AND KOPRADITSKUL, V., 1997. DNA amplification fingerprinting of *Phakopsora pachyrhizi* by RAPD technique, 23<sup>rd</sup> Congress of Science and Technology of Thailand, 20-23 de octubre, 1997. Chiang Mai, Thailand. 896-897.

PRATT, R.G. 1981. Morphology, pathogenicity and host range of *Phytophthora megasperma*, *P. erythroseptica*, y *P. parasitica* from arrow leaf clover. Phytopathology 71: 276-282.

PUJOL VIEIRA DOS SANTOS, A.M., SANTOS MATSUMURA, A.T. y VAN DER SAND, T. 2002. Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by random amplified polymorphic analysis.

PUNJA, Z.K.; FORSTER, H.; CUNNINGHAM, J. y COFFEY, M.D. 1998. Genotypes of the late blight pathogen (*Phytophthora infestans*) in British Columbia and other regions of Canada during 1993-1997. Canadian Journal of Plant Pathology 20(3): 274-282.

RIBEIRO, O.K. 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. Páginas 55 a 70 en : *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D.C. Erwin, S. Bartnicki-García, y P.H. Tsao, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 392 pp.

RISTAINO, B.J.E. y RISSLER, J.F. 1983. Histopathology of susceptible and resistant soybean roots inoculated with zoospores of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Phytopathology 73: 590-595.

ROHLF, J.F. 1993. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Versión 1.8. Exeter Software Applied Biostatistics Inc. N.Y.

RONCADORI, R.W. 1956. A nutritional comparison of some species of *Phytophthora*. Phytopathology 55: 595-599.

ROSE, J.L.; IRWIN, J.A.G.; RYLEY, M.J.; LANGDON, P.W. Y JENNER, L.B. 1982. Reaction of soybean cultivars to races of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* present in Queensland. Australian Journal of Agricultural Research, 33(5):763-771.

ROSSI, R. 2003. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. Plant Disease. 87 (1):102.

ROSSI, R. 2004. Current status of the soybean production and utilization in Argentina. En: Proceedings World Soybean Research Conference VII. Foz de Iguazu, Brasil.

ROSSI, R. y NARI, C. 1995. Genes de resistencia a *Phytophthora sojae* en líneas avanzadas y cultivares de Soja en la Argentina. En: Compendios Primer Congreso Nacional de Soja-Segunda. Reunión Nacional de Oleaginosos, Pergamino, Argentina.

RYLEY, M.J.; MOSETTER, H.F. Y ROSE, J.L. 1989. Yield losses of soybean due to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Australian Journal of Agricultural Research, 40 (6): 1161-1169.

SAGPyA. 2004. Estimaciones agrícolas mensuales. Cifras oficiales al 11/06/04. (<http://www.sagpya.mecon.gov.ar> /

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUEHI, R.H.; HOIN, G.T.K.; MULLIS, B. y ERLICH, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

SCHMITTHENNER, A.F. 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. Plant Disease 69(4): 362-368.

SCHMITTHENNER, A.F.; HOBE, M. y BHAT, R.G.1994. *Phytophthora sojae* races in Ohio over a 10-year interval. Plant Disease 78: 269-276.

SCHMITTHENNER, A.F.; HOBE, M. y BHAT, R.G. 1989. *Phytophthora* root rot : Detection, Ecology and Control. In: Pascale, A.J.,ed. World Soybean Research Conference IV Proceedings. Buenos Aires, Argentina: Orientación Gráfica Editora: 1284-1289.

SCHMITTHENNER, A.F Y WALKER, A.K. 1979. Tolerance versus resistance for control of *Phytophthora* root rot of soybeans. In: Proc. Annu. Soybean Res. Conf. 9. Washington, D.C., USA: American Phytopathological Society.

SHAN, W.X.; CAO, M.; LAUNG, D. y TYLER, B.M. 2004. The Avr1b locus for *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on

soybean plants carrying resistance gene Rps1b. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17(4): 394-403.

SHATTOCK, R.C. y SHAW, D.S. 1976. Novel phenotypes of *Phytophthora infestans* from mixed culture of antibiotic resistant mutants. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 201-206.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M. y NEEMA, C. 1997. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87: 807-813.

SKOTLAND, C.B. 1955. *Phytophthora* damping-off disease of soybean. *Plant Disease Report* 39: 682-683.

SNEATH, P.H. y SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification.* W.H. Freeman & Co, San Francisco, USA,

SOKAL, R.R. y ROHLF, J.F. 1962. The comparison of dendrograma by objective methods. *Taxon* 11: 33-40.

ST. MARTIN, S. K.; SCOTT, D. R.; SCHMITTHENNER, A. F. y McBLAIN, B. A. 1994. Relationship between tolerance to *Phytophthora* rot and soybean yield. *Plant Breeding* 113:331-334.

STOESSEL, P.; LAZAROVITS, G.; y WARD, E.W.B. 1980. Penetration and growth of compatible and incompatible races of *Phytophthora megasperma* var *sojae* in soybean hypocotyl tissues differing in age. *Canadian Journal of Botany* 58: 2594-2601.

STOESSEL, P.; LAZAROVITS, G.; y WARD, E.W.B. 1981. Electron microscope study of race specific and age related resistance and susceptible reactions of soybeans to *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Phytopathology* 71: 617-623.

SUHOVECKY, A.J. y SCMITTHENNER, A.F. 1955. Soybeans affected by early root rot. *Ohio farm and home research* 40: 85-86.

SUJKOWSKI, L.S.; GOODWIN, S.B.; DYER, A.T. y FRY, W.E. 1994. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84: 201-207.

TOOLEY, P.W. y GRAU, C.R. 1982. Identification and quantitative characterization of rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* in soybean seedlings. *Phytopathology* 72:727-733.

TOOLEY, P.W. y GRAU, C. R. 1984a. Field characterization of rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. *Phytopathology* 74:1201-1208.

TOOLEY, P.W. y GRAU, C. R. 1984b. The relationship between rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* and yield of soybean. *Phytopathology* 74:1209-1216.

TOOLEY, P.W. Y GRAU, C.R. 1984c. The relationship between rate-reducing resistance to *Phytophthora megaspema* f.sp. *glycinea* in Wisconsin. *Plant Disease* 66 (6): 472-475.

TYLER, B.M.; FORSTER, H. y COFFEY, M.D. 1995. Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of the Oomycete *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 515-523.

VAILLANCOURT, L.J. y HANAU, R.M. 1992. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Experimental Mycology* 16: 219-229.

VALLONE, S. 2002. Enfermedades de la soja. IDIA. XXI: 68-74

VALLONE, S., BOTTA, G., PLOPER, D, GRIJALBA, P, GALLY, M, BARRETO, D. y PEREZ, B. 1999. Incidencia de *Phytophthora sojae* en cultivos de soja en las regiones Pampeana Norte y Noroccidental de Argentina. *Actas Mercosoja 99*, Rosario, 21 al 25 de junio de 1999, vol.1 pp. 21-23.

VALLONE, S. y GIORDA, L. (ed.) 1997. Enfermedades de la soja en Argentina. *Agro 1* de Córdoba. INTA C.R. Córdoba. Editar, San Juan, Argentina, 72pp.

VALLONE, S. y SALINAS, L. 2002. Una enfermedad fúngica de la soja siempre vigente y en incremento: la podredumbre de la raíz y base del tallo (*Phytophthora sojae*). En: <http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos>.

VOIGT, K.; SCHLEIER, S. y BRUCKNER, B. 1995. Genetic variability in *Gibberella* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 27(6):528-35.

WALKER, A. K. y SCHMITTHENNER, A. F. 1984. Heritability of tolerance to *Phytophthora* rot in soybean. *Crop Science* 24:490-491.

WARD, E.W.B. 1990. The interactions of soybeans with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. In: *Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens*, editor D. Hornby. C.A.B. International, Wallingford, England, páginas 299-310.

WAGNER, R.E. y WILKINSON, H.T. 1992. A new physiologic race of *Phytophthora sojae* on soybean. *Plant Disease* 76: 212.

WANG, H.B.; WANG, X.M. y ZHU, Z.D. 2003. Analysis of genetic diversity of *Phytophthora sojae* isolates in China using RAPD. *Mycosystema* 22(2): 219-227.

WARD, E.W.B.; CAHILL, D.M. y BHATTACHARYYA, M.K. 1989. Early cytological differences between compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 267-283.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K. y MEYER, W. 1994. *DNA fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press. 322pp.

WELSH, J. y Mc CLELLAND. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18(24): 7213-7218.

WHISSON, S.C.; DRENTH, A.; MacLEAN, D.J. y IRWIN, J.A.G. 1994. Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of a DNA marker to two avirulent genes. *Current Genetics* 27: 77-82.

WHISSON, S.C.; HOWLETT, B.J.; LIEW, E.C.Y.; MacLEAN, D.J.; MANNERS, J.M y IRWIN, J.A.G. 1993. An assessment of genetic relationships between members of the

*Phytophthora megasperma* complex and *Phytophthora vignae* using molecular markers. Australian Systematic Botany 6 (4): 295-308.

WHISSON, S.C.; MacLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. y IRWIN, J.A.G. 1992. Genetic relationship between Australian and North American isolates of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* assessed by multicopy DNA probes. Phytopathology 82(8): 863-868.

WILCOX, W.F. y MIRCETICH, S.M. 1987. Lack of host specificity among isolates of *Phytophthora megasperma*. Phytopathology 77: 1132-1137.

WILLIAMS, J.; KUBELIK, A. y LIVAK, K. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 6531-6535.

WOLFE, M.S.; BRANDLE, U. KOLLER, U.; LIMPET, E.; Mc DERMOTT, J. M.; MULLER, K. y SCHAFFNER, D. 1992. Barley mildew in Europe: population biology and host resistance. Euphytica 63: 125-139.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; TAN, Y.; PLOPER, L.D.; PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H.H. AND YORINORI, J.T. 2001. Soybean diseases loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. Canadian Journal of Plant Pathology 23:115-121.

YANG, X.B.; RUFF, R.L.; MENG, X.Q. y WORKNEH, F. 1996. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields. Plant Disease 80: 1418-1420.

ZEIGLER, R.S.; SCOTT, R.P.; LEUNG, h.; BORDEOS, A.A.; KUMAR, J. y NELSON, R.J. 1997. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. Phytopathology 87: 284-294.

ZHENG, F.C. y WARD, E. 1998. Variation within and between *Phytophthora* species from rubber and citrus trees in China, determined by polymerase chain reaction using RAPDs. *Journal of Phytopathology* 146(2):103-109.