

Estructura genética de poblaciones de *Phytophthora capsici* en el noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina

IRIBARREN, M.J.^{1*}; BORASSI, C.¹; FERRI, A.²; GONZÁLEZ, B.¹; STECIOW, M.³; GUILLÍN, E.²

RESUMEN

Phytophthora capsici causa enfermedades destructivas en todo el mundo. El patógeno es heterotálico y los dos tipos de apareamiento (TAs) son requeridos para la reproducción sexual. La razón de TAs varía entre regiones geográficas y por lo tanto también la chance para reproducirse sexualmente. Si se toma en cuenta que la durabilidad de las medidas de control depende de la variación genética, es aconsejable considerar la cantidad y la distribución de variación genética dentro y entre poblaciones de especies, es decir, la estructura genética. Esta está determinada por factores que influyen la evolución poblacional como la mutación, la deriva genética, el flujo genético, el sistema de reproducción y de selección. En este sentido, poco se conoce sobre las poblaciones de *P. capsici* en Argentina. El objetivo fue evaluar la variabilidad genética de aislamientos de *P. capsici* de tres sitios de producción hortícola del NE de Buenos Aires. Sesenta y un aislamientos de *P. capsici* colectados de cultivos de *Capsicum annuum*, *Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum* y *Cucurbita* spp. fueron identificados morfológicamente y analizados por tipo de reproducción. Los aislamientos fueron identificados por técnicas moleculares basadas en las secuencias de las regiones ITS1-5.8S e ITS2 del ADNr. Se definieron los haplotipos para cada aislamiento y los parámetros poblacionales fueron estimados por zona geográfica y por especie hospedante junto con el número mínimo de eventos de recombinación. Las desviaciones de la coalescencia básica fueron estimadas a través de Tajima's D.; la estructura genética fue evaluada subsecuentemente a través de pruebas de AMOVA y de estimadores de Fst. La reconstrucción de redes filogenéticas fue analizada con la intención de evaluar las relaciones genealógicas entre haplotipos. Todos los aislamientos mostraron características morfológicas y genéticas típicas de *P. capsici* y pertenecieron al TA A1. No se evidenció una estructura genética cuando fueron incluidas como criterio de partición las especies hospedantes. Sin embargo, la partición geográfica permitió evidenciar alguna estructuración entre poblaciones, con la excepción de Exaltación de La Cruz que resultó el sitio más contrastante con respecto a ambos estimadores de índices de fijación. Al mismo tiempo, esta ubicación redujo los estimadores más bajos de diversidad, lo que probablemente refleja su origen reciente como zona hortícola. Dos a tres eventos de recombinación fueron detectados, lo que sugiere que la reproducción sexual podría haber influido sobre el proceso de diversificación en esta área. La estructura genética y los niveles de variación en esta región son opuestos a los resultados obtenidos por otros investigadores en la región centro oeste de Argentina y podría significar una amenaza para esta área de cultivo, al presente.

Palabras clave: *P. capsici*, *Cucurbita* spp., tipo de apareamiento, haplotipo.

¹Universidad Nacional de Luján (UNLu). Luján (6700). Bs. As., Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Hurlingham (1686). Bs. As., Argentina.

³Universidad Nacional de La Plata. La Plata (1900). Bs. As. Argentina.

*Correo electrónico: maria.josefina.iribarren@gmail.com

ABSTRACT

Phytophthora capsici causes destructive diseases worldwide. The pathogen is heterothallic and the two mating types (MTs) are required for sexual reproduction. MTs rates vary amongst geographical regions and so does the chance for sexual reproduction. Taking into account that the durability of control measures depends upon genetic variation, it is advisable to consider its structure within and between populations. The objective of the present paper was to evaluate the genetic variability of *P. capsici* isolates from three horticultural production areas of the Northeast of Buenos Aires. Sixty one isolates of *P. capsici* collected from *Capsicum annuum*, *Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum* and *Cucurbita* spp. crops were morphologically identified and analyzed for MTs. The isolates were further identified via molecular techniques based on the sequences of the ITS1 - 5.8S - ITS2 region of the ADNr. Haplotypes were defined for every isolate, and population parameters were estimated both for geographic and host-species partitions, along with the minimum number of recombination events. Departures from the basic coalescent were estimated through Tajima's *D*; the genetic structure was subsequently evaluated through AMOVA tests and *F*_{st} estimations. Phylogenetic network reconstruction was analysed in an attempt to assess genealogical relationships amongst haplotypes. All isolates showed morphological and genetic characteristics of *P. capsici* and belonged to the A1 MT. No genetic structure was detected when host-species was taken as a criterion for partition; on the other hand, geographic partition detected some structure among populations, with Exaltación de La Cruz resulting in the most contrasting site with regards to both fixation index estimates. At the same time, this location yielded the lowest estimates of diversity, probably reflecting its recent horticultural origin. Two to three recombination events were detected, suggesting that sexual reproduction could have been part of the diversification process in this area. The genetic structure and levels of variation in the region is opposite to what other researchers have found in Northwestern Argentina and could mean a threat to that breeding area now.

Keywords: *P. capsici*, *Cucurbita* spp., mating type, haplotype.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora capsici Leonian fue descrita por primera vez como patógeno del pimiento en Nuevo México (Leonian, 1922), y pronto se reportó su presencia en muchas otras especies de cultivos hortícolas, en *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* y *Fabaceae* (Kreutzer, 1937; Kreutzer *et al.*, 1940; Kreutzer y Bryant, 1946; Davidson *et al.*, 2002; Gevens y Hausbeck, 2004; Gevens *et al.*, 2008). El patógeno puede infectar todas las partes de la planta hospedadora (Gevens *et al.*, 2007) y se ha informado su presencia en diferentes lugares del mundo, incluyendo América del Norte y del Sur, Asia, África y Europa (Hwang y Kim, 1995; Erwin y Ribeiro, 1996; Sun *et al.*, 2008).

Es una especie heterotálica y sus aislamientos tienen uno de los dos tipos de apareamiento (TAs), denominados A1 y A2, que producen oosporas en estrecha proximidad (Lamour y Hausbeck, 2001). Su historia de vida implica habitualmente tanto la fecundación sexual como la reproducción asexual, que ocurre de forma rápida para su propagación y supervivencia (Lamour y Kamoun, 2009). Las oosporas presentes en el suelo y en los restos de plantas se consideran la principal fuente de inóculo (Hausbeck y Lamour, 2004) y pueden sobrevivir durante varios años en condiciones de campo (Erwin y Ribeiro, 1996; French-Monar *et al.*, 2007). La mayoría de las estrategias de control se focalizan en la reducción de las pérdidas mediante el la minimización del agua libre, pero una vez que *P. capsici* se ha establecido en un lugar (en condiciones de ambiente húmedo y cálido) no existe una estrategia de manejo disponible para limitar la enfermedad (Lamour *et al.*, 2012).

El desarrollo de cultivares resistentes para los hospedantes de importancia económica ha sido difícil debido a la diversidad global de las poblaciones del patógeno y a la existencia de cepas fisiológicas dentro de *P. capsici* (Walker y Bosland, 1999; Oelke y Bosland, 2003). Los mejoradores que trabajan en zonas con menor diversidad genética del patógeno pueden tener una mayor probabilidad de identificar cultivares resistentes a escala local (Hurtado-González *et al.*, 2008).

Las poblaciones de *P. capsici* con menor nivel de variación genética son susceptibles a adaptarse menos rápido a los hospedantes resistentes que las poblaciones con alta variabilidad genética (Lamour, 2009), con la condición de que se eviten posibles vías de diseminación desde otras áreas. Si tenemos en cuenta la ausencia de cultivares resistentes para todos los sistemas de cultivos afectados, el alto nivel de diversidad genotípica y la recombinación sexual en muchas situaciones de campo, *P. capsici* presenta el peor escenario, dentro de los oomicetes, para la producción agrícola (Lamour *et al.*, 2012). Por lo tanto se necesita tener un conocimiento detallado de la estructura poblacional de *P. capsici* para entender la composición genética de los aislamientos que se desarrollan en hospedantes y regiones en particular.

Esto ayudará a optimizar el desarrollo y el despliegue de nuevos cultivares resistentes. Se estudiaron previamente poblaciones de *P. capsici* en países en los que este patógeno provoca pérdidas significativas (Lamour y Hausbeck, 2001; Luz *et al.*, 2003; Tian y Babadoost, 2003; French-Monar *et al.*, 2006; Silvar *et al.*, 2006 y Wang *et al.*, 2009).

Los estudios que incluyeron muestras de todo el mundo (Quesada-Ocampo *et al.*, 2011) han demostrado que este patógeno presenta una estructura de población moderada, pero significativa sobre el hospedador, el origen geográfico y la sensibilidad al mefenoxam.

Los datos de estudios anteriores apoyan la hipótesis de que la reproducción clonal domina en las poblaciones de *P. capsici* que fueron obtenidos a partir de cultivares de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de Perú y de las regiones noroeste y oeste de la Argentina (provincias de Tucumán, San Juan y Mendoza) y que la recombinación sexual juega un rol limitado (o ninguno) en la aparición de nuevos genotipos en esas áreas (Hurtado-González *et al.*, 2008, Gobena *et al.*, 2012).

Estos resultados contrastan con las observaciones llevadas a cabo en otras zonas de producción hortícola, donde ambos tipos de apareamiento están presentes y las poblaciones tienen un alto nivel de diversidad genotípica y génica, probablemente como resultado de la reproducción sexual (Meitz *et al.*, 2010, Lamour *et al.*, 2012). Nuestro objetivo en el presente estudio es caracterizar la estructura genética de las poblaciones de *P. capsici* en el cinturón verde de Buenos Aires para evaluar el potencial evolutivo de este patógeno en diferentes especies de cultivo y obtener así una determinación del riesgo que supone para la producción de hortalizas en la región. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Los aislamientos fueron sistemáticamente colectados de 17 campos de producción comercial de vegetales del noreste (NE) de la provincia de Buenos Aires durante 2011 y 2012. Los lugares de muestreo se encuentran en las ciudades de Luján (N= 7), Rodríguez (N= 34) y Exaltación de la Cruz (N= 20) (entre las coordenadas: 34° 19' 14.05" S; 59° 11' 58.87" O y 34° 41' 33.75" S; 58° 54' 4.25" O). Los aislamientos fueron recuperados de las siguientes especies: zapallito, N=37 (*Cucurbita maxima* Duchesne ssp. *Maxima*



Figura 1. Mapa de la región noreste de la provincia de Buenos Aires donde se colectaron las muestras.

var Zapallitina Grebensc; forma adulta de la calabaza de verano, popular en Argentina); zucchini, N=3 (*Cucurbita pepo*); berenjena, N=13 (*Solanum melongena*), tomate, N=6 (*Solanum lycopersicum*) y pimiento o Morrón, N=2 (*Capsicum annuum*). Las muestras fueron tomadas ya sea de los tallos, frutos o brotes. Se descartaron otras especies de *Phytophthora* recuperadas de las plantas muestreadas y fueron mantenidas en agua destilada estéril por largos períodos de tiempo.

Aislamiento del patógeno

Las plantas infectadas se lavaron con agua corriente y con agua destilada estéril. Se tomaron pequeñas secciones de tejido del borde de la lesión en expansión en todos los órganos y se transfirieron a placas agar y jugo V8 (AV8). Las placas fueron incubadas 2 días a 24 °C. Las puntas de las hifas se subcultivaron a partir del micelio en expansión activa y transferidas a V8A. Para el almacenamiento a largo plazo, se guardaron porciones de agar con crecimiento de micelio en tubos Eppendorf de 2 ml con 1 ml de agua destilada estéril y tres semillas estériles pregerminadas de alpiste. Todos los aislamientos de *P. capsici* se identificaron morfológicamente de acuerdo con las características de sus zoosporangios y oogonios y al crecimiento a temperaturas específicas (Erwin y Ribeiro, 1996). Los esporangios usados para identificación fueron producidos a partir de cultivos en V8A a 24 °C bajo condiciones de luz natural durante 2 días.

Análisis del tipo de apareamiento

El tipo de reproducción se determinó mediante el apareamiento de forma simultánea de cada aislamiento con dos aislamientos testigo: A1 (CBS 11.334) y A2 (CBS 370.72), proporcionados por el *Fungal Biodiversity Centre*, Países Bajos, en placas por separado. Los aislamientos se colocaron a 2 cm de distancia en una placa de Petri con V8A fresco. Un aislamiento de prueba no apareada se utilizó como control negativo. Se usó como control positivo el apareamiento entre los tipos de reproducción opuestos de los aislamientos testigo. Las placas se envolvieron con Parafilm y se incubaron en la oscuridad a 21 °C durante al menos 1 semana. Se examinó al microscopio la formación de oosporas en la interface. Se registraron los aislamientos que produjeron oosporas con el tipo de apareamiento conocido.

Sensibilidad a fungicidas

Se testeó la sensibilidad al metalaxil en placas V8A modificadas con 100 ppm del fungicida. Se colocó una porción de micelio en activo crecimiento en el centro de la placa y se incubó en la oscuridad a 21 °C durante 7 días. Los aislamientos sensibles, intermedios y resistentes se definieron según el porcentaje de crecimiento (<10%, 10-60% y >60%; Sensible: S; Tolerante: T y Resistente: R, respectivamente). Los controles para cada aislamiento consistieron solo en placas V8A cultivadas en las condiciones mencionadas anteriormente.

Extracción de ADN

Los cultivos almacenados fueron transferidos a placas con AV8 fresco y se cultivaron en oscuridad a 24 °C durante 7 días. Se recogió el micelio de cada aislamiento y se congeló a seco. Se extrajo ADN de alto peso molecular con el protocolo de Ristaino *et al.* (1998), basado en el método CTAB. El ADN se solubilizó en 25 μ L de TE y fue almacenado a -20 °C para su uso posterior.

Amplificación por PCR y edición de la secuencia

La amplificación de la región del gen blanco se realizó en un Eppendorf Master cyclerep gradient S. Universal primers ITS4 y se usó ITS5 de White *et al.* (1990). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gels de agarosa al 1% para verificar la amplificación de un solo fragmento del tamaño adecuado. Los amplificados se purificaron usando un kit comercial (Wizard SV Clean-Up System Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se resuspendieron en 10 μ L de agua y se secuenciaron bidireccionalmente usando primers ITS4 y ITS5 en la Unidad de Genómica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de datos disponibles públicamente en el Genbank usando BLAST-n (Altschul *et al.*, 1990) para determinar si correspondían al locus ITS de *P. capsici* y para comparar los haplotipos ITS locales y extranjeros. Se realizó una alineación de secuencias múltiples con ClustalW (parámetros por defecto) como se implementó en Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Se requirieron solo ligeras correcciones manuales y ajustes debidos a la presencia ocasional de inserciones/deleciones (indeles).

Variabilidad de la secuencia de ADN, parámetros de poblacionales y análisis de recombinación

La asignación de haplotipos se realizó mediante el programa DnaSP v5.10.01 (Rozas y Librado, 2009). Se consideraron los indels en este análisis para dar cuenta de cada tipo de variación de una manera visual. Los indeles no se tuvieron en cuenta para el análisis posterior ya que algunas brechas o lagunas en la alineación se debían a variaciones de una base en poli-A o repeticiones poli-T. Esto podría conducir a una variación de la homoplusia y por lo tanto a sesgos en las estimaciones de parámetros de población. Los estimados de diversidad de secuencias, el número mínimo de recombinación y la D de Tajima (Tajima, 1989) fueron estimados usando DnaSP para tres particiones: el conjunto de datos globales, la localidad y la especie del hospedador. Los estimados de diversidad de secuencias incluyen el número de sitios de segregación (s) número de haplotipos (h), la diversidad de haplotipos (Hd) (Nei, 1978), Tajima (π) (Tajima, 1983), la theta de Watterson (θ_w) (Watterson, 1975) y el número promedio de diferencias de nucleótidos por pares (k) (Tajima, 1983). Se calcularon intervalos de confianza de 95% para cada estadística a través de simulaciones de coalescencia usando DnaSPv5.

Análisis de redes y de estructura de población

La distribución de haplotipos y sus frecuencias se muestran en función del hospedante y la localidad con el algoritmo de *Median-joining network* (MJ) utilizando la versión 4.6.1.0 del programa Network (Bandelt *et al.*, 1999) con los parámetros por defecto. Las pruebas de estructura genética según la localidad y las especies de hospedantes (AMOVA e índices de Fst) se llevaron a cabo con Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). La significancia se determinó usando 1.000 permutaciones.

RESULTADOS

Recolección e identificación morfológica de los aislamientos de *Phytophthora*

Las muestras recogidas produjeron 102 aislamientos de *Phytophthora* de los cuales, después de los análisis morfológicos, 61 fueron claramente identificados como *P. capsici* y el resto, como otras especies. Entre los aislamientos identificados, las características típicas mostraron algún grado de variación, especialmente en la relación ancho/largo de los esporangios. Todos los aislamientos de *P. capsici* pertenecieron al tipo de apareamiento A1. Las oosporas se produjeron solo cuando las placas de cada aislamiento incluyeron el aislamiento de referencia del TA A2 (CBS 370.72). El apareamiento entre los tipos de apareamiento opuestos de referencia produjo oosporas viables, tal como se esperaba. Cuando se agregó metalaxil al medio, el crecimiento se redujo significativamente (>90%) y los aislamientos fueron clasificados como sensibles.

Análisis de las poblaciones

En todos los casos, las simulaciones coalescentes incluyeron la estimación observada dentro del intervalo de confianza del 95% (tabla 1). El número total de sitios de segregación detectados para el locus ITS fue de 13 de 581 pb analizadas (conjunto global de datos), sin desviaciones detectadas del modelo de sitios infinitos de evolución de nucleótidos. Los polimorfismos se encontraron tanto en los locus ITS1 como ITS2. El locus 5.8S resultó monomórfico. Según las estimaciones de diversidad, los aislamientos obtenidos de Rodríguez y Luján resultaron considerablemente más variables que aquellos de Exaltación de la Cruz, incluso a pesar de que el tamaño de la muestra de Luján fue considerablemente menor.

Cuando se tomaron en cuenta las especies hospedantes, los aislamientos de *P. capsici* obtenidos de la berenjena mostraron los valores más grandes en la mayoría de las estimaciones, incluso con un tamaño de muestra más pequeño que el del zapallito. La D de Tajima no difirió significativamente de cero en ningún caso, lo cual sugiere que no hay una desviación significativa del modelo básico en las particiones consideradas. El análisis de los datos para el número mínimo de eventos de recombinación (RM) detectó al menos dos eventos restringidos a Rodríguez cuando el conjunto de datos fue particionado geográficamente. Sin

embargo, cuando el conjunto de datos se dividió por especies hospedadoras el análisis Rm produjo tres eventos, dos detectados para zapallito y una para berenjena.

Se definieron veinte haplotipos a partir de los 61 aislamientos de este estudio, incluyendo sitios con gaps o brechas (tabla 2) y 16 cuando fueron excluidos (tabla 1). El análisis de redes mostró que los tres haplotipos más frecuentes, 13, 14 y 16 (fig. 2) también fueron centrales en la red. Cuando se compara con las secuencias ITS de *P. capsici* que están disponibles al público en Genbank es posible notar que los haplotipos ancestrales (13, 14 y 16) resultaron idénticos a otros aislamientos obtenidos a partir

de un número de especies de cultivo distribuidas en todo el mundo (tabla 2).

El haplotipo 15, también central para la red y con frecuencia representado, fue sin embargo exclusivo para Argentina, y fue aislado del zapallito y de la berenjena en los tres sitios: Rodríguez, Luján y Exaltación de la Cruz. Los haplotipos 1, 2, 3, 4 y 10 solo fueron aislados a partir de berenjena en Rodríguez. Los haplotipos 5, 6, 8, 9, 11 y 12 resultaron únicos para especies de cucurbitáceas en Rodríguez. El haplotipo 7 fue compartido por el tomate y el zapallito en ese sitio, mientras que los haplotipos 19 y 20 se encontraron exclusivamente en los zapallitos de Lu-

	N	Diversidad estimada					
		s	h	Hd	π	Θ_w	k
Total	61	15	20	0,642	0,0035	2,76816	2,02433
Categoría	Partición por zona geográfica						
Gral. Rodríguez	34	2	17	0,69	0,00439	2,89381	2,53968
Luján	7	0	4	0,722	0,00354	2,57556	2,05556
Exaltación	20	0	5	0,257	0,00046	0,61509	0,26667
Categoría	Partición por especie hospedante						
Zapallito	37	2	14	0,694	0,00385	2,67106	2,23193
Berenjena	13	2	8	0,808	0,00455	3,22247	2,64103
Tomate	6	0	3	0,9	0,00482	2,88	2,8
Pimiento	3	0	2	0	0	0	0
Zucchini	2	0	2	0	0	0	0

Tabla 1. Promedio de las estimaciones de diversidad del locus ITS para *P. capsici* con aislados agrupados en categorías predefinidas de hospedador. s= número sitios de segregación, h= haplotipos, Hd= diversidad de haplotipos, π = π de Tajima, Θ_w = Theta de Watterson por secuencia y k= el número promedio de diferencias de pares de nucleótidos.

Haplotipo y número de aislamientos	Definición del haplotipo	Número de acceso al Genbank	País de origen		Especie hospedante	Órgano	MT ^A	MS ^B
			Sitios de muestreos de Argentina					
[Hap_1: 1	AACAGGGGGAGTATG	KF746518	Argentina, Rodríguez		berenjena	brote	A1	S
[Hap_2: 1	AACAGGGGGAGTTTA	KF746519	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S
[Hap_3: 1	AACAGGGGGAGTTTG	KF746520	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S
[Hap_4: 1	AACAGAGGGAGTAGG	KF746521	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S
[Hap_5: 1	AACAAAGGGAATATA	KF746523	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
[Hap_6: 2	AACAAAGGGAGTATG	KF746524	Argentina, Rodríguez		zapallito	tallo	A1	S
		KF746525	Argentina, Rodríguez		zapallito	tallo	A1	S
[Hap_7: 2	AACAAAGGGAGTTTA	KF746526	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
		KF746535	Argentina, Rodríguez		tomate	fruto	A1	S
[Hap_8: 1	AACAAAGGGAATTTA	KF746528	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
[Hap_9: 1	AACAAAGGGAGTTTG	KF746529	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
[Hap_10: 1	AACCAAGAAAGTATG	KF746532	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S
[Hap_11: 1	AACAAAAAAGCTTG	KF746537	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
[Hap_12: 1	AACAAAGGAAGTATA	KF746538	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S

Haplotipo y número de aislamientos	Definición del haplotipo	Número de acceso al Genebank	País de origen		Especie hospedante	Órgano	MT ^A	MS ^B		
			Sitios de muestreos de Argentina							
[Hap_13: 16	AACAGGGGGGTATG	KF746539	Argentina, Rodríguez		pimiento	tallo	A1	S		
		KF746540	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S		
		KF746541	Argentina, Exaltación		zapallito	fruto	A1	S		
		KF746542	Argentina, Rodríguez		tomate	fruto	A1	S		
		KF746543	Argentina, Exaltación		zapallito	fruto	A1	S		
		KF746544	Argentina, Rodríguez		berenjena	brote	A1	S		
		KF746545	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S		
		KF746548	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S		
		KF746550	Argentina, Rodríguez		zucchini	fruto	A1	S		
		KF746552	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S		
		KF746553	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S		
		KF746557	Argentina, Luján		zapallito	tallo	A1	S		
		KF746562	Argentina, Rodríguez		berenjena	tallo	A1	S		
		KF746571	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S		
		KF746572	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S		
		KF746573	Argentina, Exaltación		tomate	fruto	A1	S		
		AB217670	Japón		zapallo					
		AB367368	Japón		calabaza					
		AB367369	Japón		zapallito					
		AB367370	Japón		pepino					
		AB367372	Japón		pimiento					
		AJ854286	Italia		zapallito					
		AJ854287	Italia		zapallito					
		DQ464019	EE.UU.		berenjena					
		DQ464029	EE.UU.		berenjena					
		DQ464041	EE.UU.		pimiento					
		EU162757	EE.UU.		zapallito					
		EU162758	EE.UU.		zapallito					
		HQ638209	Corea del Sur		poroto					
		JN937590	Corea del Sur		tomate					
		JQ410453	Brasil		pimiento					
		[Hap_14: 9	AACAGGGGGGTTTG	KF746546	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
				KF746549	Argentina, Luján		zapallito	fruto	A1	S
KF746551	Argentina, Rodríguez			berenjena	fruto	A1	S			
KF746559	Argentina, Luján			zapallito	fruto	A1	S			
KF746574	Argentina, Luján			zapallito	fruto	A1	S			
KF746576	Argentina, Rodríguez			tomate	fruto	A1	S			
KF746577	Argentina, Rodríguez			tomate	fruto	A1	S			
KF746579	Argentina, Rodríguez			tomate	fruto	A1	S			
KF746582	Argentina, Luján			zapallito	tallo	A1	S			
AY423292	EE.UU.			tomate						
DQ069293	Inglaterra			zapallito						
DQ464018	EE.UU.			pimiento						
DQ464021	EE.UU.			tomate						
DQ464022	EE.UU.			pimiento						

Haplotype y número de aislamientos	Definición del haplotipo	Número de acceso al Genbank	País de origen		Especie hospedante	Órgano	MT ^A	MS ^B
			Sitios de muestreos de Argentina					
[Hap_14: 9	AACAGGGGGGGTTTG	DQ464023	EE.UU.		pimiento			
		DQ464024	EE.UU.		pimiento			
		DQ464025	EE.UU.		zapallito			
		DQ464026	EE.UU.		pimiento			
		DQ464031	EE.UU.		pimiento			
		DQ464032	EE.UU.		tomate			
		DQ464042	EE.UU.		pimiento			
		DQ464043	EE.UU.		poroto			
		DQ464044	EE.UU.		poroto			
		DQ464045	EE.UU.		poroto			
		EF617375	EE.UU.		tomate			
		EF617376	EE.UU.		pepino			
		EF617377	EE.UU.		zucchini			
		GU011684	EE.UU.		poroto			
		HQ261520	Italia		berenjena			
		JN382543	Italia		pimiento			
JN382544	Italia		pimiento					
JQ071939	EE.UU.		pimiento					
[Hap_15: 10	TACAGGGGGGGTATG	KF746547	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746561	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746564	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746565	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746567	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746570	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746578	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S
		KF746580	Argentina, Rodríguez		berenjena	fruto	A1	S
		KF746584	Argentina, Luján		zapallito	fruto	A1	S
		KF746585	Argentina, Exaltación		zapallito	fruto	A1	S
[Hap_16: 5	AA-AGGGGGGGTATG	KF746586	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746587	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746588	Argentina, Rodríguez		zucchini	fruto	A1	S
		KF746589	Argentina, Rodríguez		zucchini	fruto	A1	S
		KF746590	Argentina, Exaltación		zapallito	fruto	A1	S
		DQ464033	EE.UU.		pimiento			
		DQ464039	EE.UU.		pimiento			
		HQ643183	Sudáfrica		zucchini			
HQ822261	Sudáfrica		zapallito					
[Hap_17: 4	ACAGGGGGGGTATG	KF746558	Argentina, Exaltación		zapallito	tallo	A1	S
		KF746560	Argentina, Exaltación		pimiento	tallo	A1	S
		KF746569	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
		KF746581	Argentina, Rodríguez		zapallito	fruto	A1	S
[Hap_18: 1	TTCAGGGGGGGTATG	KF746568	Argentina, Exaltación		zapallito	fruto	A1	S

Haplotype y número de aislamientos	Definición del haplotipo	Número de acceso al Genbank	País de origen		Especie hospedante	Órgano	MT ^A	MS ^B
			Argentina	Luján				
[Hap_19: 1	AACAAAGAAAGTTTG	KF746583	Argentina,	Luján	zapallito	fruto	A1	S
[Hap_20: 1	TACAGGGGGGTTTG	KF746586	Argentina,	Luján	zapallito	fruto	A1	S

Tabla 2. Distribución de haplotipos por país, sitio de muestreo (en Argentina) y especie hospedadora.

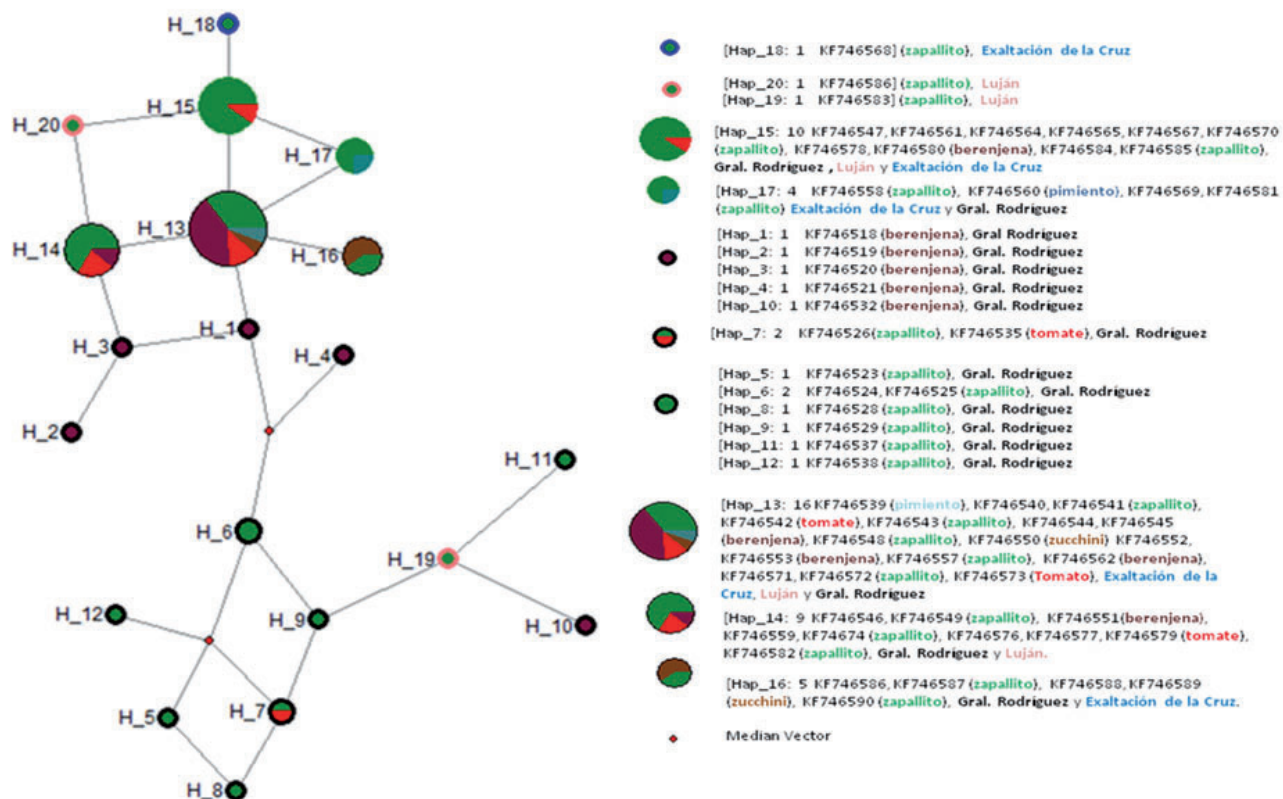


Figura 2. Red filogenética con la serie de aislamientos de *P. capsici* procedentes de los cultivos de interés: zapallito, berenjena, tomate y pimiento, y de zucchini. En el listado se indica el origen de los aislamientos (por hospedante y por localidad), en el mismo orden en que aparecen en la figura.

ján. El haplotipo 18 se encontró solo en los zapallitos de Exaltación de la Cruz; el haplotipo 16 fue compartido por el zapallito y zucchini en Exaltación y Rodríguez. El haplotipo 17 fue compartido entre el pimiento y el zapallito, también en Exaltación y Rodríguez (tabla 2 y fig. 2).

Por una parte, los estudios AMOVA mostraron una variación de 4,02% entre los grupos cuando Rodríguez y Luján (localidades cercanas entre ellas) fueron agrupadas y comparadas con Exaltación de la Cruz, a 45 kilómetros de esos lugares. La variación entre las poblaciones dentro de los grupos alcanzó el 11,07%. Estos niveles de variación fueron, sin embargo, no significativos al nivel de 0,05 (tabla 3a). La mayor cantidad de variación se encontró den-

tro de las poblaciones (84,91), la cual resultó significativa ($p < 0,02$).

Por otra parte, los índices de fijación por parejas mostraron niveles marginalmente significativos de estructura genética cuando se compararon Rodríguez y Luján. Los índices de fijación de Exaltación de la Cruz resultados significativos en el nivel 0,05 cuando se comparó con Luján y Rodríguez (tabla 3b). Cuando se agruparon de acuerdo con la especie hospedante y las familias (tabla 4) no se observó ninguna estructuración entre los grupos o poblaciones. De acuerdo con esto, cada índice de fijación por pareja entre especies hospedantes fue no significativo al nivel de 0,05, en todos los casos (tabla 4).

DISCUSIÓN

Las secuencias ITS de *P. capsici* mostraron un patrón reticular de haplotipos centrales frecuentes en la red, con haplotipos más recientes y menos frecuentes en las puntas de la red. Una posición central, junto con una mayor frecuencia, es considerada una característica de haplotipos ancestrales. Este patrón sugiere que ocurrió un proceso de diversificación en la región bajo estudio (Templeton, 1998). La aparición de los haplotipos más frecuentes y centrales (posiblemente ancestrales) en una serie de países y especies de cultivo (tabla 2) también apoya esta hipótesis.

Se detectaron de dos a tres eventos de recombinación en este estudio, en función de si se consideran las particiones geográficas o por hospedante. Estos resultados sugieren que la reproducción sexual podría haber sido parte del proceso de diversificación antes mencionado y, en consonancia, es intrigante la ausencia del TA A2 en toda Argentina (Gobena *et al.*, 2012 y estudio actual).

Por una parte, nuestro estudio no permite determinar si la recombinación y la reproducción sexual solo ocurrieron en el pasado o si todavía están presentes en la dinámica

actual de la región. Se ha sugerido que la ausencia de ambos tipos de reproducción en las poblaciones de *P. capsici* son el resultado de un sistema de producción de cultivos durante todo el año, que eliminó la necesidad de la reproducción sexual y la consiguiente formación de oosporas normalmente necesarias para la supervivencia de temporada a temporada (Lamour *et al.*, 2012). Alternativamente, podría plantearse la hipótesis de que un evento único fundacional introdujo los haplotipos antiguos en Argentina con una representación desigual de los TAA1 y A2. Posteriormente, la deriva genética podría haber dado lugar a la pérdida de los genotipos A2, originalmente menos frecuentes, en ausencia de una presión selectiva que favoreciera la aparición de ambos TAs.

Por otra parte, los genotipos A2 podrían aun estar presentes en bajas frecuencias, impulsando la reproducción sexual. Los eventos de recombinación en ausencia del TA A2 también podrían ser el resultado de la ocurrencia del tipo de apareamiento opuesto en especies alternativas; esto podría inducir la etapa sexual en *P. capsici*. Donahoo *et al.* (2008) mostraron que *P. capsici* y *P. tropicalis* forman híbridos sexuales interespecíficos en el laboratorio. Se encontró al descendiente híbrido de *P. nicotianae* y *P. cactorum* en árboles de níspero en Perú y Taiwán (Hurtao-Gonzales *et al.*, 2008) y en hidroponía en los Países Bajos (Man in't Veld *et al.*, 1998). Notablemente, el TA A2 fue encontrado en aislamientos de *P. nicotianae* y *P. cactorum* en el noreste de Buenos Aires, aunque aún no se ha registrado evidencia de hibridación cruzada (Iribarren, datos no publicados).

La estructura genética y la variación entre y dentro de los puntos de muestreo en el cinturón verde del NE de Buenos Aires se podría explicar por la actividad antrópica, ya que *P. capsici* puede ser introducido en nuevos campos a tra-

Localidad / Fst	Rodríguez	Luján	Exaltación
Rodríguez	0.00000		
Luján	0,26458*	0.00000	
Exaltación	0,05116*	0,54307*	0.00000

Tabla 3a. Índices de fijación (F_{ST}) del locus ITS de *P. capsici* con aislamientos particionados geográficamente.

*Nivel de significancia: 0,05

Hospedante / Fst	Berenjena	Pimiento	Tomate	Zapallito	Zucchini
Berenjena	0.00000				
Pimiento	0,07101*	0.00000			
Tomate	0,05084	-0,07364	0.00000		
Zapallito	0,21335*	0,17344*	0,24668*	0.00000	
Zucchini	-0,12411	-0,03998	-0,03604	0,24528*	0.00000

Tabla 3b. Índices de fijación (F_{ST}) del locus ITS de *P. capsici* con aislamientos particionados por hospedante.

*Nivel de significancia: 0,05

Fuentes de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre familias (de Hospedante)	1	0.780	- 0.01136Va	2,50%
Entre hospedantes (dentro de la familia)	3	1932	0.03767Vb	8,31%
Dentro de cada hospedante	54	23068	0.42718Vc	94,20%
Total	58	25780	0.45349	

Tabla 4. Prueba de AMOVA entre los hospedantes muestreados con presencia de *P. capsici* en el NE de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

vés de material infectado de plantas, suelo, herramientas o agua de riego (Hausbeck y Lamour, 2004; Gevens *et al.*, 2007) Por un lado, el análisis de partición geográfica reveló que la diversidad de haplotipos es particularmente alta en las localidades de Luján y Rodríguez en comparación con Exaltación de la Cruz. En esa ciudad la producción hortícola se introdujo más tarde y eso podría explicar la diferencia encontrada en esas áreas. Por otro lado, el riego por goteo y la rotación de cultivos probablemente facilitaron el cambio de hospedador de *P. capsici*, como se evidencia por la falta general de la estructura genética detectada mediante el análisis de AMOVA y los índices de FST, junto con el modelo de distribución de haplotipos observado en la red. A pesar de estos resultados, es interesante observar los niveles relativamente altos de variación que fueron encontrados en los aislamientos de berenjenas; hasta la fecha no hemos sido capaces de rastrear ninguna razón histórica o biológica que explique este hallazgo.

En cualquier caso, la estructura genética de las poblaciones de *P. capsici* en el cinturón verde de Buenos Aires contrasta notablemente con los resultados observados en Perú por Hurtado-González *et al.* (2008) y en el noroeste (NO) de Argentina por Gobena *et al.* (2012). Estas diferencias son consistentes con un patrón epidemiológico donde el viento no es un mecanismo importante y dispersión a larga distancia es poco frecuente (Granke *et al.*, 2009). De acuerdo con el modelo de riesgo presentado por McDonald y Linde (2002), en el NO de Argentina *P. capsici* debe ser considerado como un patógeno de bajo riesgo. Por el contrario, las poblaciones de estas especies que se encuentran en el cinturón verde de Buenos Aires implicarían un riesgo de moderado a alto para la práctica hortícola; tal riesgo depende de la presencia del patógeno en el momento de la reproducción sexual.

Gobena *et al.* (2012) señalaron que la estructura clonal en poblaciones del NO de Argentina han permitido la aparición de variedades de pimientos resistentes a partir del uso de aislamientos locales para limitar la infección por *P. capsici* por períodos prolongados de tiempo. Además, la ausencia de oosporas sexuales de paredes gruesas, que pueden sobrevivir por muchos años, es un activo para el manejo de enfermedades de *P. capsici* a partir del uso de estrategias de rotación de cultivos con especies resistentes o inmunes. Esta situación, sin embargo, podría ser lábil en el caso que los aislamientos de Buenos Aires lleguen, de alguna manera, a la región NO del país. En caso de que los resultados aquí mostrados sean confirmados con análisis complementarios que actualmente están en desarrollo, deberían considerarse medidas sanitarias para prevenir posibles vías de diseminación, que podrían llevar a la ruptura de la resistencia en las regiones donde *P. capsici* se controló hasta ahora con éxito.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Universidad Nacional de Luján (UNLu) y al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por aportar los fondos para este proyec-

to. Quieren agradecer también al programa Cambio Rural por su colaboración en la identificación de los productores hortícolas locales para obtener las muestras vegetales. Un enorme reconocimiento también para Claudia Ojeda (Laboratorio Central, UNLu) por su importante contribución en el procesamiento de aislamientos y su conservación a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Molecular Biology*. 215:403-410.
- ATLAS FITOPATOLÓGICO ARGENTINO. (<http://www.fitopatoatlas.org.ar/>, verificado 15 de enero de 2013).
- BANDEL, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*. 16:37-48.
- DAVIDSON, C.R.; CARROLL, R.B.; EVANS, T.A.; MULROONEY, R.P. (2002) First report of *Phytophthora capsici* infecting lima bean (*Phaseolus lunatus*) in the Mid-Atlantic Region. *Plant Disease*. 86:1049.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 562 pp.
- FRENCH-MONAR, R.D.; JONES, J.B.; ROBERTS, P.D. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Disease*. 90:345-350.
- FRENCH-MONAR, R.D.; JONES, J.B.; OZORES-HAMPTON, M.; ROBERTS, P.D. 2007. Survival of inoculum of *Phytophthora capsici* in soil through time under different soil treatments. *Plant Disease*. 91:593-598.
- GEVENS, A.J.; HAUSBECK, M.K. 2004. *Phytophthora capsici* isolated from snap bean is pathogenic to cucumber fruit and soybean. APS North Central Division Meeting.
- GEVENS, A.J.; DONAHO, R.S.; LAMOUR, K.H.; HAUSBECK, M.K. 2007. Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water. *Phytopathology*. 97:421-428.
- GEVENS, A.J.; DONAHO, R.S.; LAMOUR, K.H.; HAUSBECK, M.K. 2008. Characterization of *Phytophthora capsici* causing foliar and pod blight of snap bean in Michigan. *Plant Disease*. 92:201-209.
- GOBENA, D.; ROIG, J.; GALMARINI, C.; HULVEY, J.; LAMOUR, K. 2012. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* isolates from pepper and pumpkin in Argentina. *Mycologia*. 104:102-107.
- GRANKE, L.L.; WINDSTAM, S.T.; HOCH, H.C.; SMART, C.D.; HAUSBECK, M.K. 2009. Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. *Phytopathology* 99:1258-1264.
- HAUSBECK, M.K.; LAMOUR, K.H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*. 88:1292-1303.
- HUDSON, R.R.; KAPLAN, N. L. 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics*. 111:147-164.
- HURTADO-GONZALES, O.; ARAGON-CABALLERO, L.; APAZA-TAPIA, W.; DONAHO, R.; LAMOUR, K. 2008. Survival and spread of *Phytophthora capsici* in Coastal Peru. *Phytopathology*. 98:688-694.

- HWANG, B.K.; KIM, C. H. 1995. *Phytophthora* Blight of Pepper and Its Control in Korea. Plant Disease. The American Phytopathological Society. Vol. 79, N.º 3.
- INDEX FUNGORUM. CABI BIOSCIENCE DATABASE. (<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>, verificado 10 de diciembre de 2012).
- KREUTZER, W.A. 1937. A *Phytophthora* rot of cucumber fruit. *Phytopathology*. 27: 955.
- KREUTZER, W.A.; BODINE, E.W.; DURRELL, L.W. 1940. Cucurbit diseases and rot of tomato fruit caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*. 30: 972–976.
- KREUTZER, W.A.; BRYANT, L.R. 1946. Certain aspects of the epiphytology and control of tomato fruit rot caused by *Phytophthora capsici* Leonian. *Phytopathology*. 36:329–339.
- LAMOUR, K. 2009. *Phytophthora capsici*: Sex, Selection, and the Wealth of Variation. In: Oomycetes Genetics and Genomics. Diversity, Interactions and Research Tools. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. 41 pp.
- LAMOUR, K.H.; HAUSBECK, M.K. 2001. Investigating the Spatiotemporal Genetic Structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. *Phytopathology*. The American Phytopathological Society. Vol. 91, N.º 10. 973–980 pp.
- LAMOUR, K.H.; HAUSBECK, M.K. 2003. Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* in Michigan. *Plant Disease*. 87:841–845.
- LAMOUR, K.; KAMOUN, S. 2009. Oomycete Genetics and Genomics: Diversity Interactions and Research Tools. Hoboken, NJ. John Wiley and Sons.
- LAMOUR, K.H.; STAM, R.; JUPE, J.; HUITEMA, E. 2012. The oomycete broad host range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*. 13 (4): 329–337.
- LEONIAN, L.H. 1922. Stem and fruit blight of chilies caused by *Phytophthora capsici* sp. *Phytopathology*. 12:401–408.
- LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; FALEIRO, F.G.; DANTAS NETO, A.; MATSUOKA, K.; MARQUES, J.R.B. 2003. Diversidade genética de isolados de *Phytophthora capsici* de diferentes hospedeiros com base em marcadores RAPD patogênicidade e morfologia. *Fitopatología Brasileira*. 28:559–564.
- MAN IN'T VELD, W.A.; VEENBAAS-RIJKS, W.J.C; LLIEVA, E.; DE COCK, A; BONANTS, P.; PIETERS, R. 1998. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic ADN. *Phytopathology* 88:922–929.
- MCDONALD, B.A.; LINDE, C. 2002. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential and Durable Resistance. Annual Review. *Phytopathology*. 40:349–79.
- NEI, M. 1978. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University. Press, Nueva York. 512 pp.
- OELKE, L.M.; BOSLAND, P. W. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *J. American Society of Horticulture Science*. 128:213–218.
- QUESADA-OCAMPO, L.M., GRANKE, L.L., MERCIER, M.R., OLSEN, J.; HAUSBECK, M.K. 2011. Investigating the genetic structure of *Phytophthora capsici* populations. *Phytopathology*. 101:1061–1073.
- ROZAS, J.; LIBRADO, P. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451–1452.
- SILVAR, C.; MERINO, F.; DÍAZ, J. 2006. Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain: analysis of virulence, meta-laxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease*. 90:1135–1142.
- SUN, W.X.; JIA, Y.J.; O'NEILL, N.R.; FENG, B.Z.; ZHANG, X.G. 2008. Genetic diversity in *Phytophthora capsici* from Eastern China. *Can. J. Plant Pathology*. 30: 414–424.
- TAJIMA, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. 105:437–460.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*. 123:585–595.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*. 28(10):2731–2739.
- TEMPLETON, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*. 7: 381–397.
- TIAN, D.; BABADOOST, M. 2003. Genetic variation among isolates of *Phytophthora capsici* from Illinois (Abstract). *Phytopathology*. 93:S84.
- TIAN, D.; BABADOOST, M. 2004. Host range of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pathogenicity of isolates. *Plant Disease*. 88:485–489.
- WALKER, S.J.; BOSLAND, P.W. 1999. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *J. American Society of Horticulture Science*. 124:14–18.
- WANG, Z.; LANGSTON, D.B.; CSINOS, A.S.; GITAITIS, R.D.; WALCOTT, R.R.; JI, P. 2009. Development of an improved isolation approach and simple sequence repeat markers to characterize *Phytophthora capsici* populations in irrigation ponds in southern Georgia. *Appl. Environmental Microbiology*. 75:5467–5473.
- WATTERSON, G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical. Population Biology*. 7:256–276.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. En: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, JS. J.; WHITE T. J. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., Nueva York.