

Primer reporte de *Phytophthora sojae* y sus patotipos afectando soja en Uruguay

Sans Agustina¹, Rodríguez Marcelo², Silva Paula², Stewart Silvina²

¹Universidad de la República, Facultad de Agronomía.

²INIA La Estanzuela. Ruta 50 km 11, 70000 Colonia, Uruguay. Correo electrónico: sstewart@inia.org.uy

Recibido: 2016-09-12 Aceptado: 2017-05-13

Resumen

La podredumbre de raíz y base de tallo causada por *Phytophthora sojae* es una enfermedad que causa mermas importantes en el cultivo de soja en el mundo y en la región. Este es el primer reporte de este patógeno afectando soja en Uruguay. Para 14 aislados de *P. sojae* obtenidos de plantas sintomáticas se determinaron siete razas/patotipos diferentes utilizando un set de 14 diferenciales usados internacionalmente para tal fin. El 57 % de los aislados pertenecieron a un único patotipo (*vir1b, 3a, 3b, 5*), los seis aislados restantes pertenecieron cada uno a un patotipo diferente incluyendo algunas razas conocidas como raza 4, 14 y 25. Conocer los patotipos que predominan en el país resulta fundamental para la selección por resistencia dentro de un programa de mejoramiento de soja, y a su vez para determinar su compatibilidad con las variedades comerciales.

Palabras clave: genes resistencia, genes avirulencia, *Rps*, podredumbre de raíz y base de tallo

First Report of *Phytophthora sojae* and its Pathotypes Affecting Soybean in Uruguay

Summary

Stem and root rot caused by *Phytophthora sojae* is a disease that causes important losses in soybean worldwide and regionally. This is the first report of this pathogen affecting soybean in Uruguay. Using an international 14 differential set, seven different races/pathotypes were determined out of the 14 isolates of *P. sojae* obtained from symptomatic plants. Fifty seven percent of these belonged to a single pathotype (*vir1b, 3a, 3b, 5*), and the remaining six isolates resulted each a unique pathotype including some races known as 4, 14 and 25. Knowing which pathotypes predominate in the country is crucial to select for resistance within a soybean breeding program, and also to test their compatibility on commercial varieties.

Keywords: resistant genes, avirulence genes, *Rps*, Phytophthora stem and root rot

Introducción

Phytophthora sojae Kaufmann & Gerdemann es un Oomicete del reino Stramenopila que causa la podredumbre de raíz y de base de tallo en soja. Este patógeno puede infectar a la soja en cualquier estadio fenológico, provocando damping-off o muerte de plántulas en pre y pos emergencia, y la infección de la raíz y del tallo de plantas adultas. En 1998, se estima que se perdieron

1,27 millones de toneladas a causa de esta enfermedad en los cinco países de mayor producción de soja a nivel mundial (Dorrance y Grünwald, 2009). En EEUU, dependiendo del año, es clasificada como la segunda o tercera enfermedad más importante de la soja (Wrather y Koenning, 2009). Wilcox y St. Martin (1998) registraron mermas en la producción de grano de entre 65 % y 93 %, comparando el rendimiento de isolíneas de sojas

susceptibles y resistentes a esta enfermedad. En Argentina se han reportado incidencias del 60 y 70 % en Pergamino y Marcos Juárez, respectivamente (Vallone et al., 1999). En Brasil se reportó por primera vez en Río Grande del Sur en la zafra 1994-1995 (Costamilan et al., 1996). No fue importante hasta la zafra 2005-2006, donde se produjeron importantes fallas en la implantación en suelos compactados, lo cual conllevó a la resiembra de grandes extensiones. En Uruguay, hasta el momento, no había sido reportada en el cultivo de soja.

En los últimos 50 años, a nivel mundial, esta enfermedad se ha manejado mediante variedades de soja con genes de resistencia mayores o *Rps* (Grau et al., 2004; Schmitthenner, 1985). Se conocen actualmente 17 genes (11 loci y una serie alélica en dos de ellos) en soja que confieren resistencia a *P. sojae* (Grau et al., 2004; Lin et al., 2013; Sun et al., 2010; Zhang et al., 2013). Estos genes funcionan de acuerdo al postulado de gen-a-gen propuesto por Flor (1955). Este postulado propone que para cada gen de resistencia en la planta existe un correspondiente gen de avirulencia en el patógeno. Este último codifica un elicitor que directa o indirectamente interactúa con el producto del correspondiente gen de resistencia en la planta, causando la reacción de resistencia o hipersensibilidad (Parker, 2009).

Más de 200 patotipos del patógeno han sido reportados mundialmente en soja (Dorrance, McClure y deSilva, 2003), lo que sugiere una alta variación genética con respecto a la virulencia en la población natural. Los patotipos se determinan utilizando un set de 8 a 14 diferenciales de soja, donde cada línea de soja posee un gen de resistencia o *Rps*. Hasta el año 2000 se habían descrito 55 razas, pero debido al surgimiento continuo de nuevas combinaciones de genes de virulencia en el patógeno, la asignación de un número a la raza se tornó indescifrable (Grau et al., 2004). Por tal motivo, actualmente se describe el patotipo utilizando directamente la fórmula de virulencia, o sea indicando el gen *Rps* de la soja a la cual el aislado es capaz de infectar.

Las variedades de soja sembradas en el país generalmente se comercializan con la información del criadero indicando la resistencia a distintas razas de *P. sojae*. Es fundamental conocer qué razas o patotipos predominan en las condiciones de Uruguay para determinar su compatibilidad con las variedades sembradas y, a su vez, para seleccionar por resistencia dentro de un programa de mejoramiento de soja. El objetivo de este trabajo fue reportar por primera vez a *Phytophthora sojae* afectan-

do soja en Uruguay y determinar los patotipos de un número limitado de aislados.

Materiales y métodos

Aislamiento y purificación del patógeno

Plantas con síntomas de podredumbre de raíz y tallo, en estadios entre dos nudos y plena floración, de las variedades A 5009 RG, A 5509 RG, DM 6.2i, DM 7.0i y Cardinal GE 590 ci de las localidades de San Pedro, Semillero y Manantiales del departamento de Colonia y Trinidad en el departamento de Flores, de las zafras 2013-2014 y 2014-2015, fueron utilizadas para realizar los aislamientos. Las mismas se lavaron y se dejaron debajo de agua corriendo por 12-16 horas, luego se cortó y esterilizó la lesión con hipoclorito al 1 %, luego con alcohol al 70 % y se enjuagó con H_2O estéril. Se cortó una pequeña porción entre la zona afectada y parte sana y se colocó debajo del medio de cultivo V8 diluido (40 ml de jugo de vegetales V8, 0,6 g $CaCO_3$, 0,2 g extracto de levadura, 1 g sucrosa, 20 g agar, 1000 ml de dH_2O). Los aislados logrados fueron purificados utilizando la técnica de punta de hifa (French y Herbert, 1980) y guardados en trozos de medio de cultivo V8 diluido en agua estéril a temperatura ambiente (Schmitthenner y Bhat, 1994).

Identificación del patógeno

La identificación fue realizada observando las características de crecimiento y la morfología de las estructuras en medio de cultivo V8 diluido y luego de sucesivos lavados en dH_2O estéril a 10 °C. Para la identificación molecular, el ADN genómico fue extraído del micelio de tres aislados puros molidos con nitrógeno líquido por método CTAB (Innis et al., 1990). Los tres aislados seleccionados para la identificación molecular (Ps04, Ps06 y Ps11) fueron trabajados por duplicado y seleccionados en base a cantidad/calidad del ADN extraído. La calidad y la concentración del ADN fueron determinadas por electroforesis en agarosa al 0,8 % y utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) a 260 nm. El ADN fue amplificado por PCR convencional utilizando los cebadores ITS 5 (52'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) e ITS 4 (52'-CCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). Las condiciones de ciclado se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Ristaino et al. (1998). El largo del amplicón fue testeado en 1,5 % gel de agarosa. Los productos del

PCR fueron secuenciados en ambos sentidos (*forward*/*reverse*) utilizando el servicio estándar de Macrogen Inc, Korea del Sur (<http://www.macrogen.com>). Las secuencias *forward*/*reverse*, así como la secuencia consenso, fueron editadas utilizando el software BioEdit v7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Ambas secuencias fueron editadas eliminando los extremos con mala calidad de secuencia. Posteriormente ambas secuencias fueron alineadas, y la secuencia consenso fue sometida a búsqueda BLAST disponible en la base de datos de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y depositadas en GenBank.

Determinación de patotipos

Los patotipos fueron determinados utilizando la técnica de inoculación en hipocótilo en 14 líneas diferenciales de soja (Dorrance et al., 2008; Schmitthenner y Bhat, 1994). Los diferenciales utilizados fueron: Harlon (*Rps* 1a, Blackhawk source), L77-1863 (*Rps* 1b), Williams 79 (*Rps* 1c), Wu An - PI 103091 (*Rps* 1d), Williams 82 (*Rps* 1k), L82-1449 (*Rps* 2), L83-570 (*Rps* 3a), L91-8347 (*Rps* 3b), L92-7857 (*Rps* 3c), L85-2352 (*Rps* 4), L85-3059 (*Rps* 5), L89-1581 (*Rps* 6), L93-3258 (*Rps* 7), y Williams (susceptible universal). La soja se sembró en un sustrato mezcla (5:1:1 tierra:turba:vermiculita) en bandejas en invernáculo. A los 7-10 días de la siembra,

10 plántulas de cada diferencial fueron inoculadas efectuando una incisión, tipo ojal, en el hipocótilo con la aguja de una jeringa hipodérmica. Dentro de la lesión, utilizando la jeringa, se vertieron 0,2 a 0,4 ml de macerado del patógeno con 7-10 días de crecimiento en medio de cultivo V8 diluido (Dorrance et al., 2008). Las bandejas se cubrieron con nylon por 16-24 h para prevenir secado. Siete a diez días pos inoculación se registró la incidencia de plántulas muertas o que mostraron lesiones necróticas expandidas. Un diferencial es considerado susceptible si al menos el 70 % de las plántulas muestran esta sintomatología. El test se realizó dos veces para cada aislado.

Resultados

Se obtuvieron 14 aislados purificados de *Phytophthora sojae* de las plantas sintomáticas (Cuadro 1). Las colonias fueron identificadas como tales por presentar márgenes algodonosos densos, con oosporas de paredes gruesas de 20-42 μ m de diámetro sumergidas en el medio, con anteridios de tipo parágino y anfigino. En el agua estéril se desarrollaron esporangios no papilados, no caducos, ovoides u obpiriformes de 24-68 x 15-28 μ m, que liberan zoosporas biflageladas arriñonadas. Los

Cuadro 1. Aislados de *Phytophthora sojae* identificados.

Código	Zafra	Localidad	Departamento	Variedad
Ps01	2013/2014	Semillero	Colonia	DM 7.0i
Ps02	2013/2014	Semillero	Colonia	DM 7.0i
Ps03	2013/2014	Semillero	Colonia	DM 7.0i
Ps04*	2013/2014	Semillero	Colonia	A 5009 RG
Ps06*	2013/2014	Manantiales	Colonia	A 5509
Ps07	2013/2014	Manantiales	Colonia	A 5509 RG
Ps09	2013/2014	San Pedro	Colonia	DM 6.2i
Ps10,1	2014/2015	Tarariras	Colonia	Cardinal 590
Ps10,3	2014/2015	Tarariras	Colonia	Cardinal 590
Ps11*	2014/2015	Semillero	Colonia	DM 5958 IPRO
Ps12,1	2014/2015	Trinidad	Flores	-
Ps12,3	2014/2015	Trinidad	Flores	-
Ps13	2014/2015	-	Colonia	-
Ps13,2	2014/2015	-	Colonia	-

* Aislados identificados molecularmente.

esporangiíforos presentaron proliferación interna y encadenada o terminal. Las características evaluadas coinciden con el grupo V de Waterhouse, con el clado 7 de Kroon y con la clasificación taxonomía general del patógeno (Dorrance et al., 2007; Erwin, Bartnicki-Garcia y Tsao, 1983; Erwin y Ribeiro, 1996; Hartman et al., 2015; Kroon et al., 2012; Waterhouse, 1963). Las secuencias obtenidas de la región ITS de los tres aislados analizados presentaron 99 % o 100 % de similitud con la especie *P. sojae* en la base de datos consultada (NCBI) (Cuadro 2).

Se determinaron siete patotipos diferentes de los 14 aislados de *P. sojae* estudiados. El 57 % de los aislados pertenecieron a un único patotipo; *vir*1b, 3a, 3b, 5 (sin nombre de raza conocido). Los seis aislados restantes pertenecieron cada uno a un patotipo diferente, tres de ellos con nombres de razas conocidas: raza 4, 14 y 25 (Cuadro 3).

Nueve de los 13 genes de resistencia de la soja estudiados fueron compatibles con al menos un aislado de *P. sojae* (*Rps*1a, 1b, 1c, 1k, 2, 3a, 3b, 5 y 7) (Figura

1). Más del 70 % de los aislados fueron compatibles con los genes *Rps*1b, 3a, 3b y 5 (Figura 1). Contrariamente, los diferenciales de soja que poseen los genes *Rps*1d, 3c, 4 y 6 mostraron reacciones de resistencia al 100 % de los aislados estudiados.

Discusión

Los caracteres morfológicos y los análisis moleculares realizados permiten confirmar la identidad del patógeno como *Phytophthora sojae*, siendo este el primer reporte de *P. sojae* en Uruguay. Desde que se encontró la podredumbre de raíz y base de tallo de la soja, sólo se han visto afectadas plantas aisladas en el cultivo (Stewart, com pers.). Contrariamente, la fase de damping-off o muerte de plántulas ha producido importantes fallas de implantación (Stewart, com pers.), que al igual que en Brasil han determinado la resiembra de grandes extensiones (Costamilan et al., 1996).

A pesar del número limitado de aislados del trabajo, la variabilidad de patotipos encontrada fue mayor a la esperada para este nuevo patógeno. Generalmente cuando la

Cuadro 2. Análisis de similitud de las secuencias ITS de los aislados en estudio, con secuencias de referencias publicadas en GenBank.

Aislado	Nº accesión GenBank	Especie	Similitud*	Nº accesión secuencia con mayor similitud	Referencia
Ps04	MF093639	<i>P. sojae</i>	826/826	KU211412	Rojas et al., 2017
Ps06	MF093641	<i>P. sojae</i>	828/829	KU211412	Rojas et al., 2017
Ps11	MF093644	<i>P. sojae</i>	829/829	KU211412	Rojas et al., 2017

*Expresado en pares de bases de la cepa en estudio/pares de bases de la secuencia de GenBank

Cuadro 3. Patotipos de *Phytophthora sojae* determinados para Uruguay.

Patotipo	nº aislados	Código de aislados	Denominación
<i>vir</i> 1c 7 *	1	Ps02	raza 14
<i>vir</i> 1a 1c 7	1	Ps06	raza 4
<i>vir</i> 1b 3a 3b 5	8	Ps01, Ps03, Ps10.3, Ps11, Ps12.1, Ps12.3, Ps13, Ps13.2	-
<i>vir</i> 1b 1c 1k 2 7	1	Ps07	-
<i>vir</i> 1b 3a 3b 5 7	1	Ps04	-
<i>vir</i> 1a 1b 1k 3a 3b 5	1	Ps10.1	-
<i>vir</i> 1a 1b 1c 1k 7	1	Ps09	raza 25

* Significa que el aislado es compatible con los genes de resistencia *Rps* 1c y 7 de la soja

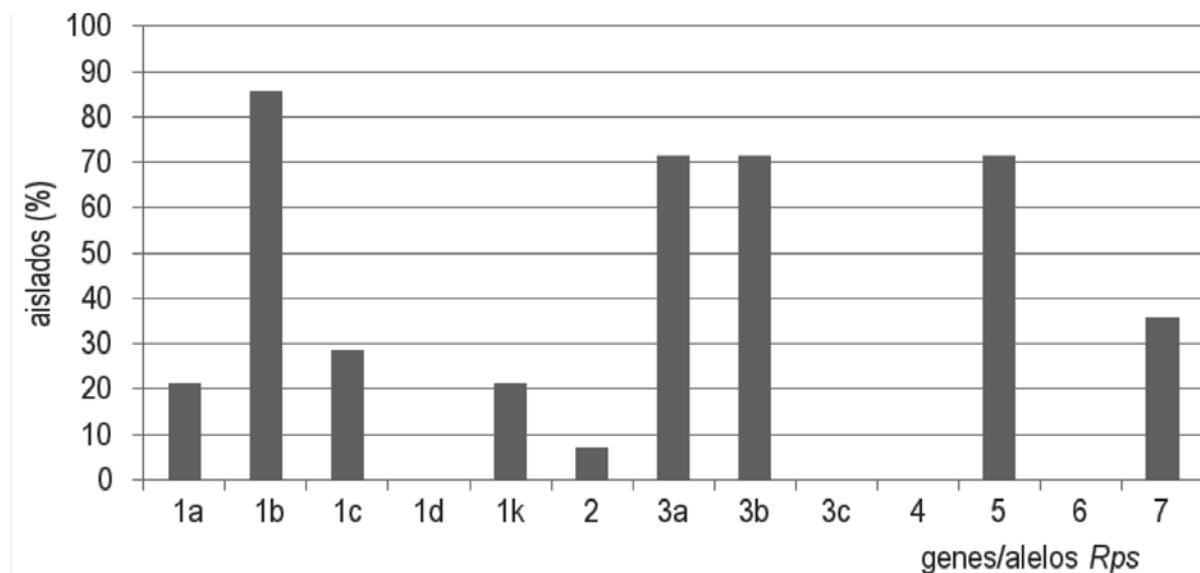


Figura 1. Porcentaje de aislados compatibles con los genes de resistencia de la soja (*Rps*).

enfermedad es recientemente introducida en una región o país, se encuentra una raza predominante. En EEUU y en Canadá prevaleció la raza 1 (*vir7*) hasta la década del 90 (Anderson y Buzzell, 1992; Laviolette y Athow, 1981; Schmitthenner, Hobe y Bhat, 1994). Tanto en Argentina como en Brasil, los primeros aislados de *P. sojae* encontrados en la década del 90 pertenecieron exclusivamente a la raza 1 (Barreto, Stegman de Gurfinkel y Fortugno, 1995; Costamilan y Bonato, 1996). Aparecieron nuevos patotipos a medida que la enfermedad adquirió importancia en el cultivo y se fueron liberando variedades con genes *Rps*. Es así que en la zafra 2013-2014 en el sudeste bonaerense se determinaron 12 patotipos distintos en 18 aislados, ninguno de los cuales correspondió a la raza 1 (Grijalba et al., 2015b). En nuestro trabajo, si bien se encontró un patotipo predominante, este no fue la raza 1, y al igual que en el sudeste bonaerense ninguno de los aislados correspondió a esta raza.

Los genes *Rps* comúnmente incorporados a las variedades comerciales en la región y en el mundo son *Rps1a*, *Rps1c* y *Rps1k* (Grijalba et al., 2015a; Schmitthenner, Hobe y Bhat, 1994), los cuales serían efectivos para más del 70 % de los patotipos encontrados en este estudio. Estos resultados sugieren que la resistencia a la enfermedad utilizando estos genes mayores todavía es efectiva para nuestras condiciones, si bien otros genes como *Rps1d*, *Rps3c*, *Rps4* y *Rps6* podrían ser hasta un 100 % efectivos.

El patotipo predominante *vir1b 3a 3b 5* debería ser utilizado para determinar su compatibilidad con las variedades

de soja sembradas localmente y con el material avanzado del programa de mejoramiento de soja local, ya que este patotipo no se utiliza para seleccionar soja en los programas de mejoramiento de la región.

A nivel mundial la tendencia es al incremento de la complejidad de la virulencia de los aislados (Dorrance, McClure y deSilva, 2003; Grijalba et al., 2015b; Schmitthenner, Hobe y Bhat, 1994), que conjuntamente con la variabilidad encontrada en este estudio realza la importancia de rutinariamente hacer un seguimiento de los patotipos y de la efectividad de los genes de resistencia.

Agradecimientos

A INIA por financiar este trabajo. A William Álvarez y Samuel Rabaza por estar siempre en todos los detalles y a Dahiana Bentos y Mónica García por su invaluable ayuda.

Bibliografía

- Anderson, T. R. y Buzzell, R. I. (1992). Diversity and frequency of races of *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea* in soybean fields in Essex County, Ontario, 1990-1989. *Plant Disease*, 76, 587-589.
- Barreto, D., Stegman de Gurfinkel, B. y Fortugno, C. (1995). Races of *Phytophthora sojae* in Argentina and reaction of soybean cultivars. *Plant Disease*, 79, 599-600.
- Costamilan, L. M. y Bonato, E. R. (1996). Identificação de raça de *Phytophthora sojae* e avaliação da resistência de cultivares de soja à podridão da raiz e da haste. *Fitopatologia Brasileira*, 21(Supl.), 353.

- Costamilan, L. M., Bonato, E. R., Urben, A. F., Matsuoka, K. y Vanetti, C. A. (1996). Ocorrência de *Phytophthora sojae* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 21 (Supl.), 395.
- Dorrance, A. E., Berry, S. A., Abney, T. S. y Anderson, T. (2008). Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. *Plant Health Progress*. doi: 10.1094/PHP-2008-0118-01-DG
- Dorrance, A. E. y Grünwald, N. (2009). *Phytophthora sojae*: diversity among and within populations. En K. Lamour y S. Kamoun (Eds.). *Oomycetes genetics and genomics: Diversity, interactions, and research tools* (pp. 197-212). New Jersey: John Wiley and Sons.
- Dorrance, A. E., McClure SA, y deSilva, A. (2003). Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* in Ohio soybean fields. *Plant Disease*, 87, 139-146.
- Dorrance, A. E., Mills, D., Robertson, A. E., Draper, M. A., Giesler, L. y Tenuta, A. (2007). Phytophthora root and stem rot of soybean. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2007-0830-07
- Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S. y Tsao, P. H. (1983). *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. St. Paul: American Phytopathological Society.
- Erwin, D. C. y Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul: American Phytopathological Society.
- Flor, H. (1955). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopathology*, 9, 275-296.
- French, E. R. y Herbert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. Costa Rica: Instituto Iberoamericano de Ciencias Agrícolas.
- Grau, C. R., Dorrance, A. E., Russin, J. y Bond, J. (2004). Fungal Diseases. En H. R. Boerma y J. E. Specht (Eds.). *Soybeans: Improvement, production, and uses* (pp 692-694). Madison: American Society of Agronomy.
- Grijalba, P., Filippi, C., Ferrari, B., Steciow, M. y Rida A. del C. (2015a). Evaluación de líneas diferenciales de soja y su interacción con *Phytophthora sojae*. En *Libro de resúmenes de XV Jornada Fitosanitarias Argentinas* (p. 75). Esperanza, Santa Fe: Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Litoral.
- Grijalba, P., Rida A. del C., Steciow, M. y Giménez Zapiola, M. (2015b). Razas de *Phytophthora sojae* obtenidas de suelos de la Región Sudeste de la provincia de Buenos Aires. En *Libro de resúmenes de XV Jornada Fitosanitarias Argentinas* (p. 76). Esperanza, Santa Fe: Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Litoral.
- Hartman, G. L., Rupe, J. C., Sikora, E. F., Domier, L. L., Davis, J. A. y Steffey, K. L. (2015). *Compendium of soybean disease and pests* (5a ed.). St. Paul: American Phytopathological Society.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. (1990). *PCR protocols: A guide to methods and amplifications*. San Diego: Academic Press.
- Kroon, L. P., Brouwer, H., de Cock, A. W. y Govers, F. (2012). The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology*, 102, 348-364.
- Laviolette, F. A. y Athow, K. L. (1981). Physiologic races of *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea* in Indiana, 1973-1979. *Plant Disease*, 65, 884-885.
- Lin, F., Zhao, M., Ping, J., Johnson, A., Zhang, B., Abney, T. S., ... y Ma, J. (2013). Molecular mapping of two genes for resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean landrace PI 567139B. *Theoretical Applied Genetics*, 126, 2177-2185.
- Parker, J. (2009). *Molecular aspects of plant resistance*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, C. L. y Parra, G. (1998). PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 948-54.
- Schmitthenner, A. F. (1985). Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Disease*, 69, 362-368.
- Schmitthenner, A. F. y Bhat, R. G. (1994). Useful methods for studying *Phytophthora* in the lab. *OARDC Special Circular*, 143, 1-10.
- 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.
- Sun, S., Wu, X. L., Zhao, J. M., Wang, Y. C., Tang, Q. H., Yu, D. Y., ... y Xing, H. (2010). Characterization and mapping of *RpsYu25*, a novel resistant gene to *Phytophthora sojae*. *Plant Breeding*. doi:10.1111/j.1439-0523.2010.01794.x.
- 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. En *Actas Mercosoya 99, Rosario, 21-25 Junio 1999* (pp. 21-23). Rosario: Colegio de Ingenieros Agrónomos de Santa Fe/ANBA.
- Waterhouse, G. M. (1963). Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*, 92, 1-22.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). New York: Academic Press.
- Wilcox, J. R. y St. Martin, S. K. (1998). Soybean genotypes resistant to *Phytophthora sojae* and compensation for yield losses of susceptible isolines. *Plant Disease*, 82, 303-306.
- Wrather, J. A. y Koenning, S. R. (2009). Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2009-0401-01-RS
- Zhang, J., Xia, C., Duan, C., Sun, S., Wang, X., Wu, X. y Zhendong, Z. (2013). Identification and candidate gene analysis of a novel *Phytophthora* resistance gene *Rps10* in a Chinese soybean cultivar. *PLoS ONE*, 8(7), e69799. doi:10.1371/journal.pone.0069799