

## Diversidad genética de *Phytophthora cinnamomi* Rands de aguacate de Michoacán, México, por medio de RAPD

RAPD-determined genetic diversity of *Phytophthora cinnamomi* Rands of aguacate, Michoacán, Mexico

Ochoa-Fuentes YM<sup>1</sup>, E Cerna<sup>2</sup>, J Landeros<sup>2</sup>, O Vazquez<sup>1</sup>, V Olalde<sup>3</sup>, A Flores<sup>2</sup>

**Resumen.** Cuarenta y dos cepas de *Phytophthora cinnamomi* Rands de aguacate, de cinco municipios del estado de Michoacán, México, fueron examinados por polimorfismos de ADN amplificadas al azar, con el objetivo de determinar la variabilidad genética. Dicha variabilidad se evaluó por reacción en cadena de la polimerasa con 21 cebadores de 10 bases, los cuales produjeron un total de 23 bandas. La distancia genética entre los aislados fue calculada por el método del promedio no ponderado y se obtuvo un dendrograma. El análisis mostró que las agrupaciones geográficas fueron fuertes.

**Palabras clave:** *Persea americana*, RAPDs, tristeza del aguacatero.

**Abstract.** Forty two Mexican isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rands were examined for genetic diversity by the random amplified polymorphic DNA assay. The amount of genetic variation was evaluated by polymerase chain reaction amplification with a set of twenty one random 10-mer primers. All amplifications revealed scorable polymorphisms among the isolates, and a total of 23 band positions were scored for the 21 primers tested. Genetic distances among the isolates were calculated, and cluster analysis was used to generate a dendrogram which showed relationships between them. These results suggest that the geographic groups were strong.

**Key words:** *Persea americana*, Root rot on Avocado, RAPDs.

## INTRODUCCIÓN

*Phytophthora cinnamomi* Rands, causante de la tristeza del aguacatero, es una de las enfermedades más devastadoras del frutal Zentmyer (1980). Este patógeno posee dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 (Erwin y Ribeiro, 1996; Alexopoulos, 1996). El grupo A2 presenta mayor grado de agresividad, y es el más común en cultivos agrícolas Zentmyer (1980); el estado sexual es una fuente potencial de variabilidad intraespecífica en especies heterotálicas (Boccas y Zentmyer, 1976). Un análisis de isoenzimas realizado en poblaciones de *P. cinnamomi* indicó que ambos grupos de compatibilidad sexual solo

están presentes en Australia (Old et al., 1984, 1988) y Sudáfrica (Linde et al., 1997, 1999) reproduciéndose sexualmente.

En México, este patógeno se ha detectado en las zonas aguacateras de Michoacán, Puebla, Veracruz, Nayarit y Morelos (Téliz et al., 1992). En Morelos y Puebla se han encontrado incidencias que fluctúan entre 45 y 90 por ciento. Actualmente, en huertas de aguacate de Michoacán, México, es alarmante el número de árboles que muestran síntomas de *P. cinnamomi*. Téliz (2000) indicó que el 5% de la superficie cultivada con aguacate presenta daños por esta enfermedad, la que tiende a incrementarse.

Existe un gran número de métodos para determinar diferencias fenotípicas y genotípicas en poblaciones de hongos y bacte-

<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia. Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Posta Zootécnica, Jesús María, Aguascalientes. CP 20900, México.

<sup>2</sup> Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. CP 25315, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Bioquímica Ecológica, CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, km 9.6 del Libramiento Norte, Carretera Irapuato- León, Irapuato, Gto. CP 36500, México.

Address Correspondence to Yisa Ochoa: e-mail: ymochoa@correo.uaa.mx; yisa8a@yahoo.com

Recibido/Received 26.III.2006. Aceptado/Accepted 20.X.2008.

rias, entre los que se destacan los basados en análisis de todo el genoma. Entre ellas se incluyen, por ejemplo, rep-PCR (PCR de elementos Palindrómicos extragénicos repetitivos); RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar); la amplificación 16S por el análisis de restricción de ADN ribosomal (ARDRA) y Ribotyping (Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción de genes de rARN; electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización de productos de PCR (PCR-DGGE), y secuenciación. Varios estudios indican que el nivel de discriminación obtenido se encuentra directamente relacionado a la resolución taxonómica que ofrece cada método. Por ejemplo ARDRA, proporcionará información a nivel de especies, mientras que RAPD y rep-PCR, revelarán la diversidad entre especies y subespecies (Péros et al., 1997; Shain et al., 2003; Picard y Bosco, 2008).

Otra de las técnicas ampliamente utilizadas para determinar variabilidad genética es Polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). Por ejemplo, esta técnica ha sido utilizada para determinar variabilidad genética entre aislados de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Claviceps africana* (González et al., 1998; Tooley et al., 2000) y diversidad genética en *Hordeum* sp. (Pakniyat et al., 1997) y *Miscanthus* sp. (Greef et al., 1997). Además, ha sido usada en fitomejoramiento, mapeo genómico y biología de poblaciones (Breyne et al., 1997).

En nuestro estudio utilizamos RAPD, que ha sido usada para detectar la variabilidad intraespecífica existente entre patógenos (Crowhurst et al., 1991; Assigbetse et al., 1994; Zimand et al., 1994). Para hongos fitopatógenos, el análisis por RAPD provee marcas para diferenciar: (1) razas de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* Snyder & Hansen (Crowhurst et al., 1991) y *F. oysporum* f. sp. *pisi* (Schlecht.) Snyder y Hansen (Grajal-Martin et al., 1993); (2) aislados agresivos y no agresivos de *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. (Goodwin y Annis, 1991; Schäfer y Wöstemeyer, 1992); (3) aislados con diferentes orígenes geográficos de *Collectotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Guthrie et al., 1992), y (4) aislados de *Discula umbrinella* Sacc. en diferentes hospederos (Haemmerli et al., 1992).

Hasta el momento, la diversidad genética de *P. cinnamomi* no ha sido determinada en Michoacán, México. Este es un importante interrogante a resolver, que permitirá planear estrategias de control. El objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad genética y las relaciones entre 42 aislados de *P. cinnamomi* utilizando polimorfismos de ADN amplificados al azar. Los aislados de *P. cinnamomi* fueron obtenidos de las principales áreas productoras de aguacate en Michoacán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Cuarenta y dos aislados (Tabla 1) de *P. cinnamomi* se analizaron por la técnica Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPD). Los aislados fueron extraídos de raíz y suelo bajo árboles de aguacate. El método de Zentmyer y Erwin (1970) se utilizó para aislar a *P. cinnamomi* de las raíces, y el método de Campbell (1949) y Rondón et al. (1988) para aislar el patógeno desde el suelo.

**Tabla 1.** Aislados de *Phytophthora cinnamomi* de Michoacán, México, usados en polimorfismos de ADN amplificados al azar.

**Table 1.** *Phytophthora cinnamomi* (Michoacán, México) isolates used in DNA polymorphisms amplified at random.

Aislado	Municipio
C1	Periban
C2	Periban
C3	Periban
C4	Periban
C5	Periban
C29	Periban
C6	S. Escalante
C7	S. Escalante
C8	S. Escalante
C9	S. Escalante
C10	S. Escalante
C24	S. Escalante
C26	S. Escalante
C31	S. Escalante
C11	San Juan Nuevo
C12	San Juan Nuevo
C13	San Juan Nuevo
C25	San Juan Nuevo
C27	San Juan Nuevo
C28	San Juan Nuevo
C30	San Juan Nuevo
C35	San Juan Nuevo
C36	San Juan Nuevo
C40	San Juan Nuevo
C14	Tancitaro
C15	Tancitaro
C16	Tancitaro
C32	Tancitaro
C37	Tancitaro
C38	Tancitaro
C39	Tancitaro
C41	Tancitaro
C42	Tancitaro
C17	Uruapan
C18	Uruapan
C19	Uruapan
C20	Uruapan
C21	Uruapan
C22	Uruapan
C23	Uruapan
C33	Uruapan
C34	Uruapan

**Tabla 2.** Secuencia de Nucleótidos de MWG, Inc. (Biomol) iniciadores usados en el experimento, y número de productos de PCR polimórficos en *Phytophthora cinnamomi*.

**Table 2.** Sequence of starting nucleotides of MWG, Inc. (Biomol) used in the study and number of polymorphic PCR products in *Phytophthora cinnamomi*.

Secuencia	Número de polimorfismos /Total
E-01 CCCAAGGTCC	0/0
E-02 GGTGCGGGAA	0/0
E-03 CCAGATGCAC	0/0
E-04 GTGACATGCC	8/9
E-05 TCAGGGAGGT	0/0
E-06 AAGACCCCTC	8/8
E-07 AGATGCAGCC	0/0
E-08 TCACCACGGT	0/0
E-09 CTTACCCGA	0/0
E-10 CACCAGGTGA	1/1
E-11 GAGTCTCAGG	0/0
E-12 TTATCGCCCC	0/0
E-13 CCCGATTCCG	0/0
E-14 TGCGGCTGAG	0/0
E-15 ACGCACAACC	0/0
E-16 GGTGACTGTG	0/0
E-17 CTAAGTCCGT	0/0
E-18 GGACTGCAGA	0/0
E-19 ACGGCCTATG	0/0
S-13 GTCGTTCTG	5/5

Se obtuvo el micelio de *P. cinnamomi* de una caja de Petri con medio V-8 agar clarificado (20% V-8, 0,2% de CaCO<sub>3</sub>, 1,6% de agar bacteriológico y 2,0% de dextrosa anhidra). La extracción de ADN se realizó por el método Doyle y Doyle (1990) modificado por Vázquez. Se pesaron 0,2 g de micelio que fueron macerados con una varilla de metal para resuspenderlos en 500 µL de buffer de extracción (Tris-HCl, pH 8,0 100 mM; EDTA pH 8,5 50 mM; NaCl 50 mM, y SDS 2%). Se agitó en un vortex durante 30 segundos, y se dejó reposar en hielo por 15 minutos. Se agregaron 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, y agitó en un vortex, para posteriormente centrifugarlo a 12.000 rpm durante 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa a la que se le adicionó un volumen igual de isopropanol. Se dejó reposar por 15 min. en hielo para posteriormente centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue desechado y la pastilla recuperada, la cual fue resuspendida en 50 µL de agua desionizada estéril. Se agregaron 10 µL de ARNasa y se incubó a 37°C por 1 h. Finalmente, se determinó la concentración de ADN, el cual fue diluido hasta obtener 50 ng/µL.

**Condiciones de PCR.** La amplificación del ADN se realizó con cada uno de los iniciadores mostrados en la Tabla 2. Estos oligonucleótidos constan de 10 bases de longitud, obtenidos de MWG, Inc. (Biomol). Las condiciones de PCR

óptimas para la reacción de RAPD fueron las siguientes: Cada 24 µL mezcla para PCR contenía 2,5 µL de buffer de la Taq 10X; 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM; 2 µL de mezcla de DNTPs a 10 mM; 0,2 µL Taq polimerasa 5U/µL; 1 µL de iniciador 10 picomoles; 2 µL ADN a 50 nanogramos, y 15,1 µL de agua.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de 94°C por 5 min., 45 ciclos a 94°C por 1 min., alineamiento a 35°C por 1 min. y extensión a 72°C por 1 min. 10 seg., y un último ciclo a 72°C por 7 min. (Chang, 1996).

**Análisis de los productos PCR.** Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% (Promega Inc Biomol) en TAE buffer 1X (pH 8,3) a 60 V por 3 h. El gel se tiñó con 5 µL de bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV (302 nm).

**Análisis de datos.** Para obtener un dendograma, se obtuvieron las disimilaridades genéticas, utilizando el coeficiente de apareamiento múltiple (Sneath y Sokal, 1973) y el método de agrupamiento jerárquico UPGMA o método del promedio no ponderado.

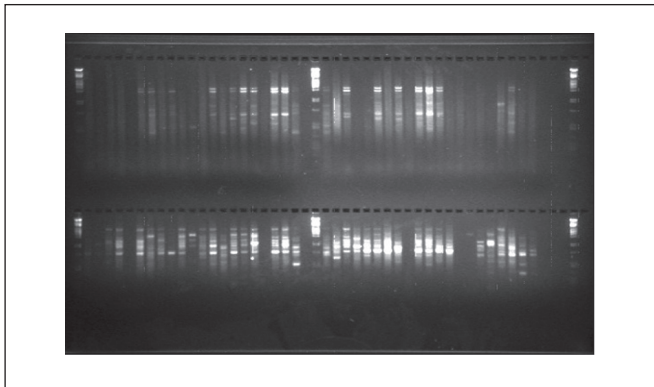
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuarenta y dos aislados de *P. cinnamomi* de aguacate de los municipios de Peribán, Tancitaro, San Juan Nuevo, Salvador Escalante y Uruapan del estado de Michoacán México, fueron analizados con 21 oligonucleótidos. Cuatro de estos oligonucleótidos presentaron amplificaciones con un total de 23 bandas, que representaron el 95,65% de polimorfismos. Los iniciadores usados, el número total de bandas, así como bandas polimórficas obtenidas de los aislados se muestran en la Tabla 2. El patrón de bandeado obtenido con los iniciadores OPS-13, OPE-04, OPE06 y OPE-10 se utilizó para determinar la distancia genética entre los aislados y construir un dendograma (Figs. 1 y 2). Chang (1996) encontró 80,2% de polimorfismos, así como coeficientes de similitud de los grupos de compatibilidad sexual A1 (0,695) y A2 (0,63) a partir de 25 aislados de *P. cinnamomi* analizados por RAPDs. Los aislados fueron obtenidos de raíces de *Cinnamomum osmophloeum* y aguacate de suelos forestales. Estos resultados indicaron que las poblaciones A1 presentaron menor variación que las poblaciones A2. Sin embargo, la diferenciación genética no fue significativa.

Las amplificaciones obtenidas en nuestro trabajo de investigación oscilaron entre 0,564 a 2,7 kb, a las que se les otorgaron dos valores: 1 para la banda presente y 0 para la ausente. Esta agrupación mostró dos niveles de asociación. Así, los aislados se clasificaron dentro de dos grupos principales y dos subgrupos. Esta separación está relacionada con la localización geográfica de la cual fueron obtenidos los mismos. El análisis y la determinación de los niveles de confianza muestran que estas agrupaciones geográficas son fuertes. Para obtener los coeficientes de confianza de Felsenstein (1985) se utilizó un total de B=1000 remuestras para los nodos del dendograma; el dendograma reporta 95% de confianza o número de veces que dicho nodo se repite.

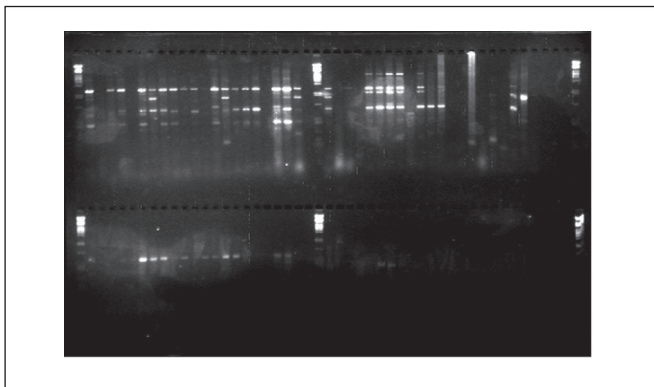
**Fig. 1.** Patrón de bandeo obtenido por polimorfismos de ADN amplificados al azar con los iniciadores OPS13 y OPE04; con  $\lambda$  HindIII como marcador de peso molecular.

**Fig. 1.** Banding pattern obtained through DNA polymorphs amplified at random with starters OPS13 and OPE04; with  $\lambda$  HindIII as a molecular weight marker.



**Fig. 2.** Patrón de bandeo obtenido por polimorfismos de ADN amplificados al azar con los iniciadores OPE06 y OPE10; con  $\lambda$  HindIII como marcador de peso molecular.

**Fig. 2.** Banding pattern obtained through DNA polymorphs amplified at random with starters OPE06 and OPE10; with  $\lambda$  HindIII as a molecular weight marker.



Al comparar las poblaciones de *P. cinnamomi* de los cinco municipios del estado de Michoacán, México, la agrupación de los aislados se mantuvo en relación a la distribución geográfica. En el grupo A se encuentran el 87,5% de los aislados de Salvador Escalante, el 83,3% de los aislados de Peribán, el 66,6% de los aislados de Tancítaro, 50% de los aislados de San Juan y 45% de los aislados de Uruapan. En el grupo B se muestra el 50% de los aislados de San Juan Nuevo y el 55% de los aislados de Uruapan. Los sitios de muestreo pertenecientes al grupo B presentan condiciones climáticas de suelo y vegetales semejantes: una altura promedio de 1950 msnm, clima templado con lluvias en verano, precipitación de 900 mm y temperaturas de 7 a 38°C. El suelo es andosol ocrico-húmico moderadamente drenado, de uso forestal y en menor proporción agrícola. En la vegetación domina el bosque de coníferas con pino oyamel y juníperos, y el bosque mixto de pino-encino

(ASSEAM, 1998). Con respecto a los dos subgrupos presentes en el dendograma y en relación con el origen geográfico de los aislados fueron designados como a1, a2, b1 y b2. Esto podría deberse a una fuente de variabilidad genética, producto de la reproducción del patógeno. Esto es debido a que *P. cinnamomi* es un importante patógeno de raíz en un enorme número de hospederos, principalmente en regiones forestales de todo el mundo (Thorn y Zentmyer, 1954; Zak y Campell, 1958; Podger, 1972; Zentmyer, 1980; Shea et al., 1983).

La reproducción sexual en especies de *Phytophthora*, ha tenido una influencia significativa en los niveles de diversidad genotípica en poblaciones de estos patógenos. Por ejemplo, la introducción de ambos grupos de compatibilidad de *Phytophthora infestans* dentro de Europa incrementó la diversidad genotípica de este patógeno (Drenth et al., 1994). Aislados de *P. cinnamomi* en Sudáfrica presentaron diferencias genéticas significativas (Linde et al., 1997, 1999).

En el mundo, la variación genética de poblaciones de *P. infestans* podría no ser totalmente atribuida a la reproducción sexual (Goodwin et al., 1994; Xu et al., 1999). La variabilidad genética generada por recombinación mitótica puede explicar variabilidad fenotípica. Esto sugiere la expresión de clones de *P. cinnamomi* en el mundo (Oudemans y Coffey, 1991). La considerable variación de poblaciones de *P. cinnamomi* en Australia es atribuida a la reproducción asexual y sexual (Dudzinski et al., 1993). La variación genotípica y fenotípica de poblaciones de *P. cinnamomi* en el mundo, no es conocida con claridad. Sin embargo, la reproducción asexual se ha informado como un mecanismo predominante de variación en poblaciones del patógeno (Huberli et al., 1997, 2001). Estos autores demostraron una variación sustancial en fenotipos dentro de una línea clonal de *P. cinnamomi*, en dos poblaciones localizadas a 70 km de distancia. Este fue el primer estudio en *P. cinnamomi* donde se usaron un gran número de aislados (73). Nuestro trabajo de investigación demostró que existe variabilidad genética en *P. cinnamomi* de aguacate en la región productora de Michoacán, México.

## REFERENCIAS

- Alexopoulos, C.J., C.W. Mims y M. Blackwell (1996). *Introductory mycology*. 4th ed. 868 p.
- ASSEAM (Asociación de Exportadores y Empacadores de Aguacate Mexicano, A.C.) (1998). *El aguacate Mexicano. Producción y destino*, Uruapan, Michoacán, México. 43 p
- Assigbetse, K.B., D. Fernandez, M.P. Dubois y J.P. Geiger (1994). Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84: 622-626.
- Boccas, B. y G.A. Zentmyer (1976). Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 66: 477-484.
- Breyne, P., W. Boerjan, T. Gerats., M. Van Montagu y A. Van Gysel (1997). Applications of AFLPTM in plant breeding, molecular biology and genetics. *Belgian Journal of Botany* 129: 107-117.

- Campbell, W.A (1949). A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. *Plant Disease Reporter* 33: 134-135.
- Chang, T.T. (1996). Decline of two *Cinnamomum* species associated with *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. *Plant Pathology Bull* 2: 1-6.
- Crowhurst, R.N., B.T. Hawthorne, E.H.A. Rikking y M.D. Templeton (1991). Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics* 20: 391-396.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Drenth, A., I.C.Q. Tas. y F. Grovers (1994). DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing populations of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 100: 97-107.
- Dudzinski, M.L., K.M. Old. y R.J. Gibbs (1993). Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* 17: 35-37.
- Erwin, D.C. y O.K. Ribeiro (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minesota. USA. 526 p.
- Felsenstein, J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- González, M., R. Rodríguez., M.E. Zavala., J.L. Jacobo., F. Hernández., J. Acosta., O. Martínez y J. Simpson (1998). Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88: 292-299.
- Goodwin, S.B., B.A. Cohen. y W.E. Fry (1994). Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academic Sciences USA* 91: 11591-11595.
- Goodwin, P.H. y S.L. Annis (1991). Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2482-2486.
- Grajal-Martin, M.J., C.J. Simon y F.J. Muehlbauer (1993). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 83: 612-614.
- Greef, J.M., J. Schondelmaier y M. Deuter (1997). Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Aspects of Applied Biology* 49: 231-235.
- Guthrie, P.A.I., C.W. Magill., R.A. Frederiksen y G. N. Odvody (1992). Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Collectotrichum graminicola*. *Phytopathology* 82: 832-835.
- Haemmerli, U.A., U.E. Brändle, O. Petrini y K.M. McDermott (1992). Differentiation of isolates of *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*) from beech, chestnut, and oak using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Plant Microbe Interaction* 5: 479-483.
- Huberli, D., L.C. Tommerup y G.E. Hardy (1997). The role of paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycological Research* 101: 1383-1388.
- Huberli, D., L.C. Tommerup., M.P. Dobrowolski., C. Calver. y J.G. Hardy (2001). Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycological Research* 105 (9): 1053-1064.
- Linde C, A. Drenth., G.H.J. Kemp., M.J. Winfield y S.L. von Broembsen (1997). Populations structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology* 87: 822-827.
- Linde, C., A. Drenth y M.J. Wingfield (1999). Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. *European Journal of Plant Pathology* 105: 667-680.
- Old, K.M, G.F. Moran y J.C. Bell (1984). Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany* 62: 2016-2022.
- Old, K.M, M.J. Dudzinski y J.C. Bell (1988). Isozyme variability in field populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. *Australian Journal of Botany* 36: 355-360.
- Oudermans, P. y M.D. Coffey (1991). Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycological Research* 95: 19-30.
- Pakniyat, H., W. Powell y E. Baird (1997). AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* c. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. *Genome* 40: 332-341.
- Péros, J.P., G. Berger. y F. Lahogue (1997). Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* populations of a single vineyard. *Phytopathology* 87: 799-806.
- Picard, Ch y M. Bosco (2008). Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften* 95: 1-16.
- Podger, F.D (1972). *Phytophthora cinnamomi*, a cause of lethal disease in indigenous plant communities in Western Australia. *Phytopathology* 62: 972-981.
- Róndon, A., Z. Suárez., M. Figueroa y V. Tellechea (1988). Comportamiento de los Patotipos de *Phytophthora cinnamomi* aislados de aguacate en Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 1: 14-16.
- Schäfer, C. y J. Wöstemeyer (1992). Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *Journal of Phytopathology* 136: 124-136.
- Shain, F., R. Kotan, P.A. Abbasi y S.A. Millar (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv *zinniae* strains. *European Journal of Plant Pathology* 109: 165-172.
- Shea, S.R., B.L. Shearer., J.T. Tippett y P.M. Deegan (1983). Distribution, reproduction and movement of *Phytophthora cinnamomi* on sites highly conducive to jarrah dieback in southwestern Australia. *Plant Disease* 67:970-973.
- Sneath, P.H. A y R.R. Sokal (1973). Numerical Taxonomy. San Francisco, W.H. Freeman and Company. San Francisco, California, USA. 573 p.
- Téliz, D., A. Mora, C. Velásquez, R. García, G. Mora, P. Rodríguez., J. Etchevers. y S. Salazar (1992). Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. *Proceedings of Second World Avocado Congress*: 79-87 p.p.
- Téliz, D (2000). El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 219 p.
- Thorn, W. A. y G.A. Zentmyer (1954). Hosts of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease Reporter* 38: 47-52
- Tooley, P.W., N.R. ONelly., E.D. Goley y M. M. Carras (2000). Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* species by RAM and AFLP analyses. *Phytopathology* 90: 1126-1130.
- Xu, J., T.G. Mitchell. y R. Vilgalys (1999). PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Molecular Ecology* 8: 59-73.
- Zak., B. y W.A. Campbell (1958). Susceptibility of southern pines and other species to the littleleaf pathogen in liquid culture. *Forest Science* 4: 151-161.

- Zentmyer, G.A. y D.C. Erwin (1970). Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology* 60: 1120-1127.
- Zentmyer, G.A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monogr. No 10. The American Phytopathological Society, St, Paul, Mn. 96 p.
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet y S. Manulis (1994). Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98: 531-534.