

Tesis Doctoral

# Sobre la mancha púrpura de la semilla de la soja: naturaleza de su etiología y diversidad

Guillin, Eduardo Alejandro

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Guillin, Eduardo Alejandro. (2018). Sobre la mancha púrpura de la semilla de la soja: naturaleza de su etiología y diversidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6511\\_Guillin](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6511_Guillin)

Cita tipo Chicago:

Guillin, Eduardo Alejandro. "Sobre la mancha púrpura de la semilla de la soja: naturaleza de su etiología y diversidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6511\\_Guillin](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6511_Guillin)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**“Sobre la Mancha Púrpura de la Semilla de la Soja: naturaleza de su etiología y diversidad”**

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

Lic. Eduardo Alejandro Guillin

**Directora de Tesis:** Dra. Alexandra M. Gottlieb

**Consejero de Estudios:** Dr. Hernán Dopazo

Instituto de Genética Ewald A. Favret,  
Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias,  
**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria,**  
Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 12.12.2018

# Agradecimientos

A mis viejos, Gloria y Eduardo. A mi hermano, Chris. La infancia es tesoro.

A Vero, Matu, Fran y Manu. Que sea mágico lo cotidiano.

A Cori y nuestro hijo. Parte del Aire, en Libertad.

Gracias por el privilegio del Amor compartido.

Las sensaciones con ustedes SON el sentido de mi vida.

Siendo un niño de la calle en la ciudad de Santos (Brasil), Oscar Alemán recibió un *cavaquinho* de manos de la viuda de un *luthier*, cuyo último deseo fue que él lo tuviera, en el mejor estuche de la Casa. Así, una mano generosa ayudó a este artista maravilloso a recorrer un camino que lo llevó a ser, acaso, el más grande guitarrista de la Humanidad.

En otro ámbito y escala, la ciencia como la vida, es una actividad colectiva. Está basada en los vínculos antes que en el “mérito individual”. Gran cantidad de *cavaquinhos* me han sido así provistos por innumerables instituciones y personas para alcanzar este logro ciertamente modesto. Sin embargo, esta tesis es para mí, a la vez, un enorme reencuentro con una parte importante de mi vida. Un modo de reconectar con un sendero del cual la tragedia alguna vez me arrancó. Vaya entonces mi más sincero y grande agradecimiento para todos ellos. Espero ser lo menos injusto posible:

- A la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación, sin cuyo apoyo, entre 2011 y 2015, esta tesis no hubiera ocurrido.
- Al Departamento de Bioquímica y Biología Celular de la Universidad Federal Viçosa (Minas Gerais, Brasil) por su muy cordial hospitalidad y generosidad al permitirme desarrollar allí parte de las tareas de la presente Tesis Doctoral.
- A la Universidad de Buenos Aires, por el espacio, la capacitación y las facilidades provistas para el desarrollo de este trabajo de tesis. Por permitirme acceder a una educación pública, gratuita, de calidad y al servicio de nuestro país.
- Al INTA, por su entidad en tanto institución, como referencia académica y para la comunidad. Porque es un recurso estratégico para que la Ciencia Argentina sirva al agregado de valor en las cadenas productivas. Y porque también está presente para los pequeños productores, donde más se necesita la asistencia del Estado.
- A todos aquellos que sostienen y luchan por una Ciencia para la inclusión.
- Al Ing. Alberto Prina, que me cobijó en IGEAF en el momento más triste de mi vida.
- Al Dr. Juan Carlos Salerno y la Ing. Agr. Gabriela Pacheco, directores del Instituto de Genética Ewald A. Favret (IGEAF). Ellos me brindaron el marco de libertad y el apoyo institucional para alcanzar este sueño (Salerno *dixit*).
- Mariana Kandus, agradezco tu simpatía, cordialidad y tantas charlas compartidas.
- A Roberto Richmond, mi “guía espiritual” e historiador en lo referente al IGEAF.
- A Javier, Miguel, Galenzo, Carlos y “los muchachos del fondo”, con quienes, en estas épocas adversas, encontramos un espacio común para hacernos fuertes.

- A toda la gente del Instituto de Genética.
- Al Laboratorio de Citogenética y Evolución (LaCyE) y su fundadora, la Dra. Lidia Poggio, mi madrina científica. Ésto recién empieza, Lidia!!!!
- A Jimena, Daniela, Mariana, Naty, y demás Chicas Superpoderosas. Mil gracias por los momentos compartidos, la cordialidad y calidez humana que sentí allí en el cuarto piso del pabellón II. Mi casa en el mundo de la Ciencia.
- A Jimena, además, y a Sol Bignolo, por su inestimable ayuda en cuestiones para mí inextricables, y que sin ellas me hubieran introducido en el Laberinto del Fauno.
- Al Dr. Luiz Orlando de Oliveira (UFV-MG), por su calidad humana y profesional. Por su ayuda, su tolerancia, su empeño y capacidad docente. Por su excelente trato. Por su valiosa experiencia y conocimiento, y su generosidad al compartirlos.
- A todos los pasantes, becarios y profesionales con quienes compartimos en el laboratorio de Luiz, bajo cuya ala conformaron un grupo de trabajo excepcional.
- Al Ing. Agr. Pablo Grijalba, con quien empezamos una colaboración profesional ya ni me acuerdo cuándo. Pero que ha sido, es y espero seguirá siendo más que fructífera tanto en lo académico como en lo humano.
- Alex: una dedicatoria precisa y justa me llevaría probablemente otra tesis (quizás quieras dirigirla, vos dirás...). Te agradezco entonces, resumiendo, tu amistad. También, todo lo mucho que me has enseñado durante interminables “días Guillin”. Gracias por tu minuciosa rigurosidad, que me ha hecho un mejor profesional. Por tus conocimientos y experiencia académica, que tanto han enriquecido esta tesis.
- A mis viejos, por la vida. Por mostrarme, hasta el punto necesario, que el mundo es de un modo. Espero poder retribuir en alguna medida, y ser recíproco con mis hijos. Será mi mejor homenaje.
- A mis hijos, Manuel, Franco y Mateo (en orden de aparición). Es muy difícil expresar al Amor y sus circunstancias, sólo con palabras. Más útil será el vórtice de las miradas. Cuando se abre una flor... es ley de vida.
- A mi hermano Christian, con quien ocupamos nichos ecológicos tan distintos. Gracias por ese prisma, que me ha permitido ver más muchos colores de los que hubiera visto por mí mismo. Sinestesia, ponele!!!!

- A Vero, por el Amor, la muchas veces inmerecida tolerancia, la inteligencia, el apoyo, la fuerza, el respeto y la generosidad de una Compañera que me honra al elegirme. Estoy muy orgulloso de nuestra vida juntos, nuestros proyectos, y el Amor que nos profesamos.
- A Corina, quien me fundó como hombre, y a nuestro hijo, fruto de nuestro Amor. Se me fueron, pero aún me guían. Siempre.

La vida es, efectivamente, un jardín de senderos que se bifurcan.

Pero esas sendas bien pueden coalescer nuevamente.

Caminos, sobre la mar.

## Resumen

La mancha púrpura de la semilla de la soja (MPSS) es una enfermedad fúngica distribuida en todas las regiones productoras de este cultivo a escala global. Se ha señalado al hongo *Cercospora kikuchii* como agente etiológico único de esta patología.

Se exploran aquí las consecuencias del encuentro entre ese agente etiológico, genéticamente muy variable y de larga historia evolutiva, y la soja, cultivo de base genética muy estrecha y reciente expansión en todo el mundo. Para ésto se evaluaron las relaciones genéticas y genealógicas entre aislamientos tentativamente identificados como *C. kikuchii* de las principales regiones sojeras de Sudamérica. El análisis filogenético se expandió para evaluar la relación con especies provenientes de otros hospederos y geografías.

Se obtuvieron aislamientos fúngicos de Argentina, Brasil y, complementariamente, del Estado de Arkansas (EEUU). El análisis estuvo basado en la información de secuencias nucleotídicas de hasta siete *loci* (seis nucleares y uno mitocondrial), con la que se confeccionaron diversos conjuntos de datos, acorde a los objetivos específicos de cada estudio. Las relaciones genealógicas se infirieron utilizando algoritmos de análisis de redes, de análisis discriminante de componentes principales y filogenias bayesianas. Las relaciones genéticas entre aislamientos fueron evaluadas con varias pruebas de recombinación. La cohesión interna de los grupos se evaluó mediante algoritmos bayesianos de delimitación de especies. Se caracterizó también la abundancia relativa de especies en diferentes países, regiones fitogeográficas y provincias. El análisis molecular de la varianza permitió estimar la estructura genética en diferentes escalas espaciales. Se establecieron gráficamente haplogrupos tomando como base los haplotipos discriminados.

El alto nivel de diversidad haplotípica aparece organizado en 4 grupos (linajes) claramente diferenciados. Las topologías reticuladas fueron evidentes, sugiriendo conflicto de caracteres entre esos grupos. Se validaron 12 eventos de intercambio (intra e inter-*locus*) de un total de 67 haplotipos analizados, aún con umbrales altamente astringentes. El análisis filogenético mostró que esos linajes exhiben una relación monofilética con al menos 5 de las 70 especies de *Cercospora* reportadas, logrando su identificación tentativa. Se corroboró que, pese al flujo génico entre linajes, los reservorios génicos de esas especies son internamente coherentes. De todo esto se sigue que los eventos de intercambio detectados resultan de eventos de transferencia génica horizontal (TGH) entre especies. Este fenómeno jugaría así un rol importante en la evolución y epidemiología de los fitopatógenos en estudio. Se observó también una gran variación genética entre especies, así como una distribución heterogénea de las especies entre las regiones consideradas.

La colonización de la soja por parte de los diversos patógenos fúngicos (nombrados como: *Cercospora* sp. Q, *Cercospora* sp. H, *C. cf. sigesbeckiae*, *C. cf. flagellaris*) se explicaría entonces por su capacidad polifágica oportunista, al acceder desde la vegetación lindante a los lotes. Por otra parte, *C. kikuchii* sería un patógeno específico del género *Glycine*. El nivel de intercambio genético entre especies registrado muestra que los agentes causales de la MPSS constituyen un singameón ó una multiespecie.

Los resultados tienen implicancia en la comprensión de los desafíos que la situación epidemiológica acarrea en el desarrollo de fungicidas, el mejoramiento y la producción de soja, los cuales parecen ser mucho más serios de lo que hasta ahora se anticipaba.

**Palabras clave:** *Cercospora*, evolución reticulada, TGH, multiespecie, epidemiología.

## Abstract

### “On the Soybean Purple Seed Stain: Nature, etiology and diversity”

Soybean purple seed stain (SPSS) is a destructive, worldwide distributed fungal disease. It has been traditionally considered that its sole etiological agent is a cercosporoid fungus, *Cercospora kikuchii*.

This work aims at shedding light on the causes and consequences of the clash between an extremely variable, ancient organism such as the causal agent of the SPSS and a recently arrived, narrow-based crop species such as the soybean. With this goal in mind, we explore the genealogical and genetic relationships within this cercosporoid fungus in the main soybean producing areas in South America. We further explore the phylogenetic relationships amongst the Southamerican lineages with other *Cercospora* species previously reported.

Fungal isolates were obtained from Argentina and Brazil and, complementarily, from the State of Arkansas (US). DNA sequences were obtained for seven *loci* across the collection of isolates. Relationships amongst isolates were evaluated through Bayesian phylogenetic inferences, distance network analyses and discriminant analyses. The occurrence of genetic exchange was tested with different recombination tests.

The high haplotype diversity was arranged into four haplogroups. Reticulate network topologies were evident and 12 inter-lineage exchange events were validated by at least four tests each, with highly stringent acceptance thresholds. Bayesian phylogenetic analyses have shown that such haplogroups formed monophyletic clusters with at least five out of the seventy *Cercospora* species previously reported. Bayesian species delimitation indicated that, despite the high frequency of genetic exchange herein detected (12 out of 67 haplotypes), the genetic *reservoirs* for these species are internally coherent. Such body of evidence indicates that the occurrence of genetic exchange is due to horizontal gene transfer (HGT) across species boundaries, rather than intra-specific recombination. This constitutes the first report of HGT in the genus *Cercospora*. Reticulate evolution appears therefore to play a significant role in the evolutionary and epidemiological dynamics of *Cercospora* species in the region. Soybean has thus been opportunistically colonized by different pathogens (mentioned as *Cercospora* sp. Q, *Cercospora* sp. H, *C. cf. sigesbeckiae*, *C. cf. flagelaris*) with polyphagic ability; *C. kikuchii*, on the other hand, seems to be a specific pathogen for the genus *Glycine*. Such species are further distributed in a heterogeneous fashion in the sampled areas. A great deal of inter-specific genetic variation was also recorded, as well as a heterogeneous distribution of those species across the regions considered.

The occurrence of interspecific recombination and a heterogeneous species distribution have implications for the understanding of epidemiological threats and challenges to fungicide development, soybean breeding and production, which appear to be far more serious than previously anticipated.

Keywords: *Cercospora*, reticulate evolution, HGT, multi-species, epidemiology.

## Índice

Introducción .....	1
Aspectos biológicos .....	2
Breve historia evolutiva de los hongos cercosporoideos .....	2
Hongos cercosporoideos .....	3
Mecanismos reproductivos en hongos .....	3
El género <i>Cercospora</i> .....	5
Diversidad genética en <i>Cercospora kikuchii</i> (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner .....	7
Aspectos agronómicos .....	7
Relevancia como fitopatógenos .....	7
El hospedero: origen de la soja como especie cultivada .....	10
Importancia del cultivo de la soja en la economía argentina .....	11
Impacto de <i>Cercospora</i> en el cultivo de la soja .....	13
Manejo de la enfermedad .....	14
Aspectos metodológicos .....	15
Análisis de Congruencia .....	15
Análisis de Redes .....	16
Análisis Discriminante de Componentes Principales .....	18
Objetivo general e hipótesis .....	20
Hipótesis iniciales .....	21
Hipótesis subyacentes .....	21
Materiales y Métodos .....	23
Materiales .....	24
Datos <i>in silico</i> .....	30
Métodos .....	36
Cultivo <i>in vitro</i> .....	36
Extracción de ADN .....	36
Amplificaciones por PCR .....	36
Secuenciación .....	38
Aproximaciones analíticas .....	39
Construcción de <i>datasets</i> .....	39
Análisis de congruencia .....	39

Ensamblado de matrices multi- <i>locus</i> .....	40
Cuantificación de la variación genética .....	40
Análisis exploratorio de datos (AED).....	41
Análisis de redes .....	41
Análisis Discriminante de Componentes Principales, DAPC.....	42
Haplotipos gráficos.....	43
Análisis de recombinación.....	43
Análisis filogenético.....	44
Delimitación bayesiana de especies .....	45
Estructura de la variación genética .....	47
Análisis de variación nucleotídica y haplotípica .....	48
Análisis de la distribución específica .....	49
Resultados.....	51
Análisis de congruencia.....	52
Análisis de la variación genética.....	52
Análisis de redes .....	53
Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) .....	59
Haplotipos gráficos .....	62
Análisis de Recombinación.....	63
Análisis filogenético .....	66
Delimitación específica bayesiana.....	72
Análisis geográfico de la variación genética .....	74
Estructura genética de los agentes etiológicos de la MPSS .....	74
Análisis de la variación nucleotídica y haplotípica por especie .....	74
Distribución específica .....	78
Discusión .....	81
Aspectos biológicos .....	82
Orígenes múltiples de la MPSS .....	84
Flujo génico y estructura taxonómica de los agentes etiológicos de la MPSS .....	88
Transferencia Génica Horizontal y Evolución Reticular.....	89
Modelo de especie para los agentes causales de la MPSS .....	91
Aspectos agronómicos: epidemiología de la MPSS .....	92
Influencia de la acción antrópica .....	94
Implicancias en el control químico.....	96
Aspectos metodológicos.....	97

Relevancia del estudio en la actividad productiva .....	99
Conclusiones y perspectivas .....	101
Conclusiones .....	102
Perspectivas .....	104
Referencias.....	106
Apéndice.....	117

# Introducción

## ***Aspectos biológicos***

### **Breve historia evolutiva de los hongos cercosporoideos**

Dos mil cuatrocientos millones de años (M.a.) es la edad aproximada de los fósiles más antiguos que poseen rasgos típicos de hongos, los cuales datan del Eón Paleoproterozoico (Bengtson *et al.*, 2017). Se ha propuesto que estos organismos eran bénticos, multicelulares, filamentosos, septados y capaces de anastomosis (Butterfield, 2005). Los hongos probablemente colonizaron la tierra durante el período Cámbrico (542–488 M.a.), mucho antes que las plantas (Brundrett, 2002). Aunque su registro fósil es fragmentario, recientes hallazgos, junto con la proliferación del uso de técnicas moleculares y nuevas aproximaciones teóricas y analíticas, han contribuido a la reconstrucción de la historia natural en el Reino Hongos.

La divergencia evolutiva que dio origen al subreino Dicaria, que incluye a los filos Basidiomycota y Ascomycota, y por lo tanto aproximadamente al 98% de todos los hongos descritos (James *et al.*, 2006), habría ocurrido antes de la colonización de la tierra, aproximadamente hace 600 M.a. La divergencia entre los basidiomicetos y los ascomicetos ocurrió unos 100 M.a. más tarde. Todos los subfilos modernos de Ascomycota (Pezizomycotina, Saccharomycotina y Taphrinomycotina) y sus respectivas clases habrían estado ya presentes hacia el Carbonífero Tardío (318–299 M.a.). Dentro de los Pezizomycotina, los Dothideomycetes habrían divergido durante el Carbonífero, hace aproximadamente 300 M.a. La clase de los Dothideomycetes se halla dividida en dos subclases, Pleosporomycetidae y Dothideomycetidae; esta última incluye los órdenes Dothideales, Capnodiales y Myriangiales (Schoch *et al.*, 2007, 2009). Se encontraron restos fósiles que recuerdan especies actuales del orden Capnodiales en depósitos Mesozoicos (Beimforde *et al.*, 2014).

Los estudios filogenéticos y taxonómicos en los Capnodiales han sido un tanto controversiales, aunque existen familias cuya monofilia está apoyada por estudios multigénicos (por ejemplo, *Capnodiaceae*, *Davidiellaceae*, *Teratosphaeriaceae*, *Dissoconiaceae* y *Schizothyriaceae*; Crous *et al.*, 2009). La familia *Mycosphaerellaceae*, por su parte, tiene una historia más compleja. En el mismo trabajo, Crous *et al.* (2009) muestran que *Mycosphaerellaceae* es un grupo polifilético que contiene numerosos linajes con una morfología conservada a nivel de los teleomorfos (formas sexuales), y diversificada a nivel de los anamorfos (formas asexuales), entre los que se encuentran los hongos cercosporoideos (Chupp, 1954). En consonancia, dentro de los Capnodiales se

han reportado fósiles teleomórficos de tipo *Mycospharella* y anamorfos posiblemente cercosporoideos, en estratos de 48,7 M.a. del Esquistos de *Princeton*, en Columbia Británica, Canadá (Lepage *et al.*, 1994). Desde esos tiempos hasta nuestros días, los linajes del género *Cercospora*, objeto de estudio de este trabajo de tesis, han tenido una larga historia de diversificación y adaptación a una enorme variedad de estilos de vida y nichos ecológicos.

### **Hongos cercosporoideos**

Estos hongos han sido aislados en todas partes del mundo, pero son especialmente abundantes y diversos en las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, Australia, América Central y del Sur (Hidayat y Meeboon, 2011). Hasta el momento, todas las formas sexuales cercosporoideas descritas son del tipo micosfaerélido (Braun *et al.*, 2013). Siendo éste uno de los problemas que surgen para su estudio, ya que los micosfaerélidos son morfológicamente uniformes. Las formas asexuales del grupo, por el contrario, están fuertemente diferenciadas desde el punto de vista morfológico, lo que se refleja en el gran número de *taxa* propuestos (Chand *et al.* 2013). Estudios recientes han propuesto una actualización de la clasificación de los hongos cercosporoideos, aislados de un amplísimo rango taxonómico de hospederos, desde helechos hasta dicotiledóneas, e incluso de otros hongos (Braun *et al.*, 2013; 2014; 2015a; 2015b; 2016).

### **Mecanismos reproductivos en hongos**

Uno de los problemas más serios que deben afrontar las especies asexuales a lo largo de su historia evolutiva es el llamado “trinquete de Müller”; éste es, el inexorable decaimiento de su adaptación biológica debido a la acumulación de mutaciones deletéreas por deriva génica (Müller, 1964). Sin embargo, la reproducción asexual es ubicua en el Reino Hongos: existen algunos *taxa* en los cuales la reproducción sexual nunca ha sido observada. Por otra parte, muchas especies consideradas como asexuales obligadas están filogenéticamente relacionadas con especies sexuales, lo que sugiere una radiación adaptativa a nuevos nichos, seguida de pérdida de la sexualidad. Otras son capaces de producir tanto propágulos sexuales como asexuales, de acuerdo con diferentes condiciones ambientales. En muchos casos es difícil descartar la existencia de mecanismos de reproducción sexual críptica, o bien facultativa (Taylor y Jacobson, 2015).

Es sabido que la recombinación, producto de la reproducción sexual, contribuye a superar el trinquete de Müller, en el sentido que permite reducir substancialmente las tasas a las

que se fijan las mutaciones deletéreas, y la consecuente disminución del *fitness*. Además puede incrementar la tasa de evolución adaptativa, generando nuevas combinaciones alélicas potencialmente beneficiosas (Kondrashov, 1994). En ascomicetes, factores como la presión selectiva, el aumento en la disponibilidad de recursos alimenticios, y otras condiciones ambientales, hacen que algunos grupos pasen de presentar una reproducción predominantemente asexual a una sexual (Heitman, 2015).

El heterotalismo (auto-esterilidad) es una condición de reproducción sexual del micelio en la cual la conjugación (intercambio de material genético) tiene lugar entre dos cepas fúngicas con sistemas de apareamiento compatibles. En contraste, el homotalismo (auto-fertilidad) ocurre cuando un único aislamiento (o cepa) puede completar el ciclo sexual (Wilson *et al.*, 2015). La conjugación en hongos se basa en la existencia de mecanismos de reconocimiento a nivel celular, que estimulan la reproducción cruzada. En los ascomicetes el desarrollo de la reproducción sexual está controlado por un único *locus* para el tipo de apareamiento (MAT). En los hongos heterotálicos, este *locus* contiene una de dos formas de secuencias alternativas, y se denominan “idiomorfos” (Crow y Dove, 1990). Los idiomorfos complementarios se denominan *MAT1-1* y *MAT1-2* (Paoletti *et al.*, 2007).

Un mecanismo de incremento de la variación genética alternativo a la reproducción sexual es la parasexualidad. Al igual que la primera, otorga a los organismos la posibilidad de recombinación de su genoma, y la producción de nuevos genotipos multi-*locus* (haplotipos); a diferencia de la reproducción sexual, la parasexualidad es un proceso que implica la transferencia de material genético sin que intervenga el proceso meiótico o se desarrollen estructuras sexuales (Nieuwenhuis y James, 2016). El proceso parasexual fue descrito por primera vez en *Aspergillus nidulans* (Pontecorvo, 1956), e implica la fusión de los núcleos (cariogamia), resultando en la formación de un núcleo diploide (heterocarionte). Luego, el *crossing-over* mitótico eventualmente conllevaría el intercambio de variantes alélicas, mientras que la haploidización probablemente implique no disyunciones y rearrreglos que produzcan tanto células aneuploides como haploides. Los núcleos haploides recombinantes surgirían así a partir de células vegetativas, y serán genéticamente diferentes del micelio parental (Zhang *et al.*, 2015).

Los procesos parasexuales pueden tener implicancia como generadores de variabilidad también a nivel de transferencia horizontal de genes (THG) entre organismos que pertenecen a linajes ó especies diferentes. Se ha observado que, bajo condiciones de

laboratorio, ciertas especies filamentosas tiene potencial para desarrollar procesos parasexuales (Fitzpatrick 2012). El significado ecológico, evolutivo y epidemiológico de la parasexualidad y la THG en la naturaleza aún se encuentra poco estudiado, aunque estudios recientes asignan gran importancia al intercambio entre linajes en relación con el surgimiento de nuevos patógenos (Yin *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2016; Gluck-Thaler y Slot, 2015).

### **El género *Cercospora***

Las especies de *Cercospora* se caracterizan por desarrollar hifas o conidios (esporas asexuales) que ingresan a los tejidos parenquimáticos foliares a través de los estomas o de las heridas. El micelio produce hifas con células binucleadas (cada uno haploide) y en condiciones propicias, conidios hialinos a subhialinos, aciculares, cilíndrico-filiformes, multiseptados, con células conidiógenas e hilios conidiales engrosados y melanizados, y conidióforos pigmentados y fasciculados (Groenewald *et al.* 2009, Crous y Braun, 2003). Sin embargo, estas características morfológicas presentan mucha superposición entre las entidades, complicando la taxonomía del género.

En una reciente revisión del género *Cercospora*, Groenewald *et al.* (2013) incorporaron tanto caracteres morfológicos como moleculares para realizar un análisis filogenético exhaustivo. Este estudio permitió superar la identificación tradicional de las especies de *Cercospora* basada primordialmente en caracteres conidiales y, en particular, en la especie huésped. Esta situación ha llevado a que en muchas ocasiones se ha descrito una nueva especie sólo por el hecho de haberla encontrado en un hospedero novedoso (Chupp 1954).

Para la mayoría de las especies de *Cercospora* no se conoce un estado sexual, ó bien éstos han sido reportados pero no confirmados. Los estudios moleculares (Groenewald *et al.*, 2013) confirman que *Cercospora* es un grupo monofilético fuertemente apoyado, en contraste con otros géneros de micosfaerélidos como *Septoria*, que aparecen como polifiléticos (Verkley *et al.*, 2014). Se han reportado teleomorfos micosfaerélidos sólo para unas pocas especies de *Cercospora*. Como en muchos otros ascomicetes heterotálicos, la culminación del ciclo sexual en *Cercospora* depende de la presencia e interacción de individuos con idiomorfos complementarios. Aunque la distribución de dichos idiomorfos en las poblaciones naturales no prueba ni refuta la existencia de estadios sexuales, se esperan frecuencias similares de los tipos de apareamiento en aquellas poblaciones que presenten reproducción sexual (Groenewald *et al.*, 2008). Alternativamente, en la

ausencia de información sobre idiomorfos, otras aproximaciones pueden ser tenidas en cuenta para proveer evidencia de la existencia de reproducción sexual críptica; éstas incluyen las mediciones de la diversidad genética, la diferenciación entre poblaciones (Groenewald *et al.*, 2008), y el análisis de la frecuencia de haplotipos recombinantes (Douhan *et al.*, 2007).

La frecuencia de variantes genéticas MAT1-1/MAT1-2 fue evaluada recientemente para algunas especies aparentemente asexuales del género *Cercospora*: Groenewald *et al.*, 2013 observaron que poblaciones de *C. beticola*, *C. zea-maydis* y *C. zeina* presentan ambas variantes; por otra parte, sólo se detectó una de las variantes alélicas del *locus* MAT en las poblaciones de *C. apii* y *C. apiicola*. La frecuencia de ambos idiomorfos fue aproximadamente similar en algunas poblaciones norteamericanas de *C. beticola*, lo que sugiere que estos genes podrían estar activos insinuando la ocurrencia de sexo críptico. Otro estudio, que abarcó un período de tres años en EEUU, también llevó a la conclusión de que *C. beticola* tiene la potencialidad para reproducirse de modo sexual (Bolton *et al.*, 2012). Por el contrario, Bakhshi *et al.* (2015) observaron una distribución sesgada en poblaciones de campos de caña de azúcar de esta especie muestreados en Irán, por lo que estos autores consideraron que *C. beticola* tendría “un tipo de reproducción predominantemente asexual” en esa región. En cambio, las poblaciones de *C. sojina* de Arkansas, genéticamente diversas, muy probablemente se reproduzcan de modo sexual, aunque lo harían de manera críptica (Kim *et al.*, 2013). El Ing. Agr. Pablo E. Grijalba (Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UBA) ha señalado la presencia de peritecios (cuerpos fructíferos) de morfología compatible con hongos micosfaerélidos en aislamientos de *Cercospora* spp. obtenidos de lotes con soja provenientes de la provincia de Buenos Aires (comunicación personal). Esta observación apunta a la ocurrencia de una fase sexual activa en especies del género sobre este cultivo.

### **Diversidad genética en *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner**

*Cercospora kikuchii* es considerado el agente causal del tizón de la hoja y vaina, y de la mancha púrpura de la semilla de la soja. Fue tradicionalmente considerada una especie hospedero-específica, patógena de la soja cultivada (*Glycine max*) y silvestre (*Glycine soja*). Ha sido usualmente identificada con base en el hospedero del que procede, los síntomas y signos ocasionados, y de las características *in vitro* de los aislamientos. Este patógeno es un hongo dicarionte con núcleos haploides, sin estados sexuales conocidos

fehacientemente. Por tanto se ha asumido que su reproducción es básicamente asexual, igual que la mayoría de las especies del género (Crous y Braun, 2003).

Sin embargo, numerosos estudios realizados en América del Norte (Cai y Schneider, 2008) y Sudamérica (González *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2005) han detectado elevados niveles de variabilidad genética en aislamientos que producen síntomas compatibles con los producidos por *C. kikuchii*. Bajo el marco teórico del patógeno hospedero-específico explicitado anteriormente, y hasta el inicio del presente trabajo de Tesis, ningún autor había puesto en cuestión formalmente si ese amplio rango de variación genética resultaba compatible con un grupo genealógicamente coherente. Groenewald *et al.* (2013), fueron los primeros en proponer que la identificación en este grupo de patógenos no debería realizarse prescindiendo la utilización de técnicas moleculares. Estos autores citan trabajos no publicados de C. Nakashima donde se indica que los síntomas en vaina y semilla de soja inoculadas con aislamientos japoneses de *Cercospora richardiicola* resultan indistinguibles de los causados por *C. kikuchii*.

## **Aspectos agronómicos**

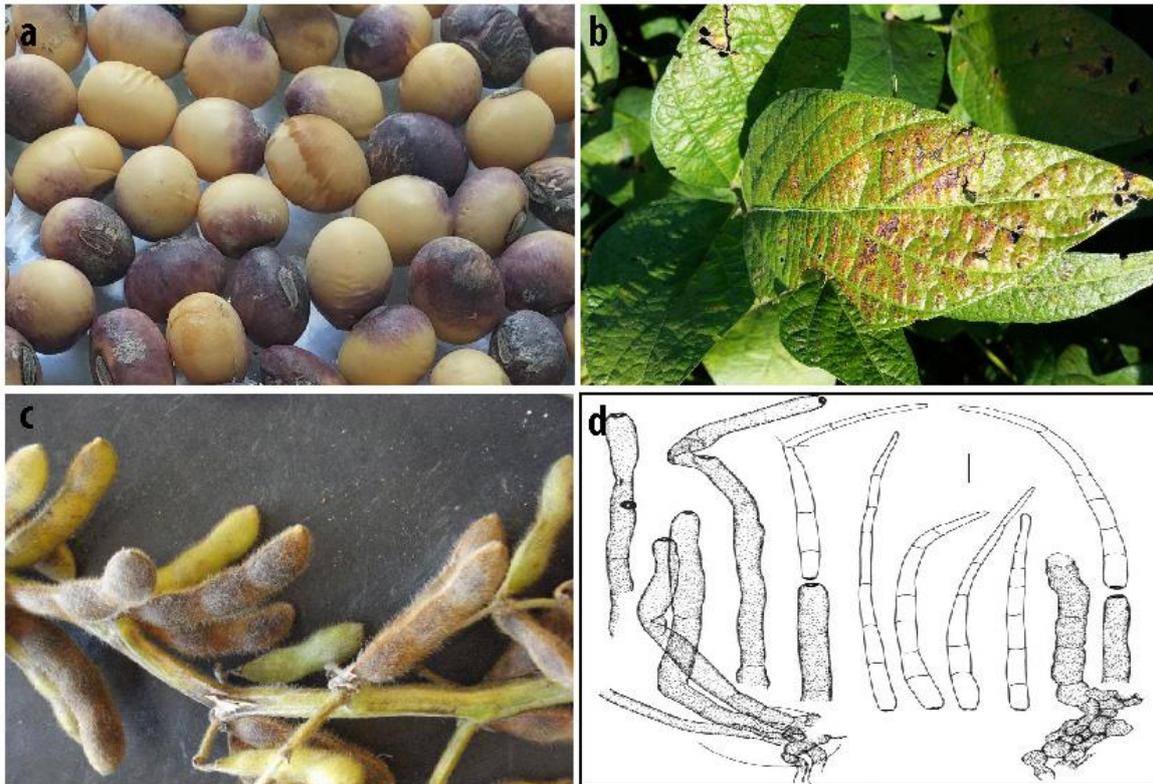
### **Relevancia como fitopatógenos**

Los hongos cercosporoideos se ubican entre los patógenos vegetales más prevalentes y destructivos, habiéndoselos detectado en un amplio rango de especies hospedadoras, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, cultivadas o silvestres. Ciertas especies cercosporoideas son agentes etiológicos de lo que en fitopatología se denominan “enfermedades de manchas foliares” (Walters, 1980). Entre las enfermedades económicamente relevantes podemos citar la mancha angular de la hoja del poroto (causada por *Pseudocercospora griseola*), la estría negra de la hoja del banano (*Pseudocercospora fijiensis*), la mancha de la hoja y fruto de los cítricos (*Pseudocercospora angolensis*), la mancha foliar del apio (*Cercospora apii*) y de la remolacha (*C. beticola*). En soja, la mancha ojo de rana (*C. sojina*), el tizón de la vaina y de la hoja, y la mancha púrpura de la semilla (*C. kikuchii*), constituyen dos de las principales amenazas sanitarias en Sudamérica para este importante cultivo (Soares *et al.*, 2015).

Tanto el tizón de la vaina y la hoja, como la mancha púrpura de la semilla de la soja (de aquí en adelante, MPSS) han sido considerados síntomas de una misma enfermedad, y comunicada por primera vez en Corea (Suzuki, 1921). El epíteto “tizón” refiere a una

lesión que asemeja una quemadura, mientras que el “púrpura” es evidente en la coloración que toman las semillas infectadas. Matsumoto y Tomoyasu (1925) indicaron que la enfermedad es causada por un agente fúngico, al que llamaron *Cercosporina kikuchii*, y luego *Cercospora kikuchii*. La enfermedad fue observada en Occidente (EEUU) por primera vez en 1924 (Gardner 1926), y en la Argentina recién en el año 1981 (Barreto *et al.* 1981).

La MPSS es considerada una enfermedad de fin de ciclo de la soja (cerca de la cosecha del cultivo; <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/cercospora-kikuchii>), aunque el patógeno puede encontrarse en etapas previas, en las hojas y otros órganos aéreos de la planta. Los síntomas en semillas son los más distintivos de la enfermedad, donde pueden verse las manchas púrpura, acompañadas frecuentemente por agrietamiento del tegumento (**Figura 1a**). En las hojas genera lesiones angulares a irregulares, de coloración amarillenta (“tizón de la hoja”), si bien es común observar coloración púrpura generalizada en la cara adaxial, sobre todo en las hojas superiores de las plantas, más expuestas a la radiación solar. Este tipo de síntomas es a veces referido localmente por los productores como “piel de sapo” (**Figura 1b**). En las vainas se observa un manchado de color morado oscuro que puede abarcar toda la superficie (**Figura 1c**). Los síntomas mencionados en los órganos vegetativos disminuyen la superficie fotosintética total, afectando por lo tanto el “llenado” del grano y el rendimiento total del cultivo. La MPSS, además de disminuir la calidad de la semilla, constituye la forma más común de propagación del inóculo entre una campaña agrícola y la siguiente.

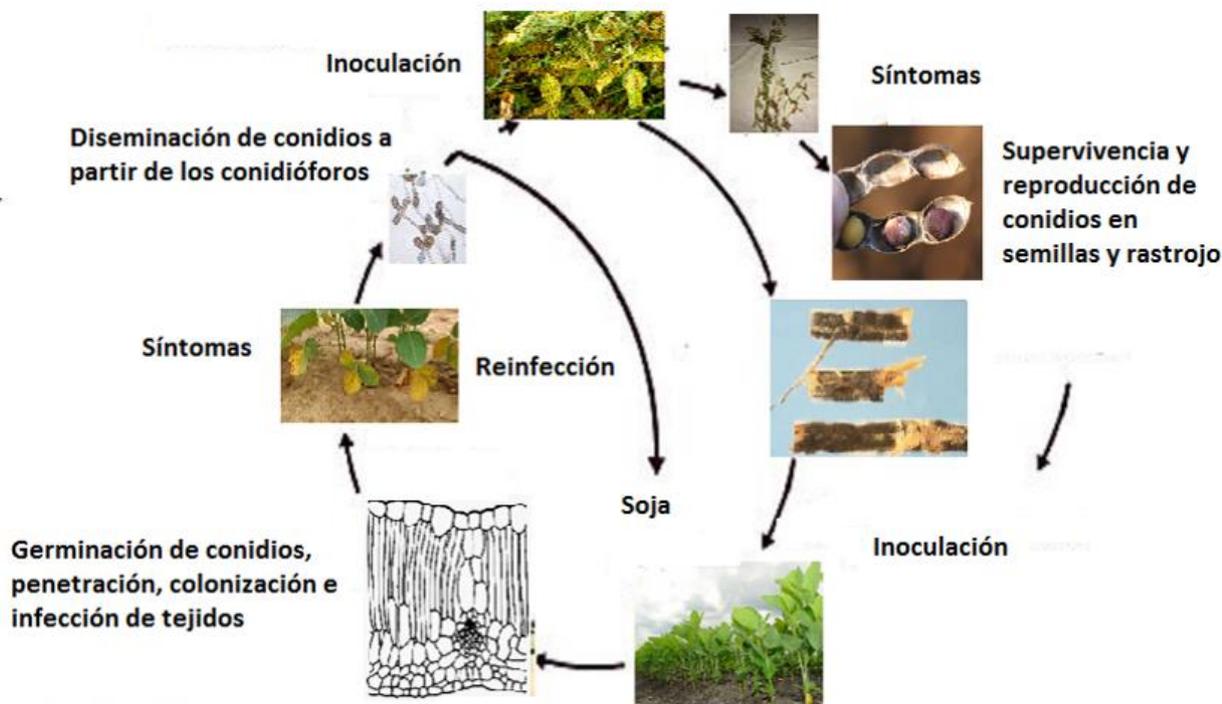


**Figura 1.** Detalle de distintos estadios del ciclo de vida de *C. kikuchii*. **a.** Semillas sintomáticas y asintomáticas con Mancha Púrpura de la Soja (fuente: [http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/wp-content/uploads/2016/03/24\\_08\\_HV-20150116.jpg](http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/wp-content/uploads/2016/03/24_08_HV-20150116.jpg)). **b.** Hojas sintomáticas (“piel de sapo”, fuente: [http://www.wikiwand.com/en/Cercospora\\_kikuchii](http://www.wikiwand.com/en/Cercospora_kikuchii)). **c.** Vainas con síntomas característicos del tizón de la soja (<http://www.patologiavegetal.unlu.edu.ar/files/site/soja%20cercospora%20kikuchii%208.JPG>). **d.** Conidios y conidióforos (fuente: <http://www.scielo.org.ve/img/fbpe/rfaz/v24n3/art01fig1.gif>).

Los aislamientos fúngicos (cultivos axénicos) de este patógeno pueden ser obtenidos a partir de tejidos de soja infectados, originando colonias micelianas uniformemente densas, blancas en el borde exterior, y desde gris claro hasta verde oliva en el centro. Usualmente producen una sustancia de color púrpura característico (cercosporina) que difunde hacia el medio de cultivo (Daub y Ehrenshaft, 2000). Los cultivos *in vitro* esporulan abundantemente bajo condiciones de alta humedad y temperaturas entre los 23 - 27°C. Los conidios (esporas asexuales formadas directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena) son hialinos, multiseptados, derechos ó curvos, con base truncada y tienen un tamaño de 2,5-5 x 50-375  $\mu\text{m}$  (**Figura 1d**). Los conidióforos son alargados, multiseptados, no ramificados, se encuentran agrupados y son normalmente lábiles, con una coloración amarronada uniforme ó pálidos en su extremo, y de 4-6 x 45-220  $\mu\text{m}$  (Chupp 1954).

La semilla de soja infectada puede originar plántulas enfermas que resultan fuentes de inóculo primario, y desde las que el hongo esporulará bajo condiciones favorables a

campo (coincidencia de alta humedad relativa y temperaturas de 26 a 30°C, durante 3 a 5 días). Los conidios son dispersados fundamentalmente por el viento y las lluvias (**Figura 2**); la incidencia de la enfermedad aumenta bajo condiciones de rocío prolongado (Lavilla e Ivancovich, 2016).



**Figura 2.** Ciclo de la enfermedad MPSS. Imagen adaptada de <http://ruralnet.com.ar/prevalencia-severidad-tizon-foliar-cercoospora-diferentes-regiones-sojeras-argentina/>

Los daños causados son más graves en condiciones de monocultivo con siembra directa, que es el modo habitual de producción de la soja en la Argentina. La siembra directa es un sistema que consiste en prácticas agrícolas con labranza reducida ó nula, y permanencia del rastrojo (tejidos vegetales remanentes de la campaña anterior) en el lote. Desde el punto de vista epidemiológico, uno de los problemas de la siembra directa es, precisamente, que el rastrojo y las plantas de soja “guachas” originadas a partir de semilla remanente infectada, actúan como fuentes de inóculo primario dentro del mismo lote de producción, al no recibir el tratamiento sanitario adecuado y frente a la no rotación de cultivos.

### **El hospedero: origen de la soja como especie cultivada**

Contrastando con la extensísima historia evolutiva de los hongos cercosporoideos (*circa* 50 M.a.), la historia de la agricultura se remonta al último período post-glaciar, apenas unos pocos miles de años atrás (máximo ca. 12.000 años, Price y Bar-Yosef, 2017). Para

el caso de la soja, los registros arqueológicos muestran que las primeras señales de su cultivo pueden haberse dado en el Este de Asia, hace aproximadamente 5.500 años (Lee *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista taxonómico, la soja (género *Glycine*) pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae). Esta familia se diversificó durante el Terciario temprano (ca. 50 M.a., Herendeen *et al.*, 1992), coincidiendo aproximadamente con el período de diversificación del género *Cercospora*. El subgénero *Soja* incluye a la soja cultivada (*G. max*) y a la soja silvestre (*G. soja*). Ambas especies son anuales; *G. max* crece sólo bajo cultivo mientras que *G. soja* crece en forma silvestre en China, Japón, Corea, Taiwán y Rusia. Esta última es, claramente, la forma ancestral silvestre de la especie cultivada (Hyten *et al.*, 2006). El otro subgénero -*Glycine*- consiste en al menos 17 especies silvestres perennes (Lackey, 1980).

Producto de los sucesivos cuellos de botella acaecidos durante las diversas fases de domesticación, la soja cultivada presenta una muy estrecha base genética. Este fenómeno se ha visto agudizado por la explosión del área sembrada en las últimas dos décadas, las características del mejoramiento genético en la soja y la necesidad de generar constantes novedades por parte de las compañías semilleras. Como resultado, las variedades comerciales occidentales de hoy día pueden haber derivado de, a lo sumo, 16 genotipos originales (Hyten *et al.*, 2006).

### **Importancia del cultivo de la soja en la economía argentina**

Tanto el grano como los subproductos de la soja son principalmente utilizados en la alimentación del ganado, y también (aunque en menor medida) en la elaboración de alimentos para la población humana (brotes, harina, texturado, tofu, salsa, aceite, etc.). Por estos motivos, la soja se ha convertido en las últimas décadas en un “*commodity*” ampliamente comercializado en todo el mundo. Hasta principios del siglo XX el cultivo y la alimentación humana con soja estaba limitada a los territorios de las actuales China, Taiwán, Corea, Japón y Vietnam. Su cultivo en Occidente (en particular en EEUU, Argentina, Brasil, Bolivia, Uruguay y Paraguay) comenzó a finales de los años ´60, y alcanzó una difusión masiva hacia mediados de los años ´90. Con el advenimiento de las primeras variedades transgénicas su producción volvió a incrementarse notablemente, llegando a substituir en muchos casos territorios antes dedicados a los cereales (trigo,

maíz, etc.) o a la ganadería, e incluso, amenazando áreas forestales (Lapegna, 2007; Agüero y Veliz, 2012). Conjuntamente considerados, Brasil y Argentina constituyen los mayores productores y exportadores de soja en el mercado mundial de granos, superando a los EEUU desde hace ya varias campañas. La producción argentina de poroto de soja para la campaña 2014/2015 osciló en los 60 millones de toneladas, cifra que no fue superada aún. Para la presente campaña se proyecta una producción total de alrededor de 46 millones de toneladas. El área sembrada alcanzó aproximadamente los 16,5 millones de hectáreas. Debido a las sequías, se anticipa que el rinde promedio (de 31,8 quintales (un quintal equivale a 100 kilogramos) por hectárea el año anterior, <http://news.agrofy.com.ar/especiales/soja-2016-2017/siembra-soja>) tendrá una merma significativa (Estimaciones del Ministerio de Agroindustria al 22/02/2018, [https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/\\_archivos/estimaciones/180200\\_Febrero/180222\\_Informe%20Mensual%2022%2002%2018.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/_archivos/estimaciones/180200_Febrero/180222_Informe%20Mensual%2022%2002%2018.pdf)).

El complejo sojero argentino se presenta como uno de los más competitivos del mundo, siendo nuestro país el tercer mayor productor del poroto a nivel global, pero liderando varios aspectos del comercio exterior. Las ventas externas de los productos sojeros argentinos equivalen al 84% de la producción nacional. Las exportaciones de poroto de soja y sus derivados para el ciclo 2014/2015 (tomado como referencia por ser el año récord) totalizaron 50,6 millones de toneladas, compuestas por 11,5 millones de toneladas de poroto de soja; 31,9 millones de toneladas de harina de soja; 6,2 millones de toneladas de aceite de soja y cerca de 1 millón de toneladas de biodiesel (Dirección de información y estudios económicos, Bolsa de Comercio de Rosario). El precio por tonelada de grano de soja oscila en 2017 entre los U\$s 250 y los U\$s 300. En el año 2014, la Argentina exportó en concepto de tortas y demás residuos sólidos de soja, un total de U\$s 14.000.000.000, y en concepto de aceite de soja un total de U\$s 4.600.000.000 (<http://trade.nosis.com/es/Comex/Importacion-Exportacion/Argentina>).

Conforme información del ciclo 2016/2017, respecto al producto soja, la Argentina es:

- Primer exportador mundial de harina y aceite
- Primer productor mundial de biodiesel
- Tercer productor mundial de harina y aceite
- Tercer productor-exportador mundial de poroto

Desde un punto de vista estratégico, además, es importante destacar que el cultivo de la soja ha contribuido significativamente a la modernización de las cadenas productivas

tanto en Argentina como en Brasil, estimulando mejoras en el sistema de transporte, promoviendo la expansión de la frontera agrícola, la internacionalización del mercado e incentivando la modernización de la agroindustria, en particular en lo relacionado con la producción aviar y porcina, y en la producción de maquinaria y tecnología de punta (drones, agricultura de precisión, vigilancia satelital de cultivos, etc.).

### **Impacto de *Cercospora* en el cultivo de la soja**

La estrecha base genética que caracteriza a la soja la torna un cultivo particularmente susceptible a la infección de un amplio rango de patógenos. En consecuencia, la producción sojera se ve amenazada por una variedad de microorganismos. Entre ellos se incluyen hongos, bacterias, virus y nematodos. Esto resulta en pérdidas de rendimiento que impactan significativamente en la economía de la región (Distéfano S., [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_enfermedades\\_soja\\_17.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_enfermedades_soja_17.pdf)). Wrather y Koenning (2009) comunicaron que en 2006 EEUU perdió el 9% de la producción (de un total de 777,3 millones de toneladas de grano) por diferentes enfermedades.

En Brasil se han reportado pérdidas de entre el 15 y el 30% debido al tizón de la hoja y la MPSS (Almeida *et al.* 2005). En la Argentina se han registrado importantes mermas en el rendimiento del cultivo (de hasta el 10-15%) y también un considerable deterioro en la calidad de la semilla y por tanto dificultades en su comercialización (P. E. Grijalba, comunicación personal). Esto se debe a la alta incidencia de esta enfermedad, que no sólo viene aumentado su frecuencia en los lotes, sino que se está esparciendo significativamente más allá del rango climático inicial, desde hace ya más de una década (Lavilla e Ivancovich, 2016). Un relevamiento realizado personalmente por el tesista, entre técnicos de las principales empresas semilleras con sede en la Argentina (Don Mario, Nidera, Syngenta, Monsanto) durante la Expoagro 2017, arrojó como resultado que la principal preocupación sanitaria de estas empresas ha sido la pérdida en rendimiento y calidad de semilla causada por el agente que se estudia aquí.

### **Manejo de la enfermedad**

La posibilidad de que un patógeno genere nuevos aislamientos multi-resistentes o de mayor agresividad frente a las diversas estrategias de manejo, reviste particular importancia en las perspectivas económicas de los cultivos. Los paquetes de manejo de enfermedades incluyen por una parte la utilización de cultivares con resistencia genética incorporada a partir de técnicas de mejoramiento tradicional o de ingeniería genética, y

por otro el control químico con fungicidas. Estas medidas de control implican enormes presiones de selección sobre los patógenos. Al mismo tiempo, la vastedad de las tierras cultivadas con monocultivos (v.g. soja) ofrece la posibilidad de una explosión en los números poblacionales de los fitopatógenos, el surgimiento de variantes resistentes y, consecuentemente, una gran velocidad de adaptación a los desafíos ambientales con que se enfrentan los patógenos. Un correcto manejo integrado de enfermedades involucra, justamente, la aplicación de medidas de control en tiempo y forma, tal que tengan en cuenta las características biológicas, reproductivas y adaptativas de los agentes causales, en función de las necesidades del productor y del ambiente (Almeida *et al.*, 2005).

Hasta el momento se han detectado muy pocas fuentes de resistencia vertical a la MPSS en el acervo genético de la soja cultivada ó silvestre (uno ó pocos genes). La mayoría de las variedades comerciales de soja resultan altamente susceptibles, con algunas pocas que presentan una susceptibilidad moderada a leve (menores síntomas ó evolución más lenta de la enfermedad). En los últimos años investigadores de la Universidad de Arkansas (EEUU) han detectado algunos genotipos de soja con buen comportamiento frente a la MPSS. Estos materiales presentarían una resistencia parcial cuya herencia sería codificada por una única región génica ya delimitada mediante marcadores microsatélites (Alloatti *et al.*, 2015). De validarse dicho estudio en diferentes regiones productivas, la incorporación de esta resistencia en materiales comerciales constituiría una herramienta importante para el manejo de la enfermedad desde la genética.

En la actualidad, sin embargo, el control químico mediante la aplicación de fungicidas es la única solución eficaz para la MPSS bajo condiciones de producción comercial. Si bien se han evaluado diferentes moléculas, ninguna ha resultado completamente eficiente si se la aplica por sí sola (Price *et al.*, 2015). Cabe destacar que los fungicidas utilizados a campo actúan sobre proteínas específicas, y se han registrado ya numerosos casos de desarrollo de resistencia a partir de mutaciones puntuales (Maciel *et al.*, 2010).

Un hecho que podría contribuir adicionalmente al rápido surgimiento de resistencias es que, por razones de costo y logística, los productores intentan una única aplicación de fungicidas hacia el final del cultivo (Sathiko *et al.*, 2011). En consecuencia, las poblaciones que provocan MPSS (presentes en los lotes desde el inicio del cultivo) pueden transitar varias generaciones sin control químico durante una misma campaña, lo que contribuiría al incremento de los números poblacionales y la generación de nueva variabilidad (Hartman *et al.*, 2015).

## ***Aspectos metodológicos***

Un propósito de la presente Tesis es el de evaluar la eficiencia de algunas aproximaciones para analizar la diversidad biológica en situaciones reales de producción agraria. A continuación, se refieren aspectos conceptuales de esos enfoques metodológicos, incluyendo una introducción al análisis de congruencia y del análisis exploratorio de datos, entendido éste en un sentido amplio, como un conjunto de algoritmos que prescinde de supuestos poblacionales y filogenéticos. Se introducen también los aspectos salientes del análisis discriminante de componentes principales, una herramienta que permite analizar la estructura genética, cuando la muestra no cumple con los requisitos de los modelos poblacionales habituales.

### **Análisis de Congruencia**

Existen diferentes estrategias para el tratamiento de datos multi-*locus* destinados a la reconstrucción filogenética ó filogeográfica. En este sentido, la consistencia de la información aportada por diferentes regiones del genoma es una noción central. Ya Woese (1987) propuso que la congruencia entre filogenias de genes independientes debería ser tomada en cuenta a fin de develar la historia evolutiva de un grupo de organismos. Del mismo modo que la correlación entre rasgos morfológicos y datos genéticos provee una validación cruzada de las inferencias filogenéticas, la concordancia topológica entre *loci* ortólogos fue considerada una fuerte evidencia a favor de relaciones genealógicas compartidas por diferentes *taxa*. Este punto de partida constituyó la base para la así llamada “congruencia taxonómica”. Una aproximación alternativa, la “congruencia de caracteres”, propone aplicar el principio de evidencia total (*sensu* Kluge, 1989) a la inferencia filogenética; éste propone que toda la información disponible debe ser concatenada en una matriz multi-*locus* única para reconstruir una historia evolutiva común (de Queiroz y Gatesy, 2006). La incongruencia dentro del *dataset*, dada la filogenia, puede ser luego evaluada utilizando una variedad de estadísticos (Campbell *et al.*, 2011).

Una tercera aproximación sugiere una “combinación condicional de datos” (Huelsenbeck y Cunningham, 1996). Esta estrategia implica evaluar *a priori* la congruencia entre los diferentes *datasets*, para determinar si los mismos son significativamente homogéneos (es decir, si los diferentes *loci* sugieren la misma historia evolutiva). Si esta hipótesis no es rechazada, entonces los datos se combinan en una única matriz multi-*locus*, utilizando la

aproximación de la congruencia de caracteres. Si la hipótesis fuera rechazada, se utiliza congruencia taxonómica.

## **Análisis de Redes**

El rol principal de las metáforas en la ciencia es el de servir como base para los modelos analíticos. Esas metáforas conceptuales intentan luego ser modelizadas en términos matemáticos, lo cual sirve como base para la descripción cuantitativa y eventualmente la predicción. El uso de modelos explícitos se encuentra en el corazón del análisis evolutivo, que implica por tanto la existencia de un número de supuestos subyacentes. La coherencia entre las características del sistema biológico bajo estudio y los supuestos del modelo utilizado debe ser evaluada *antes* de iniciar el análisis filogenético. De otro modo, se obtendrían resultados sesgados por errores sistémicos que harían menos precisos ó incluso erróneos los resultados y su posterior aplicación en situaciones prácticas (Morrison, 2014a).

Ésta evaluación es una de las principales metas del análisis exploratorio de datos (AED, Morrison, 2010). Una ventaja adicional del AED es que, al ser una aproximación que está libre de supuestos biológicos, está también exenta de constreñimientos conceptuales y teóricos. Así, es posible que a partir de los resultados del AED surjan hipótesis que hubieran quedado ocluidas por la adopción no validada de determinados modelos evolutivos (modelos poblacionales, relaciones entre especies, etc.) (Schliep *et al.*, 2017). Las hipótesis filogenéticas tradicionales (dicotómicas) implican una serie de supuestos que distan de ajustar a los sistemas biológicos bajo estudio (Posada y Crandall, 2001; Bapteste *et al.*, 2013). Esto es así en particular cuando se consideran relaciones infra genéricas (Edwards *et al.*, 2016). La disponibilidad de información genómica masiva ha venido a verificar esta situación (Wen *et al.*, 2016). La construcción teórica de un proceso cladogenético bifurcante a partir del cual las nuevas especies cesan su flujo génico a partir del momento de su divergencia (Bapteste *et al.*, 2005) no parece cumplirse siquiera para la evolución del género *Homo* (Ackerman *et al.*, 2015; Winder y Winder, 2014). Surge así la hipótesis de que ciertas regiones del árbol filogenético podrían ser mucho mejor descritas utilizando como metáfora una red ó un arbusto cuyas ramas se anastomosan, que un típico árbol dicotómico (Liu y Edwards, 2009; Linkem *et al.*, 2016).

En un sentido exploratorio entonces, cualquier hipótesis evolutiva *a priori* puede ser evaluada utilizando lo que ha dado en denominarse una red de afinidad (*affinity network*, Morrison, 2014b). En este tipo de aproximación, se propone que un proceso evolutivo

dado crea un patrón particular (reticulado ó arborescente, por ejemplo); la existencia (o no) de dicho patrón en la topología obtenida constituye el resultado del *test* en sí. El carácter exploratorio de este tipo de estudios estriba en que sus resultados no constituyen necesariamente una validación fuerte (Morrison, 2015); esto es así debido a que otros procesos podrían generar patrones similares. Por lo tanto, son necesarios análisis subsecuentes como validaciones efectivas de las hipótesis propuestas, incorporando en esta segunda etapa supuestos biológicos específicos asociados a dichas hipótesis.

Las redes de afinidad están diseñadas básicamente para mostrar el conflicto que pueda existir dentro de un *set* de datos. Esas incompatibilidades pueden ser causadas por un número de circunstancias:

1. Errores de estimación:

- a. datos incorrectos (errores en la producción de datos, etc.),
- b. errores de modelo (establecimiento de homologías primarias, etc.),
- c. diseño experimental (elección de *loci* con tasas evolutivas disímiles).

2. Conflicto de caracteres por causas biológicas:

- a. analogías u homoplasias (paralelismo / convergencia, reversión),
- b. homología vertical (coalescencia profunda),
- c. homología horizontal (hibridación, recombinación, introgresión, transferencia génica horizontal, pérdida-duplicación).

Según señala Nakhleh (2013): “la incongruencia filogenética no debería ser vista como un problema a pesar del cual la inferencia evolutiva debe ser llevada a cabo, sino como un carácter poderoso con un rico juego de estados que contribuye a reconstruir y entender los fenómenos evolutivos”. Morrison (2014a, b) coincide con Nakhleh, y propone que los eventos que producen reticulaciones no deben ser relegados al rol de meros “parámetros sin sentido” en un modelo, ó “ruido” en una metáfora, sino que deben ser cuantificados como componentes importantes de la historia de los organismos.

### **Análisis Discriminante de Componentes Principales**

Los métodos clásicos de asignación analizan genotipos multi-*locus* individuales, evaluando las probabilidades esperadas de que tal genotipo pertenezca a un grupo (*cluster*) dado. Estos métodos “basados en modelos” utilizan también supuestos implícitos, tales como poblaciones que ajustan a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento (v.g., STRUCTURE; Pritchard *et al.*, 2000). Desde ya, estos supuestos están lejos de cumplirse en un enorme número de casos, como los

organismos patógenos aquí caracterizados. La utilización de este tipo de aproximaciones cuando los supuestos poblacionales no se verifican en la realidad del sistema biológico, lleva a resultados fuertemente sesgados y a asignaciones completamente artificiales.

Un problema adicional que presentan los métodos de asignación tradicionales es que se enfocan en la variación genética total que puede ser descompuesta en varianza entre y dentro de grupos).

Aproximaciones como el análisis de componentes principales (PCA) ó el análisis de coordenadas principales (PCO) se enfocan básicamente en la varianza total, lo que oscurece la variación entre grupos. En cambio, el análisis discriminante de componentes principales (DAPC) permite superar las limitaciones antes mencionadas, ya que es un método de análisis multivariado libre de supuestos poblacionales (Jombart *et al.*, 2010); DAPC busca combinaciones sintéticas lineales de las variables originales (las llamadas funciones discriminantes), que muestran diferencias entre grupos, minimizando la variación dentro de los mismos. El análisis deriva entonces probabilidades de pertenencia de cada muestra a un determinado grupo basado en las funciones discriminantes retenidas, sin presuponer frecuencias genóticas para cada "grupo genético" (*cluster*).

# **Objetivo general e hipótesis**

La presente Tesis intenta arrojar luz respecto de algunas de las consecuencias del encuentro entre organismos con historias evolutivas tan contrastantes como la soja cultivada y los hongos cercosporoideos, caracterizar algunas de las consecuencias de dicha interacción, y las implicancias para el manejo de la MPSS en nuestra región.

Complementariamente se propone la evaluación del conjunto de metodologías arriba descritas como una herramienta útil para analizar la coherencia entre supuestos de modelos y características de los sistemas biológicos en estudio, y formular hipótesis que pudieran quedar opacadas por supuestos subyacentes a las tradicionales metodologías de análisis fitopatológico, genético y filogenético.

## **Hipótesis iniciales**

En función de los antecedentes, se plantearon tres campos de hipótesis iniciales:

### **1. En lo experimental:**

- I. La utilización de secuencias génicas permite caracterizar los patrones de variación entre aislamientos del agente causal de la MPSS.
- II. La información de secuencia permite analizar la relación entre los aislamientos de diferentes regiones de América, con otras especies del género *Cercospora*.

### **2. En lo metodológico:**

- I. El análisis exploratorio de datos permite la detección de patrones adicionales a las del análisis genético y filogenético tradicional.

### **3. En lo biológico:**

- I. La información de los diferentes *loci* muestra historias evolutivas congruentes.
- II. La variación genética presenta niveles significativos de estructuración geográfica.

## **Hipótesis subyacentes**

Como se mencionara la práctica fitopatológica trata a la MPSS como una de las principales enfermedades de fin de ciclo. Cualquier mención a la MPSS en portales fitopatológicos, de la Argentina y el exterior, dan por sentado las siguientes premisas:

1. *Cercospora kikuchii* es el agente causal (único) de la MPSS.
2. Este patógeno presenta un modo de reproducción básicamente asexual.

Si bien no fueron formuladas explícitamente, estas dos hipótesis son subyacentes a las hipótesis iniciales, y fueron puestas a prueba de modo implícito y explícito como resultado de los trabajos realizados durante la presente Tesis.



# **Materiales y Métodos**

## **Materiales**

A los efectos de obtener aislamientos fúngicos de la MPSS se colectaron semillas de soja de las principales zonas de producción de la Argentina y Brasil. Las muestras argentinas fueron cedidas esencialmente por gentileza de la Ing. Agr. Bibiana Ferrari, de la empresa Don Mario Semillas. Se obtuvieron muestras suplementarias de semillas, gentileza de diferentes fitopatólogos de la actividad pública (Ing. Agr. Norma Formento, de la Estación Experimental Agropecuaria Paraná, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Ing. Agr. Victoria González, de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Obispo Colombres, Tucumán, y el Ing. Agr. Pablo E. Grijalba de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires). Las muestras brasileñas fueron colectadas por el Dr. Luiz Orlando de Oliveira (Departamento de Bioquímica e Biología Celular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil). Esas muestras fueron remitidas tanto por productores brasileños como por investigadores de la Empresa Brasileña de Pesquisa Agropecuaria (Dr. Álvaro Almeida, EMBRAPA Soja, Londrina, Estado de Paraná). También se utilizaron cepas fúngicas provenientes del Estado de Arkansas (EEUU) cedidas por el Dr. Burton H. Bluhm (University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas).

El cultivo axénico de los aislamientos argentinos y la extracción de ADN (ver más adelante) se llevó a cabo en instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA-INTA Castelar) y la Facultad de Agronomía (UBA). Las secuencias argentinas y parte de las brasileñas publicadas en Soares *et al.* (2015) fueron obtenidas como parte del desarrollo de la presente Tesis durante la pasantía realizada en el laboratorio del Dr. de Oliveira (2012-2013). Las secuencias argentinas publicadas en Guillin *et al.* (2017) se obtuvieron en el Instituto de Genética (CNIA-INTA Castelar) y el LACyE-DEGE (FCyEN-UBA, año 2014) también como parte de la presente Tesis. La procedencia de cada aislamiento se detalla en las **Tablas 1 y 2**.

Todos los aislamientos fueron inicialmente identificados como *Cercospora kikuchii* en base a la presencia de la tinción púrpura en la semilla de soja, y las características de los micelios cultivados *in vitro*. Trabajos publicados durante el transcurso de la presente Tesis (Guillin *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2015) mostraron sin embargo que la identificación basada en esos caracteres resultó imprecisa. A los efectos de respetar el desarrollo histórico del estudio se indica en esta sección la pertenencia taxonómica tal como se propuso en un inicio. Posteriormente, en función de la caracterización molecular de los

aislamientos, se siguió la nomenclatura propuesta por Groenewald *et al.* (2013), por tanto, se emplea “*cf.*” para denotar incertidumbre con respecto a la identificación a nivel específico. Se denominó como “*aff.*” las muestras que producen síntomas y características culturales que recuerdan a aquellas de *C. kikuchii* (según Ing. Agr. P. E. Grijalba, Cátedra de Fitopatología, Facultad Agronomía, UBA; comunicación personal).

**Tabla 1.** Aislamientos fúngicos de la MPSS (todos tentativamente identificados como *C. kikuchii*), incluyendo origen geográfico, números de entradas de la base de datos GenBank y región fitogeográfica. Estos aislamientos fueron empleados para la constitución del *dataset 1* (ver más adelante).

Aislamiento	Localidad, Provincia (Estado), País	Número de entrada en GenBank			Provincia Fitogeográfica
		<i>cfp</i>	<i>tub</i>	<i>cytb</i>	
1_8	Nueve de Julio, Buenos Aires,	KP752181	KP752289	KP825009	Pampeana
1_9	”	KP752182	KP752290	KP825010	”
3_9	”	KP752183	KP752291	KP825011	”
A1	”	KP752184	KP752292	KP825012	”
A10	”	KP752185	KP752293	KP825013	”
A2	”	KP752186	KP752294	KP825014	”
A5	”	KP752187	KP752295	KP825015	”
N	”	KP752188	KP752296	KP825016	”
P1	”	KP752189	KP752297	KP825017	”
P11	”	KP752190	KP752298	KP825018	”
P12	”	KP752191	KP752299	KP825019	”
P2	”	KP752192	KP752300	KP825020	”
P3	”	KP752193	KP752301	KP825021	”
P5	”	KP752194	KP752302	KP825022	”
P6	”	KP752195	KP752303	KP825023	”
P7	”	KP752196	KP752304	KP825024	”
Pampa	Santa Rosa, La Pampa, Argentina	KP752197	KP752305	KP825025	”
Pub	Junín, Buenos Aires, Argentina	KP752198	KP752306	KP825026	”
V1_2	Las Lajitas, Salta, Argentina	KP752199	KP752307	KP825027	Monte
V1_3	”	KP752200	KP752308	KP825028	”
V1_5	”	KP752201	KP752309	KP825029	”
V1_6	”	KP752202	KP752310	KP825030	”
V1_7	”	KP752203	KP752311	KP825031	”
V1_8	”	KP752204	KP752312	KP825032	”
V1_9	”	KP752205	KP752313	KP825033	”
V2_1	San Miguel de Tucumán,	KP752206	KP752314	KP825034	”
V2_2	”	KP752207	KP752315	KP825035	”
V2_3	”	KP752208	KP752316	KP825036	”
V2_4	”	KP752209	KP752317	-	”
V2_5	”	KP752210	KP752318	KP825037	”
V2_6	”	KP752211	KP752319	KP825038	”
V2_8	”	KP752212	KP752320	KP825039	”
V2_9	”	KP752213	KP752321	KP825040	”

Viki_1	Nueve de Julio, Buenos Aires,	KP752214	KP752322	KP825041	Pampeana
Viki_2_1	"	KP752215	KP752323	KP825042	"
Viki_4_1	"	KP752216	KP752324	KP825043	"
Viki_4_2	"	KP752217	KP752325	KP825044	"
Viki_6	"	KP752218	KP752326	KP825045	"
Viki_7	"	KP752219	KP752327	KP825046	"
Ck_176	Santa Cecília, Santa Catarina,	KP752226	KP752334	KP825047	Mata Atlántica
Ck_178	Terra Boa, Pará, Brasil	KP752227	KP752335	KP825048	Cerrado
Ck_316	Goiatuba, Goiania, Brasil	KP752228	KP752336	KP825049	"
Ck_320	Rio Verde, Goiania, Brasil	KP752229	KP752337	-	"
Ck_415	Passo Fundo, Río Grande do Sul,	KP752230	KP752338	KP825050	Pampeana
Ck_418	Cruz Alta, Río Grande do Sul,	KP752231	KP752339	KP825051	"
Ck_436	Imperatriz, Maranhão, Brasil	KP752232	KP752340	KP825052	Cerrado
Ck_637	Santo Augusto, Rio Grande do	KP752233	KP752341	KP825053	Pampeana
Ck_671	Panambi, Rio Grande do Sul,	KP752234	KP752374	KP825054	"
Ck_675	Dourados, Mato Grosso do Sul,	KP752235	KP752342	KP825055	"
Ck_685	Santo Augusto, Rio Grande do	KP752236	KP752343	KP825056	Cerrado
Ck_686	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	KP752237	KP752344	KP825057	Pampeana
Ck_A101	Londrina, Paraná, Brasil	KP752238	KP752345	KP825058	Mata Atlántica
Ck_A102	"	KP752239	KP752346	KP825059	"
Ck_A103	"	KP752240	KP752347	KP825060	"
Ck_A104	Mafra, Santa Catarina, Brasil	KP752241	KP752348	KP825061	"
Ck_A105	"	KP752242	KP752349	KP825062	"
Ck_A106	Londrina, Paraná, Brasil	KP752243	KP752350	KP825063	"
Ck_A107	Maracajú, Mato Grosso do Sul,	KP752244	KP752351	KP825064	Cerrado
Ck_A108	Viçosa, Minas Gerais, Brasil	KP752245	KP752352	KP825065	"
Ck_A109	"	KP752246	KP752353	KP825066	"
Ck_A111	"	KP752247	KP752354	KP825067	"
Ck_A112	Rio Verde, Goiania, Brasil	KP752248	KP752355	KP825068	"
Ck_A113	Campos de Júlio, Mato Grosso,	KP752249	KP752356	KP825069	"
Ck_A114	Viçosa, Minas Gerais, Brasil	KP752250	KP752357	KP825070	"
Ck_A116	"	KP752251	KP752358	KP825071	"
Ck_A117	Rio Paranaíba, Minas Gerais,	KP752252	KP752359	KP825072	"
Ck_A118	"	"	KP752360	KP825073	"
Ck_A122	Viçosa, Minas Gerais, Brasil	KP752254	KP752361	KP825074	"
Arck_01	Arkansas, EEUU	KP752267	KP824987	KP825092	<i>Cornbelt</i>
Arck_03	"	KP752269	KP824988	KP825093	"
Arck_06	"	KP752272	KP824989	KP825094	"
Arck_08	"	KP752274	KP824990	KP825095	"
Arck_09	"	KP752275	KP824991	KP825096	"
Arck_10	"	KP752276	KP824992	KP825097	"
Arck_11	"	KP752277	KP824993	KP825098	"
Arck_13	"	KP752279	KP824994	KP825099	"
Arck_14	"	KP752280	KP824995	KP825100	"
Arck_15	"	KP752281	KP824996	KP825101	"

Arck_17	"	KP752282	KP824997	KP825102	"
Arck_18	"	KP752283	KP824998	KP825103	"
Arck_19	"	KP752284	KP824999	KP825104	"
Arck_21	"	KP752286	KP825000	KP825105	"
Arck_23	"	KP752287	KP825001	KP825106	"
Arck_24	"	KP752288	KP825002	KP825107	"

**Tabla 2.** Aislamientos fúngicos utilizados incluyendo origen geográfico de los aislamientos, y números de entradas de GenBank; se incluye también la identificación tentativa de los aislamientos, cuando fue posible. Estos aislamientos fueron empleados para la constitución del *dataset 2* (ver más adelante).

Aislamiento	Localidad, Provincia (Estado), País <sup>a</sup>	Reg. Fitog. <sup>b</sup>	FA <sup>c</sup>	Número de entrada en GenBank							
				<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>tef</i>	<i>cfp</i>	<i>tub</i>	<i>cytb</i>	<i>his</i> <sup>b</sup>	ITS
<b><i>Cercospora kikuchii</i></b>											
1A	Nueve de Julio, Buenos Aires, Argentina	Pampeana	7	KP860247	KP825115	KP825151	KP752220	KP752328	KP825075	KP825132	KP776648
V2_2	"		10	KP860253	KP825121	KP825157	KP752226	KP752334	KP825081	KP825138	KP776654
Ck2	"		--	KP860248	KP825116	KP825152	KP752221	KP752329	KP825076	KP825133	KP776649
Ck482	Barreiras-BA, Brasil	Cerrado	--	KP860256	KP825124	KP825160	KP752257	KP752364	KP825083	KP825141	KP776657
Ck170	São Carlos Ivaí-PR, Brasil	Mata atlántica	--	KP860254	KP825122	KP825158	KP752255	KP752362	KP825081	KP825139	KP776655
CkET	CBS 128.27 Japan	-----	--	KP860249	KP825117	KP825153	KP752222	KP752330	KP825077	KP825134	KP776650
<b><i>Cercospora aff. kikuchii</i></b>											
2A2	Ramallo, Buenos Aires, Argentina	Pampeana	22	KX361192	KX373999	KX363716	KX363962	KX363761	KX374043	-	KX374090
3A2	"		23	KX361206	KX374013	KX363730	KX363976	KX363775	KX374057	-	-
4A2	"		24	KX361208	KX374015	KX363732	KX363978	KX363777	KX374059	-	KX374093
5A	"		25	KX361209	KX374016	KX363733	KX363979	KX363778	KX374060	-	-
6A	"		26	KX361215	KX374022	KX363739	KX363985	KX363784	KX374066	-	-
7A2	"		27	KX361222	KX374029	KX363746	KX363992	KX363791	KX374073	-	-
7A2bis	"		28	KX361223	KX374030	KX363748	KX363993	KX363792	KX374074	-	-
10A	"		29	KX361190	KX373997	KX363714	KX363960	KX363759	KX374041	-	KX374085
72A	Conesa, Buenos Aires, Argentina		99	KX361216	KX374023	KX363740	KX363986	KX363785	KX374067	-	KX374097
73A1	"		100	KX361217	KX374024	KX363741	KX363987	KX363786	KX374068	-	-
73A2	"	101	KX361218	KX374025	KX363742	KX363988	KX363787	KX374069	-	KX374083	
73A2bis	"	102	KX361219	KX374026	KX363743	KX363989	KX363788	KX374070	-	KX374091	
74A2	"	Pampeana	103	KX361220	KX374027	KX363744	KX363990	KX363789	KX374071	-	-

Aislamiento	Localidad, Provincia (Estado), País <sup>a</sup>	Reg. Fitog. <sup>b</sup>	FA <sup>c</sup>	Número de entrada en GenBank							
				<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>tef</i>	<i>cfp</i>	<i>tub</i>	<i>cytb</i>	<i>his</i> <sup>b</sup>	ITS
75A	"		104	KX361221	KX374028	KX363745	KX363991	KX363790	KX374072	KX363745	KX374086
103A	Chacabuco, Buenos Aires, Argentina		127	KX361185	KX373992	KX363709	KX363955	KX363754	KX374036	-	-
104A	"		128	KX361186	KX373993	KX363710	KX363956	KX363755	KX374037	-	-
105A2	"		129	KX361187	KX373994	KX363711	KX363957	KX363756	KX374038	-	KX374082
108A1	"		130	KX361188	KX373995	KX363712	KX363958	KX363757	KX374039	-	KX374087
108A2	"		131	KX361189	KX373996	KX363713	KX363959	KX363758	KX374040	-	-
34A	Villaguay, Entre Ríos, Argentina		53	KX361193	KX374000	KX363717	KX363963	KX363762	KX374044	-	KX374099
36A1	"		54	KX361194	KX374001	KX363718	KX363964	KX363763	KX374045	-	-
37A3	"		55	KX361195	KX374002	KX363719	KX363965	KX363764	KX374046	-	KX374081
37B	"		56	KX361196	KX374003	KX363720	KX363966	KX363765	KX374047	-	KX374088
38A1	"		57	KX361197	KX374004	KX363721	KX363967	KX363766	KX374048	-	KX374089
39A1	"		58	KX361199	KX374006	KX363723	KX363969	KX363768	KX374050	-	KX374095
39A1bis	"		59	KX361200	KX374007	KX363724	KX363970	KX363769	KX374051	-	-
39A2	"		60	KX361201	KX374008	KX363725	KX363971	KX363770	KX374052	-	KX374080
39A2bis	"		61	KX361202	KX374009	KX363726	KX363972	KX363771	KX374053	-	-
39A3	"		62	KX361203	KX374010	KX363727	KX363973	KX363772	KX374054	-	KX374102
39A3bis	"		63	KX361204	KX374011	KX363728	KX363974	KX363773	KX374055	-	-
39B	"		64	KX361205	KX374012	KX363729	KX363975	KX363774	KX374056	-	-
40A	"		65	KX361207	KX374014	KX363731	KX363977	KX363776	KX374058	-	-
61A	San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina		Monte	84	KX361210	KX374017	KX363734	KX363980	KX363779	KX374061	-
61Abis	"	85		KX361211	KX374018	KX363735	KX363981	KX363780	KX374062	-	KX374103
62A2	"	86		KX361212	KX374019	KX363736	KX363982	KX363781	KX374063	-	-
63A2	"	87		KX361213	KX374020	KX363737	KX363983	KX363782	KX374064	-	KX374101
63B	"	88		KX361214	KX374021	KX363738	KX363984	KX363783	KX374065	-	KX374096
86A2	Monte Maíz, Córdoba, Argentina	Pampeana	112	KX361224	KX374031	KX363749	KX363994	KX363793	KX374075	-	KX374092

Aislamiento	Localidad, Provincia (Estado), País <sup>a</sup>	Reg. Fitog. <sup>b</sup>	FA <sup>c</sup>	Número de entrada en GenBank							
				<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>tef</i>	<i>cfp</i>	<i>tub</i>	<i>cytb</i>	<i>his</i> <sup>b</sup>	ITS
87A2	"		113	KX361225	KX374032	KX363750	KX363995	KX363794	KX374076	-	-
87B2	"		114	KX361227	KX374033	KX363751	KX363996	KX363795	KX374077	-	KX374100
91B	"		115	KX361226	KX374034	KX363752	KX363997	KX363796	KX374078	-	-
92A	"		116	KX361228	KX374035	KX363753	KX363998	KX363797	KX374079	-	-
<b><i>Cercospora sp. H</i></b>											
CkA100	Londrina-PR, Brasil	Mata atlántica	--	KP860262	KP825130	KP825165	KP752263	KP752366	KP825089	KP825147	KP776663
Ck666	Campos Novos-SC, Brasil		--	KP860260	KP825128	KP825163	KP752261	KP752373	KP825087	KP825145	KP776661
<b><i>Cercospora sp. Q</i></b>											
Ck173	Terra Boa-PR, Brasil	Mata	--	KP860255	KP825123	KP825159	KP752256	KP752363	KP825082	KP825140	KP776656
CkA110	Silvânia-GO, Brasil	Cerrado	--	KP860263	KP825129	KP825166	KP752264	KP752367	KP825090	KP825148	KP776664
<b><i>Cercospora cf. sigesbeckiae</i></b>											
Font	Nueve de Julio, Buenos Aires, Argentina	Pampeana	8	KP860250	KP825118	KP825154	KP752223	KP752331	KP825078	KP825135	KP776651
<b><i>Cercospora cf. flagellaris</i></b>											
Arck02	Arkansas, EEUU	Cornbelt	--	KP860265	KP860270	KP860282	KP752268	KP825003	KP825108	KP860276	KP776666
Arck04	"		--	KP860266	KP860271	KP860283	KP752270	KP825004	KP825109	KP860277	KP776667
Arck05	"		--	KP860267	KP860272	KP860284	KP752271	KP825005	KP825110	KP860278	KP776668
Arck07	"		--	KP860268	KP860273	KP860285	KP752273	KP825006	KP825111	KP860279	KP776669
Arck12	"		--	-	KP860274	KP860286	KP752278	KP825007	KP825112	KP860280	KP776670
Arck20	"		--	KP860269	KP860275	KP860287	KP752285	KP825008	KP825113	KP860281	KP776671
<b><i>Cercospora sojina</i></b>											
CsUBA	Tucumán, Argentina	Monte	5	KP860288	KP860289	KP860294	KP860292	KP860293	KP860290	KP860291	KP860288
<b><i>Cercospora sp.</i></b>											
V27	San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina	Monte	11	KP860252	KP825120	KP825156	KP752225	KP752333	KP825080	KP825137	KP776653
V14	Las Lajita, Salta, Argentina	Monte	9	KP860251	KP825119	KP825155	KP752224	KP752332	KP825079	KP825136	KP776652

Aislamiento	Localidad, Provincia (Estado), País <sup>a</sup>	Reg. Fitog. <sup>b</sup>	FA <sup>c</sup>	Número de entrada en GenBank							
				<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>tef</i>	<i>cfp</i>	<i>tub</i>	<i>cytb</i>	<i>his</i> <sup>b</sup>	ITS
Ck646	Carazinho-RS, Brasil	Mata atlántica	--	<i>KP860258</i>	<i>KP825126</i>	<i>KP825161</i>	<i>KP752259</i>	<i>KP752371</i>	<i>KP825085</i>	<i>KP825143</i>	<i>KP776659</i>
Ck654	Fortaleza dos Valos-RS, Brasil		--	<i>KP860259</i>	<i>KP825127</i>	<i>KP825162</i>	<i>KP752260</i>	<i>KP752372</i>	<i>KP825086</i>	<i>KP825144</i>	<i>KP776660</i>
Ck680	Maracajú-MS, Brasil		--	<i>KP860261</i>	<i>KP825129</i>	<i>KP825164</i>	<i>KP752262</i>	<i>KP752365</i>	<i>KP825088</i>	<i>KP825146</i>	<i>KP776662</i>
CkA119	Uberlândia - MG , Brasil		--	<i>KP860264</i>	<i>KP825130</i>	<i>KP825167</i>	<i>KP752265</i>	<i>KP752368</i>	<i>KP825091</i>	<i>KP825149</i>	<i>KP776665</i>

<sup>a</sup>. PR, Paraná; BA, San Salvador de Bahia; SC, Santa Catarina; MS, Mato Grosso do Sul; GO, Goiania; MG, Minas Gerais. CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Holanda). <sup>b</sup>, región fitogeográfica. <sup>c</sup> FA, Números de cultivo asignados por la colección de la Facultad de Agronomía-Universidad de Buenos Aires. <sup>b</sup> las secuencias de *his* son utilizadas sólo en el *dataset* 3. En cursiva se indican las accesiones comunicadas en Soares *et al.* (2015); en tipo normal las obtenidas en Guillin *et al.* (2017)

### **Datos *in silico***

A los efectos de evaluar las relaciones filogenéticas de los aislamientos obtenidos en este trabajo de Tesis con materiales identificados y previamente estudiados por otros autores (Groenewald *et al.* 2013), se descargaron las secuencias nucleotídicas correspondientes a *Cercospora* disponibles en bases de datos del GenBank (**Tabla 3**). A modo de referencia, se utilizó también el aislamiento CBS 128.27 (= CPC 5068) correspondiente al ejemplar tipo de la especie *Cercospora kikuchii*, adquirido al CBS-KNAW *Fungal Biodiversity Centre* (Holanda) por el Dr. Oliveira.

**Tabla 3.** Materiales adicionales de diferentes especies del género *Cercospora* utilizados en la presente tesis, incluyendo número de identificación del cultivo, especie hospedera, origen geográfico y número de entrada del GenBank para cada *locus*. Los nombres específicos son los propuestos en Groenewald *et al.* (2013). Se indica la presencia de ejemplares tipo, cuando éstos se hallaron disponibles

Nombre específico	Números(s) de colección (cultivo) <sup>a</sup>	Especie hospedera	Origen geográfico	Número de entrada en GenBank				
				<i>tef</i>	<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>his</i>	<i>ITS</i>
<i>C. achyranthis</i>	CPC 10091	<i>Achyranthes japonica</i>	Corea del Sur, Jeju	JX143278	JX143032	JX142786	JX142540	JX143524
<i>C. agavicola</i>	CBS 117292; CPC 11774 (tipo)	<i>Agave tequilana</i> var. <i>azul</i>	México, Penjamo	AY966897	AY966898	AY966899	AY966900	AY647237
<i>C. alchemillicola</i>	CPC 5259 (tipo)	<i>Alchemilla mollis</i>	Nueva Zelandia, Auckland	JX143279	JX143033	JX142787	JX142541	JX143525
<i>C. althaeina</i>	CBS 248.67; CPC 5117 (tipo)	<i>Althaea rosea</i>	Rumania, Fundulea	JX143284	JX143038	JX142792	JX142546	JX143530
<i>C. apii</i>	CBS 110816; CPC 5111; 01-4	<i>Moluccella laevis</i>	EEUU, California	DQ233346	AY840449	AY840416	AY840383	AY156919
	CBS 116455; CPC 11556 (tipo)	<i>Apium graveolens</i>	Alemania, Heilbron	AY840486	AY840450	AY840417	AY840384	AY840519
<i>C. apiicola</i>	CBS 116457; CPC 10267 (tipo)	<i>Apium</i> sp.	Venezuela, Caripe	AY840503	AY840467	AY840434	AY840401	AY840536
	CBS 132651; CPC 10759	<i>A. graveolens</i>	Corea del Sur, Namyangju	AY840511	AY840475	AY840442	AY840409	AY840544
<i>C. armoraciae</i>	CBS 132654; CPC 11338	<i>Turritis glabra</i>	Corea del Sur, Hoengseong	JX143297	JX143051	JX142805	JX142559	JX143543
	CBS 250.67; CPC 5088 (tipo)	<i>Armoracia rusticana</i>	Rumania, Fundulea	JX143299	JX143053	JX142807	JX142561	JX143545
<i>C. beticola</i>	CBS 116456; CPC 11557 (tipo)	<i>Beta vulgaris</i>	Italia, Ravenna	AY840494	AY840458	AY840425	AY840392	AY840527
	CPC 18813	"	EEUU, California	JX143310	JX143064	JX142818	JX142572	JX143556
<i>C. cf. brunkii</i>	MUCC 732	<i>Datura stramonium</i>	Japón, Wakayama	JX143314	JX143068	JX142822	JX142576	JX143560
<i>C. campi-silii</i>	CBS 132625; CPC 14585	<i>Impatiens noli-tangere</i>	Corea del Sur, Inje	JX143315	JX143069	JX142823	JX142577	JX143561
<i>C. canescens</i>	CPC 15871	-	México, Tamaulipas	JX143321	JX143075	JX142829	JX142583	JX143567
<i>C. capsici</i>	MUCC 574	<i>Capsicum annuum</i>	Japón, Chiba	JX143325	JX143079	JX142833	JX142587	JX143569
<i>C. celosiae</i>	CBS 132600; CPC 10660	<i>Celosia argentea</i> var. <i>cristata</i>	Corea del Sur, Chuncheon	JX143326	JX143080	JX142834	JX142588	JX143570
<i>C. cf. chenopodii</i>	CBS 132677; CPC 15599	<i>Chenopodium ficifolium</i>	Corea del Sur, Hongcheon	JX143328	JX143082	JX142836	JX142590	JX143572
<i>C. chinensis</i>	CBS 132612; CPC 10831	<i>Polygonatum humile</i>	Corea del Sur, Pyeongchang	JX143334	JX143088	JX142842	JX142596	JX143578
<i>C. cf. citrulina</i>	MUCC 588; MAFF 239409	<i>Ipomoea pes-caprae</i>	Japón, Okinawa	JX143340	JX143094	JX142848	JX142602	JX143582

Nombre específico	Números(s) de colección (cultivo) <sup>a</sup>	Especie hospedera	Origen geográfico	Número de entrada en GenBank				
				tef	act	cal	his	ITS
<b>C. coniogrammes</b>	CBS 132634; CPC 17017 (tipo)	<i>Coniogramme japonica</i>	Australia, Queensland	JX143341	JX143095	JX142849	JX142603	JX143583
<b>C. corchori</b>	MUCC 585; MUCNS 72 (tipo)	<i>Corchorus olitorius</i>	Japón, Shimane	JX143342	JX143096	JX142850	JX142604	JX143584
<b>C. cf. coreopsidis</b>	CBS 132598; CPC 10648	<i>Coreopsis lanceolata</i>	Corea del Sur, Seoul	JX143343	JX143097	JX142851	JX142605	JX143585
<b>C. delaireae</b>	CBS 132595 (tipo)	<i>Delairea odorata</i>	Sudáfrica, Long TomcPass	JX143345	JX143099	JX142853	JX142607	JX143587
<b>C. dispori</b>	CBS 132608; CPC 10773	<i>Disporum viridescens</i>	Corea del Sur, Pyeongchang	JX143349	JX143103	JX142857	JX142611	JX143591
<b>C. cf. erysimi</b>	CBS 115059; CPC 5361	<i>Erysimum mutabile</i>	Nueva Zelandia, Manurewa	JX143350	JX143104	JX142858	JX142612	JX143592
<b>C. euphorbiae-sieboldianae</b>	CBS 113306 (tipo)	<i>Euphorbia sieboldiana</i>	Corea del Sur, Samcheok	JX143351	JX143105	JX142859	JX142613	JX143593
<b>C. fagopyri</b>	CBS 132623; CPC 14541 (tipo)	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Corea del Sur, Yangpyeong	JX143352	JX143106	JX142860	JX142614	JX143594
	CBS 132649; CPC 10725	<i>Viola mandschurica</i>	Corea del Sur, Suwon	JX143354	JX143108	JX142862	JX142616	JX143596
<b>C. cf. flagellaris</b>	CBS 132648; CPC 10722	<i>Amaranthus patulus</i>	Corea del Sur, Namyangju	JX143360	JX143114	JX142868	JX142622	JX143602
	CBS 143.51; CPC 5055	<i>Bromus</i> sp.	--	JX143364	JX143118	JX142872	JX142626	JX143606
	CPC 4411	<i>Citrus</i> sp.	Sudáfrica, Messina	DQ835098	DQ835118	DQ835145	DQ835172	AY260071
	CPC 5441	<i>Amaranthus</i> sp.	Fiji	JX143370	JX143124	JX142878	JX142632	JX143611
<b>C. cf. helianthicola</b>	MUCC 716	<i>Helianthus tuberosus</i>	Japón, Wakayama	JX143374	JX143128	JX142882	JX142636	JX143615
<b>C. cf. Ipomoeae</b>	MUCC 442	<i>Ipomoea aquatica</i>	Japón, Kagawa	JX143377	JX143131	JX142885	JX142639	JX143618
<b>C. kikuchii</b>	CBS 128.27; CPC 5068 (tipo)	<i>Glycine soja</i>	Japón	DQ835088	DQ835107	DQ835134	DQ835161	DQ835070
	CBS 135.28; CPC 5067	"	"	DQ835089	DQ835108	DQ835135	DQ835162	DQ835071
	MUCC 590; MAFF 305040	"	Japón, Kagoshima	JX143379	JX143133	JX142887	JX142641	JX143620
	CBS 132633; CPC 16578	<i>Glycine max</i>	Argentina	JX143378	JX143132	JX142886	JX142640	JX143619
<b>C. lactucae-sativae</b>	MUCC 571; MUCNS 214	<i>Lactuca sativa</i>	Japón, Chiba	JX143383	JX143137	JX142891	JX142645	JX143624
<b>C. cf. malloti</b>	MUCC 787	<i>Mallotus japonicus</i>	Japón, Okinawa	JX143385	JX143139	JX142893	JX142647	JX143626
<b>C. mercurialis</b>	CBS 550.71 (tipo)	<i>Mercurialis perennis</i>	Rumania, Cheia	JX143387	JX143141	JX142895	JX142649	JX143628
<b>C. cf. modiolae</b>	CPC 5115	<i>Modiola caroliniana</i>	Nueva Zelandia	JX143389	JX143143	JX142897	JX142651	JX143630
<b>C. cf. nicotianae</b>	CBS 132632; CPC 15918	<i>G. max</i>	México, Tamaulipas	JX143390	JX143144	JX142898	JX142652	JX143631

Nombre específico	Números(s) de colección (cultivo) <sup>a</sup>	Especie hospedera	Origen geográfico	Número de entrada en GenBank					
				tef	act	cal	his	ITS	
	CBS 570.69; CPC 5075	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nigeria	DQ835100	DQ835120	DQ835147	DQ835174	DQ835074	
<b>C. olivascens</b>	CBS 253.67; CPC 5085 (tipo)	<i>Aristolochia clematidis</i>	Rumania, Cazanele Dunarii	JX143391	JX143145	JX142899	JX142653	JX143632	
<b>C. cf. physalidis</b>	CBS 765.79	<i>Solanum tuberosum</i>	Perú	JX143392	JX143146	JX142900	JX142654	JX143633	
<b>C. pileicola</b>	CBS 132607; CPC 10749 (tipo)	<i>Pilea pumila</i>	Corea del Sur, Dongducheon	JX143393	JX143147	JX142901	JX142655	JX143634	
<b>C. polygonacea</b>	CBS 132614; CPC 11318	<i>Persicaria longiseta</i>	Corea del Sur, Cheongju	JX143396	JX143150	JX142904	JX142658	JX143637	
<b>C. punctiformis</b>	CBS 132626; CPC 14606	<i>Cynanachum wilfordii</i>	Corea del Sur, Bonghwa	JX143397	JX143151	JX142905	JX142659	JX143638	
<b>C. cf. resedae</b>	CBS 118793	<i>Reseda odorata</i>	New Zealand, Auckland	JX143398	JX143152	JX142906	JX142660	JX143639	
<b>C. cf. richardiicola</b>	MUCC 128	<i>Tagetes erecta</i>	Japón, Ehime	JX143400	JX143154	JX142908	JX142662	JX143641	
	MUCC 582; MAFF 238880	<i>Gerbera hybrida</i>	Japón, Shizuoka	JX143404	JX143158	JX142912	JX142666	JX143645	
<b>C. ricinella</b>	CPC 10104	<i>Ricinus communis</i>	Corea del Sur, Chuncheon	JX143406	JX143160	JX142914	JX142668	JX143647	
<b>C. rodmanii</b>	CBS 113123	<i>Eichhornia crassipes</i>	Brasil, Rio Verde	AF146136	DQ835122	DQ835149	DQ835176	DQ835076	
	CBS 113126	"	Brasil, Oroco	AF146138	DQ835125	DQ835152	DQ835179	DQ835079	
<b>C. rumicis</b>	CPC 5439	<i>Rumex sanguineus</i>	Nueva Zelanda, Manurewa	JX143407	JX143161	JX142915	JX142669	JX143648	
<b>C. senecionis-walkeri</b>	CBS 132636; CPC 19196	<i>Senecio walkeri</i>	Laos	JX143408	JX143162	JX142916	JX142670	JX143649	
<b>C. cf. sigesbeckiae</b>	CBS 132621; CPC 14489	<i>Sigesbeckia pubescens</i>	Corea del Sur, Yanggu	JX143411	JX143165	JX142919	JX142673	JX143652	
	MUCC 589; MAFF 305039	<i>G. max</i>	Japón, Saitama	JX143416	JX143170	JX142924	JX142678	JX143657	
<b>C. sojina</b>	CBS 132018; CPC 12322	<i>G. soja</i>	Corea del Sur, Hoengseong	JX143418	JX143172	JX142926	JX142680	GU214655	
	CBS 132615; CPC 11353 (tipo)	"	South Korea: Hongcheon	JX143659	JX143419	JX143173	JX142927	JX142681	
	CBS 132684; CPC 17971;	<i>G. max</i>	Argentina	JX143174	JX142928	JX142682	JX143660	JX143420	
	CPC 17964; CCC 155-09, 09-285-5		"	"	JX143662	JX143422	JX143176	JX142930	JX142684
	CPC 17965; CCC 156-09, 09-285-4		"	"	JX143663	JX143423	JX143177	JX142931	JX142685
	CPC 17966; CCC 157-09, 09-285-3		"	"	JX143664	JX143424	JX143178	JX142932	JX142686
	CPC 17967; CCC 158-09, 09-285-1		"	"	JX143665	JX143425	JX143179	JX142933	JX142687
CPC 17969; CCC 167-09, 09-881	"	"	JX143667	JX143427	JX143181	JX142935	JX142689		
<b>Cercospora sp. A</b>	CBS 132631; CPC 15872	<i>Chenopodium sp.</i>	México	JX143435	JX143189	JX142943	JX142697	JX143675	

Nombre específico	Números(s) de colección (cultivo) <sup>a</sup>	Especie hospedera	Origen geográfico	Número de entrada en GenBank				
				<i>tef</i>	<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>his</i>	<i>ITS</i>
<b>Cercospora sp. B</b>	CBS 132602; CPC 10687	<i>Ipomoea purpurea</i>	Corea del Sur, Kangnung	JX143436	JX143190	JX142944	JX142698	JX143676
<b>Cercospora sp. C</b>	CBS 132629; CPC 15841	–	México, Montecillo	JX143437	JX143191	JX142945	JX142699	JX143677
<b>Cercospora sp. D</b>	CBS 132630; CPC 15856	–	México	JX143438	JX143192	JX142946	JX142700	JX143678
<b>Cercospora sp. E</b>	CBS 132628; CPC 15632	planta sin identificar	México, Montecillo	JX143439	JX143193	JX142947	JX142701	JX143679
<b>Cercospora sp. F</b>	CBS 132618; CPC 12062	<i>Zea mays</i>	Sudáfrica	DQ185083	DQ185095	DQ185107	DQ185119	DQ185071
<b>Cercospora sp. G</b>	CPC 5438	<i>Salvia viscosa</i>	Nueva Zelanda, Manurewa	JX143442	JX143196	JX142950	JX142704	JX143682
<b>Cercospora sp. H</b>	CPC 11620	<i>Chamelaucium uncinatum</i>	Argentina	JX143444	JX143198	JX142952	JX142706	JX143684
<b>Cercospora sp. I</b>	CPC 5440	<i>Nicotiana</i> sp.	Nueva Zelanda, Manurewa	JX143454	JX143208	JX142962	JX142716	JX143694
<b>Cercospora sp. J</b>	MUCC 541	<i>Antirrhinum majus</i>	Japón, Aichi	JX143455	JX143209	JX142963	JX142717	JX143695
<b>Cercospora sp. K</b>	CBS 132603; CPC 10719	<i>Ipomoea coccinea</i>	Corea del Sur, Namyangju	JX143456	JX143210	JX142964	JX142718	JX143696
<b>Cercospora sp. L</b>	CBS 115477; CPC 5114	<i>Crepis capillaris</i>	Nueva Zelanda	JX143459	JX143213	JX142967	JX142721	JX143699
<b>Cercospora sp. M</b>	CBS 132596; CPC 10553	<i>Acacia mangium</i>	Tailandia, Sanamchaikhet	AY752175	AY752203	AY752234	AY752265	JX143700
<b>Cercospora sp. N</b>	CBS 132619; CPC 12684	<i>Musa</i> sp.	Bangladesh, Western	JX143460	JX143214	JX142968	JX142722	EU514224
<b>Cercospora sp. O</b>	CBS 132635; CPC 18636	“	Tailandia, Mae Klang Loung	JX143461	JX143215	JX142969	JX142723	JX143701
<b>Cercospora sp. P</b>	CBS 112728; CPC 3949	<i>Citrus × sinensis</i>	Sudáfrica, Komatipoort	DQ835092	DQ835111	DQ835138	DQ835165	AY260076
	CBS 132680; CPC 15827	<i>Ricinus communis</i>	México, Tamaulipas	JX143468	JX143222	JX142976	JX142730	JX143708
	CPC 11633	<i>Dioscorea rotundata</i>	Ghana	JX143472	JX143226	JX142980	JX142734	JX143713
<b>Cercospora sp. Q</b>	CBS 132679; CPC 15807	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México	JX143485	JX143239	JX142993	JX142747	JX143726
	CBS 132681; CPC 15844	<i>Euphorbia</i> sp.	México, Tamaulipas	JX143486	JX143240	JX142994	JX142748	JX143727
	CPC 10550	<i>Acacia mangium</i>	Tailandia	AY752172	AY752200	AY752231	AY752262	AY752139
<b>Cercospora sp. R</b>	CBS 114644	<i>Myoporum laetum</i>	Nueva Zelanda, Grey Lynn	JX143491	JX143245	JX142999	JX142753	JX143732
<b>Cercospora sp. S</b>	CBS 132599; CPC 10656	<i>Crepidiastrum denticulatum</i>	Corea del Sur, Yangpyeong	JX143492	JX143246	JX143000	JX142754	JX143733
<b>C. vignigena</b>	CBS 132611; CPC 10812 (tipo)	<i>Vigna unguiculata</i>	Corea del Sur, Jeongeup	JX143493	JX143247	JX143001	JX142755	JX143734

Nombre específico	Números(s) de colección (cultivo) <sup>a</sup>	Especie hospedera	Origen geográfico	Número de entrada en GenBank				
				<i>tef</i>	<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>his</i>	<i>ITS</i>
<b><i>C. violae</i></b>	CBS 251.67; CPC 5079 (tipo)	<i>Viola tricolor</i>	Rumania, Cazanele Dunarii	JX143496	JX143250	JX143004	JX142758	JX143737
<b><i>C. zae-maydis</i></b>	CBS 117757 (tipo)	<i>Zea mays</i>	EEUU, Wisconsin	DQ185086	DQ185098	DQ185110	DQ185122	DQ185074
<b><i>C. zebrina</i></b>	CBS 112723; CPC 3957	<i>Trifolium repens</i>	Canadá, Ottawa	JX143504	JX143258	JX143012	JX142766	AY260079
	CBS 129.39; CPC 5078	“	Corea del Sur, Namyangju	JX143512	JX143266	JX143020	JX142774	JX143750
	CPC 5473	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	Nueva Zelandia	JX143517	JX143271	JX143025	JX142779	JX143755
<b><i>C. zeina</i></b>	CBS 118820; CPC 11995 (tipo)	<i>Zea mays</i>	Sudáfrica	DQ185093	DQ185105	DQ185117	DQ185129	DQ185081
<b><i>C. cf. zinniae</i></b>	CBS 132676; CPC 15075	–	Brasil, Valverde	JX143519	JX143273	JX143027	JX142781	JX143757
	MUCC 572	<i>Zinnia elegans</i>	Japón, Chiba	JX143521	JX143275	JX143029	JX142783	JX143759

<sup>a</sup> CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Holanda); CPC: Colección de cultivos del Dr. Pedro Crous, localizada en el Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; MAFF: Ministerio de Agricultura, Forestales y Pesca, Tsukuba, Prefectura de Ibaraki, Japón; MUCC: Colección de cultivos del Laboratorio de Patología Vegetal, Mie University, Tsu, Prefectura de Mie, Japón; MUCNS: Especímenes y cultivos activos, Chiharu Nakashima, Mie University, Tsu, Prefectura de Mie, Japón.

## **Métodos**

### **Cultivo *in vitro*.**

En todos los casos, las muestras de semillas fueron tomadas de lotes experimentales ó de producción; cada una se compone de una mezcla de aproximadamente 20 g de semillas sintomáticas de MPSS y asintomáticas. Se seleccionaron inicialmente 200 muestras procurando maximizar la representación de las distintas regiones fitogeográficas. A fin de obtener los aislamientos fúngicos, se tomaron entre tres y cinco semillas de cada muestra. Éstas fueron colocadas en cajas de Petri con medio estéril PDA (papa, dextrosa, agar 1,5% p/v) y mantenidas a 26°C en oscuridad por siete días, según se describe en Almeida *et al.* (2005). Las técnicas de repique y purificación de los aislamientos han sido las mismas que las descritas en Groenewald *et al.* (2013). La identificación específica fue inicialmente realizada conociendo el hospedero (es decir, soja), los síntomas que produce la infección (mancha púrpura en la semilla), y las características del micelio, siguiendo los lineamientos de Stewart y Rodríguez (2013). Se obtuvieron así un total de 148 cultivos axénicos, identificados tentativamente como *Cercospora kikuchii*. Estos fueron mantenidos en caja de Petri con PDA, a 4°C hasta su uso, y se encuentran depositados en el cepario de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

### **Extracción de ADN.**

El micelio fue colectado de la superficie del agar con una hoja de bisturí estéril y se procedió a su molienda en nitrógeno líquido. El ADN total fue extraído con el *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA) según instrucciones del proveedor. La cantidad y calidad inicial del ADN en cada muestra fue estimada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (p/v), teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Se tomó como estándar para su comparación la intensidad de bandas de un marcador de 100 bp cuyas concentraciones son conocidas a partir de la información provista por el proveedor (InbioHighway, Argentina). Se llevaron las soluciones de trabajo de cada muestra hasta aproximadamente 20 ng/μl. Estos valores fueron verificados por espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

### **Amplificaciones por PCR**

Se secuenciaron 5 *loci* (secuencias gónicas parciales) nucleares y uno mitocondrial, previamente aplicados en *Cercospora* por otros autores. Para esto se utilizaron los pares de cebadores que se indican en la **Tabla 4**. Los cebadores ITS5 e ITS4 permitieron amplificar el extremo 3' del gen del RNA ribosomal (rRNA) 18S, el primer espaciador transcripto interno, el gen del rRNA 5.8S, el segundo espaciador transcripto interno, y una región parcial 5' del gen del rRNA 28S, identificada aquí conjuntamente como ITS. Parte del gen de la actina (*act*) fue amplificada utilizando los cebadores ACT-512F / ACT-783R. La amplificación del factor de elongación de la transcripción 1-alfa (*tef1-α*), de la secuencia parcial de la calmodulina (*cal*), de una región distal de la tubulina (*tub2*), y una región parcial de la citocromo-oxidasa B mitocondrial (*cytb*) se utilizaron los cebadores de la **Tabla 4**. Se diseñó un cebador adicional (Ck\_Betatub-F1) que, junto con el Bt516R, permitió amplificar una sección proximal del gen de la tubulina, en adelante "*tub1*". Esta región incluye los primeros cuatro intrones del gen y sus correspondientes exones. La secuencia del cebador Ck\_Betatub-F1 se diseñó a partir del análisis de la secuencia completa del gen de la tubulina de *C. beticola* (AY856373) utilizando el programa Primer3 (Koressaar y Remm 2007).

**Tabla 4.** Información sobre los *loci*, secuencia de los cebadores, temperatura de *annealing* (T), tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases (pb), referencia de los trabajos en los que se desarrollaron los cebadores utilizados en el presente estudio, y cantidad de aislamientos ensayados por *locus* (N).

<b>Locus</b>	<b>Secuencia de los cebadores (5' - 3')</b>	<b>T</b>	<b>Long. (pb)</b>	<b>Referencia original</b>
<i>act</i>	<b>ACT-512</b> ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC <b>ACT-783</b> TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	56	226	Carbone y Khon (1999)
<i>cal</i>	<b>CAL-228</b> GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC <b>CAL-737</b> CATCTTTCTGGCCATCATGG	56	561	
<i>cfp</i>	<b>F1771</b> ATTGGTTGGAGCGACTTTTG <b>R2706</b> CAGGACAGTCTGGACAGCAA	56	935	Soares <i>et al.</i> (2015)
	<b>cfp_F1</b> GCCGATCGATTGCAGGAGTTGGC <b>cfp_R1</b> TTGCTGATCCAAGTAGTCGGACG	58	636	
<i>cytb</i>	<b>Cytb-F2</b> GGAAGAGGTCTATACTATGG <b>Cytb-R1</b> CGTGATTAGCACCTAATTGC	45	696	Imazaki <i>et al.</i> , 2006
ITS	<b>ITS5</b> GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG <b>ITS4</b> TCCTCCGCTTATTGATATGC	56	560	White <i>et al.</i> (1990)
<i>tef 1-α</i>	<b>TEF_F1</b> CCGGCAAGTCGACAACCACCG <b>TEF_R1</b> TCACGGTGACCTGGGGCGTC	56	605	Carbone y Khon (1999)
<i>tub1</i>	<b>Ck_B-F1</b> TGCCTGAAATCGTGAGTCCTCAC <b>Bt516R</b> ACGAAGTTGTCTGGCGGAAAAG	67	538	Soares <i>et al.</i> (2015); Davidson <i>et al.</i> (2006)
<i>tub2</i>	<b>Tub-F1</b> GGTCATTACACTGAGGGTGC <b>Tub-R1</b> GACAAGATCGTTCATGTTGGACTC	56	834	Imazaki <i>et al.</i> (2006)

En el presente estudio se utilizó por primera vez información de secuencia para una sección del *locus* que codifica para la proteína facilitadora de la cercosporina (CFP) de *C. kikuchii* para realizar análisis evolutivos. CFP es una proteína transmembrana que presenta dominios hidrofílicos (citósolicos y extracelulares), así como dominios hidrofóbicos (intra-membrana). La hipótesis subyacente al diseño de cebadores específicos para esta región génica, es que tanto las regiones intrónicas como los exones hidrofóbicos serían objeto de presiones selectivas leves ó nulas, y entonces presentarían un buen nivel informativo. Los cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia AF091042 con el programa Primer3 y se denominaron F1771/ R2706 y cfp\_F1/ cfp\_R1 (**Tabla 4**). El primer par es interno al segundo, y amplifican una región que contiene tres intrones y los exones flanqueantes. Para la mayoría de los aislamientos fue posible obtener una amplificación eficiente utilizando el par F1771/R2706; mientras que para otros aislamientos se empleó el par cfp\_F1/cfp\_R1.

En todos los casos las amplificaciones utilizaron aproximadamente 40 ng de templado, 0,4 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Promega), 1x *buffer* de reacción (Promega), en un volumen final de 50 µL. El perfil de amplificación utilizado fue: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturalización), 30 s a la temperatura indicada según cebadores (**Tabla 4**), y 1 min a 72°C (extensión), con un paso adicional de extensión de 10 min a 72°C. En todos los casos, la eficacia de las reacciones de amplificación fue evaluada en electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), teñidos con bromuro de etidio, y visualizados bajo luz ultravioleta. El tamaño aproximado de los amplicones fue verificado utilizando el marcador de peso molecular de 100 bp, mencionado anteriormente.

## Secuenciación

Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el *kit* ExoSapIt (Affymetrix, USB) según instrucciones del fabricante. Los servicios de secuenciación para los fragmentos obtenidos en la Universidad de Viçosa (Brasil) fueron provistos por MacroGen Inc., South Korea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Aquellos obtenidos en el LACyE (FCEyN – UBA) fueron secuenciados en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología (CNIA-INTA Castelar, Argentina). En todos los casos, las reacciones de secuenciación fueron realizadas con los mismos cebadores utilizados en las reacciones de amplificación, tanto en sentido 3'→5' como en sentido 5'→3'. Todas las secuencias obtenidas para este trabajo fueron depositadas en el GenBank (**Tablas 1 y 2**).

## ***Aproximaciones analíticas***

### **Construcción de *datasets***

Las secuencias (directas y reversas) obtenidas para cada uno de los 8 *loci* fueron importadas a Sequencher v. 4.8 beta (Gene Codes Corp.) para su ensamblado, y luego fueron utilizadas para generar alineamientos de *loci* individuales. Éstos fueron realizados inicialmente con Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), y refinados con el subprograma Muscle (Edgar, 2004) con los parámetros *default*, según se ha implementado en el programa MEGA v. 5.0 (Kumar *et al.*, 2016). Una vez obtenido cada alineamiento múltiple, los extremos fueron corregidos manualmente para eliminar regiones incompletas. El mismo procedimiento se siguió para generar los distintos *datasets* analizados en este trabajo (ver más adelante).

### **Análisis de congruencia**

Para evaluar el nivel de congruencia entre *loci* se utilizó el programa CADM (*Congruence Analysis of Distance Matrices*, Campbell *et al.*, 2011), según fue implementado en el paquete ape 2.3 (Paradis *et al.*, 2004) dentro del entorno R 2.9.0 (<http://www.R-project.org>). CADM es una extensión del *test* de Mantel (Mantel 1967), que puede ser utilizado para evaluar la hipótesis nula de incongruencia completa entre dos ó más matrices producto de particiones de datos diferentes. La hipótesis alternativa propone que las matrices son parcial ó completamente congruentes. Como estimador global del grado de congruencia se utiliza el estadístico W de Kendall (Legendre, 2005), que varía en una escala de 0 (incongruencia total) a 1 (congruencia completa). El programa CADM utiliza luego estimadores *a posteriori* (comparación de a pares entre matrices de distancia, *test* de Mantel) para identificar la probabilidad y nivel de congruencia entre particiones particulares, por lo que se obtiene una matriz de probabilidades y escala de congruencia entre las mismas.

En un contexto genealógico, CADM evalúa el nivel de congruencia (el grado de concordancia entre *loci*) tomando como información inicial las matrices de distancia evolutiva (distancia p no corregida) entre los terminales (en este caso, los aislamientos) de un alineamiento. Debido a requerimientos del programa, los alineamientos fueron ecualizados de modo de incluir sólo aquellos aislamientos con información para todos los *loci* (*i.e.*, sin secuencias faltantes). La significación se evalúa contra una distribución de los valores del estimador W obtenida a partir de 999 permutaciones de las secuencias en cada alineamiento; en función de esto, se evalúa si el valor observado se encuentra ó no

comprendido dentro de dicha distribución, a un determinado nivel de significación (en este caso  $p < 0,05$ ). CADM utiliza luego (como se señala arriba) el *test* de Mantel para realizar comparaciones entre cada par de *loci* y evaluar si existe ó no congruencia entre ellos (Campbell *et al.*, 2011).

### **Ensamblado de matrices multi-*locus***

A partir de los resultados del análisis de congruencia, y a los efectos de evaluar las diferentes hipótesis planteadas, se generaron tres matrices de *loci* concatenados, originando así los *datasets* que se detallan a continuación. Las matrices multi-*locus* (o *datasets*) fueron confeccionadas utilizando el programa Geneious v.10.0 (Biomatters, <http://www.geneious.com>). En el presente trabajo, un genotipo multi-*locus* es considerado sinónimo de “haplotipo”.

**Dataset 1.** Incluyó 148 aislamientos de Argentina, Brasil y EEUU, con información de secuencia para 3 *loci* nucleares (*cfp*, *tub1* y *tub2*) y 1 *locus* mitocondrial (*cytb*). Con este *dataset*, de 3680 pb, se buscó maximizar la representación geográfica de los aislamientos fúngicos.

**Dataset 2.** Se compuso de 67 aislamientos provenientes de Argentina, Brasil y EEUU, y 6 *loci* nucleares (*act*, *cal*, *cfp*, *tef1- $\alpha$* , *tub1*, y *tub2*) y 1 mitocondrial (*cytb*), que concatenados totalizaron 3351 pb. Con esta matriz se intentó maximizar la representación de *loci* genómicos para cada terminal.

**Dataset 3.** Este *dataset* se conformó con información de secuencia de 5 *loci* (*act*, *cal*, *his*, ITS y *tef 1- $\alpha$* ) para 100 aislamientos de las 71 especies de *Cercospora* disponibles en GenBank, más 55 haplotipos del *dataset 2*. En total, esta matriz está compuesta de 155 aislamientos con 1477 pb cada uno.

### **Cuantificación de la variación genética**

En este análisis no se incluyeron estimadores poblacionales, ya que las muestras han sido obtenidas en diferentes lotes de producción, y en muestreos discontinuos. Se utilizaron entonces aproximaciones analíticas no basadas en el modelo de Wright-Fisher (Wright, 1930), de modo de evitar el sesgo consecuente (Grünwald y Goss, 2011).

Para cada una de las matrices concatenadas se obtuvieron diferentes estimadores de variación, a saber: número de sitios segregantes (S), número total de mutaciones (Eta), diversidad nucleotídica (Pi; Nei y Miller, 1990), número promedio de diferencias

nucleotídicas ( $k$ ; Tajima, 1983), número de haplotipos ( $H$ ) y diversidad haplotípica ( $H_d$ ; Nei y Miller 1990). Para ello se utilizó la rutina de análisis de polimorfismo implementada en el programa DNAsp v. 5.10.1 (Librado y Rozas, 2009).

## **Análisis exploratorio de datos (AED)**

Para el AED y los análisis filogenéticos se adoptó el criterio de combinación condicional. Es decir, se concatenaron en una matriz multi-*locus* aquellos *loci* cuyas historias evolutivas resultaron significativamente (si bien parcialmente) congruentes. Los *gaps* fueron considerados como quinto estado en todos los análisis, siguiendo el criterio de Giribet y Wheeler, (1999). Se emplean como sinónimos los conceptos de “recombinación” e “intercambio horizontal”, dado que no es posible en este contexto distinguir una hipótesis de la otra.

## **Análisis de redes**

Se encaró el AED tanto para los *datasets* concatenados como para *loci* individuales, a los efectos de evaluar la ocurrencia de conflictos dentro y entre regiones genómicas. La obtención de una estructura de tipo arborescente daría cuenta de relaciones verticales compatibles (ausencia de conflicto), mientras que la obtención de topologías mostrando una trama reticular expresaría un cierto nivel de conflicto entre los caracteres del *locus* o *dataset* en estudio.

Para el AED se utilizó el algoritmo *NeighborNet* (Bryant y Moulton, 2004), tal como se encuentra implementado en el programa SplitsTrees v. 4.12.3 (Huson y Bryant, 2001). *NeighborNet* es una aproximación analítica combinada, que no fuerza el ajuste de los datos de secuencia dentro de un árbol filogenético (topología dicotómica). Utiliza como *input* alineamientos de secuencias. A partir de esos alineamientos calcula las matrices de distancia entre los terminales y genera desde ahí una topología que puede resultar dicotómica, reticular, o una combinación de éstas. Calcula adicionalmente un índice de ajuste (*fit index*). Este índice permite evaluar la cantidad de información retenida en la topología en relación con la matriz de distancia que el algoritmo calculó previamente. Se evaluó además el soporte interno de cada rama utilizando la metodología de *bootstrap*; se utilizaron 1000 pseudorréplicas para cada caso.

El programa SplitsTrees ofrece también la posibilidad de cuantificar el nivel de homoplasia (conflicto) entre pares de terminales (*Pairwise Homoplasy Index*, *PHI test*; Bruen *et al.*, 2006). El *test* de PHI da cuenta del nivel de conflicto de caracteres atribuible a la

recombinación, y se expresa con el estadístico  $\Phi_w$ . Este *test* utiliza la noción de incompatibilidad refinada (para caracteres con más de dos estados). Sus supuestos no incluyen la historia poblacional, ni la asignación de cada muestra a una población determinada. Por lo tanto, no requiere que se cumpla ningún escenario evolutivo particular (de ahí que se incluya dentro del AED). La significación estadística de los valores del *test* de PHI se estima a través de 1000 permutaciones al azar de los sitios nucleotídicos, asumiendo ausencia de recombinación. Luego el programa obtiene la distribución de frecuencias para los valores de PHI en las simulaciones, y estima la probabilidad de que el valor observado esté incluido en esa distribución aleatoria (Bruen *et al.*, 2006). Los autores proponen un umbral de  $p_{\Phi_w} < 0,05$  como valor de corte para la aceptación de la hipótesis de existencia de eventos de intercambio horizontal; el estadístico así validado permitiría entonces detectar la presencia de eventos de intercambio horizontal dentro del *dataset* analizado, con un bajo nivel de falsos positivos.

## **Análisis Discriminante de Componentes Principales, DAPC**

El análisis de redes no ofrece una significación estadística para los agrupamientos derivados del análisis de *NeighborNet*, sino sólo un soporte interno (valor de *bootstrap*) para cada rama de la topología. Utilizando métodos de asignación, como el análisis discriminante de componentes principales (del inglés, *Discriminant Analysis of Principal Components*, DAPC, Jombart *et al.*, 2010), puede realizarse una validación estadística de la asignación de cada haplotipo a un grupo dado. DAPC se encuentra implementado en el paquete *adegenet* 2.0.0 que corre bajo un entorno de R; se analizaron así las matrices concatenadas de los *datasets* 1, 2 y 3, según los procedimientos y parámetros propuestos por Jombart (2008). Este programa no realiza una definición de grupos en base a información externa (como puede ser, por ejemplo, la localización geográfica). DAPC realiza una asignación de grupos inicial, utilizando el algoritmo “*k-means*”, un método de agrupamiento que encuentra un número óptimo (K) de grupos, tomando como criterio la maximización de la variación entre grupos. Para identificar el número óptimo de *clusters* (K), “*k-means*” corre secuencialmente con valores incrementales de K. Luego compara las diferentes soluciones de agrupamiento (número de grupos) utilizando el Criterio de Información Bayesiano (BIC). Idealmente, la solución óptima debería corresponder con el valor más bajo de BIC. El número K de grupos es luego tomado como *input* para el análisis de DAPC, que caracteriza y valida los grupos predefinidos, otorgando a cada aislamiento (haplotipo) una probabilidad de asignación a los *clusters* definidos previamente mediante el algoritmo de “*k-means*”.

Para la representación gráfica se utilizan tanto proyecciones bidimensionales como tridimensionales, según el caso. Esto es así debido a que la proyección tridimensional elimina las distancias desde los centroides hasta la localización de cada aislamiento, que en este caso resulta informativa. No obstante, la opción gráfica 2D preserva la dispersión de los aislamientos que conforman cada grupo, contrario a lo que ocurre con una representación 3D.

## Haplotipos gráficos

Se generó una representación gráfica de los haplotipos (genotipos multi-*locus*) del *dataset* 2, a fin de obtener una visualización de la variación genética. Para ello se utilizó el paquete Genieous 7.1.7. Se determinaron diferentes grupos de haplotipos (haplogrupos), y se realizaron comparaciones iniciales entre los diferentes haplotipos gráficos individuales a los efectos de identificar posibles haplotipos de recombinantes.

## Análisis de recombinación

Los *datasets* 1 y 2, y cada uno de los *loci* individuales fueron analizados utilizando el programa RDP v. 4.80beta (Martin *et al.*, 2015). Este programa permite la identificación de secuencias recombinantes utilizando una serie de algoritmos y estima una probabilidad de ocurrencia para cada evento de recombinación detectado, de acuerdo a cada uno de esos *tests* de recombinación. Estos son métodos heurísticos que exploran los datos (alineamientos de secuencias) para descubrir patrones asociados con el intercambio horizontal. El programa utiliza inicialmente un protocolo, denominado X-OVER, que involucra 7 *tests* de recombinación independientes, e incluye 3 métodos basados en comparaciones de tripletes (3Seq, RDP, y SiScan), 3 basados en comparaciones de sustituciones nucleotídicas (Geneconv, MaxChi, y Chimaeram) y 1 de “ventana deslizante” (BootScan).

En conjunto, éstos *tests* minimizan la posibilidad de falsos positivos (error de tipo II) debido a la presencia de fenómenos verticales como la coalescencia profunda (reparto de linajes incompletos), mutación recurrente, y convergencia debida a otros procesos evolutivos generadores de conflicto entre caracteres, sin que exista recombinación. Dado que *Cercospora* ha sido reportado como un género de reproducción predominantemente asexual, se optó por arriesgar el error de tipo I (rechazar recombinantes verdaderos) como una alternativa preferible al error de tipo II (aceptar eventos falsos). Se trazó para ello un criterio umbral según el cual sólo se consideraron validados eventos de recombinación detectados por 4 o más *tests*, con una probabilidad  $p < 1,9 \times 10^{-4}$ . Este

umbral está muy por encima de  $p < 0,05$ , que es el valor por defecto del programa, y el valor utilizado por autores previos Douhan *et al.* (2007).

Cada evento de recombinación (intercambio horizontal) así detectado fue luego re-analizado individualmente, utilizando los 7 métodos disponibles en el programa.

## **Análisis filogenético**

Los modelos de sustitución nucleotídica para cada región génica fueron determinados bajo el criterio de información de Akaike (Akaike, 1974) utilizando el programa MrModeltest v.2.3 (Nylander 2004). Para el *dataset 1*, el *locus cfp* presentó el mejor ajuste al modelo de Kimura dos parámetros (K2; Kimura, 1980); *tub1* ajustó mejor al de Jukes y Cantor (JC, 1969); *tub2* ajustó al modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY, Hasegawa *et al.*, 1985), más la distribución Gamma para dar cuenta de la heterogeneidad de los sitios –G– y una proporción de sitios invariantes –I–. El modelo más adecuado para el *locus cytb* resultó ser el de Tamura (1992) (T92).

Para el *dataset 2*, los *loci act*, *cal*, *cfp* y *tef1- $\alpha$*  ajustaron al modelo K2+G. El modelo más adecuado para el *locus cytb* resultó ser T92; *tub1* presentó el mejor ajuste a JC; *tub2* ajustó mejor a HKY+G+I. Para el *dataset 3*, el modelo K2+G fue seleccionado para *act* y *tef*, mientras que T92+G fue seleccionado para *cal* e *his*, y K2 para ITS.

Los aislamientos identificados como posibles recombinantes con RDP fueron excluidos del análisis a los efectos de evitar artefactos en las topologías (Posada y Crandall, 2001).

La inferencia bayesiana fue realizada utilizando el programa MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012), con los modelos de sustitución nucleotídica mencionados arriba para cada partición (*locus*). Se utilizaron dos corridas simultáneas de  $5 \times 10^6$  generaciones, con tres cadenas frías y una caliente (parámetro de temperatura de 0,25). El *prior* para el largo de rama fue de 0,01. Los árboles fueron muestreados cada 5000 generaciones, y el primer 25% de esos árboles fue descartado como “*burn in*”. El árbol de consenso de mayoría fue generado utilizando el comando *sumt*. Para evaluar la convergencia de los parámetros estimados se utilizó el programa Tracer v.1.6.0 (Rambaut *et al.* 2014, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) inspeccionando los “*trace plots*” y los tamaños efectivos de muestra (*effective sample sizes*, ESS > 400) para todos los estadísticos. Las representaciones gráficas de los filogramas fueron editadas con FigTree v.1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

La topología bayesiana derivada del análisis del *dataset 2* fue enraizada en el punto medio, debido a que no se dispone de información de secuencia para ninguna especie del género que pueda utilizarse como raíz. La topología derivada del análisis del *dataset 3* fue enraizada sobre *C. senecionis-walkerii*, sobre la base de los resultados comunicados previamente por Groenewald *et al.* (2013).

## **Delimitación bayesiana de especies**

La especiación es un proceso continuo (Queiroz, 1998). Esto implica que la delimitación específica utilizando datos genealógicos necesariamente está asociada a un cierto grado de incertidumbre. Esa incertidumbre puede ser substancial en escalas de tiempo recientes o en situaciones de contacto secundario entre linajes que no hayan alcanzado a desarrollar barreras de aislamiento reproductivo completas (Knowles y Carstens, 2007).

La delimitación específica bayesiana (Rannala y Yang, 2003) utiliza información *multi-locus* para proponer modelos para los umbrales de intercambio genético entre *taxa*, dando cuenta de esa incertidumbre. Este método ha sido implementado, entre otros, en el programa *Bayesian Phylogenetics and Phylogeography* (BPP v.3.1; Yang y Rannala, 2010, 2017; Zhang, *et al.*, 2014). BPP está basado en el modelo del coalescente multi-especie; el programa utiliza un algoritmo de Monte Carlo de salto reversible para analizar el espacio muestral mediante cadenas de Markov (rjMCMC por sus siglas en inglés). Este algoritmo estima la distribución de probabilidades posteriores para diferentes modelos de delimitación de especies. Cada modelo asume un número de especies variable, donde cada especie está descrita por tres parámetros:  $\theta_s$ , el producto del número efectivo poblacional por la tasa de mutación por sitio ( $N_e \times \mu t$ );  $\tau_A$ , el tiempo en el que una especie surgió y  $\tau_D$ , el tiempo en el que la especie se divide en dos linajes descendientes. BPP utiliza como *input*, además de los datos de secuencia, escenarios *a priori* provistos por el investigador, que incluyen un árbol guía, el tamaño de la población raíz y los tiempos de divergencia desde esa raíz. Autores previos indican que estos escenarios *a priori* pueden afectar las probabilidades posteriores: valores altos de tamaño poblacional ( $\theta_s$ ) y bajos para los tiempos de divergencia para la raíz del árbol ( $\tau_0$ ) favorecen modelos con menos especies (Yang y Rannala, 2010; Leatché y Fujita, 2010).

A diferencia de las versiones anteriores, el BPP v. 3.1 incorpora el método de permutación de ramas conocido como de intercambio entre vecinos más cercanos (*Nearest Neighbor Interchange*, NNI), para maximizar la cantidad de topologías a evaluar dentro del espacio de muestreo a partir del árbol guía. Esto permite incorporar la incertidumbre propia de los

árboles de genes, en relación con el árbol de especies, y evita que los modelos evaluados estén restringidos por la topología fija del árbol guía. El programa también estima la probabilidad posterior marginal de especiación asociada con cada bifurcación en el árbol guía, a la que se denomina “probabilidad de especiación” (Leatché y Fujita, 2010). Una probabilidad de especiación de 1 sobre un nodo indica que cada modelo de delimitación visitado por el algoritmo rjMCMC apoyó la separación de los dos linajes que descienden de ese nodo como especies independientes. A la inversa, una probabilidad de 0 indica que todos los modelos colapsaron ese nodo en una única especie. Bajo esta metodología se esperan altos valores (probabilidades posteriores, pp, cercanas a 1) para especies que han estado aisladas por períodos de tiempo prolongados, y valores bajos (pp tendientes a cero) para aquellas que han experimentado un flujo génico extensivo ó reciente. En este marco se asume que no existió intercambio genético horizontal posterior a la separación de los linajes (basado en el concepto tradicional de especie biológica). No obstante, Leatché y Fujita (2010) consideran que una probabilidad posterior de especiación cercana 0,95 es un indicio fuerte de que dos reservorios génicos presentan cierta cohesión debida a intercambios horizontales infrecuentes ó incipientes.

A los efectos de establecer los límites específicos entre los linajes que actúan como agentes causales de la MPSS se analizó el *dataset 2*. El muestreo por rjMCMC se corrió por 200.000 generaciones, descartándose las primeras 20.000 generaciones (“*burn-in*”). Se asignó la misma probabilidad *a priori* a cada modelo de delimitación de especies. El árbol guía propuesto, basado en los resultados del análisis filogenético bayesiano del *dataset 3*, contiene 4 especies y la siguiente topología: ((*C. cf. flagellaris*, *C. sp. H*), (*C. aff. kikuchii*, *C. sp. Q*)).

Debido a que no existe en la literatura información fehaciente respecto de tamaños poblacionales ( $\theta_0$ ) ni tiempos de divergencia ( $\tau_0$ ) para la raíz del árbol, se evaluaron aquí 4 escenarios o combinaciones diferentes de distribuciones *a priori* para ambos parámetros, asignándoles una distribución gamma  $G(a,b)$  (Yang y Rannala 2003). La primer combinación asumió tamaños poblacionales ancestrales relativamente grandes  $\theta \sim G(1, 10)$  y tiempos de divergencia profundos  $\tau_0 \sim G(1, 10)$ . La segunda combinación asumió tamaños de población ancestrales pequeños con  $\theta \sim G(2, 2000)$  y tiempos de divergencia recientes con  $\tau_0 \sim G(2, 2000)$ . Una tercera combinación asumió tamaños poblacionales ancestrales grandes  $\theta \sim G(1, 10)$ , y tiempos de divergencia recientes  $\tau_0 \sim G(2, 2000)$ . El cuarto escenario, finalmente, asumió tamaños ancestrales pequeños  $\theta \sim G(2, 2000)$ , y

tiempos de divergencia antiguos  $T_0 \sim G(1, 10)$ . Se cubrieron así los cuatro posibles escenarios de origen del agente causal de MPSS en las regiones estudiadas.

## Estructura de la variación genética

Para realizar una evaluación de la partición geográfica de la variación genética a nivel general (*dataset 1*) se utilizó el Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992). En el caso de organismos de una estructura clonal, no se esperaría un componente de variación significativo dentro de las localidades. Si los mayores componentes de la varianza surgen entre unidades de muestreo (localidades, regiones, países), ésto sería indicio de que existe cierto nivel de estructuración en la variación genética. El AMOVA para el *dataset 1* se obtuvo utilizando el programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Del mismo modo,  $F_{SC}$  representa la varianza entre provincias relativa a la varianza dentro de los países,  $F_{ST}$  la varianza entre provincias relativa a la varianza total y  $F_{CT}$  la varianza entre países relativa a la varianza total. Para evaluar la significación de los resultados obtenidos, se realizó un *test* aleatorizado, que permuta 1023 veces la matriz de datos, como se describe en Excoffier *et al.* (2005).

## Análisis de variación nucleotídica y haplotípica

Se realizó una estimación de la variación genética para tres de las cuatro especies validadas como agentes causales de la MPSS. *Cercospora aff. H* no fue analizada debido al bajo número de muestras detectadas ( $N= 8$ ). Se obtuvieron curvas de acumulación de haplotipos a fin de evaluar el poder de discriminación entre haplotipos en función de los sitios segregantes ó polimórficos (S). Organismos con reproducción clonal ó parcialmente clonal alcanzarán el “*plateau*” en el número de *loci* necesario para discriminar todos los haplotipos, con una baja proporción de polimorfismos. Por el contrario, para identificar todos los individuos cuando éstos sean de reproducción predominantemente sexual, requerirá un número de polimorfismos tendiente a S (Kamvar *et al.*, 2015). Las curvas de acumulación fueron realizadas con el paquete POPPR (Kamvar *et al.*, 2015), del entorno R. Cada *locus* polimórfico fue remuestreado aleatoriamente 1000 veces.

Se evaluaron los estimadores de variación nucleotídica: S, Eta, Pi, k y el D de Tajima (Tajima, 1989) para cada uno de los linajes. El valor de éste último (mayor, igual ó menor a 0) está basado en las diferencias entre el número de sitios segregantes (S) y el número promedio de diferencias nucleotídicas (Pi), y puede estar influenciado por procesos selectivos, y/ó por la historia poblacional. Así, fenómenos de crecimiento poblacional

arrojan valores negativos, del mismo modo que procesos de selección direccional ó “purificadora” (Tajima 1989). El análisis de la variación nucleotídica se realizó, como anteriormente, con el programa DNAsp v.6.10.01

Complementariamente se analizó la variación haplotípica para cada uno de los linajes. La cantidad de genotipos *multi-locus* observados (GML) es equivalente al índice de diversidad haplotípica (H; Nei 1987) y es función del tamaño muestral. Por lo tanto, para la comparación entre muestras de diferente tamaño, un estimador más efectivo es el número esperado de haplotipos *multi-locus* (eGML), que corrige los valores observados por rarefacción, basados en una muestra de tamaño  $\geq 10$  (Gotelli y Colwell, 2011). Tanto GML como eGML fueron estimados utilizando el programa POPPR, que estima además el índice de diversidad haplotípica de Simpson ( $\lambda$ ), dado que se comporta de modo lineal en relación con el tamaño muestral ( $\lambda$  es simplemente uno menos la suma de las frecuencias haplotípicas al cuadrado). Este estimador ofrece la probabilidad de que dos muestras tomadas al azar sean diferentes, desde 0 (todos los aislamientos son iguales) hasta 1 (todos los aislamientos son genéticamente diferentes).

La uniformidad haplotípica (“*evenness*”, también estimada por POPPR) es una medida de la distribución de los haplotipos en una unidad de muestreo: una población con frecuencias haplotípicas similares tendrá una uniformidad completa (tendiente a 1), y una dominada por un único haplotipo, será igual a 0. El índice utilizado para estimar la uniformidad es el E5 (Stoddart y Taylor, 1988) que es calculado como la relación entre los haplotipos más y menos abundantes dentro de cada muestra.

El análisis de la diversidad incluyó la evaluación de la estructura genética de los dos linajes prevalentes de la MPSS en Argentina y Brasil utilizando para ello el AMOVA, según fue implementado en el paquete *ade4* (Dray y Dufour, 2007) que corre bajo entorno R.

### **Análisis de la distribución específica**

Una vez establecidos los umbrales específicos para los diferentes linajes, se evaluó la distribución de las distintas especies que actúan como agentes causales de la MPSS, por países y provincias fitogeográficas. Las provincias fitogeográficas aquí incluidas se corresponden con las principales áreas productoras de soja, tanto en Argentina (Provincia Pampeana, Provincia Prepuneña, y Provincia del Monte, Cabrera, 1971), como en Brasil (Provincia Pampeana, Provincia del Cerrado, y Provincia de la Mata Atlántica, Morrone,

2001). El Estado de Arkansas (EEUU) forma parte del “*cornbelt*”, ó cinturón del maíz, correspondiente a la Provincia fitogeográfica de las Praderas (Brummitt, 2001).

La Provincia Prepuneña guarda estrecha relación con la Provincia del Monte, a la cual algunos autores (Morrone, 2001) tratan sólo como un distrito de ésta. Por lo tanto, a los efectos del presente análisis, se incluyó a la localidad de Las Lajitas (Salta) junto con la de San Miguel (Tucumán) dentro de la Provincia fitogeográfica del Monte. Por su parte, la Provincia Pampeana abarca la mitad sur del estado de Rio Grande do Sul (Brasil), la totalidad del territorio uruguayo y las provincias argentinas de Buenos Aires, La Pampa, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y Corrientes (Morrone, 2001).

La distribución de especies se resumió en una plantilla de trabajo Excel, al solo efecto de cuantificar los porcentajes de especies para cada provincia, región y país. Al no registrarse una distribución normal, no fue posible analizar la hipótesis de distribución heterogénea utilizando el análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó entonces como aproximación la prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952). Este es un test no paramétrico de una vía, cuya hipótesis nula es que las medianas de todas las particiones son iguales, y la hipótesis alternativa es que al menos una de las poblaciones presenta una mediana diferente del resto. El estadístico de la prueba (H) se basa en la suma de los rangos asignados a las observaciones dentro de cada tratamiento. La prueba de Kruskal-Wallis se llevó a cabo utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., <http://www.infostat.com.ar>). La significación de H se obtiene a través de la aproximación de la distribución del estadístico a la distribución Chi cuadrado.

# Resultados

## Análisis de congruencia

Las matrices de distancias derivadas de los 4 *loci* disponibles para el *dataset 1* mostraron un valor global del coeficiente de Kendall de  $W = 0,495$  ( $p < 0,01$ ). Esto indica congruencia significativa y parcial a nivel global; las comparaciones entre particiones individuales (Tabla A1, del Apéndice). Para el *dataset 2* el valor global fue de  $W = 0,703$  ( $p < 10^{-03}$ ); en la comparación de a pares sólo los *loci cal* y *cytb* resultaron incongruentes (Tabla A2). Para el *dataset 3*, el análisis produjo un valor global de  $W = 0,0052$  ( $p < 0,010$ ), lo que indicó congruencia significativa y parcial. Las comparaciones de a pares de *loci* muestran que las comparaciones de a pares resultaron congruentes en todos los casos (Tabla A3).

## Análisis de la variación genética.

Los electroferogramas y las secuencias nucleotídicas asociadas, presentaron muy baja frecuencia (<1%) de sitios ambiguos (Ns). Excepto ITS, los *loci* nucleares mostraron en general mayor variación que el *locus* mitocondrial *cytb*. Los estimadores de variación nucleotídica (S, Eta, Pi, k) indicaron al *locus cfp* como el más informativo y al ITS como el menos variable. Los dos estimadores de diversidad haplotípica (H, Hd) resultaron mayores en las matrices concatenadas que en los *loci* individuales (Tabla 5). Resultados similares se verificaron para el *dataset 2* (Tabla 6). Debido al bajo nivel de variación observado en el *locus* ITS, éste no fue incorporado al análisis de congruencia.

**Tabla 5.** Cuantificación de la variación nucleotídica y haplotípica para los *loci* individuales del *dataset 1*, y para la matriz multi-*locus* del *dataset 1*. El número de aislamientos incluidos fue de 153.

	<i>Locus</i>				<i>Dataset 1</i>
	<i>cfp</i>	<i>tub1</i>	<i>tub2</i>	<i>cytb</i>	
<b>Ns</b>	150	146	146	146	133
<b>S</b>	<b>237</b>	30	116	16	473
<b>Eta</b>	<b>280</b>	32	126	16	522
<b>Pi</b>	<b>0,08</b>	0,02	0,01	0	0,03
<b>k</b>	<b>68,59</b>	3,62	11,28	1,92	95,43
<b>H</b>	35	18	54	21	<b>83</b>
<b>Hd</b>	0,84	0,65	0,89	0,84	<b>0,95</b>

Ns, número de sitios ambiguos; S, número de sitios segregantes; Eta, número total de mutaciones; Pi, diversidad nucleotídica; k, promedio de diferencias nucleotídicas; H, número de haplotipos; Hd, diversidad haplotípica.

**Tabla 6.** Cuantificación de la variación nucleotídica y haplotípica para los *loci* individuales y para la matriz multi-*locus* del *dataset 2*. El número de aislamientos incluidos fue de 67.

	<b>Locus</b>								<b>Dataset 2</b>
	<i>act</i>	<i>cal</i>	<i>cytb</i>	<i>cfp</i>	ITS	<i>tef 1-α</i>	<i>tub 1</i>	<i>tub 2</i>	
<b>S</b>	24	47	18	<b>215</b>	4	22	30	92	448
<b>Eta</b>	27	50	18	<b>245</b>	4	23	32	100	494
<b>Pi</b>	0,02	0,04	0	<b>0,08</b>	0	0,01	0,02	0,01	0,03
<b>k</b>	2,75	9,9	1,88	<b>64,35</b>	0,99	2,96	4,3	12,61	96,09
<b>H</b>	17	18	17	28	6	10	17	42	<b>67</b>
<b>Hd</b>	0,67	0,86	0,85	0,93	0,71	0,57	0,73	0,97	<b>1</b>

S, número de sitios segregantes; Eta, número total de mutaciones; Pi, diversidad nucleotídica; k, promedio de diferencias nucleotídicas; H, número de haplotipos; Hd, diversidad haplotípica.

## **Análisis de redes**

**Dataset 1.** Las topologías reticulares para los *loci* independientes evidenciaron distintos grados de complejidad. Todas ellas mostraron altos valores de ajuste de los datos (> 98%). Los 3 *loci* nucleares definieron 4 grupos (se muestran en colores en las Figuras A1-A3 del Apéndice). El *locus cytb* produjo una topología muy simple, producto de su bajo nivel de polimorfismo (Figura A4).

La topología reticulada derivada de la matriz *multi-locus* (concatenada) del *dataset 1* (**Figura 3**) muestra 4 grupos similares a los obtenidos con el *locus cfp*: un grupo enteramente compuesto por muestras de origen norteamericano (rojo), otro constituido por muestras brasileñas (aislamientos Ck\_639, Ck\_646, Ck\_654, Ck\_666, Ck\_A110, Ck\_A118, Ck\_A122) asociadas a un aislamiento *C. sojina* (grupo naranja). Aparecen otros dos grupos (verde y azul) compuestos ambos por aislamientos brasileños y argentinos; el aislamiento argentino 63A2 se ubicó en una posición intermedia entre los grupos azul y verde. El apoyo interno de *bootstrap* para las ramas mayores fue del 100%. Por su parte, el análisis de homoplasia de a pares (PHI) para el *dataset 1* (382 sitios informativos) arroja una probabilidad altamente significativa de la presencia de recombinación (ó intercambio horizontal,  $\Phi_w = 1.968 \times 10^{-6}$ ;  $p < 0,0005$ , **Tabla 7**).

**Tabla 7.** Análisis de redes por *NeighborNet*, se indica el número de aislamientos -representados por secuencias- (N) y el valor de significación para el estadístico de PHI ( $p_{\Phi_w}$ ) para cada uno de los *loci* y para la matriz *multi-locus* del *dataset 1*.

	<i>Locus</i>				<i>Dataset 1</i>
	<i>cfp</i>	<i>tub1</i>	<i>tub2</i>	<i>Cytb</i>	
<b>N</b>	150	146	146	146	133
<b><math>p_{\Phi w}</math></b>	0,00	0,96	0,0004	0,346	0,00



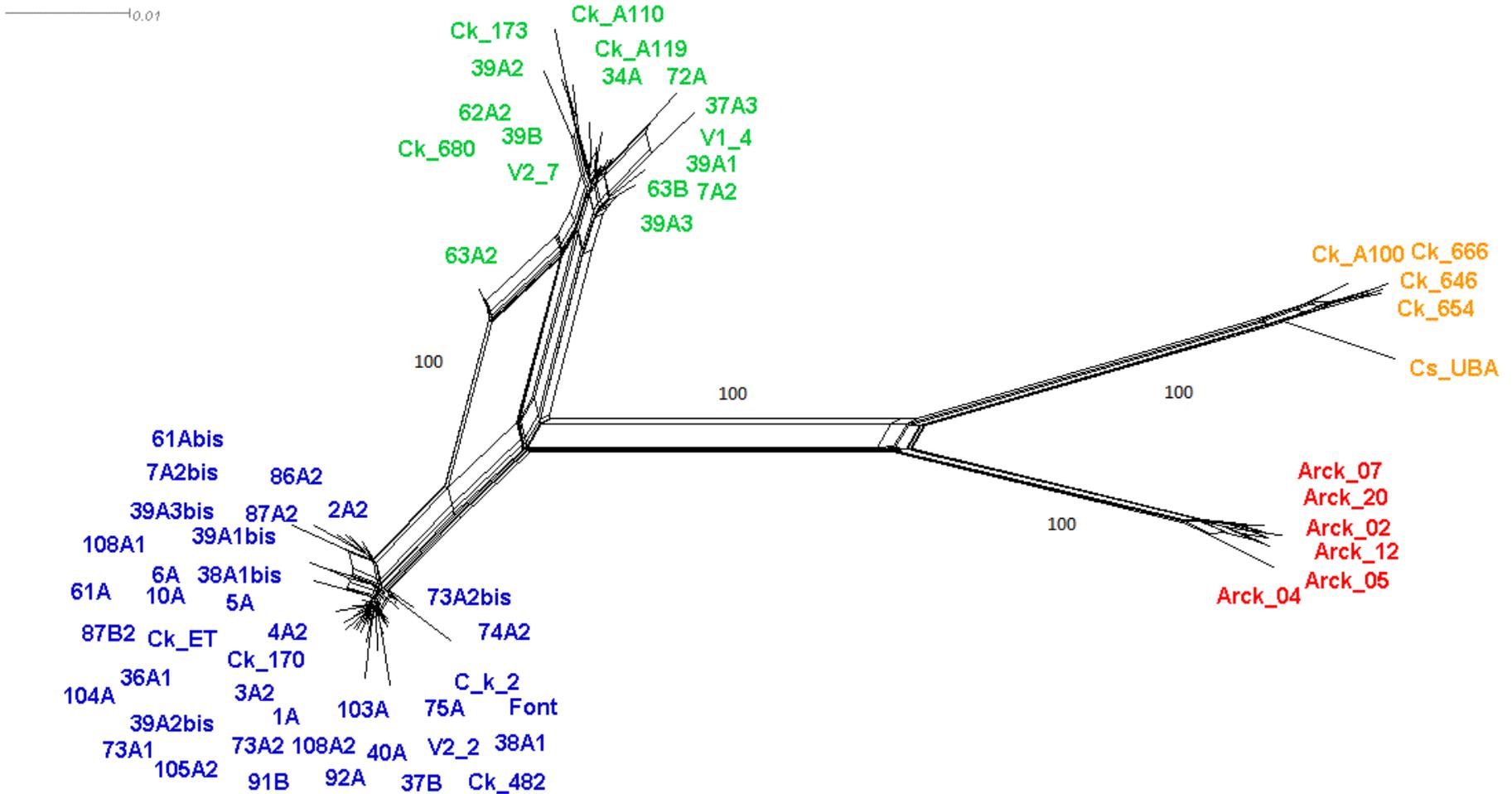
**Dataset 2.** La topología derivada recupera los 4 grupos obtenidos con el *dataset 1* (**Figura 4**). Los valores de soporte de las ramas más largas también alcanzaron el 100%. Se observa también aquí la posición intermedia del aislamiento 63A2. Las topologías reticulares para los *loci* nucleares evidenciaron nuevamente distintos grados de complejidad (Figuras A5-A12) y tendieron a recuperar los mismos grupos que la matriz concatenada; el *locus* nuclear *tef1- $\alpha$*  presentó una estructura cuasi-arborescente (Figura A10). El *locus* ITS, que como se indicó más arriba mostró un nivel de polimorfismo notablemente bajo, arrojó agrupamientos que no resultaron coherentes con los recuperados para los demás *loci* (Figura A9). Todas las topologías mostraron altos valores de ajuste de las topologías a las matrices de distancia respectivas (> 95%). El resultado del test de PHI sugiere la presencia de recombinación para los *loci* *cfp*, *tub2* y la matriz concatenada (**Tabla 8**). En cambio, pese al alto nivel de reticulación evidenciado en *act* (Figura A5), el test de PHI no encontró suficientes datos informativos para su estimación en los 121 pb. Luego, el PHI resultó por su parte sólo marginalmente significativo para la posible existencia de eventos de recombinación en el *locus cal*.

**Tabla 8.** Análisis de redes por *NeighborNet*. Se indica el número de secuencias (N) y el valor de significación para el estadístico de PHI ( $p_{\Phi_w}$ ) para cada uno de los loci y para la matriz *multi-locus* del *dataset 2*. En todos los casos el número de terminales (secuencias) fue 67.

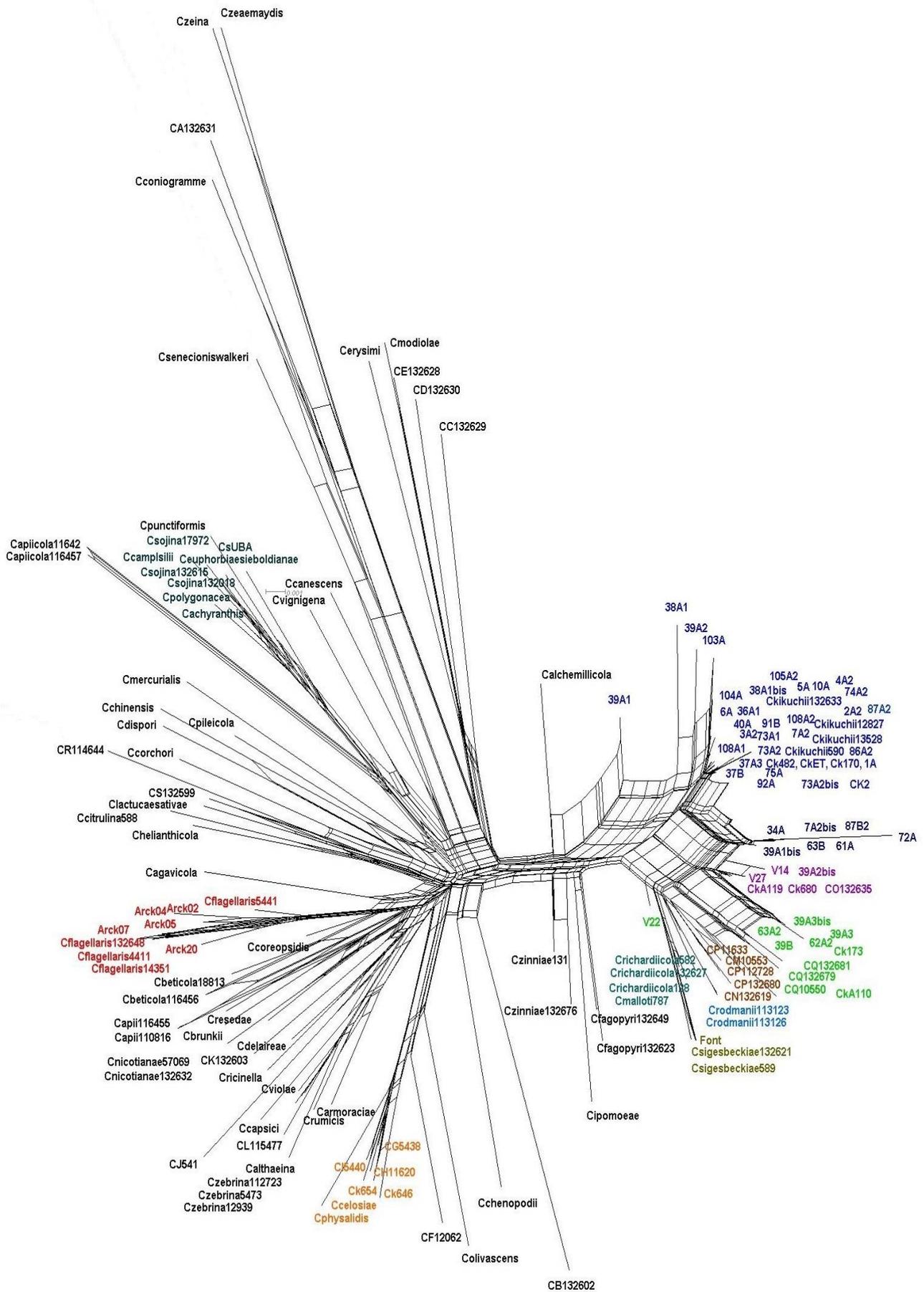
	<b>Locus</b>								<b>Dataset 2</b>
	<b>Act</b>	<b>cal</b>	<b>cytb</b>	<b>Cfp</b>	<b>tef 1-<math>\alpha</math></b>	<b>tub 1</b>	<b>tub 2</b>	<b>ITS</b>	
<b><math>p_{\Phi_w}</math></b>	ND	0,06	0,65	0	0,11	0,92	0,086	1	$3.59 \times 10^{-3}$

ND: No disponible

**Dataset 3.** Sólo se analizó en este caso la matriz *multi-locus*. La topología resultante aparece fuertemente reticulada, indicando un alto nivel de conflicto entre caracteres. El valor de significación para el test PHI ( $p_{\Phi_w} = 1,26 \times 10^{-13}$ ) sugiere que el conflicto de caracteres dentro del *dataset 3* podría ser explicado al menos en parte por la ocurrencia de eventos de intercambio horizontal entre diferentes linajes ó especies (**Figura 5**). Análogamente, el aislamiento Font agrupó junto con aislamientos previamente identificados como pertenecientes a *C. cf.* Coincidente con la complejidad de la topología, el soporte interno (*bootstrap*) resultó en muchos casos bajo (< 60%).



**Figura 4.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* basada en la matriz de distancias no corregidas del *dataset 2* (3351 bp, 67 terminales). Se indican los valores de *bootstrap* que soportan cada uno de los grupos principales. Los largos de ramas son proporcionales al número de sustituciones de cada rama. La barra de escala está expresada en unidades de distancia genética. FIT: 97,92

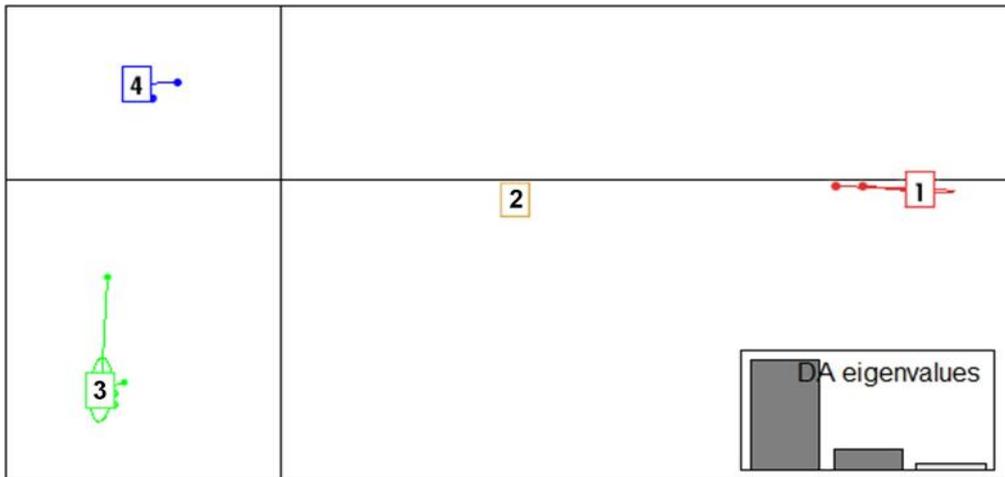


**Figura 5.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el *dataset 3*. Solo las ramas más largas mostraron valores de soporte > 0,7 y por claridad no se indican. Los largos de ramas son proporcionales al número de sustituciones de cada rama. La barra de escala está expresada en unidades de distancia genética. FIT: 96,51.

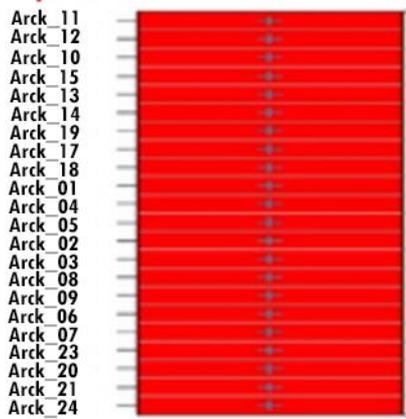
## **Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC)**

Como se mencionó, este análisis se realizó exclusivamente sobre las matrices concatenadas de *loci* congruentes. Para los *datasets 1* y *2* el número de grupos óptimo fue  $K=4$ , coincidiendo con lo observado en el análisis de *NeighborNet*. Todos los aislamientos recibieron una asignación a grupo con probabilidad 100%, coincidente con los grupos del análisis de redes también a nivel individual. Los agrupamientos del *dataset 1* fueron diferenciados con las dos primeras funciones discriminantes (**Figura 6**). Para el *dataset 2* se observó superposición parcial entre los grupos 2 y 4 cuando se graficaron las dos primeras funciones discriminantes. Esta superposición se resolvió en la representación tridimensional (tres funciones discriminantes principales, **Figura 7**).

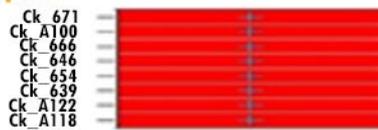
Para el *dataset 3*, el DAPC arrojó seis grupos principales ( $k=6$ ). La superposición entre los grupos genéticos se resuelve en este caso utilizando las funciones discriminantes 1 y 2, y las funciones 1 y 3. Un 95% de los aislamientos fue asignado con una probabilidad  $p=1,00$  a cada grupo genético; sin embargo, esa asignación no coincidió con los grupos obtenidos en el análisis de redes.



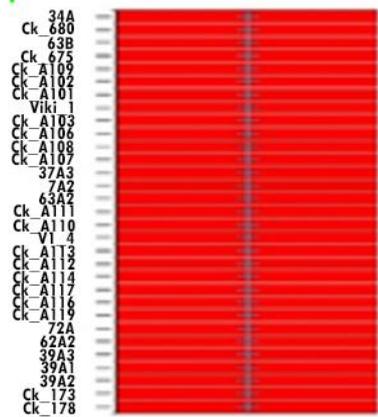
**Grupo 1**



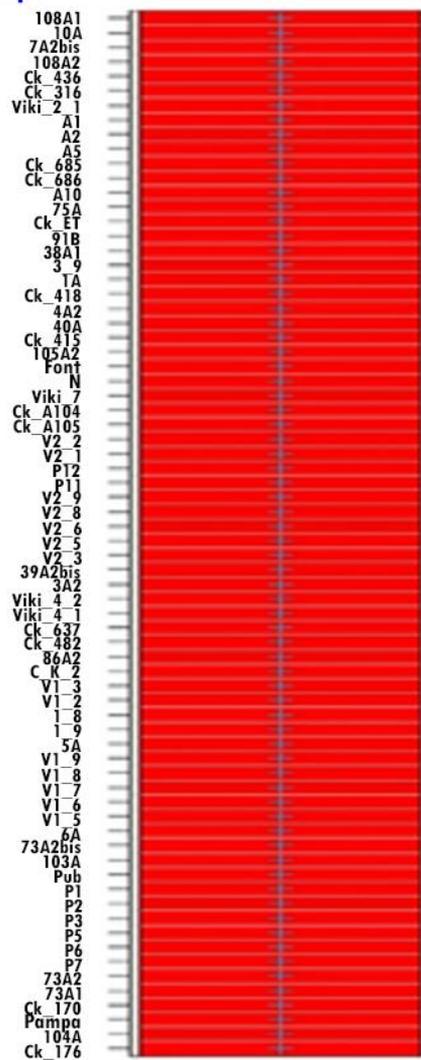
**Grupo 2**



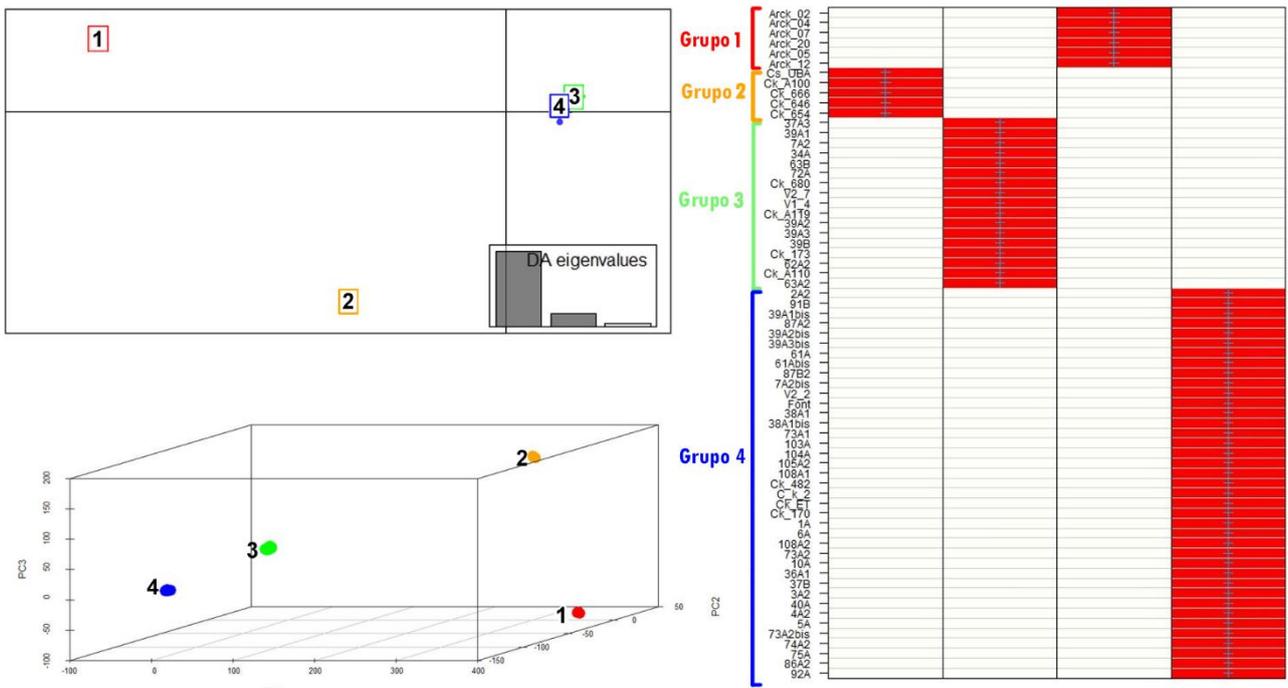
**Grupo 3**



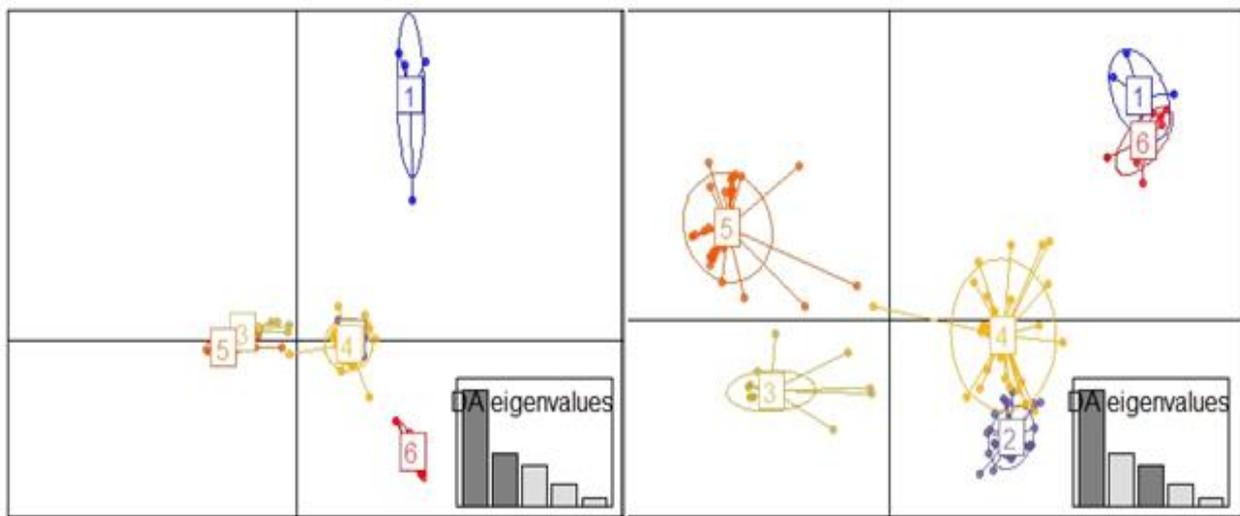
**Grupo 4**



**Figura 6.** Representación gráfica (*scatterplot*) bidimensional de los agrupamientos genéticos para el *dataset* 1. Debido a que la desviación de las coordenadas de cada aislamiento individual es mínima respecto al centroide de cada grupo, no es posible representarlos separadamente y sólo se logra observar el “centro de gravedad” de la distribución grupal. Los colores empleados para los grupos se corresponden a los usados en el *NeighborNet*. La asignación de cada haplotipo a un grupo determinado con  $p=1,00$  se refleja como una celda de color rojo.



**Figura 7.** Representación gráfica bi y tridimensional (tres primeras funciones discriminantes) para la separación entre grupos genéticos del *dataset 2*, y las correspondientes asignaciones para cada aislamiento. La asignación de cada haplotipo a un grupo determinado con  $p=1,00$  se refleja como una celda de color rojo.

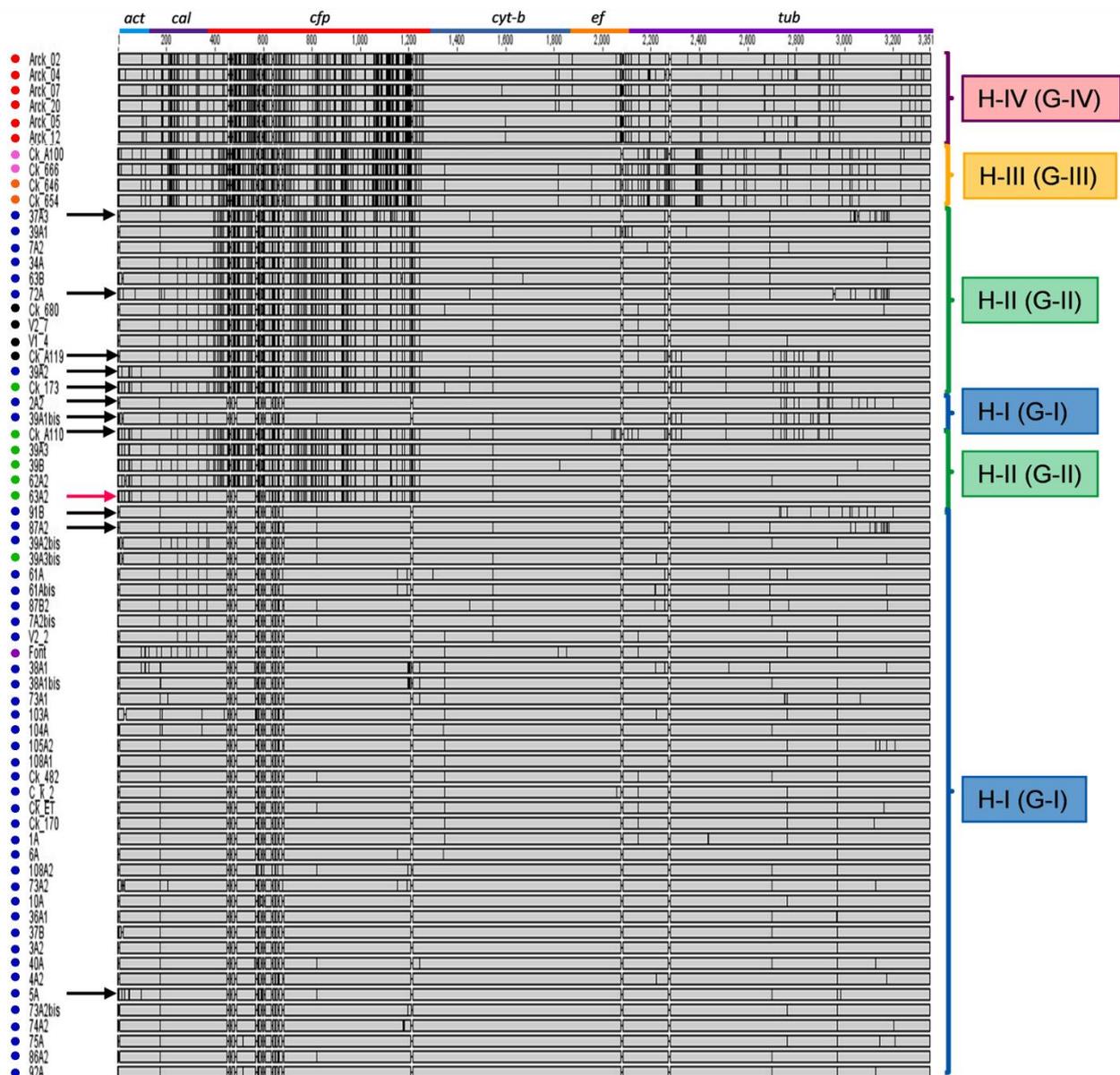


**Figura 8.** Representación gráfica bidimensional (funciones discriminantes 1 y 2) mostrando la separación entre grupos genéticos para el *dataset 3* (panel de la izquierda); los grupos 2 y 4 se encuentran superpuestos. Panel de la derecha: gráfico de las funciones discriminantes 1 y 3.

## Haplotipos gráficos

Los haplotipos gráficos obtenidos para el *dataset 2* evidenciaron una clara diferenciación en cuatro haplogrupos, denominados H-I a H-IV en la **Figura 9**, concordante con los

cuatro grupos definidos a partir de los análisis de redes y agrupamiento. En esta representación se detectaron 12 haplotipos posiblemente recombinantes, originados por intercambios inter-*loci*. Esto se visualiza (**Figura 9**) al observar los patrones mixtos de los haplotipos, que manifiestan segmentos de diferentes haplogrupos (particularmente verde y azul) en diferentes loci: Ck\_A119, 37A3, 39A1bis, 39A2, Ck\_173, 2A2, Ck\_A110, 91B, 87A2, 72A, 5A y 37A2. El aislamiento 63A2, por su parte, se visualizó como un posible recombinante intra-*locus* de *cfp*. Esto coincide con su localización intermedia en las topologías de redes.



**Figura 9.** Representación gráfica de la variación genética presente en los haplotipos presentes en el *dataset 2*, mostrando los cuatro haplogrupos (H-I a H-IV) y recombinantes putativos inter-*loci* (flechas negras) e intra-*locus* (flecha roja). Entre parentesis se indican los grupos genéticos delimitados por DAPC (G-1 a G-4).

## **Análisis de Recombinación**

El análisis X-OVER detectó 9 haplotipos de posible origen recombinante para el *dataset 1*, y 19 para el *dataset 2*. El re-análisis de cada evento particular permitió validar sólo 12 recombinantes: 1 para el *dataset 1* (aislamiento Ck\_A103) y 11 del *dataset 2* (**Tabla 9**).

Nueve recombinantes (37A3, 72A, 39A1, 7A2, 39B, 63B, 62A2, 63A2, 39A1bis) fueron validados por al menos 7 *tests* independientes. Los parentales más probables serían 6 haplotipos de *C. aff. kikuchii* (grupo azul/ 4) y *Cercospora* sp. Q (grupo verde/ 3) (**Tabla 9**). Los recombinantes 91B, y 2A2 fueron validados sólo por 4 *tests*. Éstos derivarían de haplotipos parentales pertenecientes a *C. aff. kikuchii* y *Cercospora* sp. H (grupo naranja/ 2). Finalmente, el único haplotipo recombinante del *dataset 1* (Ck\_A103) tendría como parentales putativos un aislamiento de *Cercospora* sp. Q y otro de *Cercospora* sp. H.

El intercambio horizontal intra-*locus* fue confirmado para el haplotipo 63A2, cuyos parentales putativos pertenecerían a *C. aff. kikuchii* y *Cercospora* sp. Q. Los valores de significación de los diferentes *tests* fueron en todos los casos altamente significativos (**Tabla 9**). Otros eventos intra-*locus* (en particular en la región *tub2*) permanecen como recombinantes putativos (cabe citar en particular al aislamiento Arck\_22). No se detectaron eventos de recombinación dentro de los *loci act, cal, tef1- $\alpha$ , tub1* y *cytb*.

El presente análisis no logró detectar eventos de recombinación entre aislamientos pertenecientes al mismo grupo genético.

**Tabla 9.** Resumen del análisis para los haplotipos validados como recombinantes. Los valores de p para todos los *tests* son los obtenidos sobre el *dataset* 2, excepto para el aislamiento Ck\_A103 que deriva del *dataset* 1. En *itálicas* se indican los valores de probabilidad mayores a los umbrales ( $p < 1,9 \times 10^{-4}$ ) establecidos para la validación.

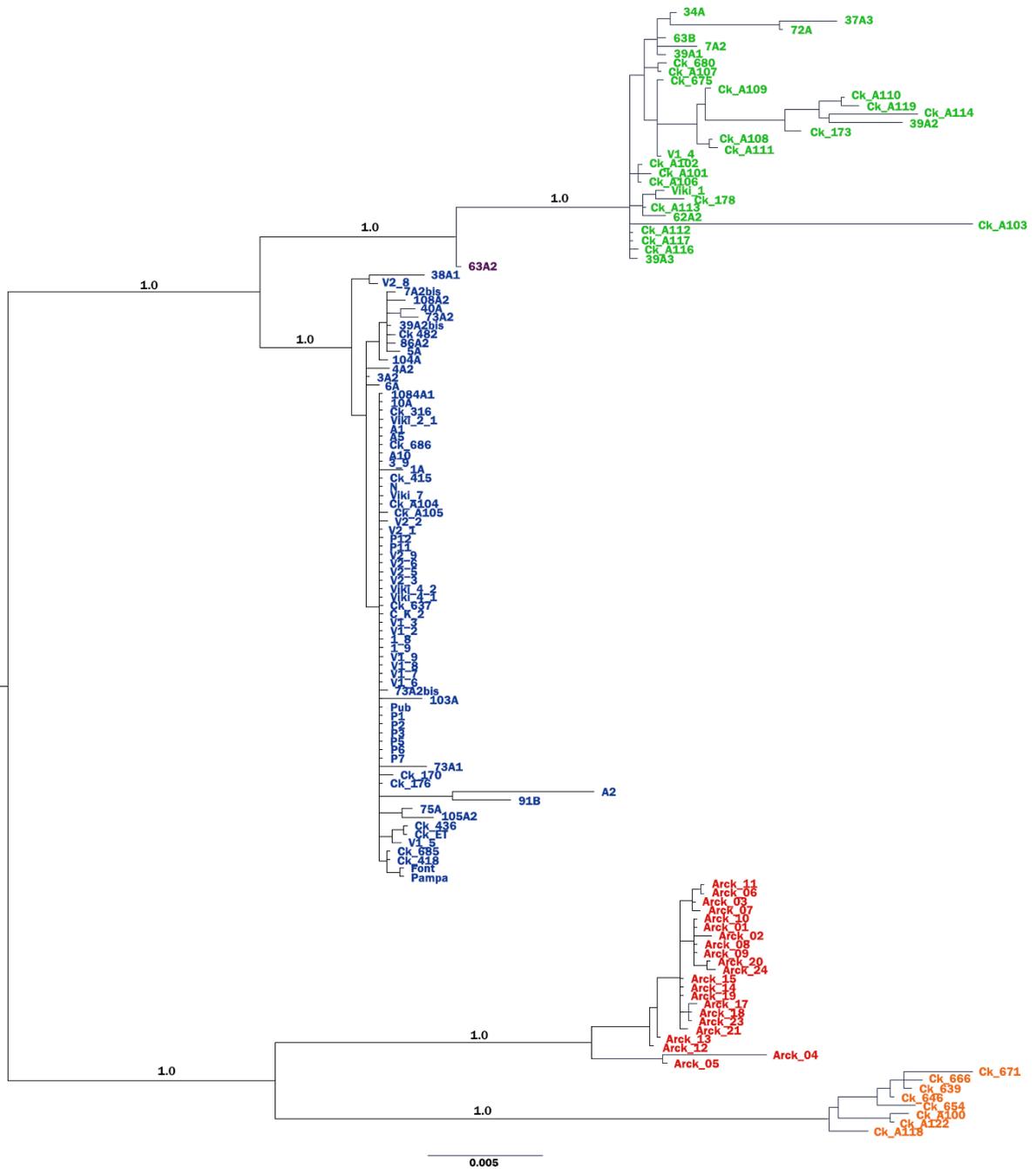
Tests de recombinación		Haplotipos recombinantes										
		37A3	72A	39A1	7A2	39B	63B	62A2	63A2	39A1bis	Ck_A103	91B
RDP	Valor p promedio	1,89 x 10 <sup>-10</sup>			4,05 x 10 <sup>-11</sup>			4,91 x 10 <sup>-12</sup>	7,99 x 10 <sup>-15</sup>	2,14 x 10 <sup>-25</sup>	1,95 x 10 <sup>-10</sup>	
GENECONV		4,82 x 10 <sup>-09</sup>			4,59 x 10 <sup>-10</sup>			4,48 x 10 <sup>-09</sup>	1,60 x 10 <sup>-13</sup>	9,51 x 10 <sup>-15</sup>	6,74 x 10 <sup>-12</sup>	
BootScan		1,76 x 10 <sup>-03</sup>			---			8,37 x 10 <sup>-04</sup>	---	2,58 x 10 <sup>-19</sup>	---	
MaxChi		1,49 x 10 <sup>-08</sup>			1,56 x 10 <sup>-06</sup>			1,06 x 10 <sup>-11</sup>	1,49 x 10 <sup>-07</sup>	3,67 x 10 <sup>-10</sup>	4,15 x 10 <sup>-04</sup>	
Chimaera		7,85 x 10 <sup>-08</sup>			4,86 x 10 <sup>-07</sup>			6,45 x 10 <sup>-12</sup>	1,39 x 10 <sup>-07</sup>	---	1,35 x 10 <sup>-04</sup>	
SiScan		3,03 x 10 <sup>-07</sup>			2,12 x 10 <sup>-08</sup>			1,25 x 10 <sup>-13</sup>	1,95 x 10 <sup>-07</sup>	1,21 x 10 <sup>-27</sup>	1,33 x 10 <sup>-07</sup>	
3Seq		2,43 x 10 <sup>-16</sup>			4,08 x 10 <sup>-16</sup>			1,17 x 10 <sup>-18</sup>	1,01 x 10 <sup>-19</sup>	1,63 x 10 <sup>-40</sup>	9,48 x 10 <sup>-09</sup>	
Parental putativo I *	<b><i>Cercospora</i> sp. Q (39A2)</b>			<b><i>Cercospora</i> sp. Q (CK_A110)</b>			<b><i>C. aff. kikuchii</i> (5A)</b>	<b><i>C. aff. kikuchii</i> (91B)</b>	<b><i>Cercospora</i> sp. H (CK_639)</b>	<b><i>C. aff. kikuchii</i> (87A2)</b>		
Parental putativo II *	<b><i>C. aff. kikuchii</i> (87A2)</b>			<b><i>C. aff. kikuchii</i> (31Abis)</b>			<b><i>Cercospora</i> sp. Q (39A2)</b>	<b><i>Cercospora</i> sp. Q (39A2)</b>	<b><i>Cercospora</i> sp. Q (39A2)</b>	<b><i>Cercospora</i> sp. H (CK_666)</b>		

\*, similitud  $\geq 99\%$

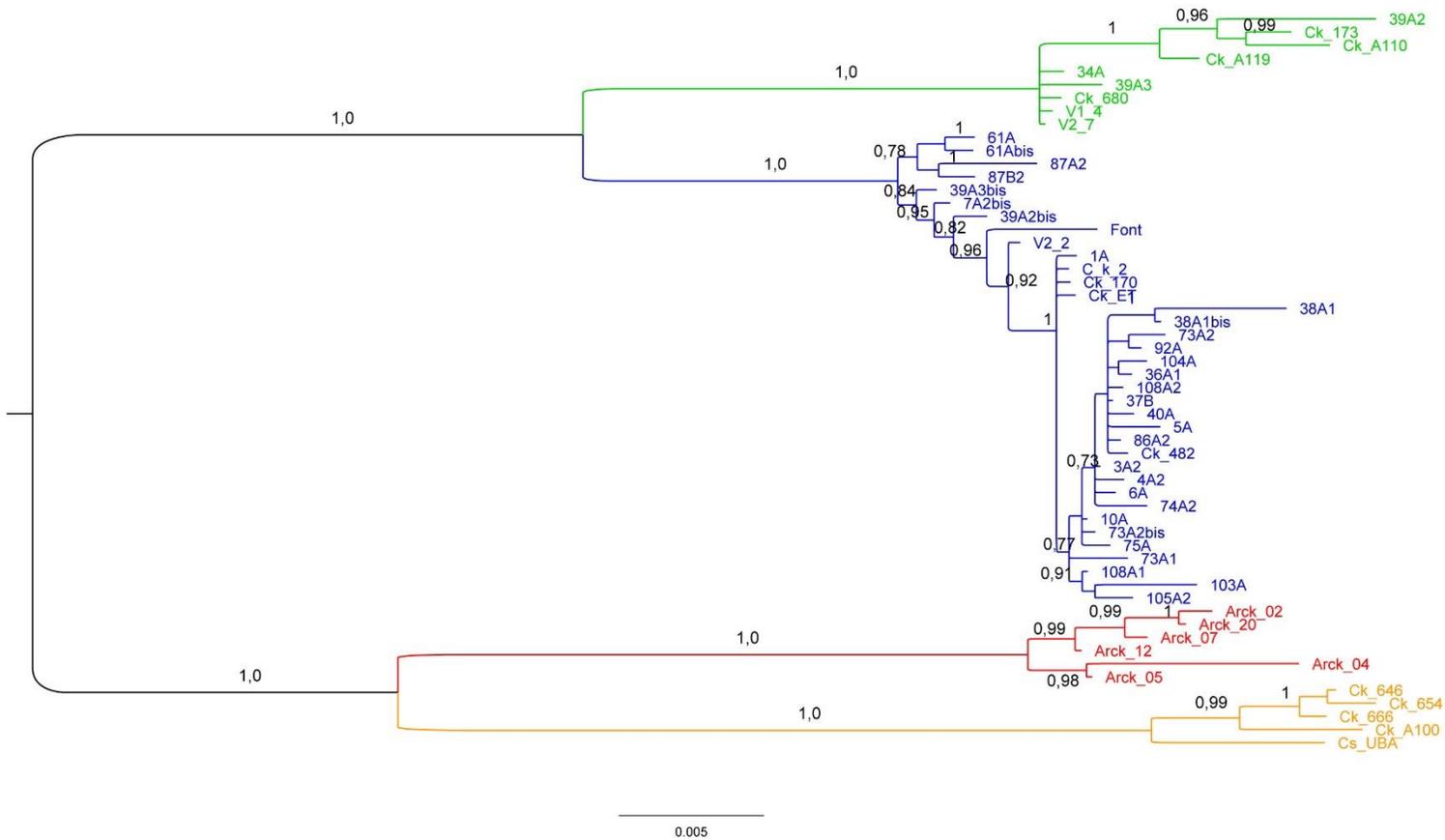
## Análisis filogenético

La topología resultante del análisis filogenético bayesiano para el *dataset* 1 arrojó nuevamente cuatro grupos principales, fuertemente apoyados (pp=1.0; **Figura 10**). Los clados obtenidos en este análisis concuerdan con los grupos delimitados en los análisis de *NeighborNet* y DAPC. Uno de ellos, indicado en verde (correspondiente al grupo genético 3) incluyó 30 aislamientos argentinos y brasileños; el clado señalado en azul (correspondiente al grupo genético 4) está compuesto por 69 aislamientos también argentinos y brasileños, más el ejemplar tipo de *C. kikuchii* (Ck\_ET). Las 22 muestras norteamericanas conforman el clado rojo (correspondiente al grupo genético 1). Los 8 aislamientos exclusivamente brasileños constituyen el clado naranja (correspondiente al grupo genético 2). Es interesante resaltar la posición del aislamiento 63A2, que (igual que en el AED) aparece intermedio entre los clados verde (G-3) y azul (G-4).

El análisis bayesiano para el *dataset* 2 (**Figura 11**) se realizó excluyendo los haplotipos recombinantes, e incluyendo al aislamiento de *C. sojina* (como se mencionó anteriormente, el agente causal de la Mancha Ojo de Rana, MOR). Se obtuvieron cuatro clados filogenéticamente diferentes (pp=1.0). Los aislamientos brasileños Ck\_A100, Ck\_666, Ck\_654 y Ck\_646, formaron un clado (pp=1.0) que resultó grupo hermano del aislamiento argentino de *C. sojina* (CsUBA; pp=0.99). Esos haplotipos también se ubicaron en el clado naranja del *dataset* 1. Este clado, a su vez, resultó grupo hermano del conformado por las muestras norteamericanas (clado rojo). En otra rama se volvieron a observar dos clados hermanos, cada uno bien apoyado (pp=1.0). El clado más numeroso contiene nuevamente al tipo de *Cercospora kikuchii*, junto con 36 aislamientos de argentinos y dos brasileños. Dentro del otro clado, los aislamientos brasileños Ck\_173 y Ck\_A110 y Ck\_A119, junto con el aislamiento argentino 39A2 formaron subclado (pp=0.98). Otros aislamientos de Argentina y Brasil (94A, 39A3, V1\_4, V2\_7, Ck\_680) del mismo clado, aparecen formando una politomía.



**Figura 10.** Árbol consenso de mayoría derivado del análisis bayesiano de los aislamientos de *Cercospora* (dataset 1). Los largos de rama están diagramados a escala. Las ramas principales están completamente apoyadas (probabilidad posterior =1,00). Los colores de los clados hacen referencia a los grupos obtenidos en el AED y DAPC (azul: G-4, verde: G-3, naranja: G-2, rojo: G-1). La topología se encuentra enraizada en el punto medio.

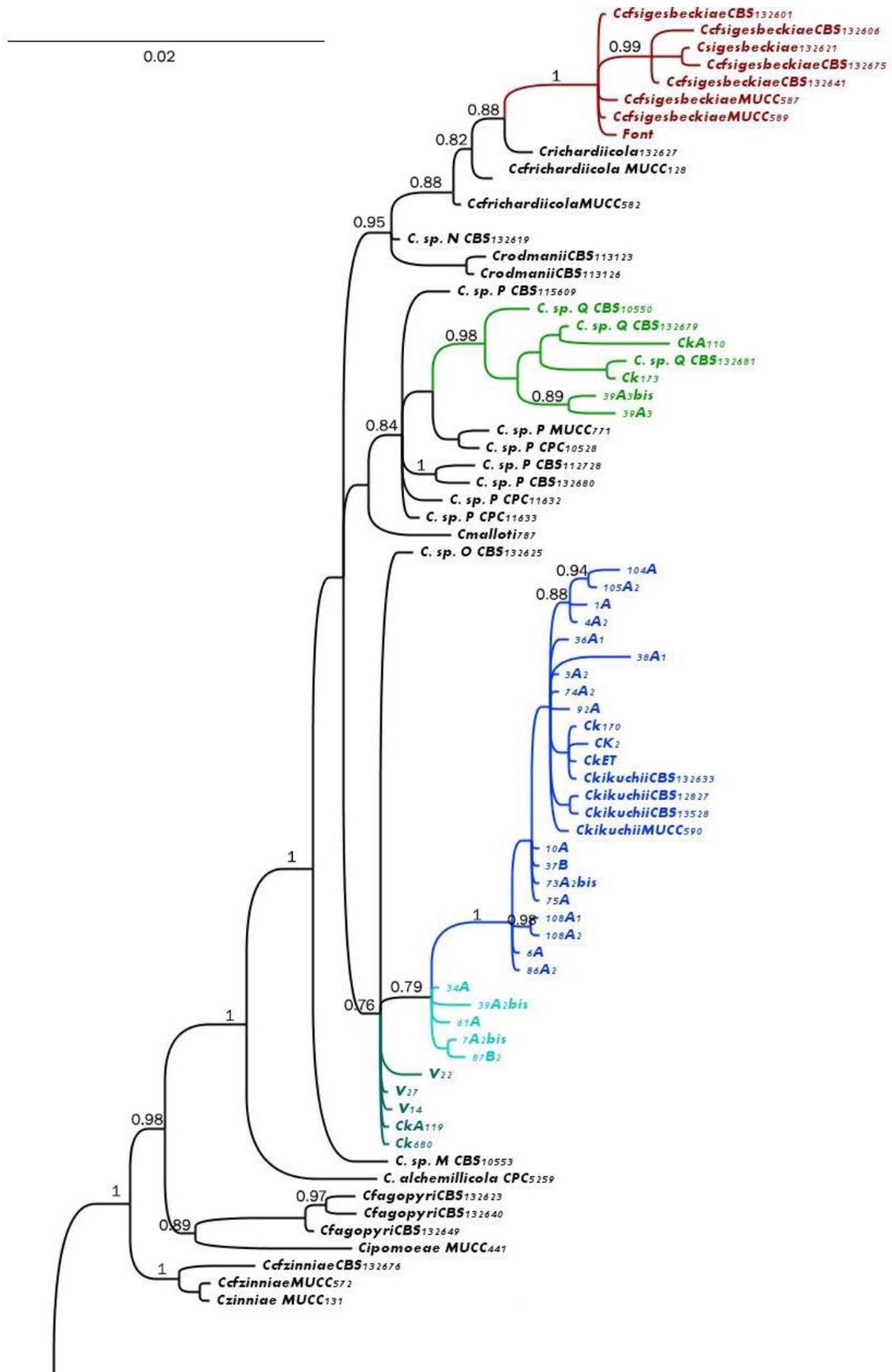


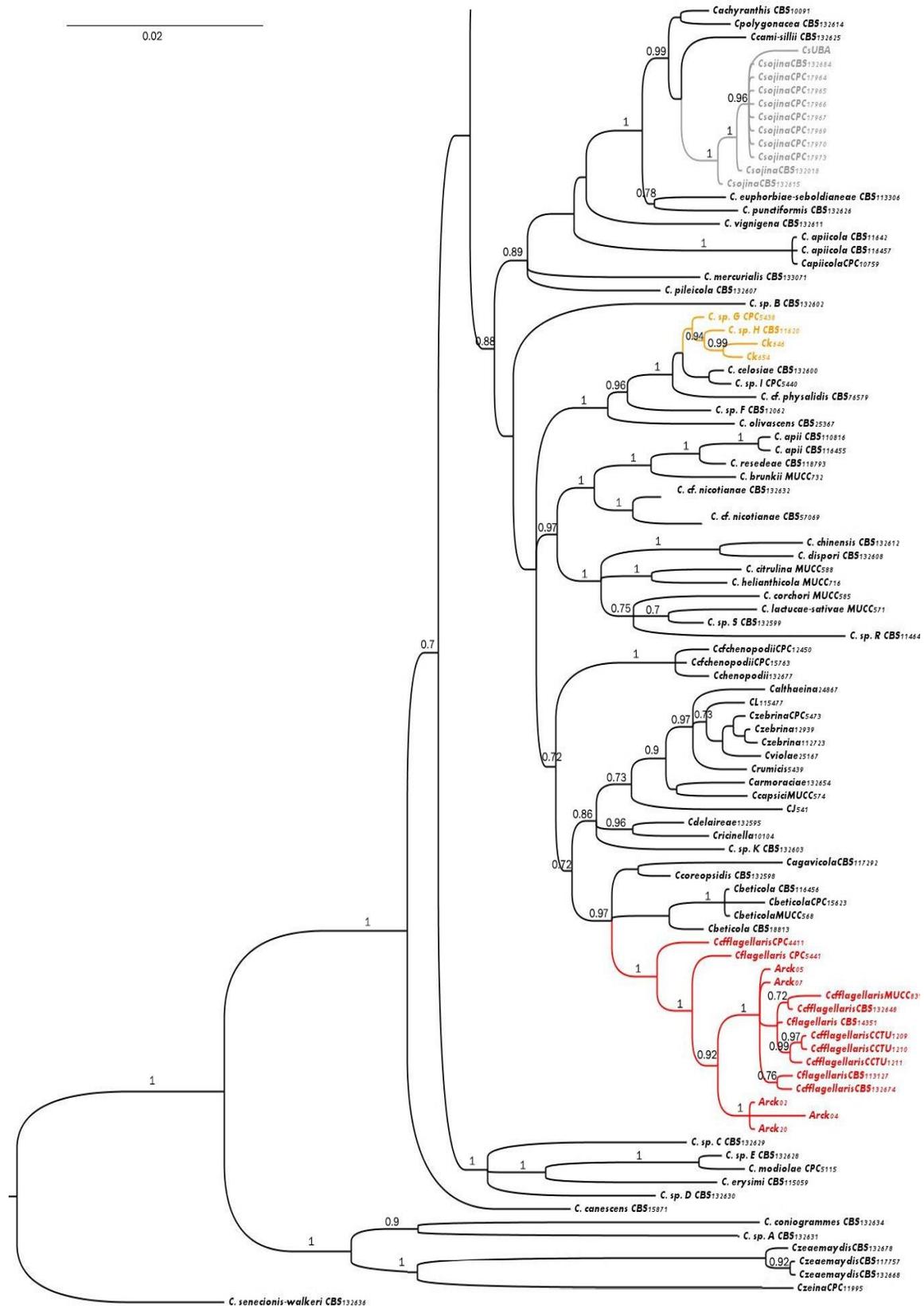
**Figura 11.** Árbol consenso de mayoría derivado del análisis bayesiano de los aislamientos *Cercospora* (dataset 2). Los largos de rama están diagramados a escala. Las ramas principales están completamente apoyadas (probabilidad posterior =1,00). Los colores de los clados hacen referencia a los grupos obtenidos en el AED y DAPC (azul: G-4, verde: G-3, naranja: G-2, rojo: G-1). La topología se encuentra enraizada en el punto medio.

La topología bayesiana derivada del *dataset* 3 (**Figura 12**) muestra que existe una clara diferencia en la distribución de las muestras asignadas a *C. sojina* y las que actúan como agentes causales de la MPSS: mientras las primeras se agrupan en un único clado (pp=1.0), los aislamientos asociados a la MPSS aparecen dispersos en la genealogía.

De entre los aislamientos etiológicamente responsables por síntomas de MPSS, las muestras de EEUU conformaron un clado único, confirmando el agrupamiento previamente detectado, junto con otros identificados como *C. cf. flagellaris* (pp=1,00). Los aislamientos brasileños Ck\_646 y Ck\_654 (pp=0.99) resultaron un grupo hermano de *Cercospora* sp. *H* (pp=0.99). Los aislamientos brasileños Ck\_A110 y Ck\_173 y dos de origen argentino (39A3bis, 39A3) formaron un clado junto a representantes de *Cercospora* sp. *Q* (pp= 0,98). Este clado resultó a su vez hermano de aislamientos de *Cercospora* sp. *P*. El aislamiento "Font", por su parte, agrupó (igual que en *NeighborNet*) con otros aislamientos de *C. cf. sigesbeckiae* (pp=1).

Los aislamientos V22, V27, V14 (argentinos), Ck\_680 y Ck\_A119 (brasileños) formaron una politomía en la que está incluido el único aislamiento disponible de *Cercospora* sp. *O*. Dentro de esa politomía se ubica también un grupo de aislamientos que conformaron un sub-clado que incluyó aislamientos argentinos, brasileños y el tipo de *C. kikuchii*, más otros 4 representantes de la misma especie previamente identificados por otros autores (pp=0.79).





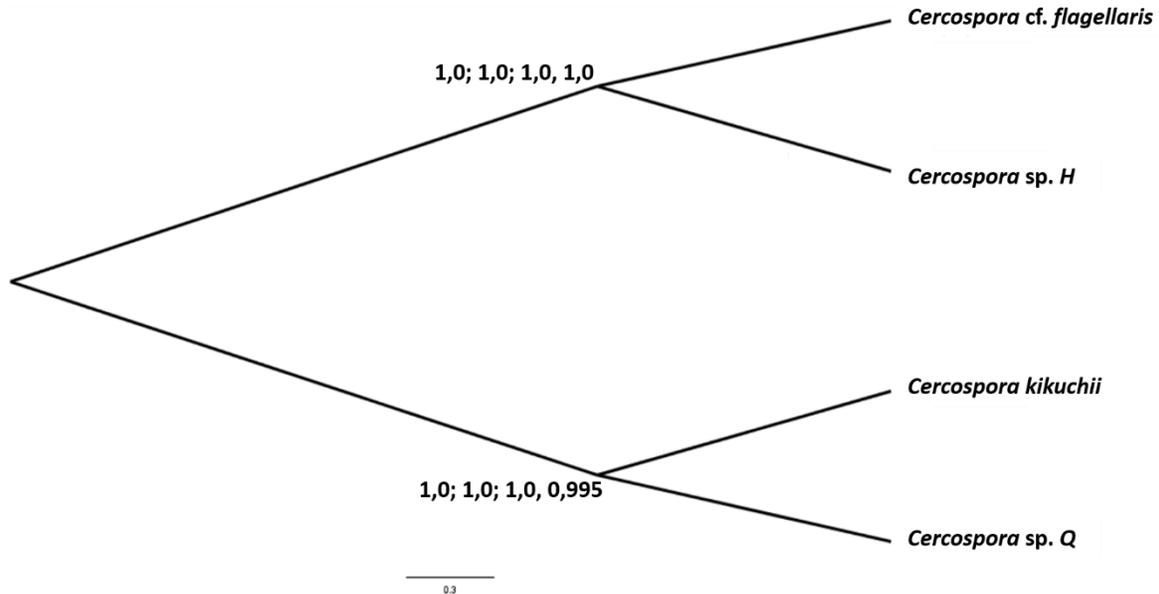
**Figura 12.** Árbol consenso de mayoría para la inferencia filogenética bayesiana de los aislamientos de MPSS y diferentes especies de *Cercospora* (*dataset 3*, 1450 sitios, 158 terminales). La longitud de las ramas está diagramada a escala. Los colores de las ramas refieren a los aislamientos que producen MPSS y especies identificadas asociadas: *C. kikuchii* y *C. aff. kikuchii* (azul); *C. cf. flagellaris* (rojo); *C. cf. sigesbeckiae* (púrpura); *C. sojina* (gris); *Cercospora* sp. Q (verde); *Cercospora* sp. H (naranja); *Cercospora* sp. (celeste). Los números sobre las ramas corresponden a probabilidades posteriores superiores a 0,7.

## Delimitación específica bayesiana

Tomando en consideración la frecuencia de intercambio horizontal entre linajes, el análisis subsiguiente tiene por objeto intentar esclarecer los límites específicos entre los linajes que actúan como agentes causales de la MPSS. Se utilizó el *dataset 2* incluyendo los aislamientos recombinantes y excluyendo del análisis al aislamiento Font, debido a que es el único representante de *C. cf. sigesbeckiae* detectado hasta el momento, ya que no se dispone de información para la mayoría de los *loci* incluidos. Por este motivo tampoco pudieron ser incluidos ejemplares tipo de otras especies (p.ej., *Cercospora* sp. G, *Cercospora* sp. H, *Cercospora* sp. O, *Cercospora* sp. P, *Cercospora* sp. Q, etc). La asignación específica para los aislamientos se realizó en base a los resultados obtenidos previamente para los *datasets 1, 2 y 3*.

Los resultados muestran que la probabilidad *a posteriori* de la existencia de cuatro especies (es decir, *Cercospora* sp. H, *C. cf. flagellaris*, *C. kikuchii* y *Cercospora* sp. Q) dentro del *dataset 2* es  $\geq 99,5\%$ , cualquiera sea el escenario propuesto *a priori* (**Tabla 10, Figura 13**).

Por otra parte, surge del análisis que para 3 de los 4 escenarios propuestos *a priori* la topología con mayor probabilidad *a posteriori* coincide con la del árbol guía (**Tabla 10**). Sin embargo, para el escenario de un pequeño tamaño efectivo de la raíz y tiempos de divergencia antiguos, la topología más probable (pp= 0,414) contradice parcialmente la topología del análisis filogenético (Tabla 9).



**Figura 12.** Delimitación bayesiana multi-locus. Para la topología con mayor pp, se muestran en los nodos respectivos las probabilidades posterior de especiación según cada escenario *a priori*, de izquierda a derecha [ $\theta \sim G(1, 10)$  y  $\tau_0 \sim G(1, 10)$ ;  $\theta \sim G(2, 2000)$  y  $\tau_0 \sim G(1, 10)$ ;  $\theta \sim G(1, 10)$  y  $\tau_0 \sim G(2, 2000)$  y  $\theta \sim G(2, 2000)$  y  $\tau_0 \sim G(2, 2000)$ ].

**Tabla 10.** Lista de modelos más probables según escenarios *a priori*.

Escenarios <i>a priori</i>	PP	N	Especies	Topología
$\theta \text{ G (1, 10)}$ $\tau_0 \text{ G (1, 10)}$	0,9624	4	CaffK CspQ CcfF CspH	<b>((CcfF, CspH), (CaffK, CspQ));</b>
	0,0247			(CcfF, (CspH, (CaffK, CspQ)));
	0,0127			(CspH, (CcfF, (CaffK, CspQ)));
$\theta \text{ G (2, 2000)}$ $\tau_0 \text{ G (1, 10)}$	0,4140	4	CaffK CspQ CcfF CspH	<b>((CcfF, CspH), (CaffK, CspQ));</b>
	0,3675			<b>((CcfF, CspH), (CaffK, CspQ));</b>
	0,2185			(CspH, (CcfF, (CaffK, CspQ)));
$\theta \text{ G (1, 10)}$ $\tau_0 \text{ G (2, 2000)}$	0,3511	4	CaffK CspQ CcfF CspH	<b>((CcfF, CspH), (CaffK, CspQ));</b>
	0,3437			(CcfF, (CspH, (CaffK, CspQ)));
	0,3052			(CspH, (CcfF, (CaffK, CspQ)));
$\theta \text{ G (2, 2000)}$ $\tau_0 \text{ G (2, 2000)}$	0,9796	4	CaffK CspQ CcfF CspH	<b>((CcfF, CspH), (CaffK, CspQ));</b>
	0,0129			(CcfF, (CspH, (CaffK, CspQ)));
	0,0050	3	CaffKCspQ CcfF CspH	(CcfF, (CaffKCspQ, CspH));
	0,0025	4	CaffK CspQ CcfF CspH	(CspH, (CcfF, (CaffK, CspQ)));

**PP:** probabilidad posterior. **N:** número de especies del modelo. **Especies:** CaffK= *Cercospora* aff. *kikuchii*; CspQ= *Cercospora* sp. Q; CcfF= *C. cf. flagellaris*; CspH= *Cercospora* sp. H; CaffKCspQ= *C. kikuchii* y *C. sp. Q* como una única especie. **Topología:** muestra la topología puesta a prueba en para cada modelo; en negrita, aquellas que coinciden con el árbol guía.

## Análisis geográfico de la variación genética

### Estructura genética de los agentes etiológicos de la MPSS

El AMOVA para el *dataset 1* (que incluye los aislamientos de Argentina, Brasil y EEUU, sin diferenciarlos según su identidad taxonómica) indica que existe una estructuración significativa de la variación genética en las regiones muestreadas. Tanto la partición entre países, como entre y dentro de localidades resultaron significativas (**Tabla 11**). La variación entre provincias, por su parte, no aportó un porcentaje detectable de la varianza total.

**Tabla 11.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA) para el *dataset 1*.

Niveles	GL	SC	CM	%	Valor p
Entre países	2	3049,56	1524,78	55,04	0,035**
Entre provincias	3	309,36	103,12	-0,91	0,538
Entre localidades	7	546,02	78,00	14,76	0,001***
Dentro de localidades	119	2313,33	19,44	31,11	0,001***
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>6218,27</b>	<b>47,47</b>	<b>100,00</b>	

GL, grados de libertad. SC, suma de cuadrados. CM, cuadrados medios. %: porcentaje del total de la variación explicada por cada nivel jerárquico. \*\*, significativo al 5%; \*\*\*, significativo al 0,1%.

### Análisis de la variación nucleotídica y haplotípica por especie

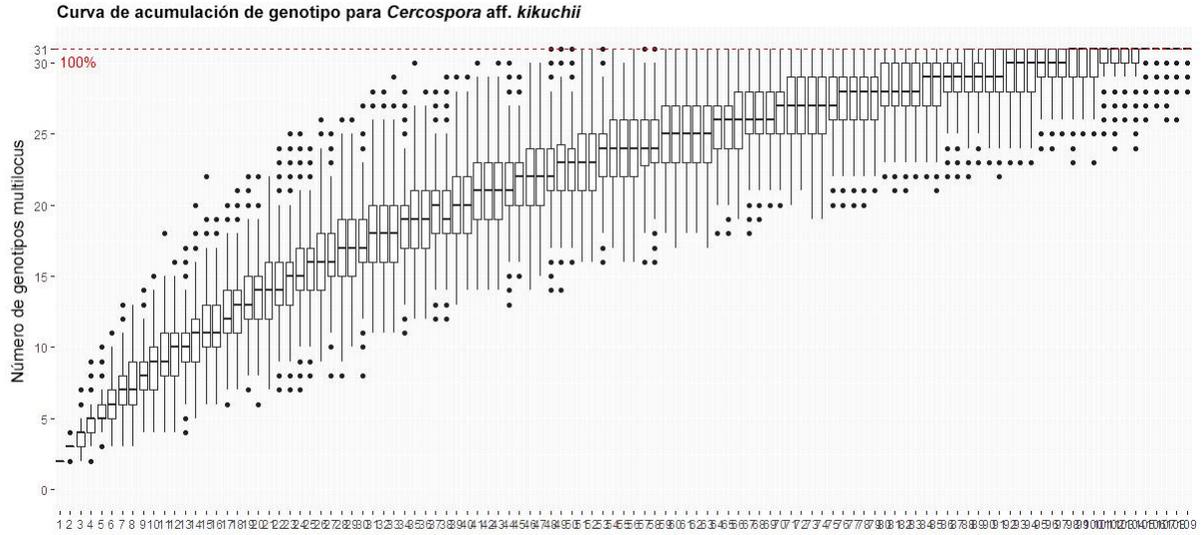
Para los grupos de aislamientos asignados a *C. kikuchii*, *Cercospora* sp. Q y *C. cf. flagellaris*, los estimadores de la variación nucleotídica y haplotípica muestran que *Cercospora* aff. Q resultó el linaje más diverso, seguido de *C. cf. flagellaris*, y *C. aff. kikuchii* (**Tabla 12**). Los valores del D de Tajima resultaron significativamente menores a cero para *C. aff. kikuchii* ( $p < 0,01$ ) y para *Cercospora* sp. Q ( $p < 0,05$ ), y no para *C. cf. flagellaris* ( $p > 0,10$ ). Valores significativamente menores a cero para la D de Tajima están asociados a procesos selectivos ó a crecimientos poblacionales.

**Tabla 12.** Estimadores de diversidad nucleotídica y haplotípica para los diferentes linajes.

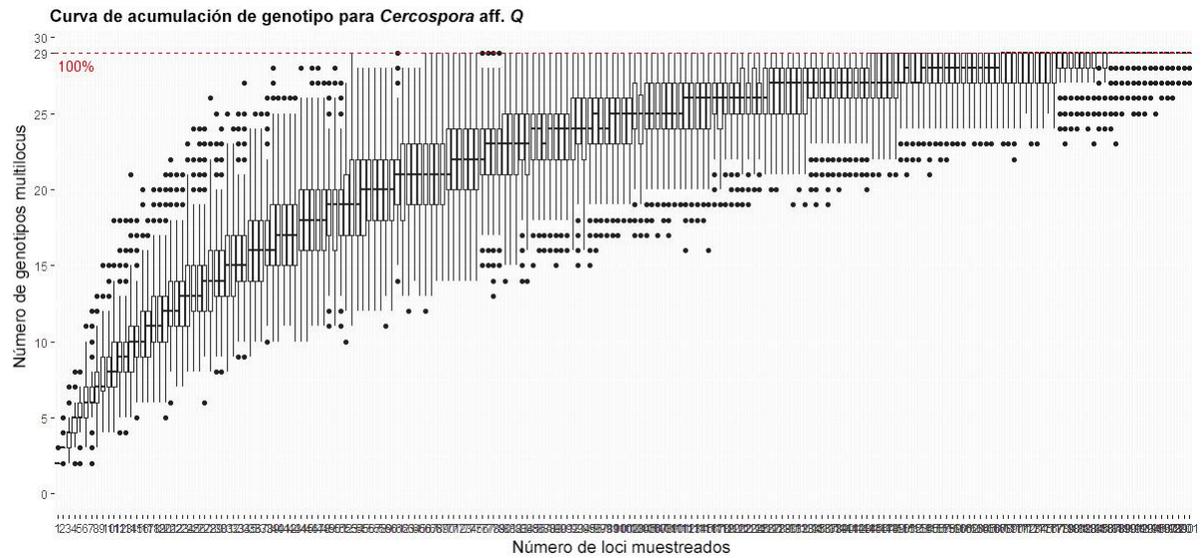
		<i>C. aff. kikuchii</i>	<i>Cercospora sp. Q</i>	<i>C. cf. flagellaris</i>
<b>N</b>		70	31	22
<b>Tamaño dataset (pb)</b>		3672	3680	3655
<b>Índices de diversidad nucleotídica</b>	<b>S</b>	110	200	55
	<b>Eta</b>	110	205	55
	<b>Pi</b>	0,001	0,007	0,003
	<b>k</b>	6,18	24,36	9,44
<b>Índices de diversidad haplotípica</b>	<b>H</b>	2,510	3,345	2,56
	<b>Hexp</b>	0,057	0,12	0,17
	<b>G</b>	5,76	12,17	11
	<b>Lambda</b>	0,827	0,964	0,909
	<b>MLG</b>	31	29	15
	<b>eMLG</b>	6,20	9,81	9,26
	<b>Hd</b>	0,839	0,996	0,952
	<b>E5</b>	0,421	0,967	0,835
<b>D de Tajima (p)</b>		-2,45 (** < 0,01)	-2,02 (* < 0,05)	-1,48 (> 0,10)

**N:** número de individuos. **S,** número de sitios segregantes (polimórficos). **Eta,** número total de mutaciones. **Pi,** número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. **k,** número promedio de diferencias nucleotídicas. **H:** índice de Shannon-Wiener de diversidad haplotípica. **Hexp,** índice de diversidad genética de Nei (1978). **G,** índice de diversidad *multi-locus* de Stoddart y Taylor (1988). **Lambda,** índice de Simpson. **MLG,** número de genotipos *multi-locus* (haplotipos) por *dataset*. **eMLG:** corregido por rarefacción con  $n \geq 10$ . **Hd,** diversidad haplotípica. **E5,** índice de uniformidad.

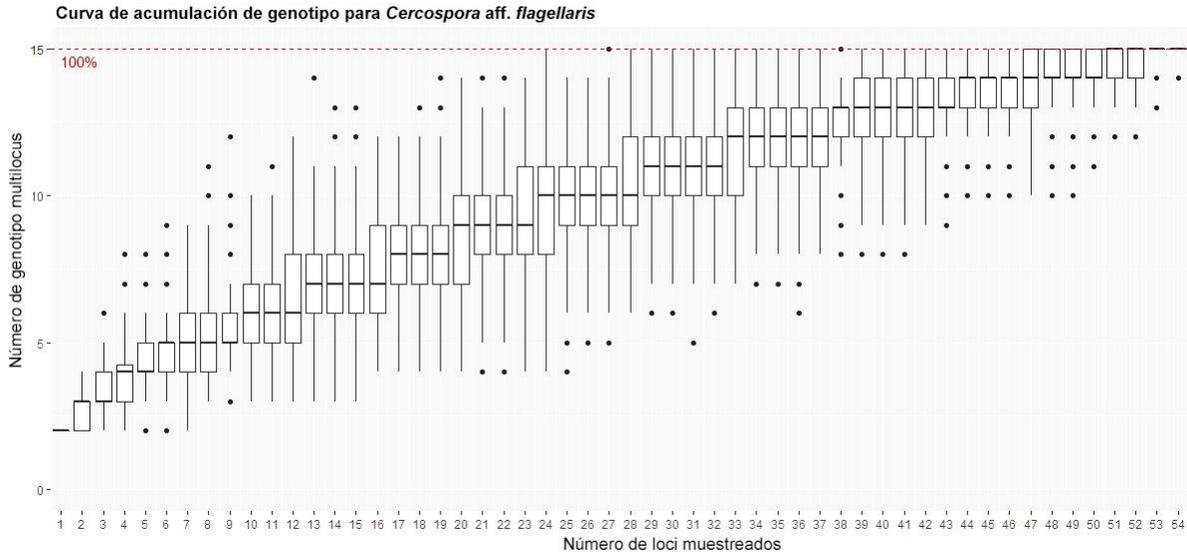
Las curvas de acumulación muestran que la identificación de la totalidad de los haplotipos en las tres especies se alcanzó sólo cuando se incorporó un alto porcentaje de los *loci* polimórficos (**Figuras 13, 14 y 15**). Mientras que los 31 haplotipos de *C. aff. kikuchii* pudieron diferenciarse utilizando 98 *loci* polimórficos de los 110 sitios segregantes observados (89,1%), La diferenciación de los 29 haplotipos de *Cercospora sp. Q* y los 15 de *C. cf. flagellaris* requirieron de la incorporación del 100% de los sitios polimórficos (200 y 55, respectivamente).



**Figura 13.** Curva de acumulación de genotipos para *C. aff. kikuchii*. En el eje x figura el número de *loci* muestreados.



**Figura 14:** Curva de acumulación de genotipos para *Cercospora* sp. Q.



**Figura 15** Curva de acumulación de genotipos para *C. cf. flagellaris*.

Se evaluó la estructura genética dentro de los linajes prevalentes en Sudamérica. El AMOVA para *C. aff. kikuchii* muestra que la mayor variación nucleotídica se encuentra dentro de las localidades (91,78%). El valor negativo del componente de variación entre provincias (-14,75%) sugiere ausencia de estructura (**Tabla 13**).

En el mismo sentido, resultados del AMOVA para *Cercospora* sp. Q (**Tabla 14**) muestran que dentro de las localidades se da el 96,24% de la variación genética observada. Sin embargo, sólo el valor del componente “entre países” resultó significativo, rechazando la hipótesis nula de distribución homogénea entre países y por tanto éste sería el único nivel donde existe una cierta estructuración de la variación nucleotídica.

**Tabla 13.** Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) para *Cercospora aff. kikuchii*.

Niveles	GL	SC	CM	%	Valor p
Entre países	1	3,71	3,71	0,15	0,469
Entre provincias	3	8,85	2,95	-14,75	0,650
Entre localidades	5	28,96	5,79	22,82	0,018 **
Dentro de localidades	60	171,67	2,86	91,78	0,076
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>213,20</b>	<b>3,09</b>	<b>100,00</b>	

GL, grados de libertad. SC, suma de cuadrados. CM, cuadrados medios. %: porcentaje del total de la variación explicada por cada nivel jerárquico. \*\*, significativo al 5%

**Tabla 14.** Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) para *Cercospora* sp. Q.

Niveles	GL	SC	CM	%	Valor p
Entre países	1	24,72	24,72	5,15	0,001*
Entre provincias	2	27,29	13,65	7,58	0,165
Entre localidades	4	34,04	8,51	-8,97	0,706
Dentro de localidades	23	280,23	12,18	96,24	0,448
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>366,29</b>	<b>12,21</b>	<b>100,00</b>	

GL, grados de libertad. SC, suma de cuadrados. CM, cuadrados medios. %: porcentaje del total de la variación explicada por cada nivel jerárquico. \*, valor significativo al 1%

### Distribución específica

Complementario al análisis molecular de la varianza genética se realizó una evaluación de la distribución de especies causales de la MPSS. Para este estudio se agrupó a los aislamientos según los resultados obtenidos en el análisis filogenético y su validación con la delimitación bayesiana. Se asignó entonces un nombre específico a cada aislamiento del *dataset* 1, y se incorporó además de la información de los diferentes niveles geográficos (país, región fitogeográfica, provincia). La **Tabla 15** muestra la abundancia específica en cada unidad de muestreo.

Como puede observarse por otra parte, la única especie detectada en el estado de Arkansas (EEUU) fue *C. cf. flagellaris*. Esta especie no se detectó en las regiones analizadas de América del Sur. Tampoco las especies observadas en este subcontinente fueron detectadas en la región sojera incluida de América del Norte. La especie prevalente para la Argentina es *C. aff. kikuchii* (82%); *Cercospora* sp. Q representó el 17% de las muestras. En Brasil la abundancia de especies es más homogénea; la especie prevalente fue *Cercospora* sp. Q (47%), seguida de *C. aff. kikuchii* (34%) y *Cercospora* sp. H (19%).

La composición específica entre las diferentes provincias fitogeográficas de la Argentina resultó muy similar: en ambos casos, los aislamientos fueron predominantemente asociados a *C. aff. kikuchii* (82% en la Provincia Pampeana, 78% en el Monte), y aproximadamente un 15 al 22% fueron identificados como *Cercospora* sp. Q, respectivamente. Se detectó además un único aislamiento de *C. cf. sigesbeckiae*, hasta el momento el único encontrado como agente causal de la MPSS, en la Provincia de Buenos Aires (localidad de 9 de Julio).

**Tabla 15.** Abundancia específica por país, región fitogeográfica y provincia/ estado.

Regiones			Especie				
País	Región fitogeográfica	Provincia / Estado	<i>C. aff. kikuchii</i>	<i>Cercospora sp. Q</i>	<i>Cercospora sp. H</i>	<i>C. cf. sigesbeckiae</i>	<i>C. cf. flagellaris</i>
Argentina	Provincia Pampeana	Buenos Aires	38	3	0	1	0
		Entre Ríos	3	5	0	0	0
		Córdoba	3	0	0	0	0
	<b>Total Pampeana</b>		<b>46</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
	Provincia del Monte	Salta	7	1	0	0	0
		Tucumán	7	3	0	0	0
	<b>Total Monte</b>		<b>14</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total Argentina</b>			<b>58</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Brasil	Cerrado	Bahía	2	0	0	0	0
		Goias	1	2	0	0	0
		Mato Grosso Norte	0	6	1	0	0
		Mato Grosso Sul	0	4	0	0	0
	<b>Total Cerrado</b>		<b>3</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	Mata Atlántica	Paraná	1	6	1	0	0
		Santa Catarina	4	0	1	0	0
	<b>Total Mata Atlántica</b>		<b>5</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Provincia de la Pampa	Rio Grande do Sul	5	0	4	0	0	
<b>Total Brasil</b>			<b>13</b>	<b>18</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
EEUU	<i>Cornbelt</i>	Arkansas	0	0	0	0	22
<b>Total</b>			<b>71</b>	<b>30</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>22</b>

La prueba de Kruskal-Wallis muestra que la distribución de *C. aff. kikuchii* difiere significativamente entre Argentina y Brasil ( $H= 4,81$ ;  $p= 0,0265$ ). La distribución de *Cercospora sp. H* entre ambos países resultó sólo marginalmente diferente ( $H= 3,64$ ;  $p= 0,0608$ ); esta escasa diferencia no refleja la situación de ausencia/presencia de la especie entre Argentina y Brasil, y puede deberse al bajo número muestral de la misma. La distribución de *Cercospora sp. Q*, por otra parte, resultó similar entre países ( $H= 0,00$ ;  $p >0,99$ ).

A nivel de las regiones fitogeográficas, el análisis de la distribución de *C. aff. kikuchii* entre el Cerrado, Mata, Monte, y Pampa, arrojó resultados que muestran sólo leves diferencias ( $H= 7,31$ ;  $p= 0,0599$ ); las distribuciones de *Cercospora* sp. *H* en cada provincia fitogeográfica, en cambio, sí resultaron significativas ( $H=5,67$ ;  $p=0,0424$ ), al tiempo que las de *Cercospora* sp. *Q* resultaron no significativas ( $H=0,42$ ;  $p=0,9322$ ).

# Discusión

La presente Tesis Doctoral, y los artículos de ella derivados, permitieron establecer por primera vez que la MPSS en Sudamérica no es producida por un único agente causal, sino por al menos cinco linajes diferentes dentro del género *Cercospora*. Se estableció seguidamente la relación filogenética entre dichos linajes y el resto de las especies del género. En función de esto se exploraron los umbrales específicos para este conjunto de agentes patógenos, validándose la presencia de al menos cinco especies, actuando como agentes patógenos de la MPSS en el continente. Se estableció por primera vez, a partir del análisis de recombinación, la presencia de fenómenos de transferencia génica horizontal (TGH) entre especies de este género. También, se caracterizó aquí por primera vez la distribución geográfica de cada especie prevalente, al tiempo que se analizó la estructura espacial de su variación genética en diferentes niveles de muestreo.

### ***Aspectos biológicos***

Los resultados del AED sobre el *dataset 1* y la observación de diferentes haplogrupos constituyeron el primer indicio de un origen múltiple de la MPSS en América; ésto derivó en los estudios publicados en Soares *et al.* (2015). Se aporta allí evidencia de que existen al menos cuatro linajes diferentes, presuntamente no monofiléticos, asociados a la etiología de la enfermedad. El trabajo sugiere que dichos linajes habrían divergido en épocas muy anteriores al surgimiento de la agricultura, e incluso de la aparición de la especie humana en el continente africano.

Se amplió posteriormente el muestreo tanto sobre la representación del genoma como sobre la distribución geográfica en las zonas productoras de soja de Argentina (*dataset 2*); se incluyó también la totalidad de las especies del género *Cercospora* (según reportadas por Groenewald *et al.*, 2013), para re-evaluar las relaciones genealógicas de los agentes causales de la MPSS con las otras especies del género. Los resultados (publicados en Guillin *et al.*, 2017) confirman por una parte la presencia de al menos cuatro especies sólo en América del Sur, más una quinta en América del Norte. Además, fue posible precisar la asociación de uno de los linajes patogénicos para MPSS (“grupo naranja”), relativo a lo

propuesto anteriormente. Este grupo había sido previamente asociado con *C. alchemiicola* (Soares et al. 2015); la mayor cantidad de especies incluidas en Guillin et al. (2017) permitió asignar una relación filogenética más cercana de esos aislamientos con *Cercospora* sp. *H*. Por otra parte, la información incluida en el *dataset 2* (cinco *loci*) no permitió una resolución clara de una región de la topología donde diversos aislamientos locales de MPSS formaron una politomía con el único ejemplar disponible hasta el momento de *Cercospora* sp. *O*.

Ante esa falta de resolución del análisis filogenético se recurrió a la delimitación bayesiana de especies, realizada con el *dataset 2*, debido a su mayor representación genómica. Estos resultados indican por una parte que los aislamientos locales de la politomía arriba mencionada quedan incluidos dentro del mismo grupo que el ejemplar tipo de *C. kikuchii*. Por otra parte, se observa que los aislamientos de los cuatro linajes definidos por el AED y el análisis filogenético (*C. aff. kikuchii*, *Cercospora* sp. *Q*, *Cercospora* sp. *H*, *C. cf. flagellaris*) presentan umbrales genéticos claros. Es decir que, pese a que con posterioridad a la convergencia sobre el nuevo huésped (la soja) se ha retomado el flujo génico entre especies, tal como lo muestra el análisis de recombinación, los reservorios génicos de cada una preservan aún su coherencia, y cada uno puede ser considerado (en el presente) una especie separada.

Es dable especular que, dada la antigüedad de los eventos de divergencia entre estas especies (no menos de 500.000 años, según Soares *et al.*, 2015), el lapso desde su contacto secundario, como consecuencia de la adopción del cultivo extensivo de la soja en América (aproximadamente 30 años) no ha sido suficiente para que el intercambio génico horizontal uniformice los reservorios génicos de los distintos agentes de la MPSS. Sin embargo, ese proceso de confluencia se ha puesto en marcha, como lo demuestra la alta frecuencia de TGH observada, y posiblemente tienda a cohesionar los *pool*es génicos a futuro.

Es importante destacar, por otra parte, que Albu *et al.* (2015) comunican un panorama taxonómico enteramente diferente para la MPSS en EEUU. Estos autores comunican que se han detectado allí sólo dos agentes causales de la

MPSS: uno identificado como *C. cf. flagellaris*, y otro linaje identificado como *C. cf. sigesbeckiae*. No se reportan allí eventos de transferencia horizontal entre especies. Por su parte, Bakhshi *et al.* (2015) obtuvieron también aislamientos de *C. cf. flagellaris* a partir de soja con síntomas de MPSS colectada en la Provincia de Ardabil, Noroeste de Irán. Este bajo número de especies registradas empleando métodos moleculares como los aplicados en esta Tesis, sugiere una situación particular para los mayores productores sojeros sudamericanos.

### **Orígenes múltiples de la MPSS**

Crous y Braun (2003) reconocieron 281 entidades (morfológicamente indistinguibles y provenientes de una multiplicidad de hospederos) dentro de lo que denominaron “complejo *Cercospora apii sensu lato*”. En ese trabajo, los autores introdujeron el concepto de “especie compuesta”, definiéndola como “grupo de especies morfológicamente indistinguibles, con diferentes rangos de hospedantes y grados de especialización biológica, genéticamente homogéneos o heterogéneos”. Esta definición, extremadamente laxa, parecería estar destinada a facilitar el manejo dentro del laboratorio de fitopatología, más que a esclarecer la situación biológica, genealógica y/o taxonómica del grupo.

Una situación similar fue reportada por Inglis *et al.* (2001), quienes compararon aislamientos norte y sudamericanos de *C. caricis* utilizando distintos marcadores moleculares. Estos autores encontraron aislamientos brasileños con menos del 50% de similitud con aislamientos de EEUU, siendo ambos grupos morfológicamente indistinguibles. Estos resultados los llevaron a postular la posible ocurrencia de especiación críptica para *C. caricis*.

Análogamente, los análisis filogenéticos para la MPSS (Guillin *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2015; Albu *et al.*, 2015; Bakshi *et al.*, 2015) han mostrado que un número de aislamientos obtenidos de semillas de soja provenientes de diferentes regiones del mundo forman clados (es decir, tendrían un ancestro común más reciente, y por ende íntima relación) con diferentes patógenos polifágicos del género *Cercospora*. Así, *C. cf. flagellaris* ha sido aislada de al menos doce familias vegetales

filogenéticamente diferentes y *C. cf. sigesbeckiae* de ocho familias de plantas distintas. A esto hay que agregar las observaciones de Groenewald *et al.* (2013), quienes refieren que *C. cf. richardiicola* (aislada de al menos cuatro grupos vegetales) produjo los mismos síntomas que *C. kikuchii* en soja. Un dato adicional citado por los mismos autores indica la existencia de *Cercospora cf. nicotianae* aislado de una planta de *Glycine max* en México (sin embargo, los autores no especifican la sintomatología, ni han confirmado el dato). Tal como el epíteto específico sugiere, *C. cf. nicotianae* ha sido aislada repetidamente de tabaco (Solanaceae). Por otra parte, los dos aislamientos de *Cercospora sp. H*, empleados en esta Tesis como referencia, fueron también obtenidos de hospedantes diversos como ser *Convolvulaceae* y *Myrtaceae*. Cabe recordar que ciertos aislamientos brasileños analizados aquí se relacionan preferentemente con esta especie. Luego, el único ejemplar de *Cercospora sp. O* incorporado al presente estudio fue aislado originalmente sobre un hospedador del género *Musa* en Tailandia; aquí, varios de los aislamientos caracterizados mostraron una relación no completamente resuelta (politomía) con esta especie.

Este cuerpo de evidencias muestra que numerosas especies del género *Cercospora* pueden infectar los cultivares modernos de soja, produciendo síntomas que en conjunto pueden denominarse “mancha púrpura de la soja”.

Es interesante destacar, por otra parte, que todas las muestras identificadas como *C. kikuchii* en Groenewald *et al.* (2013) han sido aisladas de soja cultivada ó silvestre (*G. max* ó *G. soja*). En el presente estudio, 20 aislamientos argentinos y brasileños formaron un grupo genético coherente con el ejemplar tipo de *C. kikuchii* y por tanto, son considerados como identificados bajo nombre específico. Las 17 secuencias nucleotídicas de aislamientos de *C. sojina* generados por Groenewald *et al.* (2013), junto con el aislamiento obtenido en este trabajo, han sido aislados exclusivamente de especies del género *Glycine* de diferentes geografías, y forman un clado monofilético.

Recapitulando, lo antedicho permite concluir que *C. kikuchii* y *C. sojina* serían patógenos específicos de la soja, y que existirían entre cuatro y seis especies

polífagas del género *Cercospora* que han colonizado de manera oportunista al cultivo de soja, nicho ecológico que la vastísima área de producción ofrece alrededor del mundo. Puede postularse en este sentido que las estructuras de propagación de estas especies hayan llegado a los lotes de producción desde la vegetación lindera remanente. En un trabajo reciente, Borges *et al.* (2018) obtuvieron aislamientos que identificaron como *Cercospora* sp. Q, *Cercospora* sp. H y *C. cf. flagellaris* de hospederos diferentes a la soja en Norte y Sud América. Algunos de esos hospederos incluyen al *Amaranthus palmeri* (yuyo colorado, especie registrada en las provincias de Córdoba y San Luis), *Eichhornia crassipes* (camalote, presente en la región del Litoral y utilizada en ocasiones como fertilizante de suelos), *Galinsoga parviflora* (albahaca silvestre, maleza de pasturas y cultivos anuales en la zona centro de nuestro país), y *Sigesbeckia glabrescens* (la especie *S. serrata* ha sido citada en el Noroeste argentino). Las especies vegetales mencionadas suelen encontrarse asociadas con lotes de producción sojera. La proximidad física presenta oportunidades claras para la expansión del rango de hospedero por parte de las especies fúngicas patógenas polífagas. Esta situación parece coincidir con los resultados obtenidos por Ingis *et al.* (2001) para *C. caricis*; sin embargo, desde aquí adscribimos el fenómeno descrito por estos autores no a la ocurrencia de “especiación críptica” como ellos proponen, sino a múltiples “saltos de hospedero” hacia la soja por parte de especies oportunistas preexistentes.

Las especies oportunistas han sido definidas como aquellas que presentan un bajo nivel de especialización, que pueden nutrirse de una gran variedad de alimentos, en función de la disponibilidad, siendo capaces de explotar ambientes que cambian frecuentemente, y que son más propensas a los hábitats alterados o degradados (Levinton, 1970). Se destacan además por su alta dispersión, rápido crecimiento y reproducción. Si bien la definición de Levinton (1970) fue originalmente planteada para especies animales, parece ajustarse perfectamente a las especies fúngicas tratadas en el presente trabajo.

Dado que estos patógenos oportunistas (*C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae*, *Cercospora* sp. H, *Cercospora* sp. Q), al igual que *C. kikuchii*, producen el síntoma

“mancha púrpura” es factible que secreten cercosporina. Esta es una toxina perilenquinónica que actúa como factor de virulencia durante la patogénesis y produce coloración purpúrea en tejidos infectados (Daub y Kuang-Ren, <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Cercosporin.aspx>). Las toxinas perilenquinónicas son fotoactivadas careciendo de toxicidad en la oscuridad. A la luz, estos compuestos se activan al absorber energía lumínica. La cercosporina debilita la membrana y resulta un potente productor de oxígeno libre. La exposición de las células y tejidos vegetales a esta toxina resulta en la peroxidación de los lípidos de membrana, lo que acarrea la destrucción de la misma, y la muerte celular (Daub y Briggs, 1983). El daño de membrana permite el goteo de nutrientes dentro de los espacios intercelulares, favoreciendo el crecimiento micelial y la esporulación (Daub y Ehrenshaft, 2000). Es posible así asumir que todas las especies productoras de cercosporina sean capaces, al menos en principio, de infectar la soja. Las reacciones de defensa inducidas en las plantas por parte de estas especies fúngicas son también similares. Justamente son estas características comunes las que han llevado a que fitopatólogos (y taxónomos) diagnostiquen al grupo de signos y síntomas como “Mancha Púrpura de la Semilla de la Soja” y que denominen a todos los agentes causales bajo el nombre de “*C. kikuchii*” cuando son aislados de *Glycine*.

### **Flujo génico y estructura taxonómica de los agentes etiológicos de la MPSS**

La detección de haplotipos recombinantes dentro del grupo de agentes la MPSS resultó llamativa desde el análisis filogenético tradicional, que excluye intercambios genéticos posteriores a la divergencia (cladogénesis). También fue inesperado considerando que las especies del género *Cercospora* han sido consideradas mayoritariamente como de reproducción asexual (Almeida *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008; Imazaki *et al.*, 2006).

Los resultados aquí obtenidos permiten postular que al menos algunos de los aislamientos analizados se habrían originado por recombinación meiótica (intercambio sexual). Así, para el aislamiento 63A2 (*C. aff. kikuchii* x *Cercospora* sp. Q) se registró un entrecruzamiento intra-*locus*; esto sugiere fuertemente la

presencia de recombinación meiótica, debida quizás a la presencia de barreras laxas al flujo interespecífico o de TGH. La bibliografía para TGH en hongos cita, por el contrario, intercambio de grupos de genes ó cromosomas enteros (Yin *et al.*, 2016; Fitzpatrick 2012) y no el tipo de evento detectado aquí. Al no disponer en la actualidad de un mapa genético para *Cercospora*, resta dilucidar el mecanismo por el cual se han originado los demás recombinantes confirmados.

La alta frecuencia de recombinantes detectada en esta Tesis (12 recombinantes de 63 haplotipos, 19%) sugiere que, más que un “complejo de especies” (Crous y Braun 2003), ó una “especie compuesta” (Ingis *et al.*, 2001), los diferentes linajes de la MPSS constituirían un “singameón”, ó una “multiespecie”. Van Valen (2009) definió las multiespecies como “un juego de especies simpátricas que intercambian genes en la naturaleza”. Este concepto sería equivalente al de “singameon” (Grant 1989). Según Grant, un singameon puede comportarse como una especie biológica con una estructura interna compleja desde el punto de vista de su flujo génico. Si bien será necesario un muestreo más exhaustivo para alcanzar conclusiones sólidas en este sentido, en el presente trabajo se detectó un 75% de recombinantes entre *C. kikuchii* y *Cercospora* sp. Q (9 recombinantes de 12 totales), 17% entre *C. kikuchii* y *Cercospora* sp. H (2 de 12) y 8% entre *Cercospora* sp. Q y *Cercospora* sp. H (1 de 12) (**Tabla 9**). En concordancia, se han propuesto tiempos de divergencia recientes para el primer caso (ca. 500.000 años) y tiempos de divergencia que serían muy anteriores para los otros dos (Soraes *et al.*, 2015). Esto sugiere que dentro del singameón constituido a partir del contacto secundario de estos patógenos sobre la soja, las barreras reproductivas no se encontrarían desarrolladas con igual intensidad. A modo de ejemplo, en el presente estudio a partir de tres semillas de soja se obtuvieron seis aislamientos particulares (dos por semilla). Los aislamientos 7A2, 39A2 y 39A3, cada uno derivado de una semilla diferente, fueron identificados como *C. aff. kikuchii*, mientras que los aislamientos 7A2bis, 39A2bis y 39A3bis fueron identificados como *Cercospora* sp. Q. Este resultado demuestra la ocurrencia de más de un patógeno co-infectando no ya un mismo lote, sino incluso una misma semilla. Esta observación de importancia epidemiológica, también brinda ocasión de contacto y flujo génico entre especies.

## Transferencia Génica Horizontal y Evolución Reticular

Las diferentes especies aquí detectadas como agentes etiológicos de la MPSS distan de ser monofiléticas. El análisis de recombinación muestra que han ocurrido numerosos eventos de intercambio. Este fenómeno genera (desde el punto de vista biológico) y da cuenta (desde el punto de vista analítico) de los patrones reticulados obtenidos. Cabe aquí recordar que cuando se ha verificado la existencia de conflicto de caracteres entre taxa, las redes filogenéticas serían las más apropiadas para modelizar relaciones evolutivas (Huson y Bryant, 2001; Woolley *et al.*, 2008).

Los híbridos o recombinantes arriba mencionados representan la primera identificación de la existencia de TGH entre especies del género *Cercospora*. La TGH involucra la transmisión de material genético entre organismos que no presentan relaciones de ancestro-descendencia, interpelando el patrón estándar de herencia vertical (Soanes & Richards, 2014). El rol de la TGH es bien conocido como factor evolutivo en procariontes (Thomas y Nielsen, 2005). Sin embargo, su papel en la evolución de los eucariontes, y en particular en hongos permanece largamente desconocido. Estudios recientes (Qiu *et al.*, 2016; Gluck-Thaler y Slot, 2015, Soanes y Richards 2014) han comenzado a echar luz sobre esta cuestión. Estudios previos han propuesto que la proximidad ecológica (como el caso de la co-infección arriba citado), la anastomosis, (Friesen *et al.*, 2006; Roca *et al.*, 2005), la posición relativa del producto génico dentro de la red metabólica y la función diferencial que conlleve, pueden asociarse a la probabilidad de detección de eventos de TGH (Fitzpatrick, 2012). Si bien la TGH parece ser un fenómeno generalizado en las comunidades de microorganismos el paso de TGH “transiente” a “estable” dependerá de los factores arriba mencionados (Fitzpatrick 2012).

Los patrones de relaciones reticulados aquí evidenciados y la alta frecuencia de híbridos inter-específicos validados, contribuyen a considerar que en este grupo existe una alta frecuencia de intercambio estables. El hecho que estos eventos de TGH se hayan detectado aún con una cobertura genómica muy escasa (sólo siete *loci*), con sólo 63 aislamientos, entre diferentes regiones geográficas (Argentina-Brasil) y entre diferentes especies, resalta la importancia de este fenómeno.

Asimismo sugiere una gran relevancia en la evolución y epidemiología del grupo en relación con su capacidad de adaptación a los desafíos ambientales que el manejo de enfermedades en los lotes de producción supone a las poblaciones de patógenos.

Es esperable que las redes metabólicas de las diferentes especies del género *Cercospora* sean similares y por tanto, la introgresión de un gen de una especie co-genérica no debiera resultar en general fisiológicamente disruptiva. También es dable pensar que la alta presión de selección impuesta por los actuales métodos de control de patógenos (en particular los fungicidas) tenderá a incrementar la frecuencia de genotipos con resistencia o tolerancia provenientes de diversas fuentes (especies), como mecanismo para superar esos desafíos ambientales.

Otros factores concurrentes que fomentan la ocurrencia de eventos TGH son el comercio internacional de semillas y el avance de la frontera agrícola hacia regiones previamente ocupadas por una biota natural, que brindan nuevas oportunidades de contacto entre especies. Esto sumado a un ambiente alterado por la actividad antrópica y un hospedero con una muy baja variabilidad genética, constituyen factores ecológicos que, como sostiene Fitzpatrick (2012), favorecen los eventos de TGH en hongos. Todos estos son factores que se verifican actualmente en relación con el cultivo extensivo de la soja.

### **Modelo de especie para los agentes causales de la MPSS**

La adopción del modelo de singameón para describir a los agentes etiológicos de la MPSS implica la relajación de algunos supuestos subyacentes a los diferentes conceptos de especie previamente considerados para el grupo. Entre ellos, la idea de una relación unívoca entre hospedero y patógeno (Heath, 1981). Esta idea debería ser reemplazada por la noción de un conjunto fluido de linajes relacionados genéticamente de acuerdo con el mayor ó menor grado de desarrollo de barreras de aislamiento reproductivo. Otro supuesto que posiblemente deba relajarse es la coalescencia de los linajes en un ancestro común más reciente. Es decir que, al menos para algunos casos y propósitos (manejo integrado de enfermedades), no

sería necesario ni conveniente que la monofilia fuera un requisito *sin equa non* para definir un grupo biológicamente consistente. En patógenos como los que producen la MPSS es posible que más que un pasado genético común, deba pensarse en la integración de un acervo genético cohesionado a futuro como criterio para la consideración de una entidad biológica dada. Aun cuando esta sea una especulación meramente teórica, la idea puede acarrear consecuencias prácticas de importancia en no solo en la agronomía, sino también en medicina, para el caso en que los fenómenos aquí descritos se observen también en patógenos humanos. En otros géneros como *Diaporthe*, *Fusarium* y *Puccinia*, cuyas especies son patogénicas de un enorme número de grupos vegetales, los límites específicos y los fenómenos de TGH están muy poco estudiados (Guillin *et al.*, 2014), basándose las tareas fitopatológicas en conceptos fuertemente tipológicos. Si las ideas aquí presentadas se vieran validadas a futuro, es posible que el manejo integrado de enfermedades pueda pasar de una aproximación “cultivo-específica”, a otra que tome también en consideración las especies cultivadas en una determinada zona ó región, junto con la biota autóctona que la circunda.

### **Aspectos agronómicos: epidemiología de la MPSS**

La MPSS es una enfermedad de amplia difusión en todas las regiones productoras de soja a nivel mundial, y ha sido la que más creció en América del Sur con la adopción de la siembra directa y el monocultivo (P. E. Grijalba, comunicación personal).

En este trabajo de Tesis se observó una clara diferenciación en la distribución geográfica de las especies que actúan como agentes causales (**Tabla 15**). La distribución de especies tiende a ser regular dentro de las regiones fitogeográficas analizadas y heterogénea entre ellas. Una de las excepciones a destacar en Argentina es la prevalencia de *Cercospora* sp. Q en la provincia de Entre Ríos, mientras que en el resto de la región pampeana (Córdoba, Buenos Aires, incluso Rio Grande do Sul), *C. kikuchii* es fuertemente prevalente.

La diferenciación genética entre provincias (**Tabla 11**) puede explicarse porque la dispersión de haplotipos no es suficiente para homogeneizar la distribución. El principal tipo de dispersión para la MPSS es antrópica: la maquinaria agrícola, rentada por los productores, que suele trasladarse entre Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, por ejemplo. Lo mismo ocurre con la semilla, que puede ser trasladada entre diferentes provincias o estados. En una escala geográfica menor, el alto grado de estructuración entre localidades puede ser explicado a partir del movimiento limitado de aislamientos; ésto implica un “error muestral” que se evidencia en la diferente composición genética de cada localidad. La dispersión por viento, que tendería a homogeneizar la distribución, no alcanza niveles significativos más allá de los 500 m (P. E. Grijalba, comunicación personal), por lo cual su rol para minimizar la estructura entre localidades debería resultar menor, lo que es consistente con los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las especies detectadas han sido objeto de un barrido selectivo, o bien de un crecimiento poblacional repentino y reciente (Tajima, 1989). Este fenómeno no se verificaría para las muestras provenientes de Arkansas; esta discrepancia puede deberse a que el área muestreada en EEUU es mucho menor, ya que son aislamientos provenientes de una única localidad. La hipótesis del rápido crecimiento poblacional en *C. kikuchii* y *Cercospora* sp. Q, parece más parsimoniosa que un posible barrido selectivo, al coincidir con la expansión súbita (en términos genealógicos) del área sembrada con soja en los últimos 30 años.

Los altos niveles de polimorfismo observados en las secuencias nucleotídicas (**Tablas 13 y 14**) coinciden con lo comunicado por González *et al.*, (2008), quienes utilizaron marcadores RAPD para analizar muestras identificadas como “*C. kikuchii*” por sintomatología y características *in vitro* provenientes de 7 localidades la provincia de Santa Fe. Lamentablemente estos autores no definieron grupos genéticos ó taxonómicos. Almeida *et al.* (2005) también utilizaron marcadores RAPD, e información del *locus* ITS para analizar la variación genética en MPSS. Estos autores encontraron variación en virulencia, patrones de bandas y contenido

de cercosporina entre aislamientos de diferentes regiones de Brasil. Sin embargo, continuaron considerando todos los aislamientos como pertenecientes a una misma especie, *C. kikuchii*. Imazaki *et al.* (2006) utilizaron marcadores AFLP e información de secuencias de un fragmento de la tubulina (*tub2*) para comparar entre aislamientos de “*C. kikuchii*” argentinos y japoneses, encontrando diferentes “linajes” en Sudamérica y en Japón. Es interesante notar que esos autores no encontraron diferenciación significativa entre los países, contrario a lo observado en el presente trabajo.

### **Influencia de la acción antrópica**

En coincidencia con las conclusiones de Borges *et al.* (2018) para Brasil y EEUU, la estructuración de la variación taxonómica de los patógenos fúngicos aquí estudiados puede ser explicada por la preexistencia de determinadas especies polífagas de *Cercospora* en regiones donde la producción se hizo masiva hacia mediados de los '90. A esto habría que sumar la presencia de *C. kikuchii* y *C. sojina*, que presumiblemente serían patógenos específicos del género *Glycine*, no habiendo sido aislados de ningún otro hospedero, hasta el momento.

Respecto de la distribución de especies, un caso particularmente interesante lo constituye el aislamiento “Font”, proveniente de la localidad de Fontezuela (Partido de Pergamino, Buenos Aires). El mismo ha sido identificado como *C. cf. sigesbeckiae* tanto por el AED como por el análisis filogenético bayesiano. Esta constituye la primera cita del patógeno en Sudamérica y, por lo tanto, del registro de un caso de dispersión a larga distancia de un agente etiológico de esta enfermedad. Es probable que su llegada esté asociada al traslado de germoplasma desde los EEUU sin un protocolo fitosanitario eficiente, ni un control sanitario preciso. Es una práctica corriente que las empresas desarrolladoras de genética comercial se abastezcan de soja pre-comercial en Norteamérica.

Teniendo en cuenta la detección de dispersión a larga distancia aún con lo limitado del presente muestreo, los resultados aquí presentados refuerzan la necesidad de

adoptar prácticas mucho más cuidadosas en lo atinente al traslado de materiales, la identificación de patógenos y al manejo del ecosistema agrícola.

### **Implicancias en el desarrollo de variedades resistentes**

Como se mencionara anteriormente, los resultados de este trabajo conllevan la disrupción del modelo de enfermedad (un hospedero – un patógeno) habitual en fitopatología (Flor, 1971). El escenario expuesto es mucho más complejo y desafiante para las futuras tareas de mejoramiento genético y desarrollo de fungicidas, si se procura alcanzar un manejo ambiental y económicamente sustentable.

A la fecha, los estudios para la prospección de variedades de soja resistentes o tolerantes a la MPSS han mostrado una alta inconsistencia, variando de región en región, y de acuerdo con las condiciones de los ensayos (invernáculo, a campo, clima, suelo, etc.; Almeida *et al.* 2005). Esta inconsistencia podría estar basada por ejemplo, en la distribución de especies heterogénea, los altos niveles de variación genética ó los eventos de intercambio horizontal frecuentes. Recientemente Alloatti *et al.* (2015) comunicaron la identificación en soja de un gen mayor de resistencia a MPSS (el primero a nivel mundial) que denominaron *Rpss1*. Este *locus* fue detectado en la línea PI 80837 en una región que comprende 17,1 cM (centimorgans) del cromosoma 18. Sin embargo, siendo que dicho trabajo fue realizado en el estado de Arkansas, es altamente probable que la evaluación de la resistencia haya sido realizada con aislamientos de *C. cf. flagellaris* y/ó *C. cf. sigesbeckiae*. Por tanto, la utilidad de la línea PI 80837 como variedad resistente frente a los agentes causales de la MPSS sudamericanos debería ser cuidadosamente evaluada antes de incorporar dicho gen al germoplasma comercial local. Los recursos y tiempos de un programa de mejoramiento para la resistencia a una enfermedad específica son ingentes, y las decisiones erróneas pueden significar pérdidas millonarias tanto en términos de salida al mercado como, incluso de juicios por parte de los productores al ofrecer un producto comercial que no cumple con las especificaciones que se promocionan. Existen antecedentes en este sentido para el caso del cancro de la soja (Guillin *et al.* 2014).

## Implicancias en el control químico

Se ha registrado aquí un amplio rango de variación en el acervo génico de los agentes patógenos de la MPSS, en concordancia con lo observado por autores previos (Cai y Schneider 2008, Imazaki *et al.*, 2006, Almeida *et al.*, 2005). Si bien es difícil mensurar la presión selectiva ejercida por el control químico en condiciones de producción, ésta se asume considerable; consecuentemente, la tasa de evolución de la resistencia a fungicidas podría ser muy alta, sobre todo considerando la extensión cultivada, los enormes tamaños poblacionales, la variabilidad registrada y la ocurrencia de recombinación y/o TGH, como aquí se observó.

Los fungicidas utilizados para el control de enfermedades de la soja actúan mayoritariamente sobre proteínas específicas codificadas por genes simples (Maciel *et al.*, 2010; Deising *et al.*, 2008). Se han registrado casos de resistencia en otros patógenos fúngicos a partir de mutaciones puntuales (Maciel *et al.*, 2010). Estudios recientes (Price *et al.*, 2015) muestran variabilidad en la respuesta a fungicidas en poblaciones norteamericanas presumiblemente de *C. cf. flagellaris*. Por su parte, Soares *et al.* (2015) hallaron mutaciones que confieren resistencia a inhibidores de la cadena respiratoria (en el *locus cytb*), y a inhibidores de la polimerización de la tubulina (*locus tub*) en aislamientos argentinos, brasileños y norteamericanos. Esos aislamientos forman patrones reticulados (cfr., figura 4 en Soares *et al.* 2015). En la actualidad, esos *loci* están siendo secuenciados completamente para determinar si la presencia de dichas variantes se debe a mutaciones recurrentes seguidas de selección direccional ó a fenómenos de recombinación/TGH (L.O. de Oliveira, comunicación personal). Por otra parte, recientemente se ha detectado respuesta diferencial a distintas moléculas de control en aislamientos de MPSS de diversas regiones de la Argentina (Grijalba y Guillin, resultados no publicados). Todo lo antedicho muestra que a futuro, también el desarrollo de fungicidas deberá considerar la identidad de cada aislamiento, y el flujo eventual de las variantes génicas resistentes a los fungicidas dentro del

reservorio genético propio del singameón que conforma el agente causal de la MPSS.

### ***Aspectos metodológicos***

Una cuestión aún no saldada es la referente a la calidad y cantidad de información necesaria para una descripción precisa de una genealogía. Nadie ha demostrado hasta el momento, por ejemplo, que las preguntas relevantes al análisis filogenético se beneficiarán con la incorporación de datos genómicos (Morrison, 2015). La esencia de esta afirmación estriba en que no es posible la observación directa de los datos con independencia de conceptos, hipótesis y teorías (Kuhn, 1962); así, la mera acumulación de información es usualmente improductiva, cuando no contraproducente, debido a que a mayor cantidad de variables a utilizar (por ejemplo, *loci*), mayor será también la cantidad de estimadores (modelos evolutivos, variación en las tasas de sustitución entre sitios, errores propios de la secuenciación a gran escala, etc., Chan y Ragan, 2013; Song *et al.*, 2010), lo que implica a su vez una acumulación de errores en esas estimaciones.

Una aproximación metodológica alternativa (Morrison 2015), propone utilizar un grupo acotado de *loci* congruentes (información focalizada) que permita desarrollar un modelo de relaciones genealógicas representativo, si bien provisional. La intención del presente trabajo no ha sido entonces “reconstruir la historia evolutiva” de los agentes causales de la MPSS, sino elaborar un modelo de sus relaciones genealógicas, basado en las hipótesis, herramientas e información disponibles.

La congruencia condicional permitió analizar *loci* con historias evolutivas similares. El análisis filogenético bayesiano realizado con las regiones génicas propuestas por Groenewald *et al.* (2013) arrojó aquí un número de politomías y ramas con bajas probabilidades posteriores (menores a 0,7). La inclusión de *cfp*, *tub1* y *tub2* en los análisis produjo probabilidades posteriores mayores, lo que sugiere que estas regiones génicas aportan información significativa para el esclarecimiento de las relaciones intra-genéricas en *Cercospora*.

La utilización de información “focalizada y congruente” contribuye a la posibilidad de disminuir sensiblemente el costo de la producción de datos. Esta es una contribución relevante, y una aproximación contrastante con la tendencia actual al análisis genealógico mediante el uso de datos genómicos, o al menos de un siempre creciente número de *loci* (Chan y Ragan 2013; Philippe et al., 2017).

Se propuso aquí entonces una aproximación metodológica de “información focalizada y congruente” para el análisis genealógico de problemáticas específicas (“*problem-driven research*”, Brewer y Milgroom, 2010; Milgroom, 2001), en lugar de un paradigma (industrial) de colección de información en función de la tecnología y los presupuestos disponibles (“*technology-driven research*”).

Concretamente, la cantidad de *loci* a utilizar debería ser sopesada frente a su consistencia interna (congruencia entre *loci*) y el contenido informacional de cada uno. Ejemplos contrastantes en este último sentido lo constituyen los *loci cfp* e ITS; mientras que el primero muestra muy altos niveles de polimorfismo tanto intra como inter-específico, el ITS resulta prácticamente monomórfico (Groenewald et al. 2013, este trabajo), contrario a lo reportado en otros géneros fúngicos (Frederick et al., 2002).

Es importante poner de relieve (tal como lo plantean Bapteste et al., 2013; Nakhleh et al., 2013; Morrison, 2014a, b; Schliep et al., 2017) que la utilización incuestionada de herramientas analíticas clásicas (modelos arborescentes, estudios de variación poblacional intra-específica basados en el modelo de Wright-Fisher, etc.), no hubiera permitido poner en cuestión las hipótesis subyacentes, y desarrollar hipótesis novedosas, cuya validación ha venido a delinear un panorama epidemiológico de la MPSS completamente divergente con el consenso actual de la comunidad de fitopatólogos.

### ***Relevancia del estudio en la actividad productiva***

Se ha podido establecer con claridad que los supuestos sobre los que hasta el momento se ha trabajado en la MPSS (Price et al., 2015; Alloatti et al., 2015) distan de ser realistas. Por lo tanto, es menester modificar las estrategias a futuro, tanto

en el desarrollo de variedades como de moléculas fungicidas, teniendo en cuenta los conocimientos aquí vertidos sobre diversidad, filogenia e intercambio genético entre los agentes causales de la MPSS.

Un trabajo de vigilancia epidemiológica eficaz debería enfocarse también en la presencia de cepas fúngicas con resistencia para los agentes de control químico de uso corriente, mediante la indagación de aquellos *loci* que resulten blanco de moléculas específicas, además de los trabajos tradicionales de estimación de dosis letal 50 para las diferentes moléculas de control.

El presente trabajo representa un aporte al conocimiento de la estructura de la diversidad y variación genética de los agentes etiológicos de la MPSS; si bien sus conclusiones no pueden ser extrapoladas sin más, permiten llamar la atención sobre los consensos alcanzados hasta el momento en taxonomía de patógenos y en fitopatología, cuestionando también otros sistemas de planta-patógeno. Se espera además contribuir a la adopción de medidas de control (resistencia genética, rotación de cultivos, fungicidas) optimizadas, tal que se logre sustentabilidad en las múltiples dimensiones del entorno productivo.

Finalmente, se intenta poner de relieve la importancia de los estudios de fitopatógenos y de resistencia a nivel nacional y regional, en vez de sustentarse en conocimiento, tecnologías ó genética desarrollada en el exterior. Esta situación particular para un cultivo permite ejemplificar un panorama muchísimo más amplio, y muestra la necesidad de un Sistema Científico y Tecnológico planificado por el Estado en función de las diversas necesidades del país y su comunidad. Un sistema tal será entonces capaz de obtener tecnologías adecuadas a las condiciones locales y herramientas estratégicas para las necesidades regionales.

# Conclusiones y perspectivas

## Conclusiones

El presente estudio demuestra cómo metodologías y conceptos netamente teóricos permiten poner en duda supuestos arraigados, y aportan ideas y aproximaciones alternativas para resolver situaciones prácticas y productivas.

- En América, el agente causal del tizón de la hoja y la MPSS no está constituido por una única especie, *Cercospora kikuchii*, sino por al menos cinco: *Cercospora* sp. H, *Cercospora* sp. Q, *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* y *C. kikuchii*.
- Estas especies se encuentran distribuidas de manera heterogénea en las zonas productivas del continente americano.
- Se ha verificado un alto nivel de variación genética entre los agentes causales de la MPSS y que también dicha variación está estructurada geográficamente.
- Se ha evidenciado alta frecuencia de TGH, cuyos mecanismos deben estudiarse más profundamente.
- Los agentes causales de la MPSS constituirían un singameón ó multiespecie.
- La situación epidemiológica expuesta es extremadamente compleja, y altera los supuestos subyacentes hasta el momento en las tareas de desarrollo de cultivares resistentes, como así también de fungicidas para el control químico de estos patógenos.
- La Información presentada sugiere la adopción de medidas que promuevan la heterogeneidad genética del cultivo (rotación de cultivares, de fungicidas, control biológico) y agroecológica (rotación de cultivos) en el tiempo y el espacio.
- Los trabajos de prospección para la resistencia genética deben ser realizados a nivel local, debido a la heterogeneidad en la distribución de especies.

# Perspectivas

A partir de los resultados y conclusiones alcanzadas en la presente Tesis, sería pertinente:

- Incrementar la magnitud del muestreo de patógenos tanto en cultivo como en malezas asociadas, para establecer a una escala más fina, la distribución de especies y la estructura genética en la Argentina.
- Analizar la relación entre sintomatología, condiciones ambientales y especie patógena particular que produce la infección.
- Profundizar estudios de respuesta diferencial a fungicidas, analizando correspondencia con la presencia de especies variadas, y/o de transferencia interespecífica de mutaciones que brinden resistencia a fungicidas.
- Caracterizar los *loci cfp*, *tub1* y *tub2* en los ejemplares tipo de especies de *Cercospora*, a fin de contribuir a clarificar las relaciones taxonómicas dentro del grupo.
- Desarrollar sistemas de monitoreo con instalaciones diagnósticas apropiadas que posibiliten la detección de patógenos emergentes y la adopción de medidas de cuarentena para prevenir su entrada en áreas libres.

# Referencias

- Ackermann, R. R., & Arnold, A. M. M. L. (2015). The Hybrid Origin of “ Modern ” Humans. *Evolutionary Biology*, 1 – 11.
- Agüero, S., & Veliz, S. (2012). Enfoque eointegrador de la cuestión ambiental y la sojización en la Argentina. *Monografías de La UNGS.*, 1–15.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactionson Automatic Control*, 19(6), 716–723.
- Albu, S. (2015). Evolutionary Relationships among Fungal Soybean Pathogens and Molecular Marker Development in the Genus *Cercospora*. Tesis Doctoral, Louisiana University. 168 páginas
- Alloatti, J., Chen, P., Zeng, A., Li, S., Rupe, J., Florez-Palacios, L., & Orazaly, M. (2015). Inheritance of and molecular markers for purple seed stain resistance in soybean. *Euphytica*, 206(3), 701–709.
- Álvaro M. R. Almeida, Piuga, F. F., Marin, S. R. R., Binneck, E., Sartori, F., Costamilan, L. M., Lopes, M. (2005). Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia Brasileira*, 30(6), 594–602.
- Bakhshi, M., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A., Groenewald, J. Z., Braun, U., & Crous, P. W. (2015). Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34, 65–86.
- Bapteste, E., Janke, A., Mcinerney, J., Whitfield, J. B., Bapteste, E., Iersel, L. Van, ... Steel, M. (2013). Networks : Expanding evolutionary thinking. *Trends in Genetics* 29 (8): 439 – 441.
- Beimforde, C., Feldberg, K., Nylinder, S., Rikkinen, J., Tuovila, H., Drfelt, H., ... Schmidt, A. R. (2014). Estimating the Phanerozoic history of the Ascomycota lineages: Combining fossil and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 77(1), 307–319.
- Bengtson, S., Rasmussen, B., Ivarsson, M., Muhling, J., Broman, C., Marone, F., ... Bekker, A. (2017). Fungus-like mycelial fossils in 2.4-billion-year-old vesicular basalt. *Nature Ecology and Evolution*, 1(6), 1–6.
- Bolton, M. D., Rivera, V. V, Campbell, L. G., Bolton, M. D., Secor, G. A., Rivera, V., ... Schoch, C. (2012). Evaluation of the potential for sexual reproduction in field populations of *Cercospora beticola* from USA. *Fungal Biology*, 116(4), 511–521.
- Borges, L. L., Ferreira, T. F., Lana, M. G., Caliman, I. D., Bluhm, B. H., & Oliveira, L. O. (2018). Multi-host species of *Cercospora* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybean. *Tropical Plant Pathology* 43: 170–177
- Braun, U., Crous, P. W., & Nakashima, C. (2014). Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 2. Species on monocots (Acoraceae to Xyridaceae, excluding Poaceae). *IMA Fungus*, 5(2), 203–390.
- Braun, U., Crous, P. W., & Nakashima, C. (2015). Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 3. Species on monocots (Poaceae, true grasses). *IMA Fungus*, 6(1), 25–97.

- Braun, U., Crous, P. W., & Nakashima, C. (2016). Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 5. Species on dicots (Anacardiaceae to Annonaceae). *IMA Fungus*, 7(1), 161–216.
- Braun, U., Nakashima, C., & Crous, P. W. (2013). Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 1. Species on other fungi, Pteridophyta and Gymnospermae. *IMA Fungus*, 4(2), 265–345.
- Brewer, M. T., & Milgroom, M. G. (2010). Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 268.
- Bruen, T. C., Philippe, H., & Bryant, D. (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics*, 172(4), 2665–2681.
- Brummitt, R. K. (2001). *World Geographical Scheme for Recording Plant Distributions Edition 2. Group*.
- Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2), 275–304.
- Bryant, D., & Moulton, V. (2004). Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21(2), 255–265.
- Butterfield, N. J. (2005). Probable Proterozoic fungi. *Paleobiology* 31(1), 165–182.
- Cabrera, A. L. (1971). *Fitogeografía de la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 1 – 42.
- Cai, G., & Schneider, R. W. (2008). Population Structure of *Cercospora kikuchii*, the Causal Agent of Cercospora Leaf Blight and Purple Seed Stain in Soybean. *Phytopathology* 98, 823–829.
- Campbell, V., Legendre, P., & Lapointe, F. (2011). The performance of the Congruence Among Distance Matrices (CADM) test in phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 64.
- Chan, C. X., & Ragan, M. A. (2013). Next-generation phylogenomics. *Biology Direct* 8: 1–6.
- Chand, R., Singh, V., Kumar, P., & Pal, C. (1954). The Genus *Cercospora*: Biology and Taxonomy. *En: Fungal leaf spot diseases of annual and perennial crops. Westville Publishing House.* :30-39.
- Chupp, C. (1954). A Monograph of the Fungus Genus *Cercospora*. Ithaca University Press 667 pp.
- Crous, P.W.; Braun, U. (2003). *Mycosphaerella* and its *anamorphs*: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. *CBS Biodiversity Series* 571 pp.
- Crous, P. W., Schoch, C. L., Hyde, K. D., Wood, A. R., Gueidan, C., de Hoog, G. S., & Groenewald, J. Z. (2009). Phylogenetic lineages in the *Capnodiales*. *Studies in Mycology*, 64, 17–47.

- Daub, M. E., & Briggs, S. P. (1983). Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. *Plant Physiology*, 71(4), 763–766.
- Daub, M. E., & Ehrenshaft, M. (2000). The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin : Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38: 461 – 490.
- Deising, H. B., Reimann, S., & Pascholati, S. F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 286–295.
- Douhan, G. W., Martin, D. P., & Rizzo, D. M. (2007). Using the putative asexual fungus *Cenococcum geophilum* as a model to test how species concepts influence recombination analyses using sequence data from multiple loci. *Current Genetics*, 52(5–6), 191–201.
- Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4).
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
- Edwards, S. V., Xi, Z., Janke, A., Faircloth, B. C., McCormack, J. E., Glenn, T. C., ... Davis, C. C. (2016). Implementing and testing the multispecies coalescent model: A valuable paradigm for phylogenomics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 447–462.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491.
- Fitzpatrick, D. A. (2012). Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 329(1), 1–8.
- Frederick, R. D., Snyder, C. L., Peterson, G. L., & Bonde, M. R. (2002). Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection and Discrimination of the Soybean Rust Pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology*, 92(2), 217–227.
- Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J. D., ... Oliver, R. P. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*, 38(8), 953–956.
- Giribet, G., & Wheeler, W. C. (1999). On gaps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(1), 132–143.
- Gluck-Thaler, E., & Slot, J. C. (2015). Dimensions of Horizontal Gene Transfer in Eukaryotic Microbial Pathogens. *PLoS Pathogens*, 11(10), 1–7.
- González, A. M., Turino, L., G, M., & Rapela, L. (2008). *Cercospora kikuchii* aislada en la provincia de Santa Fe ( Argentina ): variabilidad genética y producción de cercosporina in vitro. *Rev. Iberoamericana de Micología* 237–241.
- Gotelli, N., & Colwell, R. (2011). Estimating species richness. *Biological Diversity. Frontiers in Measurement and Assessment*, (2), 39–54.
- Groenewald, J. Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Jama, A. N., Groenewald, M., Braun, U.,

- & Crous, P. W. (2013). Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 115–170.
- Groenewald, M., Linde, C. C., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2008). Indirect evidence for sexual reproduction in *Cercospora beticola* populations from sugar beet. *Plant Pathology*, 57(1), 25–32.
- Grünwald, N. J., & Goss, E. M. (2011). Evolution and population genetics of exotic and re-emerging pathogens: novel tools and approaches. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 249–267.
- Guillin, E. A., de Oliveira, L. O., Grijalba, P. E., & Gottlieb, A. M. (2017). Genetic entanglement between *Cercospora* species associating soybean purple seed stain. *Mycological Progress*, 16(6), 593–603.
- Guillin, E. A., Grijalba, P. E., Oliveira, L. O. de, & Gottlieb, A. M. (2014). Specific boundaries between the causal agents of the soybean stem canker. *Tropical Plant Pathology*, 39(4), 316–325.
- Hartman, G. L., Rupe, J. C., Sikora, E. F., Domier, L. L., Davis, J. A., & Steffey, K. L. eds. (2015). *Compendium of Soybean Diseases and Pests*. 201 pp
- Heath, M. (1981). A generalized concept of host-parasite specificity. *Phytopathology* : 1121-1123.
- Heitman, J. (2015). Evolution of sexual reproduction : A view from the fungal kingdom supports an evolutionary epoch with sex before sexes. *Fungal Biology Reviews*, 29(3–4), 108–117.
- Hidayat, I., & Meeboon, J. (2011). Genus *Cercospora* in Thailand: Taxonomy and Phylogeny (with a dichotomous key to species). *Plant Pathology* 11 – 87.
- Huelsenbeck, J. P., & Cunningham, C. W. (1996). Combining data in phylogenetic analysis. *Trends. Ecol. Evol.* 11: 152–158.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2001). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* 23: 254 – 277.
- Hyten, David; Specht, J. E., Shoemaker, R. C., Hyten, D. L., Song, Q., Zhu, Y., Choi, I., ... Cregan, P. B. (2006). Impact of genetic bottlenecks on soybean genome diversity Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity, *PNAS* 103: 16666 – 16671.
- Inglis, P. W., Teixeira, E. A., Ribeiro, D. M., Valadares-Inglis, M. C., Tigano, M. S., & Mello, S. C. M. (2001). Molecular markers for the characterization of Brazilian *Cercospora caricis* isolates. *Current Microbiology*, 42(3), 194–198.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., ... Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), 818–822.
- Jombart, T. (2008). Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405.

- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components : a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 94.
- Kamvar, Z. N., Brooks, J. C., & Grünwald, N. J. (2015). Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics*, 6, 1–10.
- Kim, H., Newell, A. D., Cota-Sieckmeyer, R. G., Rupe, J. C., Fakhoury, A. M., & Bluhm, B. H. (2013). Mating-type distribution and genetic diversity of *Cercospora sojina* populations on soybean from Arkansas: evidence for potential sexual reproduction. *Phytopathology*, 103(10), 1045–1051.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120
- Kluge, A. (1989). A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology*, 38(1), 7–25.
- Knowles, L. L., & Carstens, B. C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56(6), 887–895.
- Kondrashov, A. S. (1994). Muller's Ratchet under epistatic selection. *Genetics* 136: 1469–1473.
- Kruskal H y Wallis W. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Statistical American*. 47: 583–621.
- Kuhn, T. S. (1970). *The Structure of Scientific Revolutions*. *Philosophical Review* (Vol. II).
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870 – 1874.
- Lackey, J. A. (1980). Chromosome Numbers in the Phaseoleae (Fabaceae : Faboideae) and their Relation to Taxonomy. *Botanical Society of America* 67: 595–602.
- Lapegna, P. (2007). Transgénicos, “desarrollo sustentable” y (neo) liberalismo en Argentina. *Cultura y Transformaciones Sociales En Tiempos de Globalización. Perspectivas Latinoamericanas*, 20.
- Lavilla, M; Ivancovich, A. (2016). Propuestas de escalas para la evaluación, a campo y en laboratorio, del “tizón foliar” y la “mancha púrpura de la semilla”, causadas por *Cercospora kikuchii*, en soja. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/666>
- Leache, A. D., & Fujita, M. K. (2010). Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1697), 3071–3077
- Lee, G., Crawford, G. W., Liu, L., Sasaki, Y., & Chen, X. (2011). Archaeological Soybean (*Glycine max*) in East Asia : Does Size Matter ?, *PlosOne* 6: e26720
- Legendre, P. L. (2005). Species Associations : The Kendall Coefficient, *Journal of*

*Agricultural, Biological and Environmental Statistics 10*: 226–245.

- Lepage, B. A., Currah, R. S., & Stockey, R. A. (1994). The fossil fungi of the Princeton chert. *International Journal of Plant Sciences*, 55, 828–836.
- Levinton, J. S. (1970). The paleoecological significance of opportunistic species. *Lethaia*, 3, 69–78.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Linkem, C. W., Minin, V. N., & Leaché, A. D. (2016). Detecting the anomaly zone in species trees and evidence for a misleading signal in higher-level skink phylogeny (Squamata: *Scincidae*). *Systematic Biology*, 65(3), 465–477.
- Liu, L., & Edwards, S. V. (2009). Phylogenetic analysis in the anomaly zone. *Systematic Biology*, 58(4), 452–460.
- Maciel, E F., Cristina, M., Freire, M., Almeida, Á. M. R. De, & Oliveira, L. O. De. (2010). Molecular characterization of beta-tubulin from *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Genet Mol Biol.* 358, 354–358.
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1(1), 1–5.
- Metzenberg, R. L. (1990). The role of similarity and difference in fungal mating. *Genetics* 125: 457 – 462.
- Milgroom, M. G. (2001). The synthesis of genetics and epidemiology: Contributions of population biology in plant pathology. *Journal of Plant Pathology*, 83, 57–62.
- Morrison, D. A. (2010). Using Data-Display Networks for Exploratory Data Analysis in Phylogenetic Studies Research article, 27(5), 1044–1057.
- Morrison, D. A. (2014a). Is the tree of life the best metaphor, Model, or heuristic for Phylogenetics? *Systematic Biology*, 63(4), 628–638.
- Morrison, D. A. (2014b). Phylogenetic Networks : A Review of Methods to Display Evolutionary History, 4(10), 1518–1543.
- Morrison, D. A. (2015). Next generation sequencing and phylogenetic networks, (December), 0–4.
- Morrone, J. J. (2001). *Biogeografía de América Latina y el Caribe. M&T - Manuales & Tesis SEA* (Vol. 3). Zaragoza, 148 pp.
- Muller HJ. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* (732), 2–9.
- Nakhleh, L. (2013). Computational approaches to species phylogeny inference and gene tree reconciliation. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(12), 719–728.
- Nei, M., & Miller, J. C. (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data.

*Genetics*, 125(4), 873–879.

- Nieuwenhuis, B. P. S., & James, T. Y. (2016). The frequency of sex in fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1706), 20150540.
- Paoletti, M., Seymour, F. A., Alcocer, M. J. C., Kaur, N., Calvo, A. M., Archer, D. B., & Dyer, P. S. (2007). Mating Type and the Genetic Basis of Self-Fertility in the Model Fungus *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*, 17(16), 1384–1389.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290.
- Philippe, H., Vienne, D. M. de, Ranwez, V., Roure, B., Baurain, D., & Delsuc, F. (2017). Pitfalls in supermatrix phylogenomics. *European Journal of Taxonomy*, (283), 1–25.
- Pontecorvo, G. (1956). The parasexual cycle in fungi 393–400.
- Posada D. & Crandall, K. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecology and Evolution* 5347(00), 37–45.
- Price, T. D., Bar-yosef, O., Price, T. D., & Bar-yosef, O. (2017). The Origins of Agriculture : New Data , New Ideas An Introduction to Supplement 4, 52 (October 2011).
- Price, T., Padgett, G. B., Purvis, M., Cai, G., Robertson, K., Schneider, R., & Albu, S. (2015). Fungicide resistance in *Cercospora kikuchii*, a soybean pathogen. *Plant Disease*, 99(11).
- Pritchard, J. K., Stephen M. S. and Donnelly, P. D. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945 - 959
- Qiu, H., Cai, G., Luo, J., Bhattacharya, D., & Zhang, N. (2016). Extensive horizontal gene transfers between plant pathogenic fungi. *BMC Biology*, 14(1), 41.
- Queiroz, A. De, & Gatesy, J. (2006). The supermatrix approach to systematics, 22(1).
- Queiroz, K. De. (1998). The General Lineage Concept of Species , Species Criteria , and the Process of Speciation and Terminological Recommendations. *Endless Forms: Species and Speciation*, 57–75.
- Rannala, B., & Yang, Z. (2003). Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics*, 164(4), 1645–1656.
- Regina, S., Marin, R., Lopes-da-silva, M., Almeida, Á. M. R., ... Sartori, F. (2005). cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*, (January 2016).
- Roca, M. G., Read, N. D., & Wheals, A. E. (2005). Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249(2), 191–198.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542.

- Sathiko, Â., Luiz, K. I., Bassay, E., Li, B., Arrais, M., & Li, L. (2011). Aerobiologia de *Cercospora kikuchii*. 1682–1688.
- Schliep, K., Potts, A. J., Morrison, D. A., & Grimm, G. W. (2017). Intertwining phylogenetic trees and networks. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1212 – 1220.
- Schoch, C. L., Sung, G. H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., ... Spatafora, J. W. (2009). The ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224–239
- Schoch, C. L., Sung, G. H., Volkmann-Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., & Spatafora, J. W. (2007). Marine fungal lineages in the Hypocreomycetidae. *Mycological Research*, 111(2), 154–162.
- Soanes, D., & Richards, T. a. (2014). Horizontal gene transfer in eukaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 583–614.
- Soares, A. P. G., Guillin, E. A., Borges, L. L., Da Silva, A. C. T., De Almeida, Á. M. R., Grijalba, P. E., Gottlieb AM, De Oliveira, L. O. (2015). More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye. *PLoS ONE*, 10(8), 1–20.
- Song, H. O. J. U. N., Sheffield, N. C., & Stephen, L. (2010). When phylogenetic assumptions are violated : base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics.
- Stewart, S., & Rodríguez, M. (2013). Manual de identificación de enfermedades de la soja. *INIA, Boletín de Divulgación* 104, 74.
- Stoddart, J. A., & Taylor, J. F. (1988). Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. *Genetics*, 118, 705–711.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437–460.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678–687.
- Taylor J, Jacobson D, F. M. (1999). The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Ann. Rev. Phytopathol.* 37: 197 – 246.,
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22), 4673–4680.
- Van Valen, L. (2009). Ecological Species , Multispecies , and Oaks. *Taxon*, 25(2), 233–239.

- Verkley, G. J. M., , W. Quaedvlieg, H.-D. Shin , P.W. Crous, (2014). Studies in Mycology. *Studies in Mycology*, 79, 1–47.
- Walters, H. (1980). Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease* 64: 961 – 963.
- Wen, D., Yu, Y., & Nakhleh, L. (2016). Bayesian Inference of Reticulate Phylogenies under the Multispecies Network Coalescent. *PlosGenetics* 12: 1–17.
- Wilson, A. M., Wilken, P. M., Nest, M. A. Van Der, Steenkamp, E. T., Wingfield, M. J., & Brenda, D. (2015). Homothallism : an umbrella term for describing diverse sexual behaviours, *IMA Fungus* 6, 207–214.
- Winder, I., & Winder, N. (2014). Reticulate evolution and the human past : An anthropological perspective. *Annals of Human Biology* 300-311.
- Woolley, S. M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2008). A comparison of phylogenetic network methods using computer simulation. *PLoS ONE* 3(4).
- Wrather, A., Box, P. O., Koenning, S., & Carolina, N. (2009). Effects of Diseases on Soybean Yields in the United States 1996 to 2007. *Plant Health Progress Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2010-0125-01-RS
- Wright, S. (1930). Evolution in mendelian populations. *Bulletin of Mathematical Biology*, 52(1–2), 241–295.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9264–9269.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2017). Bayesian species identification under the multispecies coalescent provides significant improvements to DNA barcoding analyses. *Molecular Ecology*, 26(11), 3028–3036.
- Yin, Z., Zhu, B., Feng, H., & Huang, L. (2016). Horizontal gene transfer drives adaptive colonization of apple trees by the fungal pathogen *Valsa mali*. *Scientific Reports*, 6, 1–9.
- Zhang, C., Rannala, B., & Yang, Z. (2014). Bayesian species delimitation can be robust to guide-tree inference errors. *Systematic Biology*, 63(6), 993–1004.
- Zhang, N., Magee, B. B., Magee, P. T., Holland, B. R., Rodrigues, E., Holmes, A. R., ... Schmid, J. (2015). Selective Advantages of a Parasexual Cycle for the Yeast *Candida albicans*. *Genetics* 200 :1117–1132.

# Apéndice

## Tablas suplementarias

Tabla A1. Congruencia entre matrices de distancia para los loci analizados en el dataset 1. Diagonal superior, valores del test de Mantel para las comparaciones de a pares; diagonal inferior, nivel de significación para cada comparación entre *loci*.

	<b>cfp</b>	<b>tub1</b>	<b>tub2</b>	<b>Cytb</b>
<b>cfp</b>		0.68	0.64	0.46
<b>tub1</b>	0.001		0.80	0.46
<b>tub2</b>	0.001	0.001		0.45
<b>cytb</b>	0.001	0.001	0.001	

Tabla A2. Congruencia entre pares de matrices de distancia para el dataset 2. Diagonal superior, valores del test de Mantel para las comparaciones de a pares; diagonal inferior, nivel de significación para cada comparación entre *loci*.

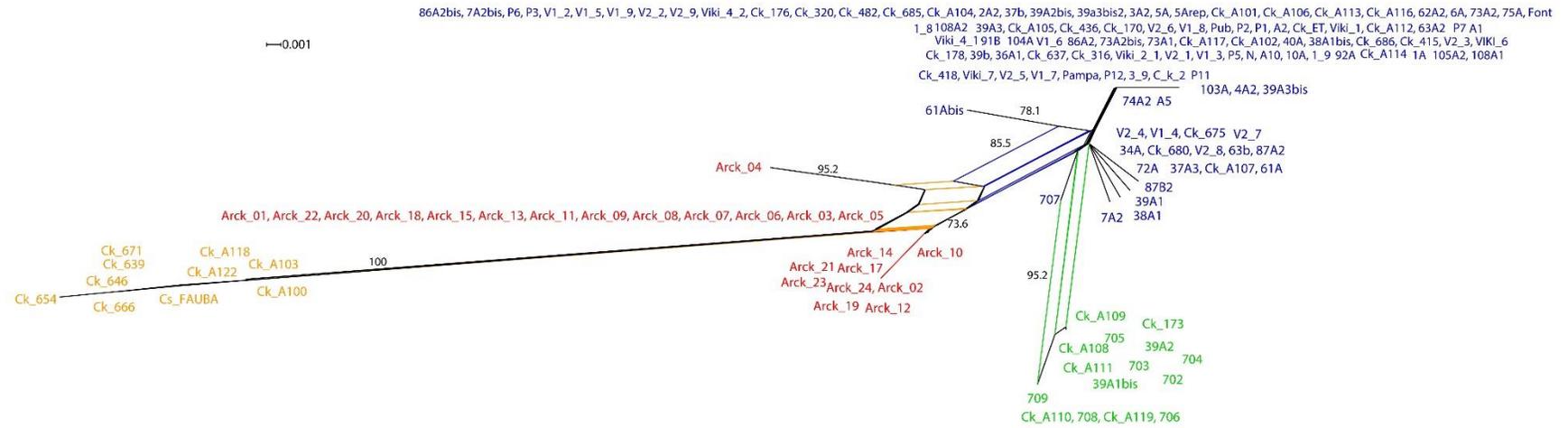
	<b>act</b>	<b>Cal</b>	<b>Cfp</b>	<b>Cytb</b>	<b>tef</b>	<b>tub1</b>	<b>tub2</b>
<b>act</b>		0.27	0.46	0.37	0.31	0.42	0.37
<b>cal</b>	0.002		0.28	0.10	0.14	0.36	0.26
<b>cfp</b>	0.001	0.001		0.46	0.57	0.68	0.64
<b>cytb</b>	0.001	0.101	0.001		0.52	0.46	0.45
<b>tef</b>	0.003	0.037	0.001	0.001		0.63	0.58
<b>tub1</b>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		0.80
<b>tub2</b>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	

Tabla A3. Congruencia entre pares de matrices de distancia para el *dataset* 3. Diagonal superior, valores del test de Mantel para las comparaciones de a pares; diagonal inferior, nivel de significación para cada comparación entre *loci*.

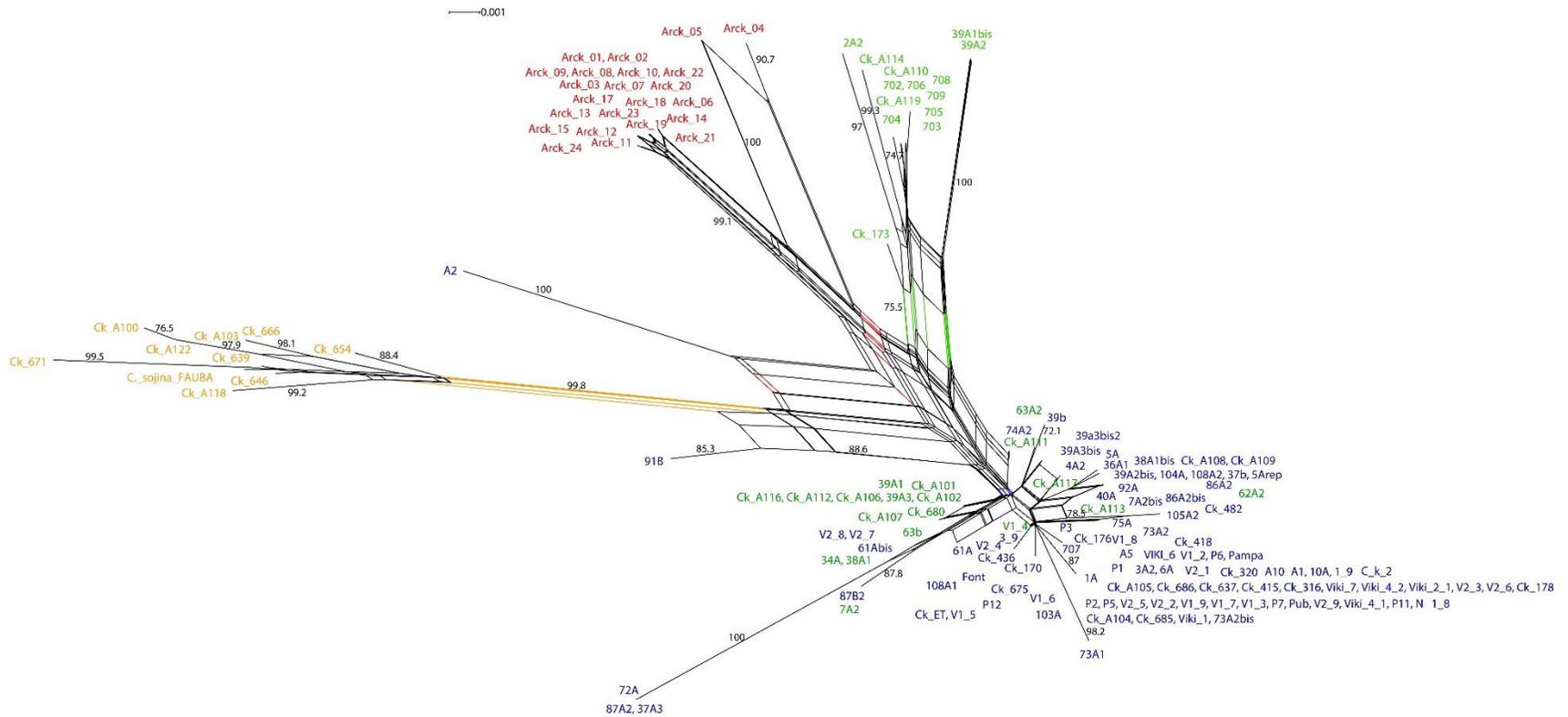
	<b>act</b>	<b>cal</b>	<b>His</b>	<b>ITS</b>	<b>Tef</b>
<b>act</b>		0.46	0.62	0.36	0.47
<b>cal</b>	0.001		0.44	0.58	0.63
<b>his*</b>	0.001	0.001		0.46	0.64
<b>ITS</b>	0.002	0.001	0.001		0.45
<b>tef</b>	0.001	0.001	0.001	0.001	

## *Figuras suplementarias*

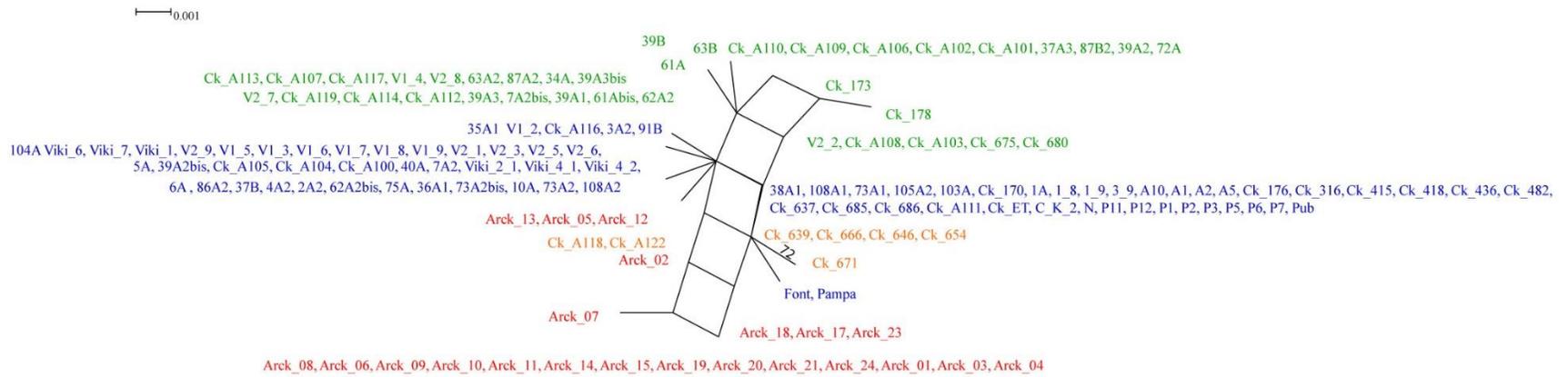




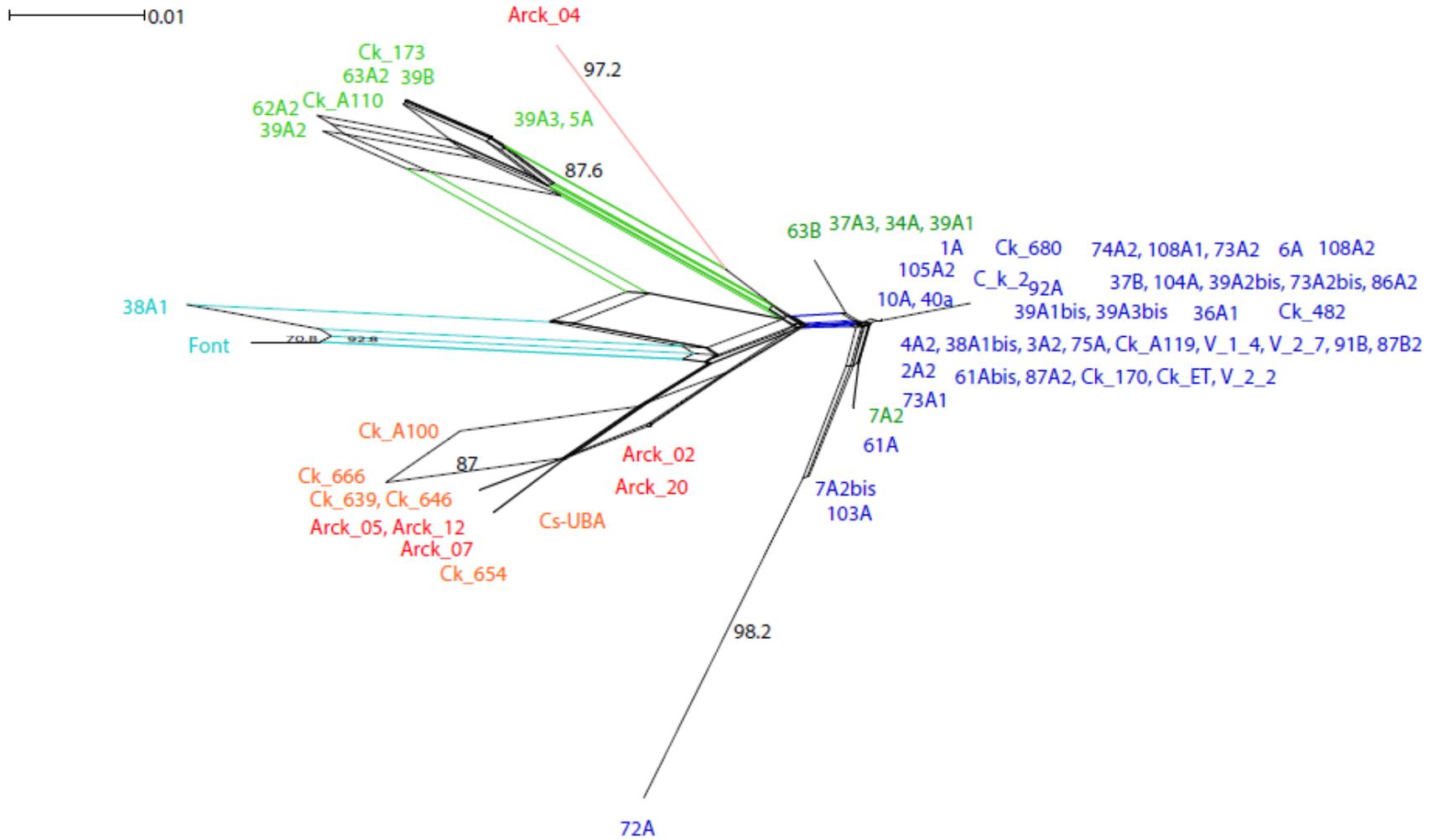
**Figura A2.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el *locus tub1* (dataset 1). FIT: 99,05



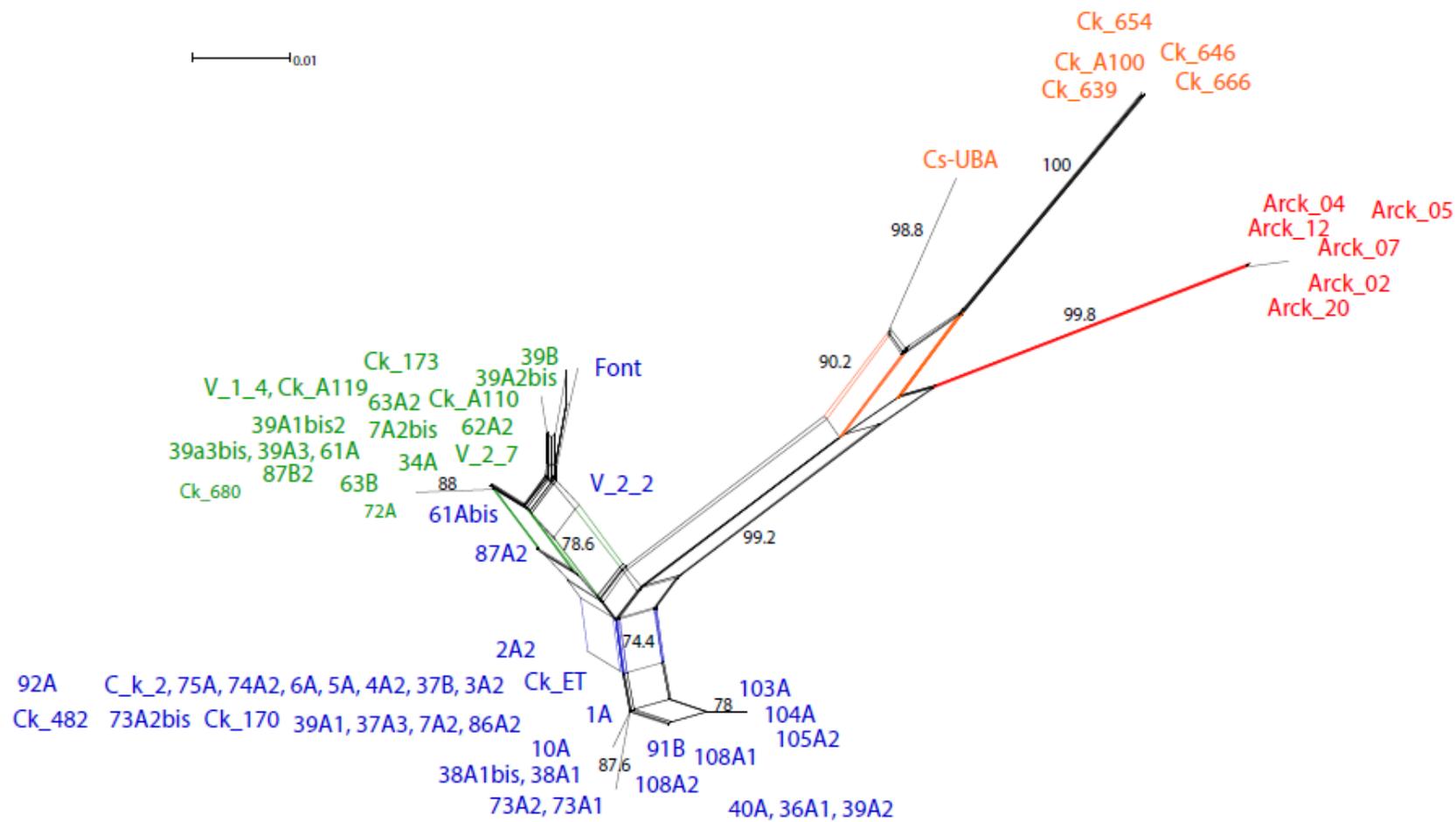
**Figura A3.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el *locus tub2* (dataset 1). FIT: 96,79



**Figura A4.** Topología resultante del análisis de NeighborNet para el *locus cytb* (dataset 1). FIT: 99,96



**Figura A5.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el locus *act* (dataset 2). FIT: 95,30



**Figura A6.** Topología resultante del análisis de NeighborNet para el locus *cal* (dataset 2). FIT: 98,50

0.01

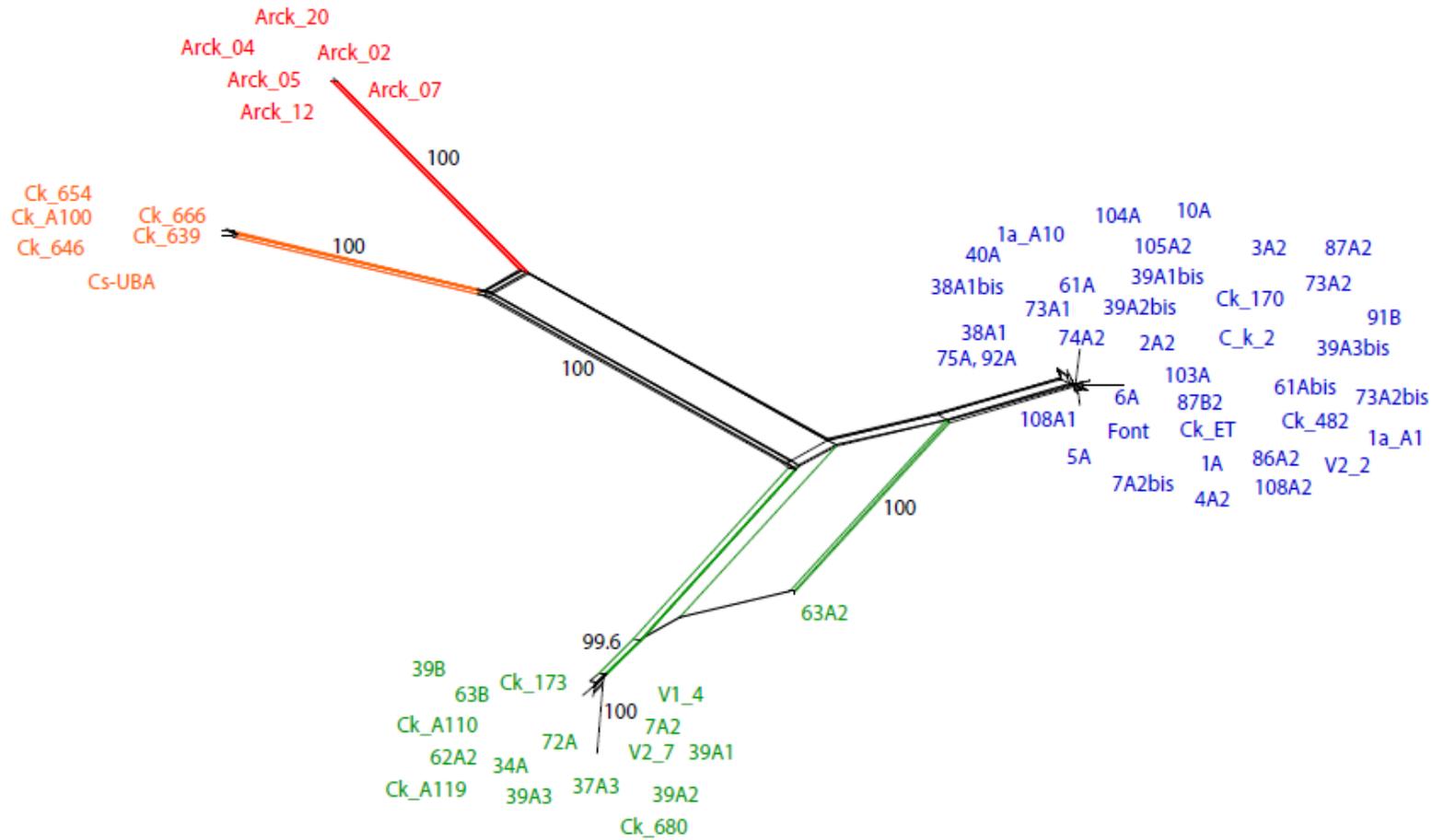
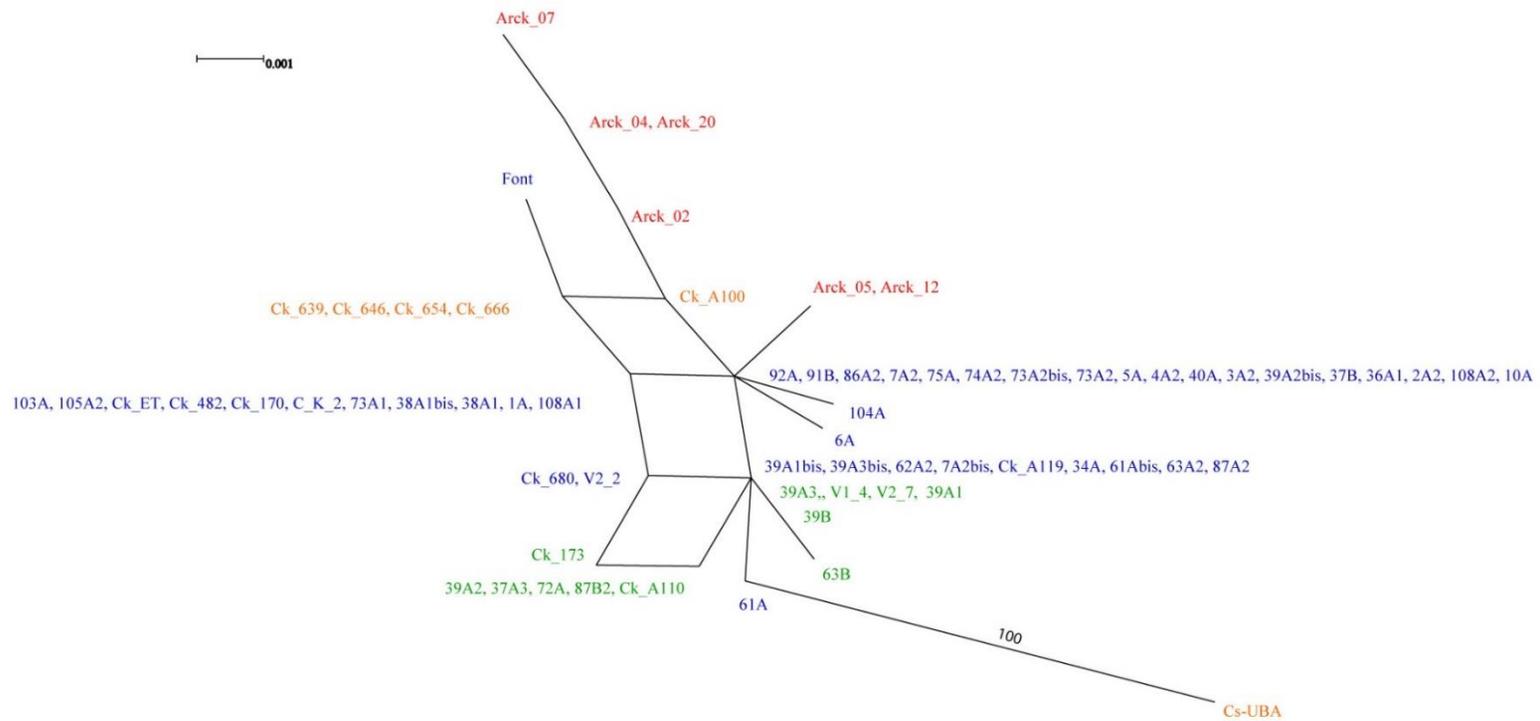
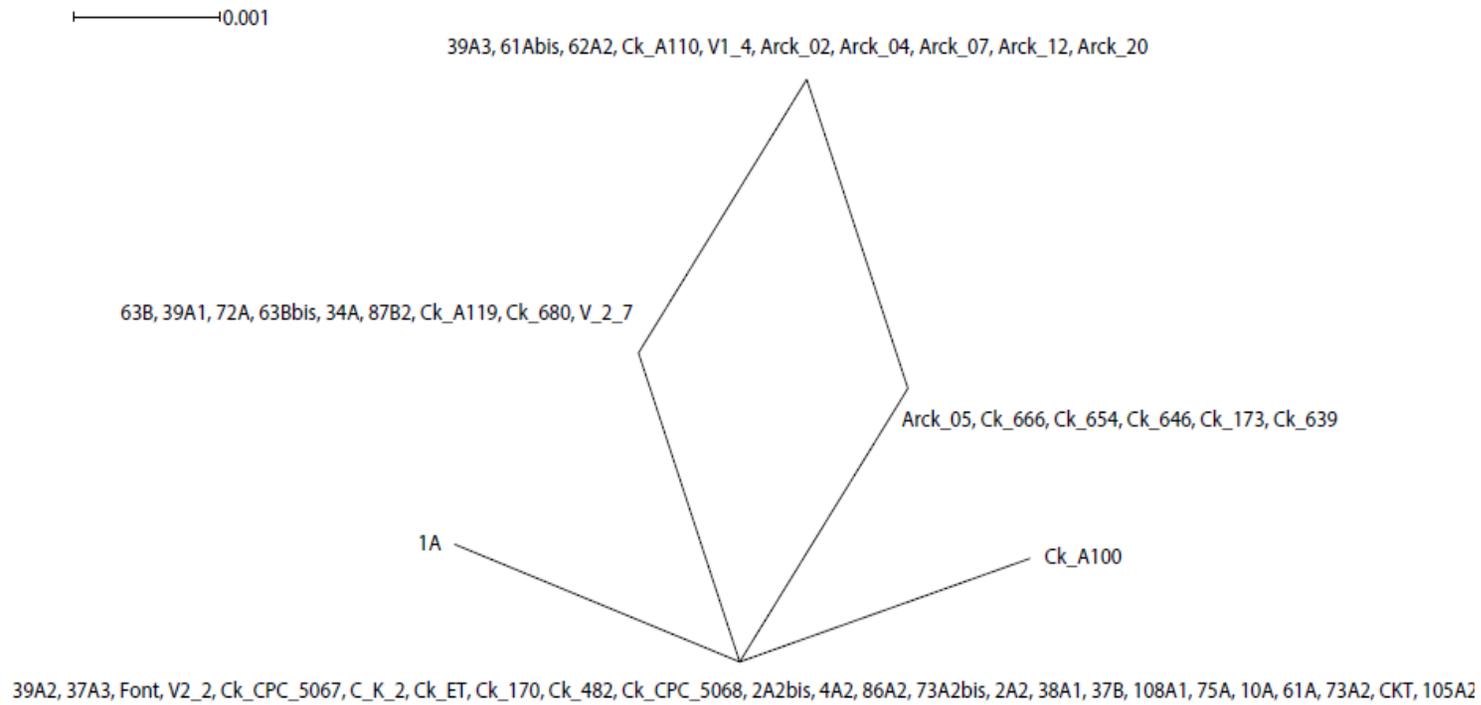


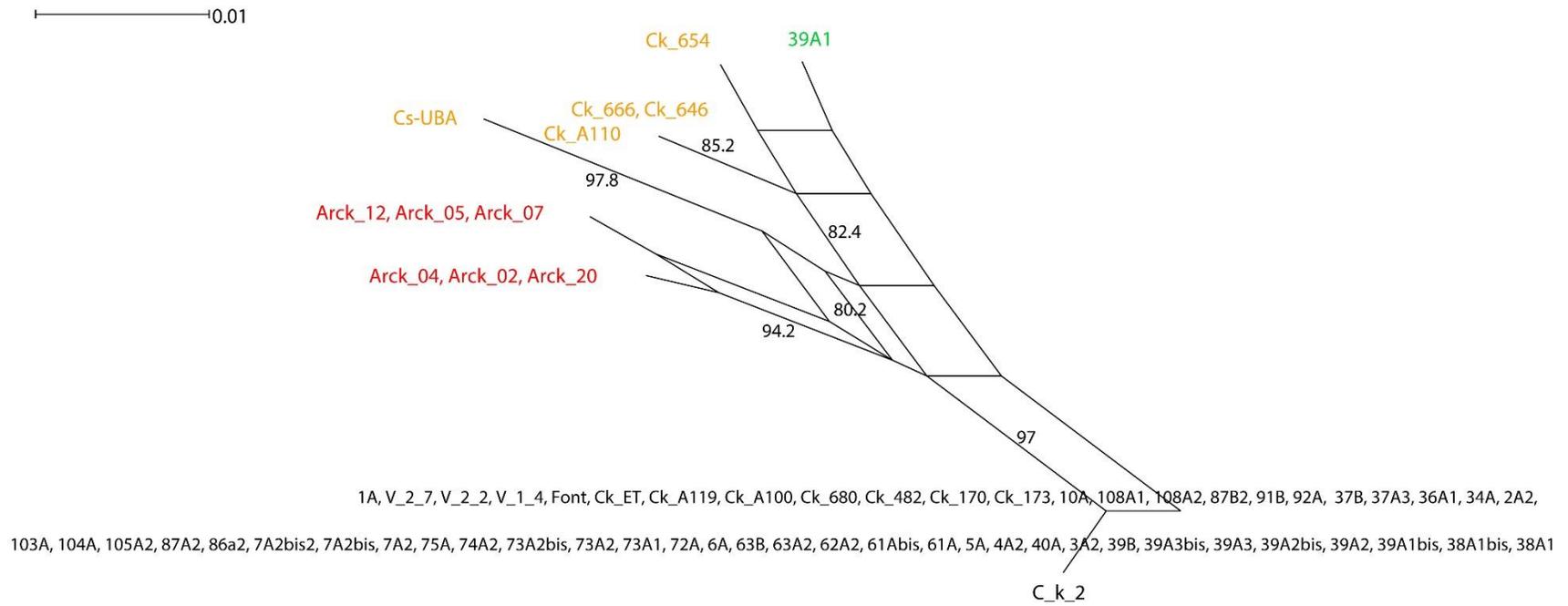
Figura A7. Topología resultante del análisis de NeighborNet para el locus *cfp* (dataset 2). FIT: 99,40



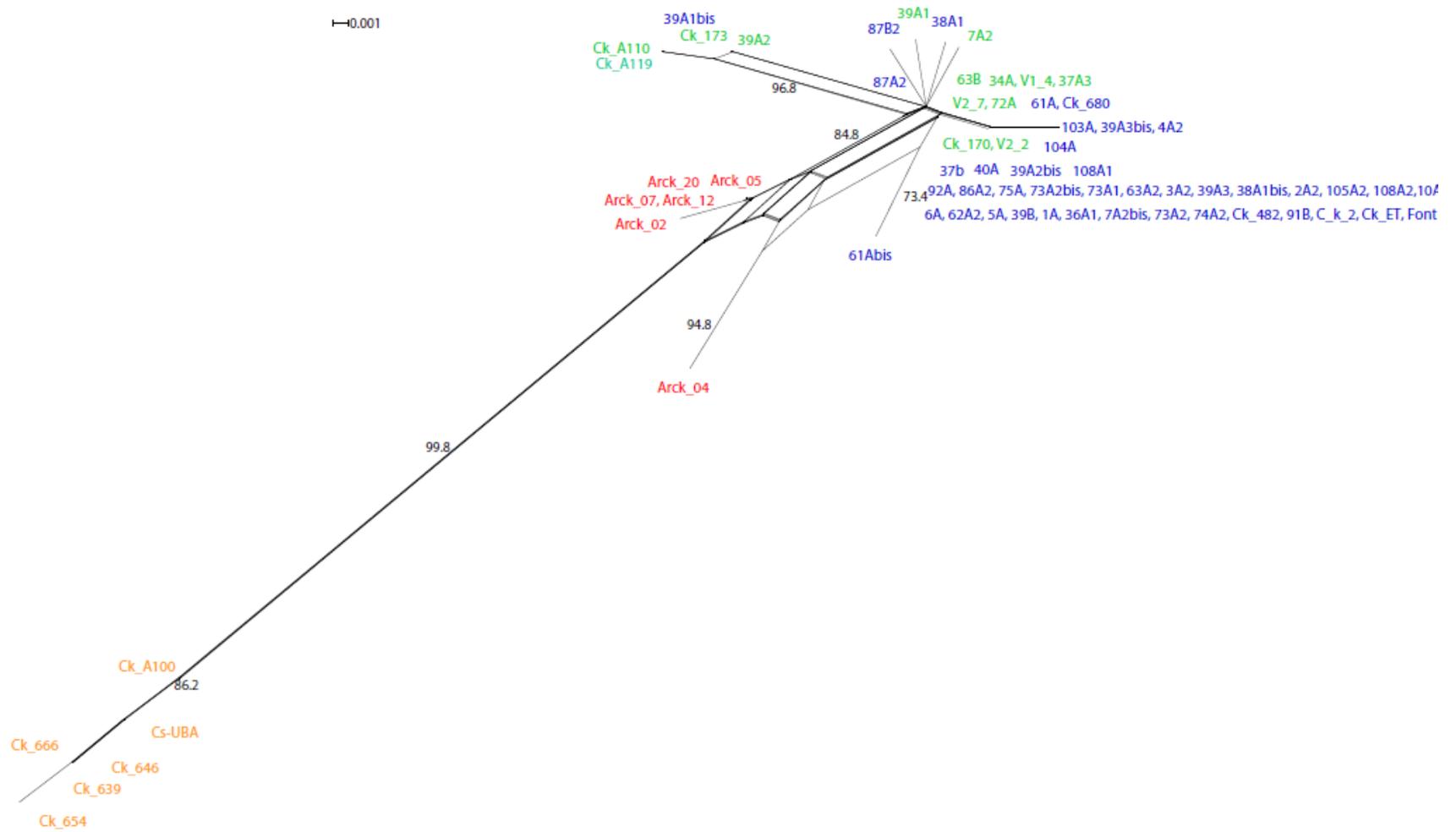
**Figura A8.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el locus *cytb* (dataset 2). FIT: 99,94



**Figura A9.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el locus ITS (*dataset 2*). FIT: 100



**Figura A10.** Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el locus *tef 1- $\alpha$*  (dataset 2). FIT: 100



**Figura A11.** Topología resultante del análisis de NeighborNet para el locus *tub1* (dataset 2). FIT: 99,23

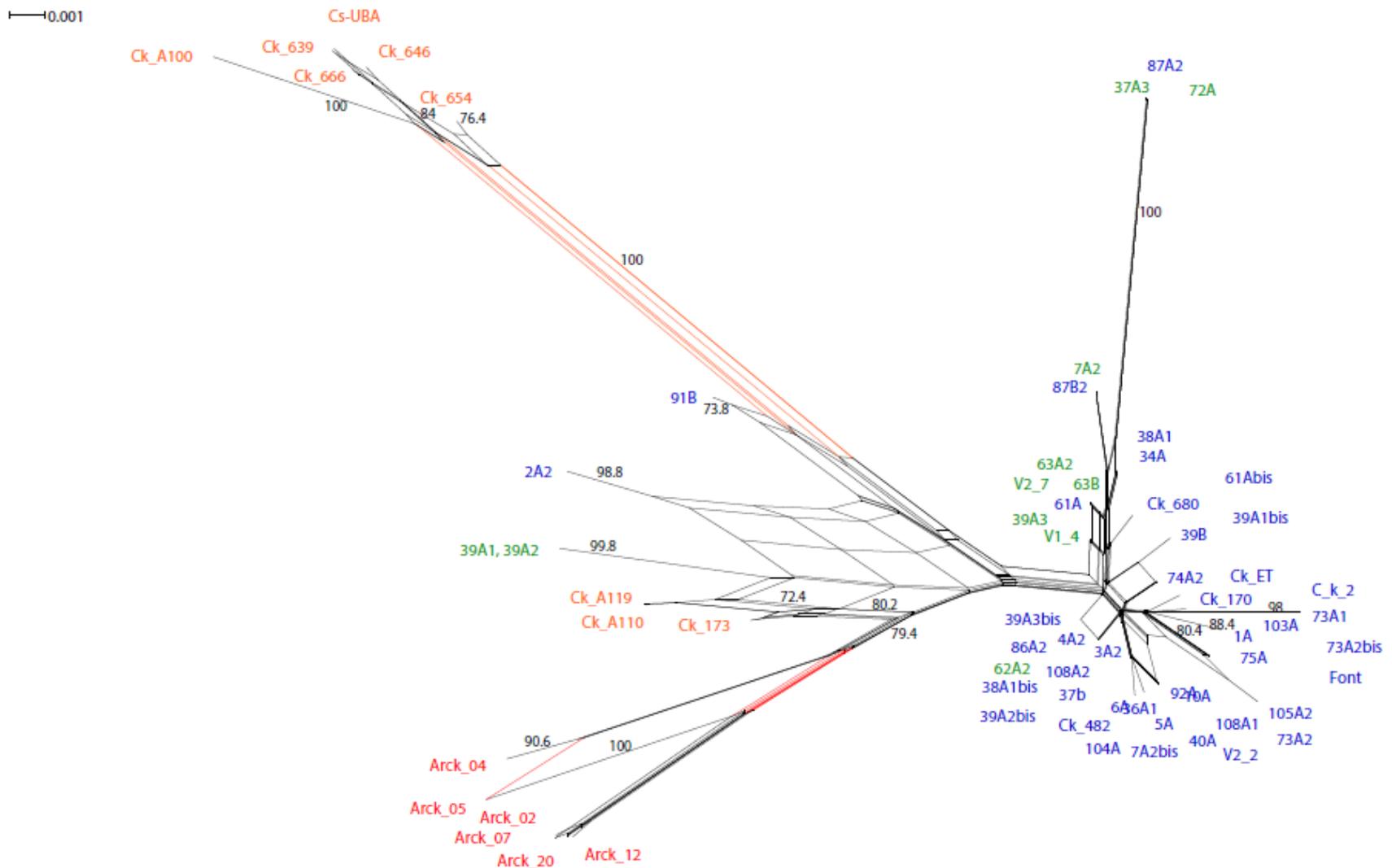


Figura A12. Topología resultante del análisis de *NeighborNet* para el locus *tub2* (dataset 2). FIT: 99,88

