

Etiology of soybean (*Glycine max*) leaf spot in Sinaloa, Mexico

Etiología de la mancha foliar en soya (*Glycine max*) en Sinaloa, México

Iris Alejandrina González-Molotla, Rubén Félix-Gastélum*, Karla Yeriana Leyva-Madriral, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Los Mochis, Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, CP 81223, México; **Francisco Roberto Quiroz-Figueroa, Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza**, Departamento de Biotecnología Agrícola, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional-IPN, Unidad Sinaloa. Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave, Sinaloa, CP 81101, México. *Autor para correspondencia: ruben.felix@uadeo.mx.

Recibido: 11 de Mayo, 2021.

Aceptado: 16 de Julio, 2021.

González-Molotla IA, Félix-Gastélum R, Leyva-Madriral KY, Quiroz-Figueroa FR and Maldonado-Mendoza IE. 2021. Etiology of soybean (*Glycine max*) leaf spot in Sinaloa, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 371-390.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2105-2>

Primera publicación DOI: 02 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 02, 2021.

Resumen. La soya es una de las leguminosas más importantes en el mundo. En años recientes en el norte de Sinaloa se ha observado incidencia de mancha foliar en la etapa de llenado de grano e inicio de la madurez. El objetivo del presente trabajo fue identificar el agente causal de esta enfermedad. Se colectaron muestras de foliolos sintomáticos en ocho lotes comerciales de soya, de los cuales se obtuvieron ocho aislados fúngicos, y se identificaron morfológica y molecularmente. Se realizaron pruebas

Abstract. Soybean is one of the most important legumes worldwide. In recent years, in the North of Sinaloa the incidence of a leaf spot has been observed at the growth stages of full seed and beginning maturity. The objective of the present study was to identify the causal agent of the disease. Symptomatic soybean leaflets were collected from eight commercial fields, from which eight fungal isolates were obtained and identified morphologically and molecularly. Pathogenicity tests were performed on soybean var. Nainari. The Koch postulates were fulfilled by the re-isolation of the original isolates from the inoculated plants. The morphological analyses determined the genus *Curvularia* associated to the soybean leaf spot. The phylogenetic analysis of the gene *gapdh* allowed the identification of *Curvularia ahvazensis*, *C. muehlenbeckiae*, *C. spicifera* and *Curvularia* sp. These species were pathogenic on soybean var. Nainari presenting variation in virulence since the area foliage diseased varied from 3 to 31%.

de patogenicidad en plantas de soya var. Nainari y se confirmaron los postulados de Koch, mediante el reaislamiento de los aislados originales. Los análisis morfológicos determinaron al género *Curvularia* asociado a la mancha foliar de la soya. El análisis filogenético del gen *gadh* permitió la identificación de *Curvularia ahvazensis*, *C. muelhenbeckiae*, *C. spicifera* y *Curvularia* sp. Estas especies resultaron patogénicas en soya var. Nainari mostrando variación en virulencia, pues el área foliar afectada varió de 3 a 31%. Los resultados abren nuevas líneas de investigación relacionadas con el impacto de la enfermedad en el rendimiento y calidad de la cosecha de la soya en Sinaloa.

Palabras clave: *Curvularia*, leguminosa, patogenicidad, *gadh*.

La soya (*Glycine max*) representa una de las leguminosas más importantes en el mundo, donde destacan como países productores Estados Unidos de Norteamérica, Brasil y Argentina, con producciones de 125 millones de toneladas y Argentina con 50 millones de t (FAO, 2020). La importancia de la soya en México radica en la aplicación de subproductos que tienen demanda en el ámbito alimenticio para la elaboración de harinas y aceites comestibles. En México se sembraron 155,000 ha en 2019, con una producción de 233, 000 t y un rendimiento promedio de 1.6 t ha⁻¹ (SIAP, 2020). Sinaloa, ocupa el primer lugar en cuanto a soya cultivada en superficie de riego con 10,331 ha, con una producción de 24,718 t y un rendimiento de 2.4 t ha⁻¹ durante el ciclo primavera-verano (SIAP, 2020). La producción y calidad de soya en el mundo se ve limitada por agentes abióticos y bióticos en estos últimos sobresalen las enfermedades.

En Estados Unidos de Norteamérica las pérdidas anuales por enfermedades de la soya se estiman en

The results open new research lines regarding the impact of the disease on yield and quality of soybean in Sinaloa.

Key words: *Curvularia*, leguminous, pathogenicity, *gadh*.

The soybean (*Glycine max*) is one of the world's most important legumes, with countries such as the United States, Brazil and Argentina standing out as the largest producers, the first two of which produce around 125 million tons and the latter, 50 million (FAO, 2020). The importance of the soybean in Mexico lies in the application of sub-products that have a high demand in the food market for the production of flour and edible oils. Mexico planted 155,000 ha of the crop in 2019, with a production of 233, 000 t and an average yield of 1.6 t ha⁻¹ (SIAP, 2020). Sinaloa is the state with the most soybean planted under irrigation, with 10,331 ha, a production of 24,718 t and a yield of 2.4 t ha⁻¹ during the spring-summer cycle (SIAP, 2020). The production and quality of the soybean worldwide has been limited by abiotic and biotic agents, including, particularly, diseases.

In the United States, annual losses due to diseases are estimated in 4.5 billion dollars (Bandara *et al.*, 2020). Foliar diseases include brown spot (*Septoria glycines*), frog-eye leaf spot (*Cercospora sojina*), leaf blight and purple seed stain (*Cercospora kikuchii*), anthracnosis (*Colletotrichum truncatum*), pod and stem blight (*Phomopsis sojiae*), mildew (*Peronospora manshurica*), leaf spot by *Alternaria* (*Alternaria* spp.), ring spot (*Corynespora cassiicola*), bacterial pustule (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*) and bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) (Carmona *et al.*, 2010). These diseases are known as late-season diseases (EFC), since they take place in plants in the stage of maturity, which

4.5 billones de dólares (Bandara *et al.*, 2020). Las enfermedades foliares incluyen a la mancha marrón (*Septoria glycines*), mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*), tizón de la hoja y mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*), antracnosis (*Colletotrichum truncatum*), tizón de la vaina y tallo (*Phomopsis sojiae*), mildiú (*Peronospora manshurica*), mancha foliar por *Alternaria* (*Alternaria* spp.), mancha anillada (*Corynespora cassiicola*), pústula bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*) y tizón bacteriano (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) (Carmona *et al.*, 2010). A estas enfermedades se les conoce como de fin de ciclo, pues ocurren en plantas en etapa de madurez, lo cual coincide con un ambiente lluvioso y cálido (Carmona *et al.*, 2015).

En Sinaloa se han consignado a *C. sojina*, *C. cassiicola*, *C. kikuchii* y *P. manshurica* como agentes causales de la mancha foliar de la soya (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019). En virtud de la alta incidencia de la enfermedad en ciclos agrícolas recientes, se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos: a) identificar al agente causal mediante estudios morfométricos y moleculares y b) determinar la patogenicidad de los hongos asociados a la enfermedad en lotes comerciales de esta fabácea durante el verano de 2018.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras y obtención de aislamientos monospóricos. La colecta de folíolos de plantas de soya con síntomas en el Valle del Carrizo y Valle del Fuerte, se llevó a cabo en los meses de septiembre y octubre de 2018 (Cuadro 1). Se obtuvieron muestras de ocho lotes comerciales de soya var. Nainari. Los predios variaron de 10 a 30 ha de cultivo, cinco en etapa de llenado de grano (R6) y tres en etapa de inicio de la madurez (R7) (Fehr y Caviness, 1977); en cada lote se utilizó el método de

coincides with a warm and rainy environment (Carmona *et al.*, 2015).

In Sinaloa, *C. sojina*, *C. cassiicola*, *C. kikuchii* and *P. manshurica* have been confirmed as causal agents of the foliar spot disease in soybean (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019). Given the high incidence of the disease in recent agricultural cycles, this investigation was performed with the following aims: a) to identify the causal agent with morphometric and molecular studies, and b) to determine the pathogenicity of the fungi related to the disease in commercial fields of this legume during the summer of 2018.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples and obtaining monosporic isolates. Symptomatic soybean plant leaflets were collected in the del Carrizo and del Fuerte valleys between September and October, 2018 (Cuadro 1). Samples were taken from eight commercial soybean var. Nainari fields. These varied between 10 and 30 ha of crops, five in the stage of grain filling (R6) and three in the stage of the beginning of maturity (R7) (Fehr and Caviness, 1977); in each lot, the sampling method used (five of gold) was to select five plants, out of which five leaflets, each with light to dark brown foliar spots surrounded by a yellow halo were taken. The isolates of fungi related to symptomatic leaflets were carried out in agar water (AA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, Mexico) following procedures described by Maraite *et al.* (1997). They were incubated at 25 ± 2 °C for 72 h, until mycelial growth was observed. To purify the isolates, hypha tips were transferred to potato-dextrose-agar (PDA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, Mexico).

The monosporic isolates were obtained by serial dilutions, which were planted in the AA at

Cuadro 1. Sitios de colecta de aislados fúngicos de foliolos de plantas de soya var. Nainari con síntomas en el Valle del Carrizo y Valle del Fuerte.
Table 1. Areas in which fungal isolates were obtained from symptomatic leaflets of soybean plants var. Nainari were collected in the del Carrizo and del Fuerte valleys.

Aislado	Localidad	Fecha	Latitud Norte	Longitud Oeste
Cv-3	Ejido Chihuahuita, Ahome	01/sept/2018	26° 9' 56"	109° 2' 57"
Cv-4	Ejido Chihuahuita, Ahome	01/sept/2018	26° 9' 46"	109° 2' 26"
Cv-5	Poblado 5, Ahome	01/sept/2018	26° 11' 26"	109° 3' 24"
Cv-8	Poblado 5, Ahome	01/sept/2018	26° 11' 26"	109° 3' 43"
Cv-11	Ejido Chihuahuita, Ahome	01/sept/2018	29° 9' 12"	109° 2' 57"
Cv-19	El Carrizo, Ahome	15/sept/2018	26° 18' 44.43"	108° 59' 30.27"
Cv-21	El Carrizo, Ahome	15/sept/2018	26° 18' 1.01"	109° 2' 3.81"
Cv-29	Bachoco, Guasave	02/oct/2018	25° 43' 55.83"	108° 46' 33.98"

muestreo de cinco de oros para seleccionar cinco plantas de las cuales se tomaron cinco foliolos con manchas foliares de un color café claro a oscuro rodeadas de un halo amarillento. Los aislamientos de hongos asociados a foliolos sintomáticos se realizaron en agua agar (AA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) siguiendo procedimientos descritos por Marañón *et al.* (1997). Las siembras se incubaron a 25 ± 2 °C por 72 h, hasta observar crecimiento micelial. Para la purificación de los aislados, se transfirieron puntas de hifas a papa-dextrosa-agar (PDA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México).

Los aislados monospóricos se obtuvieron mediante diluciones seriales, que se sembraron en AA al 1.6% y se incubaron durante 4 h; de ahí un conidio germinado se transfirió a medio PDA y las siembras se incubaron a 25 °C. Los aislados monospóricos se conservaron a 15 °C en tubos de ensayo con PDA inclinado, adicionados con aceite mineral (Flores-Córdova *et al.*, 2013).

Características fenotípicas de colonias miceliales. Las características fenotípicas de las colonias se determinaron en PDA. Los cultivos se incubaron por 11 días a 25 °C, con un régimen de 12 h de

1.6% and incubated for 4 h; a germinated conidium was transferred from there to a PDA medium and the plants were incubated at 25 °C. Monosporic isolates were stored at 15 °C in tilted test tubes with PDA, with added mineral oil (Flores-Córdova *et al.*, 2013).

Phenotypic characteristics of mycelial cultures.

The phenotypic characteristics of the cultures were determined with PDA. The cultures were incubated for 11 days at 25 °C, with a 12 h light-darkness regime, and the mycelial growth rate was determined (Kim *et al.*, 2005), along with the color of the culture, using standard Kelly and Judd colors (1976).

Morphometry of the conidia of isolates.

Fragments, 5 mm in diameter, were cut from the margin of the four-day-old cultures in PDA and transferred to the same medium. The shape and color of the septa, as well as the length and width of 40 conidia from each isolate were determined seven days after planting in the same medium and incubated at 25 °C. Preparations were then made with lactophenol blue to be measured in a micrometer installed in a compound microscope

luz y 12 h de oscuridad, y se determinó la tasa de crecimiento micelial (Kim *et al.*, 2005) y el color de la colonia, usando colores estándares de Kelly y Judd (1976).

Morfometría de los conidios de los aislados.

Fragmentos de 5 mm de diámetro se cortaron del margen de las colonias de cuatro días de edad en PDA y se transfirieron al mismo medio. La forma, número de septos, así como la longitud y ancho de 40 conidios de cada aislado se determinó a los siete días después de la siembra en el mismo medio e incubados a 25 °C. Posteriormente, se hicieron preparaciones con azul de lactofenol para medirse mediante un micrómetro instalado en un microscopio compuesto (Labmed; Lab America, Inc. Los Angeles, CA, USA).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 50-100 mg de micelio en cultivos en PDA de siete días, utilizando el reactivo DNAzol (Molecular Research Center Inc., Car. No. DN127, Cincinnati, OH, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del ADN extraído se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Para confirmar la identidad de los aislados, se amplificó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), utilizando los iniciadores *gpd1* (5'-CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG-3') y *gpd2* (5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG C-3'), que amplifican un fragmento de aproximadamente 580 pares de bases (Berbee *et al.*, 1999). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 mL, los cuales contenían 1 mL de ADN genómico, Buffer GoTaq Flexi 1X, 1.25 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada iniciador, 0.2 mM de dNTP's y 1 U de DNA polimerasa GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI, USA). Las condiciones de amplificación

(Labmed; Lab America, Inc. Los Angeles, CA, USA).

Extraction of DNA, PCR and sequencing.

The extraction of genomic DNA was carried out using 50-100 mg of mycelia in seven-day-old PDA cultures, using DNAzol as a reagent (Molecular Research Center Inc., Car. No. DN127, Cincinnati, OH, USA), following the instructions by the manufacturer. The quality and concentration of the DNA extracted was determined in a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). To confirm the identity of the isolates, the gene from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was amplified using primers *gpd1* (5'-CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG-3') and *gpd2* (5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG C-3'), which amplify a fragment of approximately 580 pairs of bases (Berbee *et al.*, 1999). The PCR's reaction took place in a final volume of 50 mL, which contained 1 mL of genomic DNA, GoTaq Flexi 1X Buffer, 1.25 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each primer, 0.2 mM of dNTP's and 1 U of DNA polymerase GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI, USA). Amplification conditions were as follows: initial denaturalization at 95 °C for 2 min, 35 denaturalization cycles at 95 °C for 1 min, alignment at 60 °C for 1 min, an extension at 72 °C for 45 s and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were visualized in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide in a Chemidoc (BIO-RAD) and the bands of interest were split for their later purification using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quantification of the purified PCR products were carried out with a NanoDrop 2000c spectrophotometer. The fragments were sequenced unidirectionally with the primer *gpd1* in an AB3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in the genomic

fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 60 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 45 s y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, en un Chemidoc (BIO-RAD) y las bandas de interés fueron escindidas para su posterior purificación utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany). La cuantificación de los productos de PCR purificados se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c. Los fragmentos se secuenciaron unidireccionalmente con el iniciador *gpd1* en un equipo AB3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en el laboratorio de servicios genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

Análisis filogenético. Las secuencias se editaron en el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y fueron comparadas contra otras secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BlastN. Las secuencias se alinearon junto con un set de 68 secuencias de referencia del género *Curvularia* y una secuencia de *Bipolaris maydis* como grupo externo (Madrid *et al.*, 2014; Manamgoda *et al.*, 2015; Tomaso-Peterson *et al.*, 2016; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019), utilizando el alineador MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en MegaX (Kumar *et al.*, 2018). El análisis filogenético se realizó en MegaX, empleando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), con distribución gamma (cuatro categorías) y sitios invariables. Todos los “gaps” fueron considerados en el análisis y la robustez de la topología se evaluó con 1000 réplicas bootstrap. Finalmente, el filograma se editó en el software FigTree versión 1.4.0 (Rambaut, 2014).

services lab of the National Genomic Laboratory for Biodiversity (LANGEBIO).

Phylogenetic analysis. The sequences were edited in the software BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) and compared with other sequences deposited in the GenBank data base, using the BlastN algorithm. The sequences were aligned along with a set of 68 references sequences of the genus *Curvularia* and a sequence of *Bipolaris maydis* as an external group (Madrid *et al.*, 2014; Manamgoda *et al.*, 2015; Tomaso-Peterson *et al.*, 2016; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019), using the MUSCLE aligner (Edgar, 2004) implemented in MegaX (Kumar *et al.*, 2018). The phylogenetic analysis was carried out in MegaX, using the maximum likelihood method and the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model, with a gamma distribution (four categories) and unvariable sites. All the gaps were considered in the analysis and the robustness of the topology was evaluated with 1000 bootstrap replications. Finally, the phylogram was edited using the software FigTree version 1.4.0 (Rambaut, 2014).

Pathogenicity tests in a greenhouse. To determine the pathogenicity of the eight isolates associated with the disease, soybean plants var. Nainari were used, which were planted in 5L plastic pots with a pasteurized substrate (sand 48.0, silt 19.4 and clay 32.5%, respectively and a pH of 7.0); one seed was placed in each pot. The plants were watered according to each one’s requirements and fertilized every week with Miracle-Gro (The Scotts Company LLC; Marysville, Ohio, USA), following the manufacturer’s recommendations. Four replicates were used for each isolate (four pots with one plant each).

Pruebas de patogenicidad en invernadero. Para determinar la patogenicidad de los ocho aislados asociados a la enfermedad, se utilizaron plantas de soya var. Nainari, las cuales se sembraron en macetas de plástico de 5 L de capacidad con sustrato pasteurizado (arena 48.0, limo 19.4 y arcilla 32.5%, respectivamente y pH 7.0); se colocó una semilla por maceta. Las plantas se regaron según sus requerimientos hídricos y se fertilizaron semanalmente con Miracle-Gro (The Scotts Company LLC; Marysville, Ohio, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se emplearon cuatro repeticiones por aislamiento (cuatro macetas con una planta).

Preparación de inóculo. Los aislados monoclonales se desarrollaron en PDA a 25 °C, con un régimen de 12 h luz y 12 h de oscuridad durante 10 días. Los conidios se obtuvieron agregando 10 mL de agua destilada estéril a cada cultivo y raspando con una espátula estéril para desprenderlos. Las suspensiones de conidios se filtraron a través de doble malla quesera para remover el micelio (Prieto *et al.*, 2016) y las concentraciones de inóculo de cada aislado se ajustaron de 5×10^4 a 7×10^4 conidios mL^{-1} mediante un hematocitómetro.

Las suspensiones conidiales se asperjaron en plantas (en etapa R6) hasta punto de escurrimiento. Las plantas testigo se asperjaron con agua destilada estéril. Posteriormente, las plantas se cubrieron durante 24 h con bolsas plásticas de 90 x 20 cm con papel absorbente saturado con agua destilada para lograr humedad relativa de 85-90% en su interior y se mantuvieron de 22 a 28 °C; posteriormente se sometieron siete días consecutivos a las mismas condiciones de humedad y temperatura durante 12 h diarias. Después, las plantas permanecieron 21 días sobre los estantes del invernadero donde la temperatura varió de 20 a 24 °C con rangos de humedad relativa de 50 a 75%. Las plantas inoculadas

Preparation of inoculum. The monoconidial isolates were developed in PDA at 25 °C, with a 12 h light-darkness regime for 10 days. The conidia were obtained by adding 10 mL of sterile distilled water to each culture and scraping with a sterilized spatula to release them. The conidial suspensions were filtered through a double cheese mesh to remove the mycelia (Prieto *et al.*, 2016) and the inoculum concentrations of each isolate were adjusted from 5×10^4 to 7×10^4 conidia mL^{-1} with a hemacytometer.

The conidial suspensions were sprayed on plants (in the R6 stage) to the point of run-off. The control plants were sprayed with sterile distilled water. The plants were then covered for 24 h with 90 x 20 cm plastic bags with paper towels saturated with distilled water to achieve a relative humidity of 85-90% in their interior and they were kept at 22 to 28 °C; they underwent the same moisture and temperature conditions for 12 h a day, every day for seven consecutive days. The plants then remained for 21 days on the greenhouse benches, where temperatures ranged from 20 to 24 °C with relative humidity ranges of 50 to 75%. The inoculated and control plants were distributed in a totally random design. The pathogenicity of the isolates was determined 30 days after inoculation. Ten leaflets were collected at random from each plant and the percentage of the leaf area affected (LAA) was determined, following procedures described Soares *et al.* (2009). To comply with Koch's postulates, after the experiments, isolates were carried out from symptomatic leaflets taken from inoculated plants. The identity of the isolates was confirmed based on the morphology of the cultures and the morphometry of twenty conidia from each isolate.

Statistical analysis. The percentages of LAA were transformed using the arcsine function (Gómez y Gómez, 1984) before performing an ANOVA. The

y testigo se distribuyeron en un arreglo completamente al azar. La patogenicidad de los aislados se determinó a los 30 días después de la inoculación. Se colectaron 10 folíolos al azar de cada planta y se determinó el porcentaje de área foliar afectada (AFA) de acuerdo a procedimientos descritos por Soares *et al.* (2009). Para cumplir con los postulados de Koch, al final de los experimentos se efectuaron aislamientos a partir de folíolos sintomáticos de las plantas inoculadas. La identidad de los aislados se confirmó con base en la morfología de las colonias y la morfometría de veinte conidios de cada aislado.

Análisis estadístico. Los porcentajes de AFA se transformaron usando la función arcoseno (Gómez y Gómez, 1984), previo al ANOVA. La comparación de medias se realizó mediante el procedimiento de Tukey (Little y Hills, 1973), utilizando el paquete estadístico SAS® versión 9.4 (1999). Los experimentos se condujeron en dos ocasiones. En virtud de que los análisis estadísticos indicaron interacción significativa entre los aislados y los experimentos, se presentan los resultados de los dos experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características culturales y morfométricas de los aislados fúngicos. Las características fenotípicas de las colonias, los conidióforos y conidios de ocho aislados obtenidos durante el periodo de muestreo (cuadro 1) se determinaron en PDA después de ocho días de incubación. Esto permitió la ubicación de los aislados en el género *Curvularia* (Manamgoda *et al.*, 2015). No se encontró el teleomorfo del hongo durante el periodo de muestreo, aun cuando el género *Cochliobolus* se ha consignado como el teleomorfo de algunas especies de *Curvularia* (Marin-Felix *et al.*, 2020). La fenología

comparison of means was carried out with Tukey's test (Little and Hills, 1973), using the statistical package SAS® version 9.4 (1999). The experiments were held twice. Given that the statistical analyses indicated a significant interaction between isolates and the experiments, the results of both experiments are presented.

RESULTS AND DISCUSSION

Cultural and morphometric characteristics of fungal isolates. The phenotypic characteristics of the cultures, the conidiophores and conidia of eight isolates obtained during the sampling period (Table 1) were determined in PDA after eight days of incubation. This helped locate the isolates in the genus *Curvularia* (Manamgoda *et al.*, 2015) genus. No fungal teleomorph was found during the sampling period, although the genus *Cochliobolus* has been confirmed as the teleomorph of some species of *Curvularia* (Marin-Felix *et al.*, 2020). The phenology of the colonies, the characteristics of conidiophores and the morphometry of the *Curvularia* species are described below.

Isolates Cv-3, Cv-5 and Cv-8. Cultures with a mycelial growth rate of 3.7 – 4.4 mm/day on PDA, with a velvet-like aspect, olive-gray, with faint concentric circles (Figure 1A); reverse side of the cultures with olive-brown pigmentation (Figure 1B). Straight, dark brown septate conidiophores, geniculated in the terminal part (Figure 1C); conidia, 15.0 – 27.5 µm in length by 7.5 – 15.0 µm in width, with 2 to 4 transversal septa, the middle septum being the bulkiest one and with the most pigmentation, a pronounced curvature and a dark hilum (Table 2; Figure 1D). The morphometric characteristics of these are similar to those recorded for *C. muehlenbeckiae* (Berbee *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 2014).

de las colonias, las características de los conidióforos y morfometría de conidios de las especies de *Curvularia* se describen a continuación.

Aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8. Colonias con tasa de crecimiento micelial de 3.7 – 4.4 mm/día en PDA, de aspecto aterciopelado, gris oliváceo, con anillos concéntricos tenues (Figura 1A); reverso de las colonias con pigmentación café-olivo (Figura 1B). Conidióforos café oscuro rectos, septados, geniculados en la parte terminal (Figura 1C); conidios de 15.0 – 27.5 µm de largo por 7.5 – 15.0 µm de ancho, con 2 a 4 septos transversales, con el septo medio más voluminoso y con mayor pigmentación, curvatura pronunciada e hilio oscuro (Cuadro 2; Figura 1D). Las características morfométricas de estos aislados son similares a las consignadas para *C. muehlenbeckiae* (Berbee *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 2014).

Aislado Cv-4. Colonias de apariencia algodonosa a gamuza suave, con tasa de crecimiento micelial de 4.0 mm/día en PDA, de color gris oscuro con tonalidades no uniformes de café a gris claro (Figura 1E) y anverso de color café oscuro dorado (Figura 1F). Conidióforos de color café claro y geniculados en la parte superior. Conidios cilíndricos, con tres a cuatro distoseptas, elipsoides, color marrón dorado (Figura 1G y H), de 10.0 – 22.5 µm de largo, por 7.5 – 10.0 µm de ancho (Cuadro 2). Las características culturales y morfométricas son similares a las de *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017; Qostal *et al.*, 2019).

Aislado Cv-11. Colonias color gris oliváceo, poco densas, con aspecto aterciopelada, con anillos concéntricos muy marcados (Figura 1I) y tasa de crecimiento micelial de 3.9 mm/día en PDA. Reverso de las colonias verde olivo a oscuro (Figura 1J). Conidióforos solitarios y geniculados en la parte

Isolate Cv-4. Cultures with a cotton- or suede-like appearance, with a mycelial growth rate of 4.0 mm/day on PDA, colored dark gray with uneven tones of brown to light gray (Figure 1E) and the front, dark golden brown in color (Figure 1F). Light-brown conidiophore and geniculated on the top part. Cylindrical conidia, with three to four distosepts, ellipsoidal, golden maroon in color (Figure 1G and H), 10.0 – 22.5 µm in length by 7.5 – 10.0 µm in width (Table 2). The cultural and morphometric characteristics are similar to those found in *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017; Qostal *et al.*, 2019).

Isolate Cv-11. Olive-gray cultures, scarcely dense, with a velvetlike aspect, very noticeable concentric rings (Figure 1I) and a mycelial growth rate of 3.9 mm/day on PDA. The reverse side of the cultures dark to olive green (Figure 1J). Isolated and geniculated conidiophore in the terminal part, without ramifications (Figure 1K). Conidia between 16.2 and 27.5 µm in length by 6.2 to 10.0 µm in width (Table 2), with a smooth wall, ellipsoidal to cylindrical, rounded tips, with 2 to 4 transversal distosepta (Figure 1L), protuberant hilum (Arrow in Figure 1L), coinciding with the characteristics described for *C. ahvazensis* (Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29. Cultures with a mycelial growth rate of 2.8 – 4.3 mm/day in PDA, with a suede-like aspect, undefined concentric rings and whitish plumes (Figure 1M), and a dark maroon to black reverse side (Figure 1N). Conidiophore are erect to flexible, septated, often geniculated (Figure 1O). Conidia are 10 to 35 µm in length by 5 to 12.5 µm in width, ellipsoidal or rounded on the tips, pale to dark maroon, 2 a 5 distosepts (generally 4), smooth conidial wall (Table 2; Figure 1P y Q). The phenotypical characteristics of the cultures, as

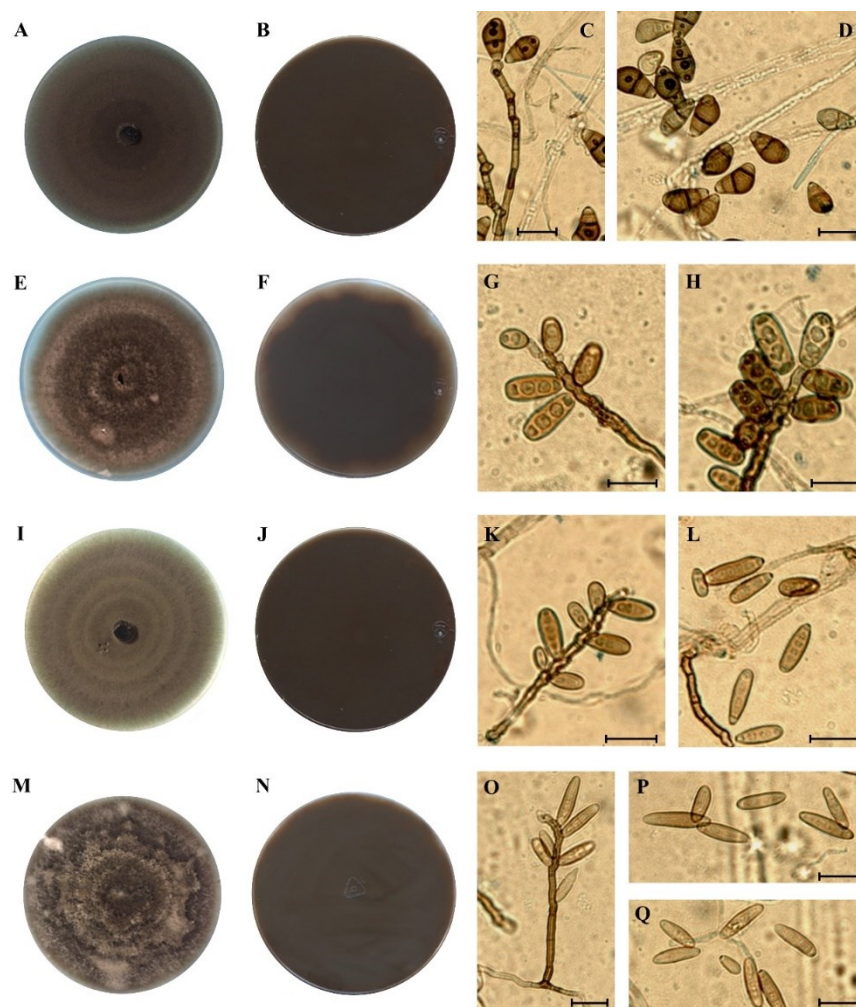


Figura 1. Morfología de especies de *Curvularia* en PDA asociadas a la mancha foliar de la soya. A-D) Morfología representativa de los aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8 (*C. muehlenbeckiae*); A) Anverso de colonia; B) Reverso de colonia; C-D) Conidióforos y conidios. E-H) Aislado Cv-4 (*C. spicifera*); E) Anverso de colonia; F) Reverso de colonia; G y H) Conidióforos y conidios. I-L) Aislado Cv-11 (*C. ahvazensis*); I) Anverso de colonia; J) Reverso de colonia; K-L) Conidióforos y conidios; L) Conidios. M-Q) Morfología representativa de los aislados Cv-19, Cv-21, Cv-29 (*C. hawaiiensis*); M) Anverso de colonia; N) Reverso de colonia; O-P-Q) Conidióforos y conidios. Barra de escala = 20 μ m.

Figure 1. Morphology species of *Curvularia* in PDA related to leaf spot in soybean. A-D) Representative morphology of isolates Cv-3, Cv-5 and Cv-8 (*C. muehlenbeckiae*); A) Front side of the culture; B) Reverse side of the culture; C-D) Conidiophores and conidia. E-H) Isolate Cv-4 (*C. spicifera*); E) Front side of the culture; F) Reverse side of the culture; G and H) Conidiophores and conidia. I-L) Isolate Cv-11 (*C. ahvazensis*); I) Front side of the culture; J) Reverse side of the culture; K-L) Conidiophores and conidia; L) Conidia. M-Q) Representative morphology of isolates Cv-19, Cv-21, Cv-29 (*C. hawaiiensis*); M) Front side of the culture; N) Reverse side of the culture; O-P-Q) Conidiophore and conidia. Scale bar=20 μ m.

Cuadro 2. Morfometría de conidios de hongos asociados a la mancha foliar de la soya var. Nainari.
Table 2. Morphometry of fungal conidia associated with leaf spot in soybean var. Nainari.

Especie/Aislado	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Relación (L/A) (µm)	Septos/Distoseptas
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-3	15.0-27.5 ^x	7.5-12.5	2.0	2.0-4.0
	21.75 ^y	11.25		3.6
	1.0 ^z	0.6		0.7
<i>C. spicifera</i> Cv-4	10.0-22.5	7.5-10.0	2.1	3.0-4.0
	18.75	9.0		3.9
	1.0	0.5		0.4
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-5	20.0-27.5	10.0-15.0	1.9	2.0-4.0
	23.25	12.0		3.6
	0.9	0.5		0.7
<i>C. muehlenbeckia</i> Cv-8	17.5-25.0	7.5-15.0	2.0	3.0-4.0
	22.0	11.0		3.6
	0.7	0.6		0.5
<i>C. ahvazensis</i> Cv-11	16.2-27.5	6.2-10.0	2.9	2.0-4.0
	22.3	7.6		4.2
	2.7	0.5		1.1
<i>Curvularia</i> sp. Cv-19	10.0-22.5	7.5-10.0	2.1	3.0-4.0
	18.75	9.0		3.9
	1.0	0.5		0.4
<i>Curvularia</i> sp. Cv-21	10.0-35.0	5.0-7.5	3.7	2.0-5.0
	20	5.5		3.8
	1.5	0.4		0.6
<i>Curvularia</i> Cv-29	17.5-27.5	7.5-12.5	2.4	2.0-5.00
	21.75	9.0		3.8
	1.1	4.0		0.7

^xEl primer renglón representa la longitud máxima y mínima de las estructuras; ^yel segundo renglón indica la media de las 40 estructuras en cada muestra; ^zel tercer renglón se refiere a la desviación estándar de los datos. / ^xThe first row represents the maximum and minimum length of the structures; ^ythe second row indicates the mean of the 40 structures in each sample; ^zthe third row refers to the standard deviation of the data.

terminal, sin ramificación (Figura 1K). Conidios de 16.2 a 27.5 µm de largo, por 6.2 a 10.0 µm de ancho (Cuadro 2), con pared lisa, elipsoides a cilíndricos, extremos redondeados, con 2 a 4 distoseptas transversales (Figura 1L), hilio protuberante (Flecha en figura 1L), coincidiendo con las características descritas para *C. ahvazensis* (Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29. Colonias con tasa de crecimiento micelial de 2.8 – 4.3 mm/día en PDA, con apariencia de gamuza suave, con anillos

well as the morphometry of the conidia are similar to those in species phylogenetically related to *C. hawaiiensis* (Manamgoda *et al.*, 2015).

Molecular identification. The partial sequences of the *gapdh* gene were deposited in the GenBank database (accession MT680146-MT680150 and MT680152-MT680154). The analyses confirmed the identity of the isolates at a genus level. In turn, the comparison of the sequences in the GenBank database displayed high percentages of similarity with diverse *Curvularia* species; isolates Cv-3,

concéntricos poco definidos y penachos blanquecinos (Figura 1M), reverso marrón oscuro a negro (Figura 1N). Los conidióforos son erectos a flexuosos, septados, a menudo geniculados (Figura 1O). Conidios de 10 a 35 µm de largo por 5 a 12.5 µm de ancho, elipsoidales o redondeados en los extremos, marrón pálido a marrón oscuro, 2 a 5 distoseptas (generalmente 4), pared conidial lisa (Cuadro 2; Figura 1P y Q). Las características fenotípicas de las colonias, así como la morfometría de los conidios son similares a las de especies filogenéticamente relacionadas a *C. hawaiiensis* (Manamgoda *et al.*, 2015).

Identificación molecular. Las secuencias parciales del gen *gapdh* fueron depositadas en la base de datos GenBank (acceso MT680146-MT680150 y MT680152-MT680154). Los análisis confirmaron la identidad de los aislados a nivel género. A su vez, la comparación de las secuencias en la base de datos del GenBank mostró altos porcentajes de similitud con diversas especies de *Curvularia*; los aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8 fueron similares a *C. muehlenbeckiae* cepa UTHSC 08-2905 (No. Acc. LT715807; 99% de identidad) y CBS 144.63 (No. Acc. LT715806, 100% de identidad); el aislado Cv-4 fue similar a *C. spicifera* cepa CBS 198.31 (No. Acc. LT715814.1, 99% de identidad); el aislado Cv-11 registró altos porcentajes de similitud con las especies *C. hawaiiensis* cepa CBS 173.57 (No. Acc. LT715812, 99% de identidad), *C. nodosa* cepa CPC 28812 (No. Acc. MF490840, 98.5% de identidad), *C. perotidis* cepa CBS 350.90 (No. Acc. LT715813, 97.9% de identidad) y *C. dactyloctenii* cepa BRIP 12846 (No. Acc. KJ415401, 98.5% de identidad); mientras que los aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29 compartieron altos porcentajes de similitud con las especies *C. beasleyi* cepa BRIP 15854 (No. Acc. MH433639, 99.1% de identidad), *C. dactyloctenii* cepa BRIP 12846 (No. Acc.

Cv-5 and Cv-8 were similar to *C. muehlenbeckiae* strain UTHSC 08-2905 (accession LT715807; 99% identity) and CBS 144.63 (accession LT715806, 100% identity); isolate Cv-4 was similar to *C. spicifera* strain CBS 198.31 (accession LT715814.1, 99% identity); isolate Cv-11 recorded high percentages of similarity with *C. hawaiiensis* strain CBS 173.57 (accession LT715812, 99% identity), *C. nodosa* strain CPC 28812 (accession MF490840, 98.5% identity), *C. perotidis* strain CBS 350.90 (accession LT715813, 97.9% identity) and *C. dactyloctenii* strain BRIP 12846 (accession KJ415401, 98.5% identity); whereas isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29 shared high percentages of similarity with *C. beasleyi* strain BRIP 15854 (accession MH433639, 99.1% identity), *C. dactyloctenii* strain BRIP 12846 (accession KJ415401, 98.9% identity), *C. hawaiiensis* strain CBS 173.57 (accession LT715812, 98.7% identity), *C. nodosa* strain CPC 28812 (accession MF490840, 98.5% identity) and *C. perotidis* strain CBS 350.90 (accession LT715813, 97.9% identity).

Figure 2 shows the phylogram inferred from the partial sequence of gene *gapdh*. Isolates Cv-3, Cv-5 and Cv-8 were grouped, along with the *C. muehlenbeckiae* type sequence, with a high bootstrap support (90.9%), which coincides with the morphological description of these isolates for the species at hand (Figure 1A-D). Isolate Cv-4 was identified as *C. spicifera*, since it grouped with the type sequence of this species (bootstrap 94.1%) and its morphological characteristics coincide with those reported previously. Isolate Cv-11 is grouped with *C. ahvazensis* (52.1% bootstrap) and its morphological characteristics coincide with those reported for the species. The phylogram shows that isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29 are different and do not correspond to any of the species of *Curvularia* used as references in the analysis, and were therefore considered as *Curvularia* sp.

KJ415401, 98.9% de identidad), *C. hawaiiensis* cepa CBS 173.57 (No. Acc. LT715812, 98.7% de identidad), *C. nodosa* cepa CPC 28812 (No. Acc. MF490840, 98.5% de identidad) y *C. perotidis* cepa CBS 350.90 (No. Acc. LT715813, 97.9% de identidad).

La Figura 2 muestra el filograma inferido a partir de la secuencia parcial del gen *gapdh*. Los aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8 se agruparon junto con la secuencia tipo de *C. muehlenbeckiae*, con alto soporte bootstrap (90.9%), lo cual concuerda con la descripción morfológica de estos aislados para la especie en cuestión (Figura 1A-D). El aislado Cv-4 fue identificado como *C. spicifera* ya que se agrupó con la secuencia tipo de esta especie (bootstrap 94.1%) y sus características morfológicas coinciden con las ya reportadas. El aislado Cv-11 se agrupa con la especie *C. ahvazensis* (bootstrap de 52.1%), y sus características morfológicas coinciden con las reportadas para esta especie. El filograma muestra que los aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29 son diferentes y no corresponden a ninguna de las especies de *Curvularia* utilizadas como referencia en el análisis, por lo que se designaron como *Curvularia* sp. Los tres aislados son filogenéticamente cercanos a *C. beasleyi* especie con las que comparan porcentajes de similitud de 99 – 99.2%.

Este grupo de hongos posee una alta complejidad morfológica y diversidad de especies crípticas, por lo que su taxonomía no está completamente resuelta (Manamgoda *et al.*, 2015). Actualmente, el género comprende poco más de 100 especies descritas, de las cuales solo ~80 han sido aceptadas y se ha establecido su ubicación taxonómica mediante análisis filogenético multigen (Manamgoda *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019); sin embargo, el gen *gapdh* por si solo puede resolver las especies de *Curvularia* (Manamgoda *et al.*, 2015), y es el locus con mayor información filogenética entre los loci analizados para este género

The three isolates are phylogenetically near to *C. beasleyi*, the species with which they share 99 – 99.2% similarities.

This group of fungi has a high morphological complexity and diversity of cryptic species; therefore, its taxonomy has not been entirely solved (Manamgoda *et al.*, 2015). Currently, the genus covers just over 100 described species, out of which only ~80 have been accepted and their taxonomic locations have been established through multigene phylogenetic analyses (Manamgoda *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019). However, the gene *gapdh* on its own can solve the *Curvularia* species (Manamgoda *et al.*, 2015), and it is the locus with the most phylogenetic information among the loci analyzed for this fungal genus (Ferdinandez *et al.*, 2019). For isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29, the identities of which could not be determined, we recommend carrying out a more detailed molecular characterization to corroborate them as a new lineage within the genus and give them a name. In order to do this, the sequencing of the ITS region and/or the translation elongation factor (TEF) gene must be included, as it has been done previously in the registration of new species of *Curvularia* (Heidari *et al.*, 2018; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Pathogenicity test. All the isolates obtained from symptomatic soybean leaflets were pathogenic in soybean var. Nainari and caused similar symptoms to those observed in the field (Figure 3). The first symptoms were found in the basal third and middle of the plants six days after inoculation, while defoliation began 15 days after inoculation; in turn, the symptoms caused by the different *Curvularia* species were similar, but with variations in the degree of virulence. In experiment 1, 30 days after inoculation, the plants inoculated with the *C. ahvazensis* (Cv-11) and *Curvularia*

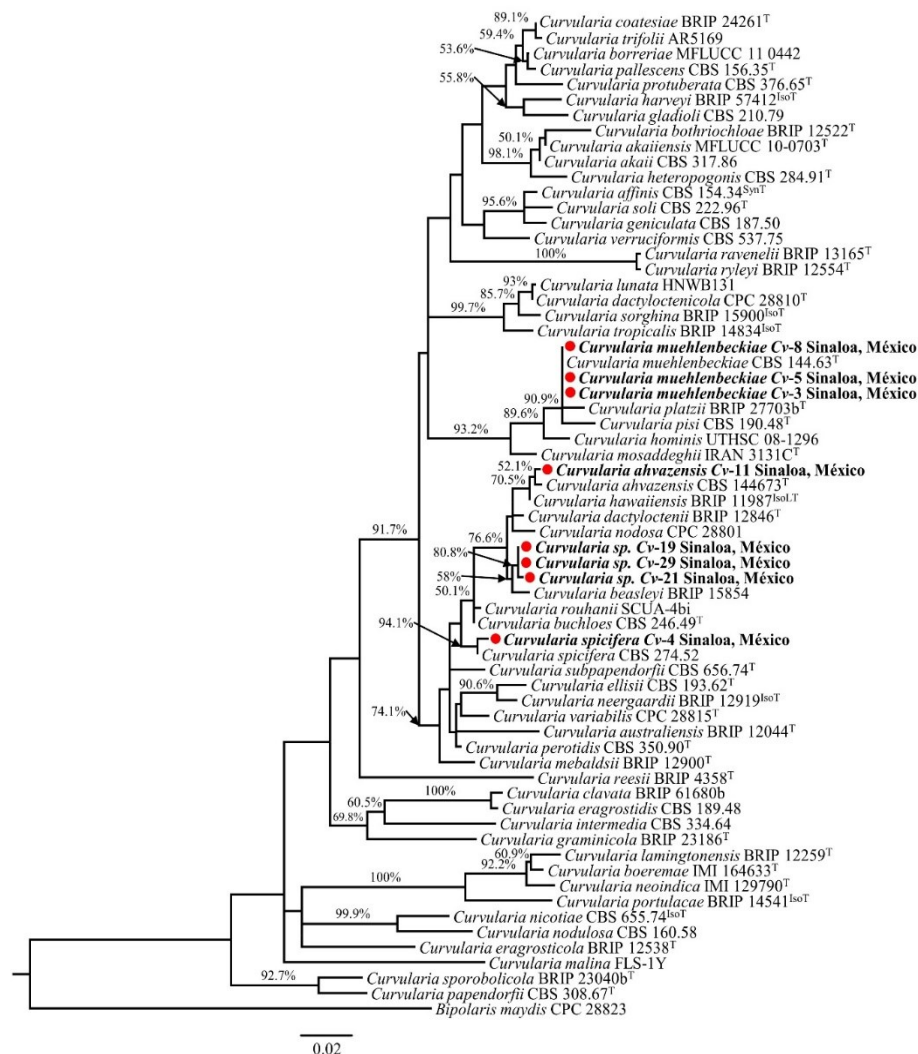


Figura 2. Árbol filogenético del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), inferido por Máxima Verosimilitud (lnL -4286.90) en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Los valores Bootstrap $\geq 70\%$ se presentan sobre las ramas, cerca de los internodos. Las especies encontradas en este estudio se muestran en negritas, precedidas de un círculo rojo. ATCC, American Type Culture Collection, Virginia, USA; BRIP, Queensland Plant Pathology Herbarium, Brisbane, Australia; CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, the Netherlands; MFLUCC, Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Ria, Thailand; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, Department of Pathology at the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA; CPC, Culture Collection of Pedro Crous, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; IMI, International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Bakeham Lane, UK. ^{ET}, ^{IsoT}, ^{IsoLT}, ^{SynT} y ^T indican cepas ex-epitipo, ex-isotipo, ex-isolectotipo, ex-sintipo y ex-tipo, respectivamente.

Figure 2. Phylogenetic tree of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) gene, inferred by maximum likelihood (lnL -4286.90) in MEGA X. The scale represents the average of situations per site. Bootstrap values $\geq 70\%$ are presented on the branches, near the internodes. The species found in this study are shown in bold, followed by a red circle. ATCC, American Type Culture Collection, Virginia, USA; BRIP, Queensland Plant Pathology Herbarium, Brisbane, Australia; CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, the Netherlands; MFLUCC, Mae Fah Luang University Culture Collection, Chian Ria, Thailand; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, Department of Pathology of the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA; CPC, Culture Collection of Pedro Crous, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; IMI, International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Bakeham Lane, UK. ^{ET}, ^{IsoT}, ^{IsoLT}, ^{SynT} and ^T indicate ex-epitype, ex-isotype, ex-isolectotype, ex-syntype and ex-type strains, respectively.

fúngico (Ferdinandez *et al.*, 2019). En el caso de los aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29, cuya identidad no se pudo determinar, se recomienda realizar una caracterización molecular más detallada, para corroborarlos como un nuevo linaje dentro del género y asignarles un nombre. Para ello, se deberían incluir la secuenciación de la región ITS y/o el gen del factor de elongación de la traducción (TEF), como se ha realizado previamente en el registro de nuevas especies de *Curvularia* (Heidari *et al.*, 2018; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Prueba de patogenicidad. Todos los aislados obtenidos de folíolos de soya sintomáticos, resultaron patogénicos en soya var. Nainari y causaron síntomas similares a los observados en campo (Figura 3). Los primeros síntomas ocurrieron en el tercio basal y parte media de las plantas seis días después de la inoculación, mientras que la defoliación inició 15 días después de la inoculación; a su vez, los síntomas causados por las distintas especies de *Curvularia* fueron similares, pero con variación en el grado de virulencia. En el experimento 1, a los treinta días después de la inoculación, las plantas inoculadas con los aislados de *C. ahvazensis* (Cv-11) y *Curvularia* sp. (Cv-21), presentaron un AFA de 30%, sin diferencias ($F=73.3$; $P<0.0001$) entre estas especies, pero si las hubo con respecto a los aislados Cv-3 y Cv-8 de *C. muehlenbeckiae* y los aislados Cv-19 y Cv-29 de *Curvularia* sp., que causaron un AFA de 10%. Los aislados de *C. spicifera* (Cv-4) y *C. muehlenbeckiae* (Cv-3 y Cv-5), fueron los menos virulentos pues causaron un AFA de 3 a 9% (Cuadro 3). En el experimento 2 el porcentaje de AFA causado por los aislados de *C. ahvazensis* (Cv-11) y *Curvularia* sp. (Cv-21) fue de 24.0 y 19.0%, respectivamente, con diferencias ($F=27.0$; $P<0.0001$) entre estos aislados y el resto de ellos pertenecientes a diversas especies de *Curvularia*, las cuales causaron de 5.0 a 15.0% de AFA. En los

sp. (Cv-21) isolates presented an LAA of 30%, without differences ($F=73.3$; $P<0.0001$) between these species, although there were differences with isolates Cv-3 and Cv-8 from *C. muehlenbeckiae* and isolates Cv-19 and Cv-29 of *Curvularia* sp., which caused an AFA of 10%. The isolates of *C. spicifera* (Cv-4) and *C. muehlenbeckiae* (Cv-3 and Cv-5) were the least virulent, since they caused an AFA of 3 to 9% (Table 3). In experiment 2, the percentages of AFA caused by isolates of *C. ahvazensis* (Cv-11) and *Curvularia* sp. (Cv-21) were 24.0 and 19.0%, respectively, with differences ($F=27.0$; $P<0.0001$) between these isolates, and the rest belonged to diverse species of *Curvularia*, which caused between 5.0 and 15.0% of LAA. In both experiments, the control plants sprayed with distilled water remained asymptomatic throughout the investigation (Figure 1B).

To comply with Koch's standards, the inoculated *Curvularia* species were re-isolated from the symptomatic plants and their identity was confirmed by comparing the phenotypical characteristics of the cultures and morphometry of 20 conidia with the original isolates.

The species of *Curvularia* mentioned previously were proven to cause leaf spot in soybean plants, which contrasts with reports in Sinaloa in which *Corynespora asiicola*, *Cercospora sojina* and *Cercospora kikushii* are mentioned as causal agents of the disease (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019), as well as in Brazil (Teramoto *et al.*, 2017), the United States (Sumabat *et al.*, 2018) and Argentina (Reznikov *et al.*, 2018). Although the symptoms caused by the *Curvularia* species in our study are similar to those caused by other fungi (Stewart and Rodríguez, 2016; Mwase and Kapooria, 2000), these were not found in the sampling period of our investigation. Fungal foliar diseases in soybean that occur in the stage of grain filling are called late-season diseases (LSD), since they take place

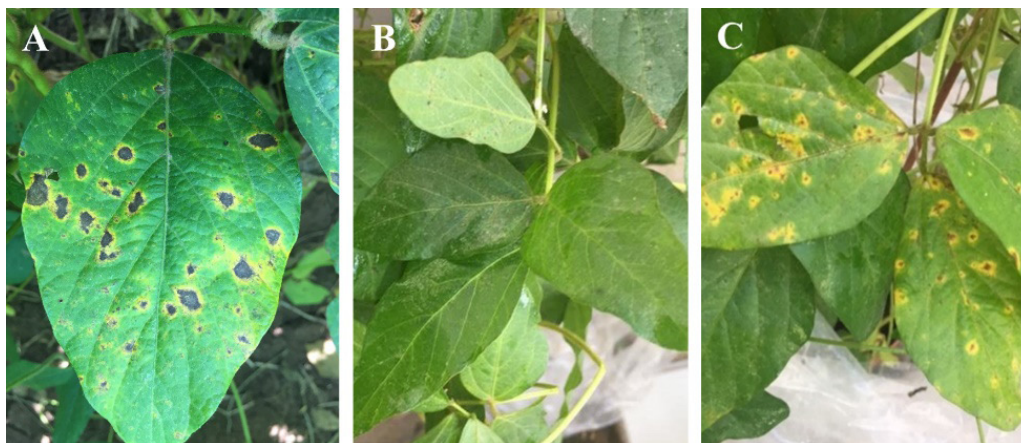


Figura 3. A) Síntomas de mancha foliar en foliolo de planta de soya a partir de infecciones naturales en campo; B) Foliolos de planta testigo sin inocular; C) Foliolo con síntomas, característicos de la mancha foliar de la soya, causados por especies de *Curvularia* (aislado Cv-11) en inoculaciones en el invernadero.

Figure 3. A) Symptoms of foliar spot in leaflets of soybean plants from natural infections in the field; B) Non-inoculated control plant leaflets; C) Leaflets with symptoms, typical of leaf spot in soybean plants, caused by species of *Curvularia* (isolate Cv-11) in greenhouse inoculations.

Cuadro 3. Porcentaje de área foliar afectada en plantas de soya variedad Nainari, inoculadas con aislados de diferentes especies de *Curvularia*.

Table 3. Percentage of foliar area affected in soybean plants, variety Nainari, inoculated with different species of *Curvularia*.

Especie/Aislado ^x	Experimento 1	Experimento 2
<i>C. ahvazensis</i> Cv-11	30.0 a ^z	24.0 a ^z
<i>Curvularia</i> sp. Cv-21	30.0 a	19.0 ab
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-8	21.0 b	15.0 bc
<i>Curvularia</i> sp. Cv-19	10.0 c	8.0 d
<i>Curvularia</i> sp. Cv-29	10.0 c	11.0 cd
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-3	9.0 c	9.0 cd
<i>C. spicifera</i> Cv-4	9.0 c	10.0 cd
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-5	3.0 d	5.0 de
Testigo sin inoculación	0.0 d	0.0 e
CV	29.8	39.2

^xLa patogenicidad de los aislados se evaluó a los 30 días después de la inoculación. / ^xThe pathogenicity of the isolates was evaluated 30 days after inoculation.

^zMedias con la misma letra en cada columna no son diferentes en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). / ^zMeans with the same letter in each column are not different in Tukey's test ($p \leq 0.05$).

dos experimentos las plantas testigo asperjadas con agua destilada permanecieron asintomáticas durante el desarrollo del trabajo (Figura 1B).

Para cumplir con los postulados de Koch, las especies de *Curvularia* inoculadas se re-aislaron de las plantas sintomáticas y su identidad se confirmó mediante la comparación de las características fenotípicas de las colonias y morfometría de 20 conidios con los aislados originales.

Se demostró que las especies de *Curvularia* antes señaladas causan la mancha foliar de la soya, lo cual contrasta con reportes en Sinaloa, donde se mencionan a *Corynespora asiicola*, *Cercospora sojina* y *Cercospora kikushii* como agentes causales de la enfermedad (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019), al igual que en Brasil (Teramoto *et al.*, 2017), Estados Unidos de Norteamérica (Sumabat *et al.*, 2018) y Argentina (Reznikov *et al.*, 2018). Aun cuando los síntomas causados por las especies de *Curvularia* en el presente estudio son similares a los causados por otros hongos (Stewart y Rodríguez, 2016; Mwase y Kapooria, 2000), éstos no se encontraron durante el periodo de muestreo en el presente trabajo. A las enfermedades foliares de origen fungoso en la soya, que ocurren en la etapa de llenado de grano se les denomina enfermedades de fin de ciclo (EFC), pues se presentan en estadios intermedios a avanzados del cultivo (De Lisi *et al.*, 2015). En virtud de que la mancha foliar de la soya causada por *C. spicifera*, *C. muehlenbeckiae*, *C. ahavensis* y *Curvularia* spp. en Sinaloa se presenta a partir del llenado de grano, también deben ubicarse como EFC. Esta enfermedad ocurrió durante septiembre y octubre, cuando la precipitación varió de 321 a 373 mm en la región y la temperatura osciló entre 26 y 39 °C (Estación Meteorológica, Junta Local del Valle del Carrizo, Sinaloa, 2019). En otras regiones productoras de soya se han registrado como agentes causales de EFC a *Colletotrichum truncatum*, *Septoria glycines*, *Phomopsis sojiae*,

in plants in intermediate to advanced crop stages of maturity (De Lisi *et al.*, 2015). Given that foliar spot in soybean caused by *C. spicifera*, *C. muehlenbeckiae*, *C. ahavensis* and *Curvularia* spp. in Sinaloa appears in the grain-filling stage, it must also be considered an LSD. This disease appeared in September and October, when rainfalls varied between 321 and 373 mm in the region and the temperature fluctuated between 26 and 39 °C (Junta Local del Valle del Carrizo weather station, Sinaloa, 2019). In other soybean-producing regions, *Colletotrichum truncatum*, *Septoria glycines*, *Phomopsis sojiae*, *Peronospora manshurica* and *Alternaria* spp. have been registered as LSD causal agents (Carmona *et al.*, 2015), yet these pathogens were not found at the time the present investigation was being carried out. Studies in Argentina indicate that LSD reduce crop yield by 8 to 10%, and a maximum of up to 30% (Carmona *et al.*, 2004); in this sense, the investigations carried out in Sinaloa to determine the impact of the disease in crop yield and quality are justifiable, in the same way the implantation of strategies for their control would be, if needed.

CONCLUSIONS

The fungi *Curvularia spicifera*, *C. muehlenbeckiae*, *C. ahavensis* and *Curvularia* sp. were implicated in foliar spot in soybean, which began in the stage of grain filling (R6). The species were identified with the analysis of its morphometric characteristics and phylogenetic reconstruction, based on a fragment of the gene *gapdh*. The *Curvularia* species were found to be pathogenic in soybean var. Nainari and they displayed different degrees of virulence. This is the first report in Mexico involving species of *Curvularia* in the etiology of leaf spot in soybean.

Peronospora manshurica y *Alternaria* spp. (Carmona *et al.*, 2015), pero estos patógenos no se detectaron durante el desarrollo del presente trabajo. Estudios en Argentina indican que las EFC reducen de 8 a 10% el rendimiento de la cosecha, con un máximo de hasta 30% (Carmona *et al.*, 2004); en este sentido, se justifica el desarrollo de investigación en Sinaloa para determinar el impacto de la enfermedad en el rendimiento y calidad de la cosecha, y de ser necesario implementar estrategias para su control.

CONCLUSIONES

Los hongos *Curvularia spicifera*, *C. muelhenbeckiae*, *C. ahvazensis* y *Curvularia* spp., se encontraron asociados a la mancha foliar de la soya la cual ocurrió a partir de la etapa de llenado de grano (R6). La identidad de las especies se realizó mediante el análisis de sus características morfológicas y reconstrucción filogenética basada en un fragmento del gen *gapdh*. Las especies de *Curvularia* resultaron patogénicas en soya var. Nainari y mostraron diferentes grados de virulencia. Este es el primer reporte en México implicando especies de *Curvularia* en la etiología de la mancha foliar de la soya.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento parcial para la realización del presente estudio por parte del PFECE-SES-SEP, convocatoria 2017.

LITERATURA CITADA

Ayoubi N, Javad M, Zare R and Zafari D. 2017. First report of *Curvularia inaequalis* and *C. spicifera* causing leaf blight and fruit rot of strawberry in Iran. *Nova Hedwigia* 105(1-2): 75-85. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2017/0402

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the partial funding of the present study by PFECE-SES-SEP, 2017.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Bandara AY, Weerasooriya DK, Bradley CA, Allen TW and Esker PD. 2020. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLoS ONE* 15: e0231141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>
- Berbee M, Pirseyedi M and Hubbard S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91(6): 964-977. <https://doi.org/10.2307/3761627>
- Carmona M, Sautua F, Perelman S, Gally M and Reis EM. 2015. Development and validation of a fungicide scoring system for management of late season soybean diseases in Argentina. *Crop Protection* 70: 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.019>
- Carmona M, Moschini R, Cazenave G y Sautua F. 2010. Relación entre la precipitación registrada en estados productivos de la soja y la severidad de *Septoria glycines* y *Cercospora kikushii*. *Tropical Plant Pathology* 35(2): 71-78. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000200001>
- Carmona M, Gally M, Grijalba P, Sugia V and Jaeggi E. 2004. Frequency and chemical control of causal pathogens of soybean late season diseases in the Pampeana Region. 7<sup>th</sup> World Soybean Research Conference, 4<sup>th</sup> International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congreso Mundial de Soja, 29 de febrero al 5 de marzo de 2004. Foz de Iguazú, Brasil. 159p.
- De Lisi V, Reznikov S, Aguaysol NC, Martínez CV, Claps MP, Bernal ML, Gomez EN, Martinez-Monteros MJ, Villafañe P, Escobar M, Gonzalez V y Ploper LD. 2015. Enfermedades presentes en la campaña de soja 2014/2015 en el NOA. *Publicación Especial EEAOC* 51: 112-118. <http://hdl.handle.net/11336/15007>
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. *Statistical Yearbook. World Food and Agriculture*. 366p. <https://doi.org/10.4060/cb1329en>. (Consulta junio 2021).
- Fehr WR and Caviness CE. 1977. Stages of soybean development. Iowa State University. *Special Report* 87. 13p. <http://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>
- Ferdinandez RSKHS, Udayanga D, Deshapriya N, Munasinghe MLAMS and Manamgoda DS. 2019. Species limits in

- Curvularia*: Updated backbone phylogeny and fresh collections from Sri Lanka. International Research Conference of UWU-2019. <http://www.erepo.lib.uwu.ac.lk/bitstream/handle/123456789/65/24.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Flores-Córdova MA, Martínez-Damián MT, Nieto-Ángel D, Rodríguez-Pérez JE, Colinas-León MT y Martínez-Solis J. 2013. Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 180-190. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509009>
- Gómez KA and Gómez AA. 1984. Statistical procedures for agricultural research. John Wiley and sons Inc. New York, USA. 680p.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41:95-98.
- Heidari K, Mehrabi-Koushki M and Farokhinejad R. 2018. *Curvularia mosaddeghii* sp. nov., a novel species from the family Pleosporaceae. *Mycosphere* 9(4): 635-646. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/4/2>
- Kelly KL and Judd DE. 1976. *Color Universal language and dictionary of names*. National Bureau of standards (U.S.). Special publication 440. 184p.
- Kim YK, Xiao CK and Rogers JD. 2005. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphareopsis pyripitrescens*. *Mycologia* 97(1): 25-32. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.25>
- Kiss N, Homa M, Manikandan P, Mythili A, Krizsán K, Revathi R., Varga M, Papp T, Vágvölgyi C, Kredics L and Kocsubé S. 2019. New species of the genus *Curvularia*: *C. tamilnaduensis* and *C. coimbatorensis* from fungal keratitis cases in South India. *Pathogens* 9(1):9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010009>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology Evolution* 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Little TM and Hills FJ. 1973. *Agricultural Experimentation and Analysis*. John Wiley and Sons. New York, USA. 350p.
- Madrid H, Da Cunha KC, Gené J, Dijksterhuis J, Cano J, Sutton DA, Guarro J and Crous PW. 2014. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia* 33(1): 48-60. <https://doi.org/10.3767/003158514X683538>
- Manamgoda DS, Rossman AY and Castlebury LA. 2015. A taxonomic and phylogenetic reappraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa* 212(3): 175-198. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.212.3.1>
- Maraite M, Zinno TD, Longree H, Daumerie V and Duveiller E. 1997. Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. In: Duveiller E, Duvin HJ, Reeves J, and MacNab A (eds). *Helminthosporium* blight of wheat: Spot blotch and tan spot. CIMMYT. 293-300p.
- Marin-Felix Y, Hernández-Restrepo M and Crous PW. 2020. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress* 19(6):559-588. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6>
- Mehrabi-Koushki M, Pooladi P, Eisvand P and Babaahmadi G. 2018. *Curvularia ahvazensis* and *C. rouhani* spp. nov. from Iran. *Mycosphere* 9(6):1173-1186. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/6/7>
- Mwase WF and Kapoora RG. 2000. Incidence and severity of frogeye leaf spot and associated yield losses in soybeans in agroecological zone II of Zambia. *Mycopathologia* 149(2):73-78. <https://doi.org/10.1023/A:1007126225457>
- Prieto KR, de Medeiros LS, Isidoro MM, Toffano L, da Silva MFGF, Fernandes JB, Vieira PC, Forim MR, Rodrigues-Filho E, Stuart RM and Machadob MA. 2016. Rapid determination of ACTG-and AK-toxins in *Alternaria alternata* by LC-ESI-MS/MS Analysis and antifungal properties of citrus compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27(8):1493-1505. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160195>
- Qostal S, Kribel S, Chliyah M, Selmaoui K, Ouazzani A, Serghat S, Zaarati H, Benkirane R and Douira A. 2019. *Curvularia spicifera*, a parasite of the fungal complex of root rot of wheat and barley in Morocco. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 20(9-10):354-365. <https://www.ikprress.org/index.php/PCBMB/article/view/4627>
- Rambaut A. 2014. FigTree v1.4.2, A Graphical Viewer of Phylogenetic Trees. Available from <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>.
- Reznikov S, de Lisi V, Escobar M, Claps MP, Bleckwedel J, Gutierrez H, Daniel F, Gonzalez V, Ledesma F, Devani MR and Ploper LD. 2018. Panorama sanitario del cultivo de la soja en el noroeste argentino durante la campaña 2017/2018. *Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres; Soja en el NOA; 54(9):1-5* <http://hdl.handle.net/11336/95779>
- Rodríguez-Cota FG, Cortez-Mondaca E, Saucedo-Cota RH, Valenzuela-Herrera V y Macías-Cervantes J. 2019. Tecnología para producir soja en Sinaloa. *Campo Experimental Valle del Fuerte, INIFAP, Folleto Técnico No. 45*. Juan José Ríos, Sin., México. 48p.
- SAS, Institute Inc. 1999. *SAS user's guide: Statistics*. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028 p.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo "Modalidad riego + temporal, Primavera-verano". SAGARPA, D.F. México. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenDelegacion.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. *Panorama Agroalimentario 2020*. Ciudad de México. 200p. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/11/Atlas-Agroalimentario-2020.pdf>
- Soares RM, Godoy CV y Oliveira MCN. 2009. Diagrammatic scale for severity evaluation of soybean target spot. *Tropical Plant Pathology* 34(5): 333-338. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000500007>
- Stewart S y Rodríguez M. 2016. *Manual de identificación de enfermedades de la soja*. 2a edición ampliada y corregida

- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay. Boletín de Divulgación No 4. 74p.
- Sumabat LG, Kemerait RC, Kim DK, Mehta YR and Brewer MT. 2018. Clonality and geographic structure of host-specialized populations of *Corynespora cassiicola* causing emerging target spot epidemics in the southeastern United States. PLoS ONE 13: e0205849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205849>.
- Tan YP, Crous PW and Shivas RG. 2018. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. MycoKeys 35: 1-25. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25665>
- Teramoto A, Meyer MC, Suassuna ND and Cunha MG. 2017. *In vitro* sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. Summa Phytopathologica 43(4): 281-289. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2195>
- Tomaso-Peterson M, Jo YK, Vines PL and Hoffmann FG. 2016. *Curvularia malina* sp. nov. incites a new disease of warm-season turfgrasses in the southeastern United States. Mycologia 108(5): 915-924. <https://doi.org/10.3852/15-238>