UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

Unidad Regional Los Mochis



Departamento Académico de Investigación y Posgrado Programa Educativo: Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente

TESIS:

"Caracterización morfométrica, molecular y patogenicidad de especies de *Curvularia* asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson (*Sorghum halepense* L.) en el norte de Sinaloa, México".

Presenta

Biol. Daniela Daylin Olivas Peraza

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Fitopatología y Medio Ambiente

Directores de Tesis:

Dr. Rubén Félix Gastélum

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez

Los Mochis, Sinaloa, México a octubre de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

VICERRECTORÍA ACADÉMICA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Asunto: carta conclusión de tesis para opción de grado. Los Mochis, Sinaloa 28 de septiembre de 2020.

Dra. Karla Mariela Sandoval CotaJefa del Departamento de Investigación y Posgrado Unidad Regional Los Mochis

Presente

Habiendo constatado que las observaciones realizadas por el comité revisor han sido atendidas en la obra, el suscrito en la calidad de director de tesis, doy por concluido el trabajo siguiente:

Nombre del maestrante: Daniela Daylin Olivas Peraza Matricula: 18021405.

Nombre de Tesis: "Caracterización morfométrica, molecular y patogenicidad de especies de *Curvularia* asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson (*Sorghum halepense* L.) en el norte de Sinaloa, México."

Nombre del Programa Educativo: Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente.

Atentamente.

Dr. Rubén Félix Gastélum Director de Tesis



El presente trabajo de investigación titulado "Caracterización morfométrica, molecular y patogenicidad de especies de Curvularia asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson (Sorghum halepense L.) en el norte de Sinaloa, México." realizado por la Lic. Daniela Daylin Olivas Peraza con matrícula 18021405, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

COMITÉ DE TESIS:

Dr. Rubén Félix Gastélum Director de Tesis

Dra. Glenda Judith Lizarraga Sánchez

Directora de Tesis

Dra. Rosa María Longoría Espinoza

Asesora de Tesis

Dr. Hugo Beltrán Peña Asesor de Tesis

Los Mochis, Sinaloa, Septiembre de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día _06_ del mes _noviembre_ del año _2020_, quien suscribe _Daniela Daylin Olivas Peraza_ alumna del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente (Registro CONACyT 004128) con número de matrícula _18021405_, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de _Dr. Rubén Félix Gastélum y Dra. Glenda _Judith _Lizárraga Sánchez_ y cede los derechos del trabajo titulado "Caracterización morfométrica, molecular y patogenicidad de especies de *Curvularia* asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson (*Sorghum halepense* L.) en el norte de Sinaloa, México", a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Daniela Daylin Olivas Peraza

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, bajo la dirección del Dr. Rubén Félix Gastélum. El proyecto de tesis recibió financiamiento de la Universidad Autónoma de Occidente a través de la Dirección de Investigación y Posgrado, por medio de convocatorias emitidas por la propia institución.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a Dios por permitirme culminar esta etapa importante en mi vida, cada momento ha sido único y las experiencias vividas durante este proyecto me han dado la oportunidad de crecer de manera profesional, personal y espiritual.

Agradezco a mi esposo Alberto Visaiz, por ser el principal promotor de mis sueños y por apoyarme en cada decisión durante este proceso, gracias por amarme, dedicarme el tiempo, paciencia y compañía, además por confiar y creer en mí. A mi familia Martina Peraza, Noel Olivas, Sofía Olivas y Noel Gerardo Olivas los cuales han estado a mi lado durante esta experiencia, por darme ánimos y motivarme a concluir el proceso. A una gran amiga Keren Torres, gracias por escucharme cuando más lo he necesitado y motivarme.

Al Dr. Rubén Félix Gastélum por ser un excelente profesor y ser humano, a quien admiro y aprecio, gracias por dedicar su tiempo y sus conocimientos los cuales me han ayudado a desarrollarme en el ámbito profesional, desde la Licenciatura y ahora al culminar esta etapa de Maestría. A mi comité de tesis, Dra. Glenda Lizárraga, Dra. Rosa María Longoría y Dr. Hugo Beltrán, por dedicarme su tiempo y aconsejarme durante este proceso. Agradezco al Dr. Ignacio Maldonado y a la Dra. Karla Leyva Madrigal, los cuales que fueron pieza fundamental en el desarrollo de este proyecto de investigación. A mis compañeros los cuales conocí al realizar esta maestría con los que compartí conocimientos y experiencias. Muchas gracias a todos.

Resumen

El zacate Johnson (Sorghum halepense), es una arvense perenne de la familia Poaceae, es considerada una maleza invasora en muchos países. Su distribución es amplia en el territorio mexicano y se encuentra como ruderal y en áreas agrícolas. En años recientes, esta maleza ha mostrado síntomas severos de mancha foliar en campo, al principio se manifiestan como manchas circulares que van de 1 a 3 mm de diámetro, de color café rojizo con el centro pajizo rodeadas de un halo clorótico tenue, las lesiones se vuelven oblongas invadiendo gran parte de la lámina foliar, vaina y nervadura principal. En vista de que, en México no existe información sobre la etiología de la enfermedad en esta arvense, en el presente trabajo de investigación se identificaron morfométrica y molecularmente, a las especies asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson, así como también se determinó su patogenicidad. Un total de 12 aislados se obtuvieron en el norte de Sinaloa. La caracterización fenotípica de las colonias, permitió la identificación del género Curvularia. Los estudios morfométricos indicaron que los aislados se asemejan a C. dactyloctenicola y C. muehlenbeckiae. El análisis filogenético realizado con el fragmento del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapdh) confirmó la identidad de las dos especies asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson. Ambas especies resultaron patogénicas en zacate Johnson con diferentes grados de virulencia en inoculaciones en invernadero. Los postulados de Koch se cumplieron mediante el reaislamiento del patógeno de las plantas inoculadas y su identificación mediante estudios morfométricos. C. dactyloctenicola y C. muehlenbeckiae se reportan por primera vez en México. Investigaciones futuras deberán incluir estudios de patogenicidad en poáceas de importancia agrícola tales como sorgo y maíz, los cuales se han reportado susceptibles a la mancha foliar causada por estas especies de Curvularia.

Palabras clave: Zacate Johnson, mancha foliar, identificación molecular, *C. dactyloctenicola*, *C. muehlenbeckiae*.

Abstract

Johnson grass (Sorghum halepense), is a perennial weed of the Poaceae family, considered a wild species and an invasive weed in many countries. Johnson grass is distributed in Mexican territory and found as ruderal and around agricultural areas. In recent years, this plant has shown severe symptoms of leaf spot; the initial symptoms are manifested as circular, reddish brown with a clear center and around by a faint chlorotic halo, spots of 1 to 3 mm in diameter; the lesions they become oblong, invading a large part of the leaf area, sheath and midrib. Considering that, in Mexico there is no information on the etiology of the disease in this weed, in the present study was characterized by phenotypic, morphometric, molecular and pathogenic studies, isolates of *Curvularia* associated with leaf spot in Johnson grass. In this research were obtained 12 isolates associated from symptomatic plants in northern Sinaloa. The phenotypic characterization from the colonies, allow the identification of Curvularia genera. The morphometric characterization indicated that isolates similar to the C. dactyloctenicola and C. muehlenbeckiae. The molecular analysis included the gen Gliceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapdh), which allowed the confirmation of the identity of species C. dactyloctenicola and C. muehlenbeckiae associated with leaf spot in Johnson grass. During the pathogenicity test, both species were pathogenic with different degrees of virulence in greenhouse inoculations. Koch's postulates were fulfilled by re-isolating the pathogen from the inoculated plants and their identity was confirmed by morphometric studies of the conidia. C. dactyloctenicola and C. muehlenbeckiae had not been previously reported in Mexico. Subsequent experiments should studies pathogenicity in Poaceae of agricultural importance such as sorghum and corn, which have been reported as susceptible to leaf spot caused by of Curvularia.

Key words: Johnson grass, leaf spot, molecular identification, *C. dactyloctenicola*, *C. muehlenbeckiae*.

INDICE	Pagina
Resumen	1
Abstract	
Índice de cuadros	
Índice de figuras	
I. INTRODUCCIÓN	
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Características y distribución del zacate Johnson (<i>S. halepense</i>)	
2.2 Clasificación taxonómica del zacate Johnson	
2.3 Importancia del zacate Johnson en la agricultura	
2.4 Pérdidas ocasionadas por zacate Johnson en la agricultura	
2.5 Enfermedades importantes en zacate Johnson	
2.6 El género <i>Curvularia</i>	
2.7 Clasificación taxonómica del género <i>Curvularia</i>	
2.8 Importancia y daños económicos ocasionados por <i>Curvularia</i>	
agricultura	16
III. ANTECEDENTES	
3.1 Investigaciones relevantes sobre Curvularia spp. asociadas a pla	antas de la
familia Poaceae	17
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos específicos	
VI. HIPÓTESIS	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23

norte de Sinaloa	23
7.2 Obtención de aislados de hongos asociados a la mancha folia	ar en zacate
Johnson	23
7.3 Obtención de cultivos monospóricos de hongos asoci	iados a la
enfermedad	24
7.4 Caracterización fenotípica de las colonias de Curvularia spp	24
7.5 Morfometría de los aislados obtenidos de Curvularia a par	rtir de tejido
sintomático	25
7.6 Caracterización molecular	25
7.6.1 Extracción de ADN	25
¡Error! Marcador no definido6.2 Amplificación del ADN obtenido	o de aislados
de <i>Curvularia</i> 26	
7.6.3 Purificación de los productos de PCR amplificados	por ITS y
GAPDH	27
7.6.4 Secuenciación de productos de PCR, edición y ali	ineación de
secuencias	28
7.6.5 Análisis filogenético	28
7.7 Patogenicidad de aislados de <i>Curvularia</i> obtenidos	de zacate
Johnson	29
7.7.1 Producción de plantas de zacate Johnson	29
7.7.2 Producción de inóculo de C. dactyloctenicola y C. mueh	lenbeckiae v
pruebas de patogenicidad en zacate Johnson	
III. RESULTADOS	
8.1 Síntomas de mancha foliar en zacate Johnson en campo y o	obtención de
8.1 Síntomas de mancha foliar en zacate Johnson en campo y caislados	
8.1 Síntomas de mancha foliar en zacate Johnson en campo y daislados	31

8.2.1 Características fenotípicas de aislados de Curvularia e	n medio de cultivo
PDA	34
8.2.2 Morfometría de conidios de aislados de Curvularia ob	tenidos de zacate
Johnson	37
8.3 Crecimiento micelial de especies de Curvularia obtenidas o	de zacate Johnson
en medio PDA	40
8.4 Análisis molecular	42
8.5 Pruebas de patogenicidad de aislados de C. dact	yloctenicola y C.
muehlenbeckiae en plantas de zacate Johnson	49
8.6 Niveles de patogenicidad de los aislados de C. dac	tyloctenicola y C.
muehlenbeckiae obtenidos de zacate Johnson	51
IX. DISCUSIÓN	54
X. CONCLUSIONES	57
XI. LITERATURA CITADA	58
XII. ANEXOS	66

Índice de cuadros

Cuadro 1. Localidades y georreferencias	de los sitio	s de mue	streo d	e hoja	s de
zacate Johnson con síntomas de mancha fo	liar durante	octubre-n	oviemb	re de 2	.018
en los municipios de Ahome y Guasave					33
Cuadro 2. Características morfométricas de	conidios d	e dos espe	ecies de	Curvu	ılaria
obtenidas a partir de zacate Johnson	desarrolla	das en i	medio	de cu	ıltivc
PDA					38
Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo P	DA en el	crecimient	o mice	lial de	dos
aislados de <i>C. dactyloctenicola</i> y 10 aislad	os de C. n	nuehlenbe	ckiae a	25 ±	2 °C
sometidos a fotoperiodos de	10 h	n luz	у	14	r
oscuridad					41
Cuadro 4. Medias de porcentaje de daño	en prueb	as de pa	togenici	idad d	e C
dactyloctenicola y C. muehlenbeckiae en pla	ıntas de zad	cate Johns	on		53

Índice de figuras

Figura 1. Hojas de zacate Johnson con: A) Síntomas iniciales y avanzados de I
enfermedad en campo, B) Lesiones oblongas presentes en lámina foliar y vaina d
la hoja3
,
Figura 2. Sitios de muestreo de los aislados obtenidos a partir de zacate Johnson
puntos naranjas corresponden a los muestreos realizados en 2018, en lo
municipios de Ahome y Guasave3
maniopies de 7 tileme y Eddedave
Figura 3. Características morfológicas de Curvularia dactyloctenicola; A) Colonia e
medio de cultivo PDA después de cinco días de incubación a 25 ± 2 °C co
regímenes de 10 h luz y 14 h oscuridad3
rogimones de 16 maz y 11 m escandadi
Figura 4. Características morfológicas de Curvularia muehlenbeckiae; A) Coloni
en medio de cultivo PDA después de cinco días de incubación a 25 ± 2 °C co
regímenes de 10 h luz y 14 h oscuridad3
, og o o o o o o o o o o o o
Figura 5. Gel de electroforesis en agarosa al 1 % mostrando la amplificación de
ocho muestras de Curvularia para la región espaciador transcrito interno (ITS) de
ADNr a las 600 pb4
Figura 6. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando la amplificación de 1
muestras de Curvularia para el gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenas
(GAPDH) a las 598 pb4
, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
Figura 7. Árbol filogenético basado en la región espaciador transcrito interno, ITS
del ADNr de 12 aislados obtenidos de zacate Johnson4

Figura	8.	Árbol	filogenético	basado	en	el	gen	gliceraldehído	3-fosfato
deshidrogenasa (GAPDH) de 12 aislados obtenidos de zacate Johnson4								47	
Figura :	9. Si	íntomas	de mancha f	oliar en z	acate	e Jol	hnson	causado por los	s aislados
de <i>Curvularia</i> mediante inoculaciones artificiales50									
Figura ′	10. F	ruebas	de patogenic	idad en pla	antas	s de	zacate	e Johnson	52

I. INTRODUCCIÓN

El zacate Johnson (*Sorghum halepense* L.) es una arvense perteneciente a la familia Poaceae que comprende 205 géneros en México (Dávila *et al.*, 2018). El género *Sorghum* incluye a especies cultivadas como *S. bicolor*, y especies consideradas silvestres, tales como *S. almum*, *S. purpureoserium*, *S. vertisicolor* y *S. halepense* (Muraya *et al.*, 2011); estas especies perennes puede llegar a medir de 2 a 3.5 metros de altura cuando alcanzan la madurez; presenta rizomas carnosos (De Wet, 1978; Ceseski *et al.*, 2017).

Esta maleza es nativa del este de India y se distribuyó a regiones templadas y cálidas del mundo (De Wet, 1978); fue introducida en algunos países para uso forrajero y en la actualidad se encuentra distribuida por todo el mundo, siendo considerada una planta invasora; la cual puede encontrarse como ruderal y en áreas agrícolas (Ceseski *et al.*, 2017). Es considerada una de las diez malezas más problemáticas a nivel mundial (Monaghan, 1979); su propagación puede darse a través de rizomas y semillas (Ohadi *et al.*, 2018; Ceseski *et al.*, 2017).

Esta planta silvestre posee una gran adaptabilidad y resistencia a condiciones ambientales adversas; por su capacidad de propagación y producción de un gran número de semillas, hace que sea difícil de controlar (Baličević *et al.*, 2016). La presencia de esta arvense en sistemas agrícolas, puede causar una reducción en el rendimiento de los cultivos y a su vez el incremento en los costos de producción (USDA, 2015). La importancia de este zacate radica en la competencia por espacio, nutrientes, agua y luz; ocasionando la reducción en la producción; además de ser hospederos alternos plagas y enfermedades (SENASICA, 2019).

Según Monaghan (1979), el zacate Johnson es considerado un huésped alterno de diversas plagas y patógenos de importancia agrícola, entre los que destacan los

virus (Teakle y Grylls, 1973; Garrido y Trujillo, 1993; Ceseski *et al.*, 2017), nematodos (Inserra *et al.*,1989); bacterias (Malvick, 1991), y diversos hongos fitopatógenos (Pratt, 2006).

Especies de *Curvularia*, se han consignado en otras partes del mundo como patógenas en cereales y pastos, causando síntomas severos de mancha foliar (Azizah-Kusai *et al.*, 2016). Los síntomas se manifiestan como pequeñas manchas redondas de color marrón-rojizo, las cuales se extienden hasta formar lesiones irregulares y presentan un halo amarillo clorótico alrededor de la mancha (Xu *et al.*, 2018).

En años recientes, en el norte de Sinaloa, se han observado síntomas severos de mancha foliar en zacate Johnson; sin embargo, en vista de que en México, no existe información sobre la etiología de la enfermedad, en el presente trabajo se identificaron morfométrica y molecularmente, a las especies de *Curvularia* asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson, y se determinó su patogenicidad en esta Poaceae.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características y distribución del zacate Johnson

El zacate Johnson, es una planta silvestre, la cual pertenece a la familia Poaceae (Dávila *et al.*, 2018); este organismo vegetal es perenne y cuando alcanza su madurez, puede llegar a medir de 2 a 3.5 metros de altura; presenta rizomas carnosos, sus láminas foliares pueden medir 90 cm de largo y 4 cm de ancho, sus espiguillas se tornan de color verde pálido a marrón púrpura y sus granos se encuentran cerrados por glumas; las cuales son de color marrón rojizo a negro (De Wet, 1978; Ceseski *et al.*, 2017). Su inflorescencia es una panícula que mide 50 cm de longitud, la cual se encuentra abierta y ramificada.

Esta planta silvestre es nativa del este de India y se distribuyó a regiones templadas y cálidas del mundo (De Wet, 1978); se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2300 msnm; su hábitat es ruderal y arvense; se puede encontrar a lo largo de carreteras, vías de ferrocarril y alrededor de zonas agrícolas. Se encuentra distribuida en zonas áridas, pastizales y matorrales xerófilos (CONABIO, 2009). Para el óptimo desarrollo del zacate Johnson, se necesitan temperaturas de 27 a 32 °C, aunque posee la capacidad de sobrevivir a temperaturas bajas como -10 °C y necesita una precipitación anual de 500 a 700 mm (Peerzada *et al.*, 2017).

La planta es de fácil propagación ya sea, a través de rizomas subterráneos o semillas (Ohadi *et al.*, 2018; Ceseski *et al.*, 2017). La temperatura mínima para la formación de rizomas es de 15 °C a 20 °C; estos pueden penetrar de 7 a 12 cm en suelo franco arenoso y en suelo arcilloso de 5 a 7 cm (Warwick y Black, 1983). Una planta de zacate Johnson puede producir hasta 28,000 semillas, las cuales pueden ser dispersadas por el viento, agua de riego, equipos agrícolas contaminados,

animales como aves y ganado, donde pueden soportar el paso por su tracto

digestivo (Monaghan, 1979).

2.2 Clasificación taxonómica del zacate Johnson

Taxonomía actual, según el NCBI (2019a):

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: Sorghum

Especie: Sorghum halepense

2.3 Importancia del zacate Johnson en la agricultura

El zacate Johnson ha sido considerada una especie vegetal la cual afecta los intereses del hombre en la agricultura; según Monaghan, (1979) se encuentra en la sexta posición dentro de las diez malezas más problemáticas e importantes a nivel mundial, puede infestar a 30 cultivos diferentes en 53 países según la clasificación de Holm, (1977) citado por (Warwick y Black, 1983; Peerzada et al., 2017); esta maleza compite con cultivos de maíz (Zea mays L.), sorgo (Sorghum bicolor L.), caña de azúcar (Saccharum officinarum L.), soya (Glycine max L.), trigo (Triticum aestivum L.), cacahuate (Arachis hypogaea L.), algodón (Gossypium hirsutum L.), hortalizas, frutales, tabaco (Nicotiana tabacum L.), granos, pastos y alfalfa (Medicago sativa L.) (Monaghan, 1979). Es una especie nativa de Asia que fue introducida y distribuida en toda América, Europa, África y Oceanía (Peerzada et al., 2017).

12

Los principales efectos que ocasiona la presencia de esta maleza en sistemas agrícolas, es la competencia por espacio, nutrientes, agua y luz; ocasionando la reducción en la producción, además de ser hospedantes alternativos de insectos y patógenos como nematodos virus, bacterias y hongos (SENASICA, 2019).

2.4 Pérdidas ocasionadas por zacate Johnson en la agricultura

Sorghum halepense, es considerada una amenaza potencial para los agroecosistemas en 53 países, por su gran adaptación a regiones cálidas y su deliberada introducción por contaminación de semillas y suelo. Esta maleza disminuye el rendimiento de los cultivos en un promedio del 57 al 88 %; su control se encuentra limitado ya que la utilización de métodos químicos ha incrementado la tolerancia de esta maleza a los herbicidas; los enfoques culturales son importantes para evitar la propagación en áreas no infestadas (Peerzada *et al.*, 2017).

Se ha reportado que *S. halepense* ocasiona pérdidas en el rendimiento de los cultivos como el trigo y la soya de 59-88 %, maíz de 80-100 %, caña de azúcar hasta 69 % y algodón del 70 % (Peerzada *et al.*, 2017). El sorgo cultivado para semilla se ve afectado por el polen del zacate Johnson, se obtienen semillas pequeñas y reducen el rendimiento de grano en 0.045 ton ha⁻¹ (Warwick y Black, 1983).

Esta planta arvense libera compuestos aleloquímicos tóxicos y limita la disponibilidad de nutrientes y humedad lo cual afecta la capacidad de desarrollo del cultivo, con ello ocasiona la disminución en el rendimiento potencial del cultivo (Mitskas *et al.*, 2003). El zacate Johnson posee una gran adaptabilidad al estrés hídrico, su competitividad hace que incremente la biomasa de raíces, que ayudan a la extracción del agua; así logra una tasa alta de crecimiento (Acciaresi y Guiamet, 2010).

2.5 Enfermedades importantes en zacate Johnson

Según Monaghan (1979), el zacate Johnson es considerado un huésped alternativo de diversas plagas y patógenos de importancia agrícola. Dentro de las enfermedades están las ocasionadas por virus como el *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Teakle y Grylls, 1973); *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) (Ceseski *et al.*, 2017) y *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) (Garrido y Trujillo, 1993), nematodos como *Heterodera graminophila* (Inserra *et al.*, 1989), bacteriosis causada por *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris* (Malvick, 1991). Se han reportado enfermedades de tipo fúngico alrededor del mundo en *S. halepense*, como la mancha foliar causada por *Exserohilum turcicum* (Del Serrone y Fornasari, 1995), *E. rostratum*, *Bipolaris cynodontis*, *Curvularia lunata* y *C. geniculata*, estas especies han sido aisladas de zacate Johnson (Pratt, 2006).

2.6 El género Curvularia

El género *Curvularia* comprende a un grupo de hongos de la familia Pleosporaceae; incluye especies patógenas, saprófitas y se ha asociado a especies vegetales, animales y humanos; también se han encontrado en agua, aire y suelo (Tan *et al.*, 2018). Especies de *Curvularia*, se han reportado en todo el mundo, y causan daños severos en cereales y pastos (Azizah-Kusai *et al.*, 2016). Las especies de *Curvularia* pueden atacar a un amplio rango de hospedantes entre ellos el maíz, trigo y sorgo, pero también pueden dañar a especies de otras familias, tales como: Actinidiaceae, Aizoaceae, Caricaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Iridaceae, Lamiaceae, Lythraceae, Oleaceae, Polygonaceae y Rubiaceae (Marin-Felix *et al.*, 2017b). Según Pitt y Hocking (2009), los factores ambientales que influyen en el desarrollo de especies de *Curvularia* son la temperatura y la actividad de agua (a_w). Es capaz de germinar a 0.89 a_w y a los 25 °C.

Las especies de Curvularia presentan en su estado asexual (anamorfo),

conidióforos simples, a veces ramificados, septados, rectos, pigmentados,

geniculados de color marrón; sus conidios maduros son ligeramente curvados con

2-3 septos transversales, pigmentación uniforme en todas sus células, la célula

media de mayor tamaño (Shoemaker, 1959). El teleomorfo comprende un ascomata

negro, globoso, bitunicado y ascas cilíndricas; sus ascosporas son hialinas libres.

Su forma sexual, no se encuentra en la naturaleza, pero se puede producir bajo

condiciones experimentales (Nelson, 1964).

En la actualidad la identificación y determinación de las relaciones filogenéticas de

las especies de Curvularia, está basada en técnicas moleculares que utilizan

diversos genes como ITS (espaciador transcrito interno ribosómico nuclear),

GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y TEF (factor de elongación de

traducción) (Berbee et al., 1999; Tan et al., 2014; Manamgoda et al., 2015).

2.7 Clasificación taxonómica del género Curvularia

Taxonomía actual, según el NCBI (2019b):

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Subclase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales

Suborden: Pleosporineae

Familia: Pleosporaceae

Género: Curvularia

15

2.8 Importancia y daños económicos ocasionados por *Curvularia* spp. en la agricultura

El género *Curvularia* comprende a especies fitopatógenas importantes entre ellas, *C. lunata, C. geniculata* (Pratt, 2006; Akram *et al.*, 2014), *C. hawaiiensis, C. eragrostidis, C. aeria* (Azizah-Kusai *et al.*, 2016), *C. dactyloctenicola* (Hidayat y Ramadhani, 2019), *C. hominis* y *C. muehlenbeckiae* (Manamgoda *et al.*, 2015), las cuales se han reportado en todo el mundo por causar daños severos de mancha foliar en miembros de la familia Poaceae entre ellos maíz, sorgo y arroz (Azizah-Kusai *et al.*, 2015). Las especies de *Curvularia* son parásitos facultativos y se encuentran presentes en suelo; causan daños tanto en hojas, tallos, flor y semillas, los síntomas que presentan en los tejidos infectados, son pequeñas manchas marrón-rojizo las cuales se extienden y forman lesiones de mayor tamaño (Estrada y Sandoval, 2004). *C. lunata* está asociada al complejo mancha de asfalto (CMA) en México, Nicaragua, Brasil y Guatemala, el cual es considerado una limitante para zonas productoras como Chiapas y Guerrero, donde se han reportado pérdidas de 55.1% en materiales híbridos de maíz (Ríos-Herrera *et al.*, 2017).

III. ANTECEDENTES

3.1 Investigaciones relevantes sobre *Curvularia* spp. asociadas a plantas de la familia Poaceae

Dentro de las investigaciones más relevantes y recientes sobre el hongo fitopatógeno *Curvularia* y como hospedante de plantas de la familia Poaceae, se destacan las siguientes:

- 1) Pratt, (2006), reporta al zacate Johnson y otros pastos como nuevos hospedantes de seis especies fitopatógenas. En el sureste de los Estados Unidos, se han presentado síntomas en diversos pastos entre ellos el zacate Johnson, en el cual se observó necrosis y muerte regresiva de hojas, tallos y raíces y disminución en el crecimiento. Estos síntomas son ocasionados por hifomicetos dematiáceos. En este estudio se reportó a *E. rostratum*, *B. cynodontis*, *C. lunata* y *C. geniculata* estas especies asociadas a la enfermedad de mancha foliar en zacate Johnson.
- 2) Akram et al. (2014), reportaron por primera vez a C. lunata, como agente causal de la mancha foliar en sorgo en Pakistán; hacen mención que campos enteros fueron afectados por la enfermedad; los síntomas que se presentaron en las hojas fueron manchas circulares color marrón rojizo. Realizaron una descripción morfométrica, los conidióforos fueron de color marrón, septados, geniculados, simples, y presentaron cuatro células grandes y curvadas; su tamaño varía de 7.3 a 21.6 μm. El hongo se identificó mediante técnicas moleculares, se utilizó la combinación de los iniciadores ITS1 / ITS2 e ITS4 / ITS5. La evaluación de la patogenicidad se realizó en quince plantas con su réplica, las cuales fueron asperjadas con 1x10⁶ esporas mL⁻¹ Para la producción de esporas se cultivó al hongo en medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) al 2 % y se incubó por una semana. Sus

- plantas mostraron los síntomas de la enfermedad, iguales a los observados en plantas infectadas en campo.
- 3) Manamgoda et al. (2015), en el presente estudio realizaron una evaluación taxonómica y filogenética del género Curvularia (Pleosporaceae) como patógenos de humanos y plantas. Se elaboró un árbol basado en regiones genéticas ITS, GPDH y TEF, obtenidas de distintos huéspedes en colecciones frescas y de diferentes ubicaciones geográficas del mundo. Algunas de las especies que habían sido descritas en humanos, se encontraron como patógenos de plantas. C. muehlenbeckiae estuvo presente en Sorghum sp. y S. bicolor en Estados Unidos y Japón, y C. trifolii en sorgo en Sudáfrica. C. hominis y C. muehlenbeckiae, en principio se describieron como patógenos de humanos, se aislaron de Sorghum sp. por primera vez en este estudio.
- 4) Azizah-Kusai et al. (2016), los autores de la presente investigación; realizaron una caracterización morfométrica e identificaron mediante técnicas moleculares a especies de Curvularia asociadas a la mancha foliar en arroz (O. sativa) en Malasia Peninsular y determinaron la filogenia de los aislados obtenidos. Se realizó una descripción fenotípica en la que evaluaron las características más importantes como apariencia, pigmentación y crecimiento radial. Los aislados fueron crecidos en medio completo de xilosa (CMX) en condiciones de 12 h luz y 12 h oscuridad y se preservaron en glicerol al 25 % a -80 °C. Para la morfometría se utilizó medio de cultivo agua agar (AA) con paja de arroz estéril y fueron incubados por siete días; evaluaron forma y tamaño de conidios, número de septos transversales y conidióforo. En la identificación molecular se utilizaron iniciadores ITS1 e ITS4. Como resultado se identificó a C. hawaiiensis, C. geniculata, C. eragrostidis, C. lunata y C. aeria y a B. sorokiniana.

- 5) Xu et al. (2018), realizaron el primer reporte en China sobre C. lunata, asociado a la mancha foliar en Pennisetum hydridum; describen los síntomas como pequeñas manchas de color rojo oscuro; pueden ser redondas u ovales hasta formar lesiones irregulares. Aislaron el hongo a partir del tejido sintomático y lo crecieron en PDA, incubaron a 28 °C, realizaron descripción fenotípica de los cultivos, describen las colonias de color blanco-grisáceo, que se tornan a color verde-negruzco. Realizaron morfometría y sus resultados de conidios fueron de 23.17 a 31.61 × 8.92 a 13.91 µm, y tres septos transversales. En la presente investigación se identificó a la especie mediante herramientas moleculares, se amplificaron las regiones ITS con los iniciadores ITS1 / ITS4, y GAPDH por gpd1 / gpd2. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en hojas desprendidas, con una suspensión de esporas de 1x106 mL-1; a los siete días, se observaron los síntomas de la enfermedad.
- 6) Hidayat y Ramadhani, (2019), reportaron a dos especies de Curvularia patógenas en sorgo en Indonesia, realizaron la identificación de cuatro aislados obtenidos de tejido sintomático de sorgo; los autores realizaron un análisis filogenético basado en la región ITS (espaciador transcrito interno) y se complementó dicho estudio con la morfología de los aislados. Los cuatro aislados fueron genéticamente idénticos a C. lunata y C. dactyloctenicola.

IV. JUSTIFICACIÓN

En Sinaloa, el zacate Johnson es una ruderal que compite con cultivos de importancia agrícola, lo que repercute en el manejo de éstos. En años recientes en México, se han reportado síntomas severos de mancha foliar en esta Poaceae. A la fecha no existe información científica que sustente la identidad del agente causal de la enfermedad. En el presente trabajo se aborda la identificación de las especies de *Curvularia* asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson y su patogenicidad. En este estudio se generará conocimiento sobre la etiología de la enfermedad y la biodiversidad de las especies fúngicas presentes en la región asociadas a zacate Johnson.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar mediante estudios morfométricos, moleculares y patogénicos los aislados de *Curvularia* asociados a la mancha foliar en zacate Johnson (*Sorghum halepense* L.).

5.2 Objetivos específicos

- Identificar mediante estudios fenotípicos y morfométricos los aislados de Curvularia spp.
- Caracterizar mediante técnicas moleculares a las especies de *Curvularia* asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson.
- Determinar la patogenicidad de especies de *Curvularia* en zacate Johnson.

VI. HIPÓTESIS

Más de una especie de *Curvularia* causan la mancha foliar en zacate Johnson en el norte de Sinaloa, México.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Colecta de muestras de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar en el norte de Sinaloa

Los recorridos de campo se realizaron en el norte de Sinaloa durante los meses de octubre y noviembre en 2018, en los municipios de Ahome y Guasave, se recolectaron 10 hojas de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar por sitio de muestreo a una distancia mayor a 2 km; los sitios de muestreo fueron georreferenciados mediante GPS Apple iOS (versión 13.6.1). Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, etiquetadas y se depositadas en una hielera (8 a 10 °C), se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis para su procesamiento, lo cual se llevó a cabo en un periodo no mayor de 48 h después de su recolección.

7.2 Obtención de aislados de hongos asociados a la mancha foliar en zacate Johnson

Los aislados se obtuvieron a partir de hojas de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar, se realizaron cortes del tejido vegetal de $0.5~\rm cm^2$ del margen de las lesiones, éstas se sumergieron en hipoclorito de sodio al $0.5~\rm \%$ por un minuto, después se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril. Los tejidos se colocaron sobre papel absorbente estéril para su secado, enseguida se sembraron cinco cortes en cada caja Petri con medio de cultivo AA al $1.6~\rm \%$ (Becton Dickinson, México). Las cajas de cultivo se incubaron a temperatura ambiente $25 \pm 2~\rm ^{\circ}C$, hasta observar desarrollo micelial. Los aislados fueron transferidos al medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Becton Dickinson, México) y se incubaron a temperatura ambiente.

7.3 Obtención de cultivos monospóricos de hongos asociados a la enfermedad

Los aislados se sembraron en medio de cultivo AA al 1.6% con hojas de zacate Johnson estéril (Anexo) y se colocaron en una incubadora de madera a 24 °C con regímenes de 10 h de luz y 14 h de oscuridad durante 10 días, para la obtención de cultivos monospóricos. Enseguida, un fragmento de hoja colonizada por el hongo se depositó en tubo Eppendorf con 0.5 mL de agua destilada estéril, se agitó en vórtex para desprender los conidios y realizar una dilución 10^{-1} . De esta dilución se tomaron 0.2 mL y se colocaron en el centro de las placas con medio AA y se dispersó por asa de Digralsky; las placas se incubaron durante 7-10 h a 25 ± 2 °C. Después, se tomó un conidio germinado y se transfirió a medio de cultivo PDA. Los aislados monospóricos se incubaron durante seis días a 25 ± 2 °C. Los aislados puros se transfirieron a tubos de ensayo con PDA inclinado donde se desarrollaron a 24 °C por 10 días, para cubrirse con aceite mineral estéril y se preservaron a la misma temperatura, para su utilización en estudios subsiguientes.

7.4 Caracterización fenotípica de las colonias de *Curvularia* spp.

Las colonias de 12 aislados de *Curvularia* asociados a la mancha foliar en zacate Johnson, se caracterizaron mediante los procedimientos desarrollados por Marin-Felix *et al.* (2017b) y Kidd *et al.* (2016). Las características registradas fueron, el color de la colonia (Ridgway, 1912), producción de pigmentos, tipo de margen, características de las hifas como pigmentación, presencia de tabiques y ramificación.

Se determinó la tasa de crecimiento micelial (mm día-1) en PDA las colonias se incubaron a 25 ± 2 °C con regímenes de 10 h luz y 14 h oscuridad en un periodo de 10 días (Kim *et al.*, 2005). El experimento de tasa de crecimiento micelial se realizó en dos ocasiones; los tratamientos se distribuyeron en un arreglo completamente al

azar; utilizando cuatro repeticiones por aislado en medio de cultivo PDA y se realizó una comparación de medias mediante el procedimiento Tukey (P=0.05).

7.5 Morfometría de los aislados obtenidos de *Curvularia* a partir de tejido sintomático

Los aislados se transfirieron a cajas Petri con medio PDA y se incubaron a 24 °C con regímenes de 10 h luz y 14 h oscuridad durante 15 días. Los conidios se observaron con un microscopio compuesto (Labomed, Inc, USA); con el objetivo 40 X y un micrómetro ocular. Las preparaciones en fresco se realizaron con azul de lactofenol (Parija y Prabhakar, 1995). Para asegurar la uniformidad en la forma y tamaño de los conidios, éstos se tomaron a 2 cm al interior del margen de la colonia. La forma, longitud, diámetro y número de septos transversales se midió en 40 conidios por aislado (Marin-Felix *et al.*, 2017b).

7.6 Caracterización molecular

7.6.1 Extracción de ADN

El ADN de 12 aislados con ocho días de edad cultivados a 25 ± 2 °C en PDA, se extrajo con el kit DNAzol® Reagent. El micelio se obtuvo mediante un raspado con un asa bacteriológica estéril y se colocó en un tubo de 1.5 mL con 200 μ L de DNAzol. El micelio se congeló y maceró con pistilos estériles para propiciar la lisis celular. Las muestras se incubaron por 10 minutos en hielo; enseguida se centrifugaron a temperatura ambiente (Silent Spin 24 -D703153) a 10,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Al precipitado del ADN, se agregaron 500 μ L de alcohol absoluto refrigerado a 4 °C y se mezcló cinco veces por inversión; las muestras se incubaron por 20 minutos a -20 °C para favorecer la precipitación. Enseguida, las muestras se centrifugaron de nuevo a 12,000 rpm por cinco minutos

a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 μ L de etanol al 75 % (4 °C), y se mezcló por inversión cuatro veces; las muestras se incubaron por cinco minutos a temperatura ambiente y después se centrifugaron a 10,000 rpm por dos minutos a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. El procedimiento antes mencionado se repitió en una ocasión. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por dos horas hasta la completa evaporación del etanol. En la elución del ADN, se agregaron 30 μ L de agua ultra pura y se agitaron en vórtex. La concentración del ADN ng μ L-1 se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). En la electroforesis se utilizó un gel de agarosa al 1% (GALILEO bioscience) y se observó en un fotodocumentador (BIO-RAD) para visualizar el ADN.

7.6.2 Amplificación del ADN obtenido de aislados de Curvularia

Los aislados de *Curvularia* se identificaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los iniciadores ITS: (ITS1: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G e ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC); GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa): (GPD1: CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG y GPD2: GCC AAG CAG TTG GTT GTG C) (Berbee *et al.*, 1999; Manamgoda *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2014).

Los componentes de la reacción de PCR fueron los siguientes: H_2O ultra pura 17.25 μ L, buffer sin MgCl₂ 2.5 μ L, MgCl₂ 10 mM 0.75 μ L, dNTPs 10 mM 1.25 μ L, primers 1.0 μ L, Taq-ADN-polimerasa 0.25 μ L. Enseguida, de la solución stock se tomaron 24 μ L, a la cual se adicionó 1 μ L de ADN obtenido de los aislados, al control negativo se colocó 1 μ L de H_2O ultra pura y al control positivo ADN de *C. hawaiiensis*. Enseguida, las muestras se colocaron en una microcentrífuga por un pulso de 10 segundos y después se colocaron en un termociclador (Vertiti 96 Well Thermal Cycler y MULTIGENE Labnet)

Las condiciones para los iniciadores ITS1 e ITS4 fueron las siguientes: para la desnaturalización, se realizó un ciclo inicial a 95 °C por cuatro minutos, después 34

ciclos a 95 °C por un minuto, el alineamiento a 55 °C por un minuto; extensión a 72 °C por dos minutos y una extensión final por cinco minutos a 72 °C, se finalizó a 12 °C. Para los GPD1 y GPD2, para la desnaturalización del ADN, se realizó un ciclo inicial de 95 °C por dos minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C por un minuto, el alineamiento a 52 °C por un minuto, la extensión a 72 °C por 45 segundos y una extensión final de 10 minutos a la misma temperatura y finalizó en 12 °C.

El producto de PCR resultante, se visualizó mediante gel de agarosa al 1% (0.4 g de agarosa en 40 mL de buffer TAE 1X). La cámara de electroforesis se cargó con 5 μL del producto de PCR, 2 μL de buffer de carga y 2 μL de marcador de peso molecular Lambda, se colocó a las condiciones 100 V, 400 mA por 40 minutos.

7.6.3 Purificación del producto de PCR amplificados con ITS y GAPDH

Los productos de PCR resultantes de los iniciadores ITS1/ITS4 y GPD1/GPD2, se purificaron mediante los reactivos de QIAquick® PCR Purification Kit (250) (157043045). Al tubo con el producto de PCR se le agregaron 100 µL del Binding buffer PB y se transfirió el volumen total del tubo a una columna nueva; seguido se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto a temperatura ambiente, para que el ADN se adhiriera a la columna. Se decantó el líquido que pasó por la columna y se lavó con 750 µL del wash buffer PE y se dejó reposar por un minuto. En seguida se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto y se decantó el líquido que pasó por la columna. Se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto, para el secado de la columna. Para la elución de ADN se agregaron 30 µL del buffer EB y se colocaron las columnas en tubos limpios de 1.5 mL, se incubaron por dos minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron otros 30 µL del buffer EB, y se centrifugó de la forma antes mencionada. La columna se desechó y las muestras se almacenaron a -20 °C. La concentración del ADN se determinó en cada una de las muestras mediante la cuantificación en un espectrofotómetro, se preparó un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador.

7.6.4 Secuenciación de productos de PCR, edición y alineación de secuencias

Los productos de PCR purificados, se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Irapuato, México. La secuenciación para ITS y GAPDH se realizó en una dirección (forward 5´->3´). Las secuencias, fueron observadas en el programa ChromasPro 2 (Technelysium DNA Sequencing Software); se alinearon y editaron con el software Editseq (Lasergene) y comparadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI-BLAST).

7.6.5 Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó mediante el software MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), la edición se realizó en software FigTree 1.4.0. El árbol filogenético se realizó con base en el modelo de máxima verosimilitud (Neighbor-Joining) con 1,000 boostrap, se utilizó el modelo Kimura 2-parameter y Tamura 3-parameter con distribución gamma para modelar la variación de tasa entre sitios. Las secuencias de referencia de las especies de *Curvularia* se utilizaron para comparar entre las secuencias de los aislados obtenidos, como grupo externo se utilizó una secuencia de *Bipolaris maydis* (outgroup) para enraizar el árbol filogenético resultante.

7.7 Patogenicidad de aislados de Curvularia obtenidos de zacate Johnson

7.7.1 Producción de plantas de zacate Johnson

Las plantas de zacate Johnson se cultivaron a partir de semilla, la cual fue recolectada en agosto de 2019 en terrenos del Campo Experimental Valle del Fuerte – INIFAP, Juan José Ríos, Sinaloa. Las macetas que se utilizaron fueron de 28 cm de diámetro y se llenaron con suelo solarizado (arcilla: limo: arena, en las proporciones 28.1:27:44.9 con un pH de 7.0); se colocaron dos semillas en cada maceta; al final se dejó una planta por maceta, la cual se regó según sus requerimientos hídricos y se fertilizó cada siete días con Miracle-Gro (The Scotts Company LLC; Marysville, Ohio, USA) con las recomendaciones del fabricante.

7.7.2 Producción de inóculo de *C. dactyloctenicola* y *C. muehlenbeckiae* y pruebas de patogenicidad en zacate Johnson

La patogenicidad de dos aislados de *C. dactyloctenicola* (*Cd*1 y *Cd*2) y siete de *C. muehlenbeckiae* (*Cm*7, *Cm*10, *Cm*13, *Cm*16, *Cm*18, *Cm*19, *Cm*20), se determinó en zacate Johnson. La producción de inóculo de los aislados, se llevó a cabo mediante los procedimientos desarrollados por Estrada y Sandoval (2004) y Marin-Felix *et al.* (2017b) con algunas modificaciones. Los aislados se sembraron en placas de Petri con medio AA al 1.6% con hojas de zacate Johnson esterilizadas y se incubaron a 24 °C bajo un régimen de 10 h luz y 14 h oscuridad por un periodo de 12 días. A cada caja de cultivo se le agregaron 20 mL de agua destilada estéril, enseguida el crecimiento superficial del medio de cultivo se raspó con una espátula estéril para el desprendimiento del micelio y los conidios. La suspensión de conidios se filtró con malla de algodón grado 90. La concentración de conidios se ajustó a 13x10⁴ a 19x10⁴ conidios mL-1, mediante un hematocitómetro (Estrada y Sandoval, 2004; Rodrigues *et al.*, 2010). Las suspensiones de conidios se asperjaron en plantas de zacate Johnson en etapa de floración (60 días de edad). Los aislados se

inocularon de forma separada en el follaje; a las plantas testigo se les asperjó agua destilada estéril. Enseguida, las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno transparente. Para propiciar altos niveles de humedad relativa en el interior de las bolsas con las plantas, se colocó papel absorbente saturado con agua corriente durante 12 h durante seis días consecutivos después de la inoculación; la temperatura ambiente varió de 25 a 28 °C. El experimento se estableció en dos ocasiones y los tratamientos se distribuyeron en un arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones (cuatro plantas en su respectiva maceta) para cada aislado.

La patogenicidad se determinó a los 15 días de la inoculación y se determinó con base en el área foliar afectada (AFA) en cm². Un total de 10 hojas de cada planta fueron seleccionadas al azar y se determinó en cada una de ellas el AFA mediante la utilización de una cuadrícula de 10 x 25 cm con cuadros de 0.5 x 0.5 cm la cual se colocó sobre las lesiones de las hojas y se cuantificó el número de puntos sobre las lesiones y el total se dividió entre cuatro (Zadoks y Schein, 1979). Una vez obtenido el AFA, se obtuvo el porcentaje con la siguiente fórmula:

$$AFA \text{ en cm}^2$$
% de AFA = $x 100$
Área total de la hoja en cm²

Los datos sobre el porcentaje de AFA se sometieron a un análisis de varianza paramétrica y separación de medias de acuerdo al procedimiento de Tukey (P=0.05).

VIII. RESULTADOS

8.1 Síntomas de zacate Johnson en campo y obtención de aislados de *Curvularia*

Los síntomas de mancha foliar en campo se presentaron con mayor frecuencia en hojas senescentes; los síntomas iniciales consistieron en manchas circulares pequeñas (1 a 3 mm de diámetro), con frecuencia rodeadas de un halo clorótico tenue; en estados avanzados de la enfermedad las hojas mostraron lesiones oblongas (2 a 13 cm de longitud y 0.3 a 1.5 cm de ancho) con un centro pajizo de color café claro y borde café rojizo (Figura 1A); la vaina de la hoja mostró manchas irregulares café rojizo la cuales se extendieron a través de las nervaduras con el mismo color (Figura 1B).

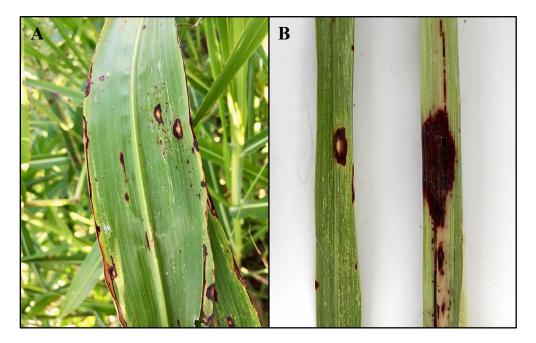


Figura 1. Hojas de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar. A) síntomas iniciales y avanzados de la enfermedad en campo, B) lesiones oblongas presentes en lámina foliar y vaina de la hoja.

Doce aislados del género *Curvularia*, se obtuvieron a partir de hojas sintomáticas de zacate Johnson (Figura 2 y Cuadro 1); de acuerdo a descripciones morfológicas para dicho género (Manamgoda *et al.*, 2012; Marin-Felix *et al.*, 2017b).

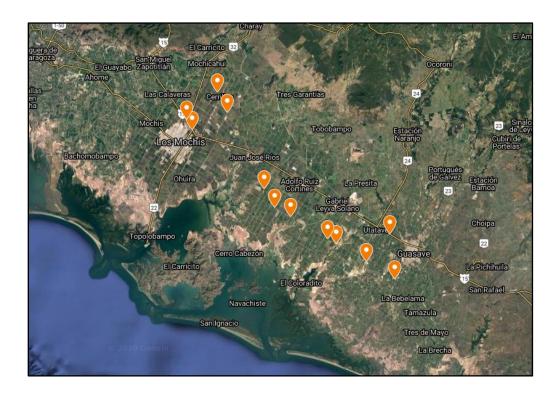


Figura 2. Sitios de muestreo de 12 aislados obtenidos a partir de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar; puntos naranjas corresponden a los muestreos realizados en 2018, en los municipios de Ahome y Guasave, en el norte de Sinaloa.

Cuadro 1. Localidades y georreferencias de los sitios de muestreo de hojas de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar durante octubre-noviembre de 2018, en los municipios de Ahome y Guasave, Sinaloa.

Aislado	Localidad/Municipio	Ubicación	geográfica	Fecha de colecta
		N	0	
Cd1	Los Mochis, Ahome	25° 48' 49"	108° 57' 42"	01/10/2018
Cd2	Los Mochis II, Ahome	25° 50' 02"	108° 58' 25"	10/10/2018
Cm7	Santa Rosa, Ahome	25° 50' 55"	108° 52' 58"	28/10/2018
Cm10	Cerrillos, Ahome	25° 53' 18"	108° 54' 17"	28/10/2018
Cm13	San Fernando, Guasave	25° 32' 56"	108° 34' 23"	06/11/2018
Cm14	Campo Díaz, Guasave	25° 30' 52"	108° 30' 35"	06/11/2018
Cm15	Bacahui, Guasave	25° 35' 05"	108° 38' 24"	06/11/2018
Cm16	Bacahui II, Guasave	25° 35' 41"	108° 39' 33"	06/11/2018
Cm17	Baturi, Guasave	25° 39' 29"	108° 46' 39"	06/11/2018
Cm18	Corerepe, Guasave	25° 38' 20"	108° 44' 31"	06/11/2018
Cm19	Bachoco, Guasave	25° 41' 43"	108° 47' 59"	10/11/2018
Cm20	Valle Verde, Guasave	25° 36' 17"	108° 31' 14"	10/11/2018

8.2 Caracterización fenotípica y morfométrica de aislados de *Curvularia* asociados a la mancha foliar en zacate Johnson

8.2.1 Características fenotípicas de aislados de Curvularia

Las colonias de los aislados Cd1 y Cd2, a los cinco días, mostraron un crecimiento algodonoso blanquecino y áreas café claro a obscuro en su parte central y bordes irregulares; al reverso de la placa, presentó color café obscuro en el centro y en el margen color naranja-marrón, con anillos concéntricos tenues en el margen de la colonia (Figura 3A, B). A los 10 días, mostraron un crecimiento plano, de color café claro con áreas blanquecinas y el margen naranja-marrón, con anillos concéntricos en el anverso; al reverso de la placa, fue de color café obscuro con anillos concéntricos tenues (Figura 3C, D).

Los aislados Cm7, Cm10, Cm13, Cm14, Cm15, Cm16, Cm17, Cm18, Cm19 y Cm20, a los cinco días de incubación, mostraron colonias con apariencia algodonosa en su parte central, presencia de anillos concéntricos, color verde olivo claro y bordes regulares; al reverso de la placa, se observó un color verde olivo a gris con anillos concéntricos marcados (Figura 4A, B). A los 10 días, mostraron un crecimiento algodonoso blanquecino con margen verde olivo; al reverso de la placa, presentaron color negro con margen verde olivo (Figura 4C, D).

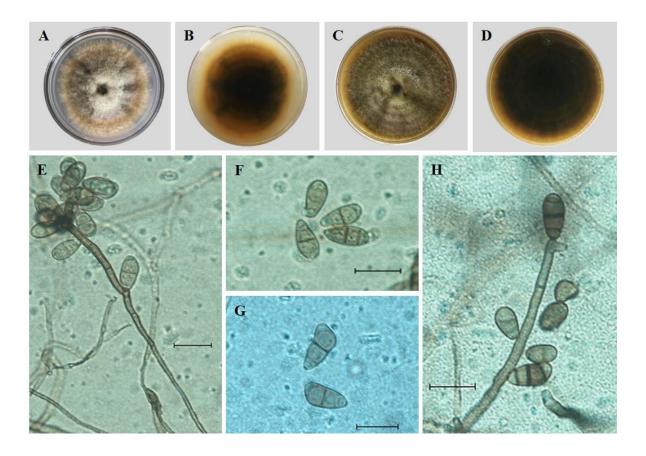


Figura 3. Características morfológicas de *Curvularia dactyloctenicola*; A) Colonia en medio de cultivo PDA después de cinco días de incubación a 25 ± 2 °C con regímenes de 10 h luz y 14 h oscuridad, B) Reverso de placa de Petri, color café obscuro en centro y margen naranja-marrón con anillos concéntricos tenues, C) Colonia en PDA después de 10 días de incubación, D) Reverso de placa petri color café obscuro con anillos concéntricos tenues, E) Conidióforo septado, simple, pigmentado de color café con conidios en racimo, F,G) Conidios elipsoides con tres septos transversales, curvados, pigmentados color café con hinchamiento en segunda célula, H) Conidióforo geniculado con conidio en la punta. Barra de escala = 20 μm.

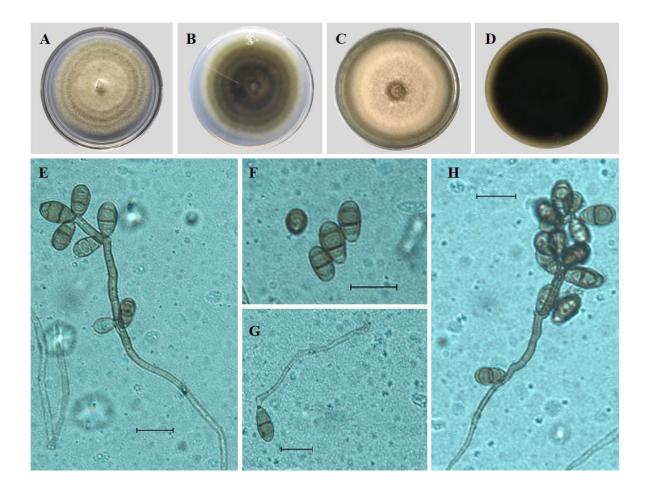


Figura 4. Características morfológicas de *Curvularia muehlenbeckiae*; A) Colonia en medio de cultivo PDA después de cinco días de incubación a 25 ± 2 °C con regímenes de 10 h luz y 14 h oscuridad, B) Reverso de placa de petri con anillos concéntricos color verde olivo, C) Colonia en PDA después de 10 días de incubación, D) Reverso de placa petri color negro y margen verde olivo, E) Conidióforo septado, simple, geniculado, pigmentado con conidios en la punta y parte media, F) Conidios con tres septos transversales, pigmentados con hinchamiento en segunda célula, G) Conidio germinado, H) Conidióforo geniculado con conidios en forma de racimo. Barra de escala = 20 μm

8.2.2 Morfometría de conidios de aislados de *Curvularia* asociados a la mancha foliar en zacate Johnson

Aislados Cd1 y Cd2. Conidióforos simples, septados, rectos, pigmentados de color café, geniculados, con conidios en forma de racimo (Figura 3E, H). Conidios elipsoides, pigmentados de color café, curvados, con la célula media desigualmente agrandada, con tres septos transversales; la longitud de los conidios varió de 17.5 a 22.5 μ m, con un promedio de 20.5 μ m (SD 1.5) (Por sus siglas en inglés, Standard Deviation); con 7.5 a 11.2 μ m de ancho y un promedio de 9.3 μ m (SD 1.0) (Figura 3F, G).

Aislados Cm7, Cm10, Cm13, Cm14, Cm15, Cm16, Cm17, Cm18, Cm19 y Cm20. Conidióforos simples, pigmentados de color café obscuro, geniculados, septados con conidios en la punta y parte media (Figura 4E, H). Conidios elipsoides, pigmentados de color café, ligeramente curvado, con hinchamiento en segunda célula, con tres septos transversales; la longitud de los conidios varió de 12.5 a 23.7 μm, con un promedio de 19.1 μm (SD 2.1); con 5.0 a 12.2 μm de ancho, con un promedio de 9.2 μm (SD 1.4) (Figura 4F, G).

Cuadro 2. Características morfométricas de conidios de dos especies de *Curvularia* obtenidas a partir de zacate Johnson desarrolladas en medio de cultivo PDA.

	Longitud	Ancho	Relación (L/A)	Septos
Especie / Aislado	(µm)	(µm)	(µm)	transversales
Curvularia dactyloctenicola				
	17.5-22.5 ^x	7.5-10.2		
Cd1	20.6 ^y	9.4	2.1	3
	1.3 ^z	0.8		
	17.5-22.5	7.5-11.2		
Cd2	20.5	9.1	2.2	3
	1.6	1.2		
	17.5-22.5	7.5-11.2		
Media general	20.5	9.3	2.2	3
	1.5	1.0		
Curvularia muehlenbeckiae				
	17.5-22.5	7.5-11.2		
Cm7	20.1	9.8	2.0	3
	1.4	0.7		
	17.5-22.5	8.0-10.2		
Cm10	19.3	9.8	2.0	3
	1.3	0.4		
Cm12	17.0-22.5 19.7	7.5-11.2	2.0	2
Cm13	19.7	9.8 0.6	2.0	3
	17.5-22.5	7.5-10.0		
Cm14	17.3-22.3	9.5	2.0	3
Omi	1.4	0.7	2.0	9
	17.0-22.5	7.5-10.7		
Cm15	18.8	9.3	2.0	3
	1.4	8.0		
	12.5-17.5	5.0-7.5		

Media general	12.5-23.7 19.1 2.1	5.0-12.2 9.2 1.4	2.0	3
Cm20	20.0 1.5	9.6 0.9	2.1	3
	1.2 17.5-23.7			_
Cm19	19.6	9.6	2.0	3
55	1.3 17.5-22.5	0.9 7.5-10.5		J
Cm18	17.5-22.5 19.7	7.5-10.0 9.4	2.1	3
Cm17	16.2-22.5 19.6 1.7		2.0	3
Cm16	14.5 1.4	5.4 0.8	2.7	3

Los valores de las dimensiones en (µm) representan el promedio de la medición de 40 conidios de 2 y 10 aislados de *Curvularia dactyloctenicola* y *C. muehlenbeckiae* de forma respectiva, obtenidos a partir de tejido sintomático de zacate Johnson.

^xEl primer renglón en cada aislado muestra los rangos mínimos y máximos de la longitud de los conidios; ^yel segundo renglón muestra la media de 40 mediciones de conidios por aislado; ^zel tercer renglón indica la desviación estándar.

8.3 Crecimiento micelial de especies de *Curvularia muehlenbeckiae* y *C. dactyloctenicola*

La tasa de crecimiento micelial de los aislados Cd1 y Cd2 de *C. dactyloctenicola* en medio de cultivo PDA fue de 7.2 y 6.8 mm día-1, sin diferencias significativas entre ellos (P≥0.05). A su vez, los aislados de *C. dactyloctenicola* no mostraron diferencias significativas con respecto a los aislados Cm 10, Cm16, Cm17, Cm18 y Cm20 de *C. muehlenbeckiae* los cuales tuvieron un crecimiento de 5.9, 7.2, 7.5, 6.7 y 7.7 mm día-1 de forma respectiva. Los aislados Cm13, Cm14, Cm15 y Cm19 de *C. muehlenbeckiae* no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero si respecto al resto de los aislados (P≤0.05), el crecimiento micelial fue de 5.5, 5.2, 4.9 y 4.7 mm día-1. El aislado Cm7 no mostró diferencias significativas respecto a los aislados Cm13, Cm14, Cm15 y Cm19, pero fue el que obtuvo un menor crecimiento micelial de 4.4 mm día-1 (Cuadro 3).

Se muestran los resultados del experimento 1, ya que los resultados del segundo experimento fueron similares.

Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo PDA en el crecimiento micelial de dos aislados de *Curvularia dactyloctenicola* y 10 aislados de *C. muehlenbeckiae* a 25 \pm 2 °C sometidos a fotoperiodos de 10 h luz y 14 h oscuridad.

Especie / Aislado	Media / Crecimiento radial en medio PDA ^x	
	mm día ⁻¹	
Curvularia dactyloctenicola		
Cd1	7.2 ab*	
Cd2	6.8 abc	
Curvularia muehlenbeckiae		
Cm7	4.4 e	
Cm10	5.9 bcd	
Cm13	5.5 cde	
Cm14	5.2 de	
Cm15	4.9 de	
Cm16	7.2 ab	
Cm17	7.5 a	
Cm18	6.7 abc	
Cm19	4.7 de	
Cm20	7.7 a	

^xPDA = papa dextrosa agar

^{*}Medias dentro de la columna con letras en común no son significativamente diferentes (P≥0.05) de acuerdo con una comparación de medias mediante el procedimiento Tukey.

8.4 Análisis molecular

Los productos de amplificación para la región ITS fueron aproximados a las 600 pares de bases (pb) (Figura 5), mientras que para GAPDH fueron de 598 pb (Figura 6). Los controles negativos no amplificaron, mientras que los positivos, con ADN de $C.\ hawaiiensis$ si amplificaron bandas similares a las de los aislados. La concentración de ADN genómico de los aislados varió de 10.6 a 138.8 ng μL^{-1} y la absorbancia en relación a A_{260}/A_{280} 1.5 a 2.1.

Se obtuvieron dos árboles filogenéticos con base en las secuencias de la región ITS con el modelo Kimura 2-parameter y GAPDH con el modelo Tamura 3-parameter, ambos con cuatro categorías gamma y como grupo externo la secuencia correspondiente a *Bipolaris maydis* (MH855024), los cuales permitieron determinar la identidad de los aislados obtenidos de tejido sintomático de zacate Johnson.

El árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias de ITS (Figura 7) agrupó a los aislados Cd1 a C. lunata (JX256429), Cd2 a C. chiangmaiensis (MF490814), Cm17 a C. fallax (MH855476); los aislados Cm7 y Cm13 fueron cercanos a C. fallax, Cm10, Cm15 y Cm18 idénticos a C. hominis (HG779011), Cm14, Cm16, Cm19 y Cm20 a C. pisi (KY905678). Basado en la comparación de secuencias en la base de datos GenBank por BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) mostró que los aislados tenían un alto porcentaje de similitud entre el 97 y el 100%.

El árbol filogenético obtenido con base en las secuencias del gen GAPDH (Figura 8), mostró una mayor claridad y separación entre las especies de *Curvularia*. La identidad de los aislados Cd1 y Cd2 corresponden a un mismo halotipo de *C. dactyloctenicola* (MF490837) siendo idénticos entre ellos; mientras que los aislados Cm7, Cm10, Cm13, Cm14, Cm15, Cm16, Cm17, Cm18, Cm19 y Cm20 se ubicaron dentro de la especie *C. muehlenbeckiae* (KP419996). Basado en la comparación de

secuencias en la base de datos GenBank por BLASTn, los aislados tenían un alto porcentaje de similitud entre el 99 y el 100%.

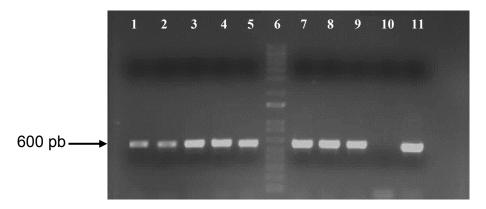


Figura 5. Gel de electroforesis en agarosa al 1 % mostrando la amplificación de ocho muestras de *Curvularia* para la región espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr a las 600 pb. Carril 1-5, 7-9). Aislados de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar. Carril 6) Marcador de peso molecular 1kb. Carril 10) Control negativo (H₂O ultra pura). Carril 11) Control positivo (*Curvularia hawaiiensis*).

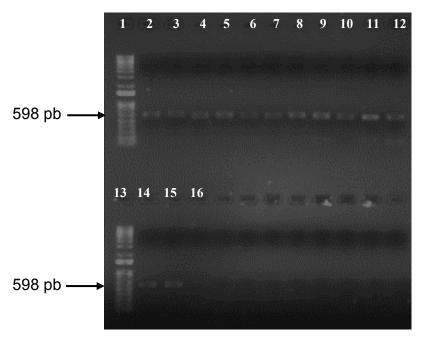


Figura 6. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando la amplificación de 12 muestras de *Curvularia* para el gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) a las 598 pb. Carril 2-12 y 14). Aislados de zacate Johnson con síntomas de mancha foliar. Carril 1 y 13) marcador de peso molecular 1kb. Carril 15) Control positivo (*Curvularia hawaiiensis*). Carril 16) Control negativo (H₂O ultra pura).

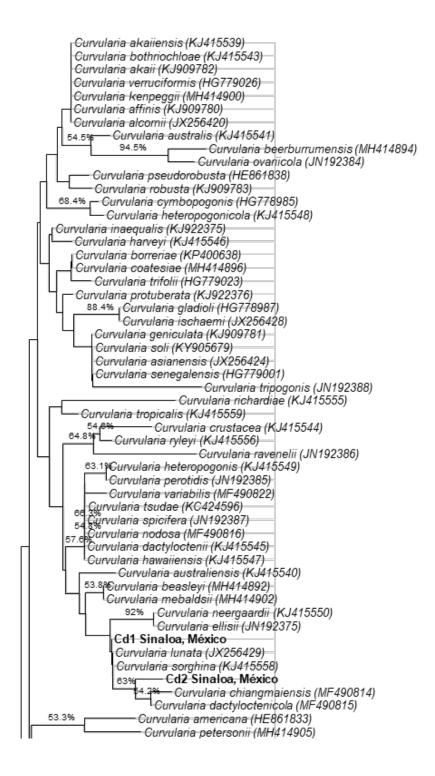


Figura 7. Árbol filogenético basado en la región espaciador transcrito interno, ITS del ADNr de 12 aislados obtenidos de zacate Johnson.

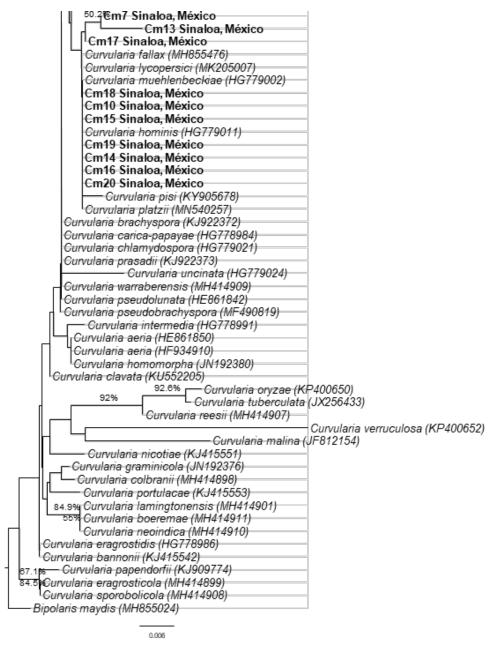


Figura 7. Árbol filogenético basado en la región espaciador transcrito interno, ITS del ADNr de 12 aislados obtenidos de zacate Johnson; Análisis de Neighbor-joining; el árbol fue construido con MEGA 6.0 (bootstrap= 1000), utilizando el modelo Kimura 2-parameter y cuatro categorías gamma para modelar la variación de tasa entre sitios. La secuencia correspondiente de *Bipolaris maydis* fue utilizado como un grupo externo. Los números de acceso a la base de datos NCBI de las secuencias se proporcionan en paréntesis. Los valores de Bootstrap se dan como porcentajes. Las secuencias de aislamientos obtenidas en este trabajo se muestran en negrita y la barra de escala indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

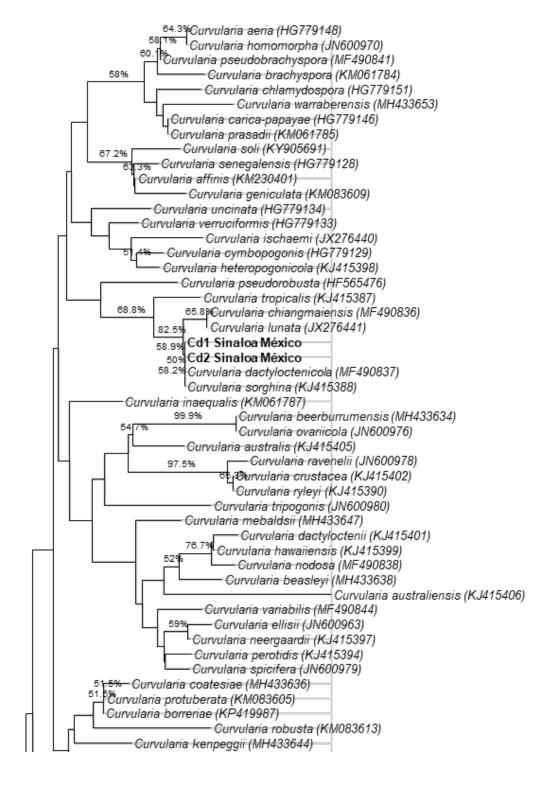


Figura 8. Árbol filogenético basado en el gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de 12 aislados obtenidos de zacate Johnson.

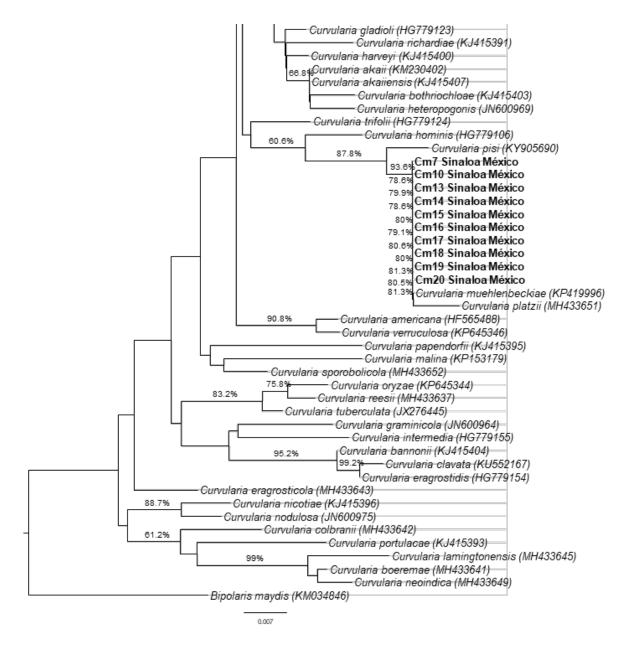


Figura 8. Árbol filogenético basado en el gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de 12 aislados obtenidos de zacate Johnson; Análisis de Neighbor-joining; el árbol fue construido con MEGA 6.0 (bootstrap= 1000), utilizando el modelo Tamura 3-parameter y cuatro categorías gamma para modelar la variación de tasa entre sitios. La secuencia correspondiente de *Bipolaris maydis* fue utilizado como un grupo externo. Los números de acceso a la base de datos NCBI de las secuencias se proporcionan en paréntesis Los valores de Bootstrap se dan como porcentajes. Las secuencias de aislamientos obtenidas en este trabajo se muestran en negrita y la barra de escala indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

8.5 Pruebas de patogenicidad de aislados de *C. dactyloctenicola* y *C. muehlenbeckiae* obtenidos de zacate Johnson

Los dos aislados de *C. dactyloctenicola* y siete aislados de *C. muehlenbeckiae* fueron patogénicos en zacate Johnson. Las plantas mostraron los síntomas de mancha foliar similares a los observados en campo, mientras que las plantas testigo sin inoculación permanecieron asintomáticas durante las pruebas de patogenicidad, en ambos experimentos.

Las plantas de zacate Johnson, presentaron síntomas iniciales de mancha foliar, los cuales se manifestaron a las 48 h después de la inoculación. Los síntomas se presentaron como pequeñas manchas circulares de color café y borde café rojizo con un centro pajizo que van de 1 a 3 mm de diámetro (Figura 9A). A las 96 h después de la inoculación, se presentaron lesiones oblongas de color café rojizo. También se observaron síntomas en la nervadura principal, como manchas alargadas de color café rojizo y centro color pajizo (Figura 9B); en la vaina de la hoja, se presentaron manchas punteadas a irregulares de color café rojizo (Figura 9C). Las plantas de zacate Johnson no mostraron defoliación después de 15 días de haber sido inoculadas. Las observaciones experimentales coinciden con observaciones realizadas en campo.

C. dactyloctenicola y C. muehlenbeckiae se reaislaron en PDA a partir del tejido sintomático de las plantas de zacate Johnson inoculadas, se observaron los conidios y se comparó su morfología, la cual fue similar con los inoculados en ambos experimentos, con esto se cumplieron los postulados de Koch.



Figura 9. Síntomas de mancha foliar en zacate Johnson causado por los aislados de *Curvularia* mediante inoculaciones artificiales, A) Síntomas iniciales en lámina foliar, B) Síntomas presentes en nervadura principal de la hoja, C) Síntomas en la vaina de la hoja.

8.6 Niveles de patogenicidad de los aislados de *Curvularia dactyloctenicola* y *C. muehlenbeckiae* en plantas de zacate Johnson

Los dos aislados de *C. dactyloctenicola* (Cd1 y Cd2) y siete de *C. muehlenbeckiae* (Cm7, Cm10, Cm13, Cm16, Cm18, Cm19 y Cm20) resultaron patogénicos en zacate Johnson, causaron daño moderado en el follaje a los 15 días después de la inoculación (Figura 10) y los síntomas en las plantas inoculadas fueron similares a los observados en campo.

En el primer experimento de pruebas de patogenicidad, el porcentaje de AFA de los aislados Cd1 y Cd2 de *C. dactyloctenicola* fue de 46.9 y 35.3 %, de forma respectiva y presentaron diferencias significativas entre ellos (P≤0.05). A su vez, el aislado Cd1 no mostró diferencias significativas (P≥0.05) con respecto a los aislados Cm13, Cm16 y Cm19 de *C. muehlenbeckiae* los cuales causaron un 44.1, 47.1 y 43.1 % de AFA, de forma respectiva. El AFA causado por los aislados Cm7, Cm10, Cm18 y Cm20 de *C. muehlenbeckiae* varió de 32.3 a 39.4 % y no mostraron diferencias significativas (P≥0.05) respecto al aislado Cd2. El aislado Cm16 mostró un mayor porcentaje de daño del 47.1 %, mientras que el aislado Cm18 fue el de menor porcentaje de AFA de 32.3 %.

En el segundo experimento de patogenicidad, el AFA de los aislados Cd1 y Cd2 de *C. dactyloctenicola* fue de 48.4 y 46.0 %, de forma respectiva, no mostraron diferencias significativas entre ellos (P≥0.05). A su vez los aislados de *C. dactyloctenicola* no mostraron diferencias significativas (P≥0.05) con respecto a los aislados Cm7, Cm10, Cm16 y Cm19 de *C. muehlenbeckiae*, los cuales causaron un AFA de 45.7, 52.3, 48.6 y 49.2 %, de forma respectiva. El aislado Cm20 de *C. muehlenbeckiae* causó un AFA de 57.0 %, no mostró diferencias significativas respecto a los aislados Cm10, Cm13 y Cm18, pero si respecto al resto de los aislados (P≤0.05). El aislado Cm18 mostró un mayor porcentaje de daño del 62.6 %, mientras que el aislado Cm7 fue el de menor porcentaje de AFA de 45.7 % (Cuadro 4).

Las plantas control asperjadas con agua destilada estéril permanecieron asintomáticas durante el desarrollo de ambos experimentos. Para dar cumplimiento a los postulados de Koch *C. dactyloctenicola* y *C. muehlenbeckiae* se reaislaron en PDA del tejido sintomático de las hojas inoculadas. La morfología de los conidios reaislados coincidió con la inoculación original.

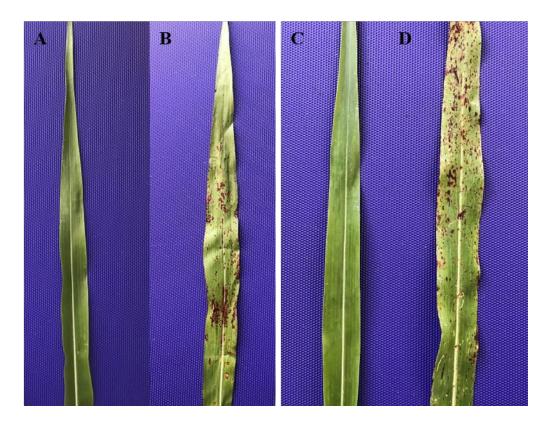


Figura 10. Hojas de zacate Johnson a los 15 días de inoculación en planta en las pruebas de patogenicidad. A y C) hojas de plantas testigo sin síntomas, B) hoja con síntomas de mancha foliar causado por el aislado Cd2 de *C. dactyloctenicola*, D) hoja con síntomas de mancha foliar causado por el aislado Cm20 de *C. muehlenbeckiae*.

Cuadro 4. Medias de porcentaje de daño en pruebas de patogenicidad de *Curvularia dactyloctenicola* y *C. muehlenbeckiae* en plantas de zacate Johnson.

	Zacate Johnson % Área foliar afectada (AFA) ^x		
Especie / Aislado			
•	Experimento 1	Experimento 2	
Curvularia dactyloctenicola			
Cd1	46.9a*	48.4cd	
Cd2	35.3de	46.0d	
Curvularia muehlenbeckiae			
Cm7	39.4bcd	45.7d	
Cm10	38.8bcd	52.3bcd	
Cm13	44.1ab	53.5bc	
Cm16	47.1a	48.6cd	
Cm18	32.3e	62.6a	
Cm19	43.1abc	49.2cd	
Cm20	37.7cde	57.0ab	
Testigo sin inoculación	0.0f	0.0e	

^xEl grado de severidad en plantas de zacate Johnson se determinó a los 15 días después de la inoculación.

^{*}Medias dentro de la columna con letras en común no son significativamente diferentes (P≥0.05) de acuerdo con una comparación de medias por la prueba de Tukey.

IX. DISCUSIÓN

La incidencia de la enfermedad durante el periodo de muestreo fue del 100 % y el AFA varió del 30 al 70%, en todos los sitios de muestreo. Los síntomas observados en zacate Johnson en Sinaloa, México, son similares a los causados por algunas especies de *Curvularia* en otras poáceas en otras partes del mundo, tales como sorgo (*S. bicolor*) (Akram *et al.*, 2014), arroz (Estrada y Sandoval, 2004; Azizah-Kusai *et al.*, 2016), maíz (Garcia-Aroca *et al.*, 2018) y caña de azúcar forrajera (*Pennisetum hydridum*) (Xu *et al.*, 2018), los cuales consisten en pequeñas manchas circulares con borde café rojizo y por lo general rodeados de un halo amarillo tenue; las manchas se expanden y se forman lesiones enlongadas hasta cubrir gran parte de la hoja y la vaina de la misma, para dar lugar a un atizonamiento.

La aparición de los primeros síntomas de la enfermedad en zacate Johnson, ocurrió durante los meses de agosto y septiembre cuando se registró una lluvia acumulada de 687.6 mm y la temperatura varió de 23.6 a 29.7 °C (CONAGUA, 2020), estas condiciones climáticas coinciden con las registradas en otros países como Pakistán, EEUU, China e Indonesia donde ocurre la mancha foliar causada por *C. lunata* y *C. dactyloctenicola* en sorgo (Akram *et al.,* 2014; Hidayat y Ramadhani, 2019), maíz (Garcia-Aroca *et al.,* 2018) y *Pennisetum hydridum* (Xu *et al.,* 2018), de forma respectiva.

Las características fenotípicas de las colonias, así como la morfología y pigmentación de los conidióforos y conidios de los aislados permitieron la identificación del género *Curvularia* (Manamgoda *et al.*, 2012; Marin-Felix *et al.*, 2017b). Por otra parte, estudios morfométricos preliminares indicaron que los aislados Cd1 y Cd2, se asemejan a *C. dactyloctenicola* (Hidayat y Ramadhani, 2019); mientras que los aislados Cm7, Cm10, Cm13, Cm14, Cm15, Cm16, Cm17, Cm18, Cm19 y Cm20 son similares a *C. muehlenbeckiae* (Madrid *et al.*, 2014).

Respecto a la tasa de crecimiento micelial en PDA en aislados de siete días de desarrollo, esta fue de 47.6 a 50.4 mm día⁻¹ en los aislados de *C. dactyloctenicola*, similar a lo consignado por Marin-Felix *et al.* (2017a) y de 30.8 a 53.9 mm día⁻¹ en los aislados de *C. muehlenbeckiae* similar a lo consignado por Nam *et al.* (2020).

En el presente estudio, se elaboró un árbol filogenético con base en la región ITS (Manamgoda et al., 2012), la cual es común para la identificación de Dothideomycetes y también se han utilizado iniciadores universales para este grupo de hongos (Schoch et al., 2012). Sin embargo, las secuencias con ITS, no resultaron apropiadas para la identificación de las especies de *Curvularia*, pero fueron útiles para la identificación de los aislados a nivel género, donde los valores bootstrap fueron <50 %, lo cual coincide con trabajos previos que utilizaron los mismos iniciadores (Madrid et. al., 2014). En cambio, el fragmento del gen GAPDH (Berbee et al., 1999; Manamgoda et al., 2012; Marin-Felix et al., 2017b; Hernández-Restrepo et al., 2018) permitió la separación clara de los aislados en dos clados y así la identificación de dos especies de *Curvularia* asociadas a la mancha foliar en zacate Johnson. La identidad de los aislados Cd1 y Cd2 se confirmó mediante la región antes mencionada, los dos aislados se agruparon en el clado de la especie C. dactyloctenicola MF490837 (Tan et al., 2018); por otra parte, los aislados Cm7, Cm10, Cm13, Cm14, Cm15, Cm16, Cm17, Cm18, Cm19 y Cm20 se ubicaron dentro de la especie C. muehlenbeckiae KP419996 (Tan et al., 2018).

Aun cuando en el presente estudio se logró la identificación de las especies, se ha reportado la utilización de otros loci codificantes para proteínas, como el factor de elongación de traducción (TEF1-α) (Marin-Felix *et al.*, 2017a; Hidayat y Ramadhani, 2019) para la separación de especies de *Curvularia*, el cual aporta más información filogenética que utilizar solo el ADNr en ascomycotas (Schoch *et al.*, 2009). Por lo tanto, en este aspecto, debe considerarse utilizar la región TEF1-α en estudios

futuros sobre identificación de las especies de *Curvularia* asociadas al zacate Johnson, así como otras especies de plantas cultivadas o silvestres.

Curvularia dactyloctenicola se ha consignado como agente causal de la mancha foliar en zacate egipcio (Dactyloctenium aegyptium (L.) Willd) en Tailandia (Marin-Felix et al., 2017a) y S. bicolor en Indonesia (Hidayat y Ramadhani, 2019). Por otro lado, aún cuando C. muehlenbeckiae fue descrita por primera vez como patógena de humanos, se ha reportado asociada a Muehlenbeckia sp. en India (Madrid et al., 2014), y como agente causal de la mancha foliar en Sorghum sp. y S. bicolor en EEUU y Japón, de forma respectiva (Manamgoda et al., 2015). Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta a C. dactyloctenicola y C. muehlenbeckiae como agentes causales de la mancha foliar en zacate Johnson en México.

Por otro lado, los dos aislados de *C. dactyloctenicola* y siete de *C. muehlenbeckiae* resultaron patogénicos con diferentes grados de virulencia en zacate Johnson en inoculaciones en invernadero. Investigaciones futuras deberán incluir estudios de patogenicidad de estas especies en Poaceae de importancia agrícola tales como sorgo (Hidayat y Ramadhani, 2019) y maíz (Manamgoda *et al.*, 2015; Garcia-Aroca *et al.*, 2018), las cuales se han reportado susceptibles a la mancha foliar causada por estas especies de *Curvularia*.

X. CONCLUSIONES

- Estudios fenotípicos y morfométricos realizados a aislados obtenidos de manchas foliares en zacate Johnson los ubicaron dentro del género Curvularia.
- El análisis filogenético permitió la identificación de los aislados obtenidos de manchas foliares en zacate Johnson a nivel especie como Curvularia dactyloctenicola y C. muehlenbeckiae.
- Todos los aislados de C. dactyloctenicola y C. muehlenbeckiae resultaron patogénicos en zacate Johnson, mostraron diferentes niveles de virulencia y causaron síntomas similares a los observados en campo, con lo cual se confirma que ambas especies son las agentes causales de la mancha foliar del zacate Johnson en el norte de Sinaloa.

XI. LITERATURA CITADA

- Acciaresi, H. A. and Guiamet, J. J. 2010. Below- and above-ground growth and biomass allocation in maize and *Sorghum halepense* in response to soil water competition. *Weed Research* 50:481–492. DOI: 10.1111/j.1365-3180.2010.00794.x
- Akram, W., Anjum, T., Ahmad, A. and Moeen, R. 2014. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spots on *Sorghum bicolor* from Pakistan. *Plant Disease* 98:1007–1007. DOI: 10.1094/PDIS-12-13-1291-PDN
- Azizah Kusai, N., Zakuan Azmi, M. M., Zulkifly, S., Termizi Yusof M. and Mohd-Zainudin, N. A. I. 2016. Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 27:205–214. DOI: 10.1007/s12210-015-0458-6
- Baličević, R., Ravlić, M. and Balić, A. 2016. Dormancy and germination of Johnson grass seed (*Sorghum halepense* (L.) Pers.). *Journal of Central European Agriculture* 17:725–733. DOI: 10.5513/JCEA01/17.3.1769
- Berbee, M. L., 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* 91:964–977. DOI: 10.2307/3761627
- Ceseski, A., Al-Khatib, K. and Dahlberg, J. A. 2017. Biology and management of Johnsongrass (*Sorghum halepense*). University of California. *Agriculture and Natural Resources* 8569:1–11. DOI: 10.3733/ucanr.8569

- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2020. Resúmenes mensuales de temperaturas y lluvia. Disponible en línea: https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2009. Sorghum halepense (L.) Pers. Disponible en línea: http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/sorghum-halepense/fichas/ficha.htm#2.%20Origen%20y%20distribuci%C3%B3n%20 geogr%C3%A1fica
- Dávila, P., Mejia-Saulés, M. T., Soriano-Martínez, A. M. y Herrera-Arrieta, Y. 2018.

 Conocimiento taxonómico de la familia Poaceae en México. *Botanical Sciences* 96:462–514. DOI: 10.17129/botsci.1894
- De Wet, J. M. J. 1978. Systematics and evolution of *Sorghum* Sect. *Sorghum* (Gramineae). *American Journal of Botany* 65:477–484. DOI:10.2307/2442706
- Del Serrone, P. and Fornasari, L. 1995. Host range and evaluation of an isolate of *Exserohilum turcicum* on some populations of Johnsongrass (*Sorghum halepense*). *Proceedings of the Eighth International Symposium on Biological Control of Weeds* 1:487–492. Disponible en línea: http://bugwoodcloud.org/ibiocontrol/proceedings/pdf/8 487-492.pdf
- Estrada, G. y Sandoval, I. 2004. Patogenicidad de especies de *Curvularia* en arroz. *Fitosanidad* 8:23–26

- Garcia-Aroca, T., Doyle, V., Singh, R., Price, T. and Collins, K. 2018. First report of *Curvularia* leaf spot of corn, caused by *Curvularia lunata*, in the United States.

 *Plant Health Progress 19:140–142. DOI: 10.1094/PHP-02-18-0008-BR
- Garrido, M. J. and Trujillo G. E. 1993. Occurrence of *Johnsongrass mosaic virus* on *Sorghum* in Venezuela. *Plant Disease* 77:847. DOI: 10.1094/PD-77-0847A.
- Hernández-Restrepo, M., Madrid, H., Tan, Y. P., da Cunha, K. C., Gené, J. Guarro,
 J. and Crous, P. W. 2018. Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum. Persoonia* 41:71–108. DOI: 10.3767/persoonia.2018.41.05
- Hidayat, I. and Ramadhani, I. 2019. Phylogenetic study of *Curvularia* on *Sorghum* from Indonesia based on ITS rDNA sequence. *Jurnal Mikologi Indonesia* 3:118–124.
- Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V. and Herberger, J. P. 1977. The world's worst weeds. University Press of Hawaii, Honolulu. 609 pp.
- Inserra, R. N., Vovlas, N. and Esser R. P. 1989. *Heterodera graminophila* in Florida. *Nematology Circular* 169:1–4.
- Kidd, S., Halliday, C., Alexiou, H. and Ellis, D. 2016. Descriptions of medical fungi 3rd Edition. Australia. 266 p. Disponible en línea: https://mycology.adelaide.edu.au/docs/fungus3-book.pdf
- Kim, Y. K., Xiao, C. L. and Rogers, J. D. 2005. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of Sphaeropsis pyriputrescens. Mycologia 97:25–32. DOI: 10.1080/15572536.2006.11832835

- Madrid, H., da Cunha, K. C., Gené, J., Dijksterhuis, J., Cano, J., Sutton, D. A., Guarro, J. and Crous, P. W. 2014. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia* 33: 48–60. http://dx.doi.org/10.3767/003158514X683538
- Malvick, D. K. 1991. Bacterial blights of forage grasses. University of Illinois at urbana-champaign. *Report on Plant Disease* 315:1–4. Disponible en línea: https://ipm.illinois.edu/diseases/rpds/315.pdf
- Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R. G., Tan, Y. P. and Hyde, K. D. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris Cochliobolus Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56:131–144. DOI 10.1007/s13225-012-0189-2
- Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Chukeatirote, E. and Hyde, K. D. 2015. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa* 212:175–198. http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.212.3.1
- Marin-Felix, J., Senwanna, C., Cheewangkoon, R. and Crous, P.W. 2017a. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere* 8:1556–1574. DOI: 10.5943/mycosphere/8/9/11
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J. Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I.,
 Bensch, K., Braun, U., Camporesi, E., Damm, U., de Beer, Z. W.,
 Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernández-Restrepo, M., Hyde, K.
 D., Jayawardena, R. S., Lombard, L., Luangsa-ard, J., McTaggart, A. R.,
 Rossman, A. Y., Sandoval-Denis, M., Shen, M., Shivas, R. G., Tan, Y. P., van
 der Linde, E. J., Wingfield, M. J., Wood, A. R., Zhang, J. Q., Zhang, Y. and

- Crous, P. W. 2017b. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology* 86:99–216. DOI: 10.1016/j.simyco.2017.04.002
- Mitskas, M. B., Tsolis, C. E., Eleftherohorinos, I. G. and Damalas, C. A. 2003. Interference between corn and johnsongrass (*Sorghum halepense*) from seed or rhizomes. *Weed Science* 51:540–545. DOI: 10.1614/0043-1745(2003)051[0540:IBCAJS]2.0.CO;2
- Monaghan, N. 1979. The biology of Johnson grass (*Sorghum halepense*). Weed Research 19:261–267. DOI:10.1111/j.1365-3180.1979.tb01536.x
- Muraya, M. M., de Villiers, S., Parzies, H. K., Mutegi, E., Sagnard, F., Kanyenji, B. M., Kiambi, D. and Geiger, H. H. 2011. Genetic structure and diversity of wild sorghum populations (*Sorghum* spp.) from different eco-geographical regions of Kenya. *Theoretical and Applied Genetics* 123:571–583. DOI: 10.1007/s00122-011-1608-6
- Nam, B., Lee, J. S., Lee, H. B. and Choi, Y. J. 2020. Pezizomycotina (Ascomycota) fungi isolated from freshwater environments of Korea: *Cladorrhinum australe*, *Curvularia muehlenbeckiae*, *Curvularia pseudobrachyspora*, and *Diaporthe longicolla*. *The Korean Journal of Mycology* 48:29–38. https://doi.org/10.4489/KJM.20200003
- National Center of Biotechnology Information (NCBI). 2019a. Taxonomy of genus Sorghum halepense. Disponible en línea: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4560
- National Center of Biotechnology Information (NCBI). 2019b. Taxonomy of genus *Curvularia*. Disponible en línea: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5502

- Nelson, R. R. 1964. The perfect stage of *Curvularia geniculata*. *Mycologia* 56:777–779. http://dx.doi.org/10.2307/3756550
- Ohadi, S., Littlejohn, M., Mesgaran, M., Rooney, W. and Bagavathiannan, M. 2018. Surveying the spatial distribution of feral sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and its sympatry with johnsongrass (*S. halepense*) in South Texas. *Plos One* 13:e0195511. DOI: 10.5061/dryad.434196d
- Parija, S. C. and Prabhakar, P. K. 1995. Evaluation of lacto-phenol cotton blue for wet mount preparation of feces. *Journal of Clinical microbiology*. 33:1019–1021. Disponible en línea: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228091/
- Peerzada, A. M., Ali, H. H., Hanif, Z., Bajwa, A. A., Kebaso, L., Frimpong, D., Iqbal, N., Namubiru, H., Hashim, S., Rasool, G., Manalil, S., van der Meulen, A. and Chauhan, B. S. 2017. Eco-biology, impact, and management of *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Biological Invasions*. DOI 10.1007/s10530-017-1410-8
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 2009. Fungi and food spoilage. Springer Science+Bussines Media, Australia. 520 p.
- Pratt, R. G. 2006. Johnsongrass, yellow foxtail, and broadleaf signalgrass as new hosts for six species of *Bipolaris*, *Curvularia*, and *Exserohilum* pathogenic to bermudagrass. *Plant Disease* 90:528–528. https://doi.org/10.1094/PD-90-0528B
- Ridgway, R. 1912. Color standards and color nomenclature. Published by the Author, Washington, DC. 164 p.

- Ríos-Herrera, E. N., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez, E., Landeros-Flores, J., Cepeda-Siller, M. y Rodríguez-Guerra, R. 2017. Hongos asociados a la mancha de asfalto en el cultivo de maíz en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:457–462. DOI: 10.29312/remexca.v8i2.65
- Rodrigues, T. T. M. S., Maffia, L.A., Dhingra, O. D. and Mitzubuti, E. S. G. 2010. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology* 35:203–2012. Disponible en línea: https://www.scielo.br/pdf/tpp/v35n4/v35n4a01.pdf
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque C. A., Chen, W. and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 109:6241–6246. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1117018109
- Schoch, C. L., Sung, G. H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J. et al. 2009. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. Systematic Biology 58:224–239. DOI:10.1093/sysbio/syp020
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

 2019. Malezas reglamentadas. Disponible en línea:
 https://www.gob.mx/senasica/documentos/malezas-reglamentadas-110914
- Shoemaker, R. A. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from *Helminthosporium*. *Canadian Journal of Botany* 37:879-887. DOI: 10.1139/b59-073

- Tan, Y. P., Crous, P. W. and Shivas, R. G. 2018. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycoKeys* 35:1–25. DOI: 10.3897/mycokeys.35.25665
- Tan, Y. P., Madrid, H., Crous, P. W. and Shivas, R. G. 2014. Johnalcornia gen. et. comb. nov., and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology* 43:589–603. DOI: 10.1007/s13313-014-0315-6
- Teakle, D. S. and Grylls, N. E. 1973. Four strains of *Sugarcane mosaic virus* infecting cereals and other grasses in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 24:465–477. DOI: 10.1071/AR9730465
- United States Department of Agriculture (USDA). 2015. Weed risk assessment for Sorghum halepense (L.) Pers. (Poaceae) –Johnsongrass. Animal and Plant Health Inspection Service 1:1–22. Disponible en línea: https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/weeds/downloads/wra/sorghum-halepense.pdf
- Warwick, S. I. and Black, L. D. 1983. The biology of canadian weeds. 61. Sorghum halepense (L.) Pers. Canadian Journal of Plant Science 63:997–1014. DOI: 10.4141/cjps83-125
- Xu, G., Zheng, F., Ma, R., Zheng, F. Q., Zheng, L., Ding, X. F. and Xie, C. P. 2018. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot of *Pennisetum hydridum* in China. *Plant Disease* 102:2372–2372. DOI: 10.1094/PDIS-04-18-0598-PDN
- Zadoks, J. C. and Schein, R. D. 1979. Epidemiology and plant disease management.

 Oxford University Press. 427 p.

XII. ANEXOS

Medio de cultivo PDA

Para la preparación del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) marca BIOXON, se disuelven 39 g de polvo PDA en 1,000 mL de H₂O destilada; el pH final del medio de cultivo se ajusta a 6.0-6.5, después es autoclavado por 15 minutos a 121 °C a 15 libras de presión. Por último, el medio de cultivo se vierte en placas de Petri cuando éste baja su temperatura a 45-50 °C.

Componentes:

Papa Dextrosa Agar	39 g
H ₂ O destilada	1,000 mL

Medio de cultivo WAJGL (por sus siglas en inglés, Water Agar Johnson Grass Leaves).

Para preparar el medio de cultivo Agua Agar con hojas de zacate Johnson, las hojas se desinfectan de forma por ambos lados con alcohol etílico al 96%, se dejan secar a temperatura ambiente y luego se colocan en placas de Petri, después se esterilizan en autoclave por 20 minutos a 121 °C a 15 libras de presión, en dos ocasiones. Para preparar el agar bacteriológico marca BIOXON, se disuelven 16 g de polvo agar en 1,000 mL de H₂O destilada; el pH final del medio se ajusta a 6.0-6.5, después es autoclavado por 15 minutos a 121 °C a 15 libras de presión. Por último, el medio de cultivo se vierte en placas de Petri cuando éste baja su temperatura a 45-50 °C y sobre el medio solidificado se colocan las hojas de zacate Johnson estériles.

Componentes:

Agar bacteriológico	16 g
H ₂ O destilada	1,000 mL
Hojas de zacate Johnson	(cuatro trozos de 2 cm aproximadamente por
placa de Petri)	