



Análisis morfogenético de aislamientos de *Cercospora kikuchii* provenientes de distintas regiones de la Argentina

Morphogenetic analysis of *Cercospora kikuchii* isolates from different regions of Argentina

 <https://doi.org/10.47230/agrosilvicultura.medioambiente.v4.n1.2026.4-20>

Recibido: 23-01-2026 **Aceptado:** 11-03-2026 **Publicado:** 01-06-2026

Miguel Ángel Lavilla^{1*}

 <https://orcid.org/0000-0002-7282-4696>

Ana Edith Fernández²

 <https://orcid.org/0009-0001-8625-6239>

Guillermo Raúl Pratta³

 <https://orcid.org/0000-0002-3682-0946>

1. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires; Pergamino, Argentina.
2. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires; Pergamino, Argentina.
3. CAR. CONICET-UNR, Campo Experimental Villarino; Zavalla, Argentina.

Volumen: 4

Número: 1

Año: 2026

Paginación: 4-20

URL: <https://revistas.unesum.edu.ec/agricultura/index.php/ojs/article/view/68>

***Correspondencia autor:** mllavilla@comunidad.unnoba.edu.ar

RESUMEN

La caracterización morfológica y molecular de *Cercospora kikuchii* es necesaria para un mejor profundizar en el... conocimiento del patógeno en Argentina. Analizar morfológica y molecularmente los aislamientos de *C. kikuchii* recolectados de pecíolos y semillas durante los años 2015 y 2016 a través de las diferentes regiones sojeras de Argentina. Los análisis morfológicos de los 528 aislamientos y los moleculares de 96 aislamientos fueron realizados en los laboratorios de Biotecnología y Fitopatología, en Pergamino, Buenos Aires, Argentina durante 2015 a 2021. La caracterización morfológica tuvo en cuenta la región y el órgano de origen, el año y variables patométricas. La caracterización molecular se realizó con siete secuencias blanco-nucleares y una mitocondrial. La estructura genética de la población se examinó a través del software STRUCTURE y Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). La relación longitud / ancho de los conidios fue mayor en los aislamientos provenientes de la región norte, comparada con las de las regiones pampa norte y pampa sur. El análisis morfogenético de los aislamientos indicó que pertenecen a la especie *C. kikuchii*. No se encontró estructuración en la población de *C. kikuchii* de Argentina. Los aislamientos de *C. kikuchii* mostraron variación morfológica y molecular sustancial, aunque no asociada con el órgano de origen: pecíolo y semilla. La información molecular indica que las variantes de haplotipos tenían una mayor homología con secuencias de *C. kikuchii* descritas previamente que con secuencias de otras especies. Tomados en conjunto, los datos demuestran que en Argentina el tizón foliar por *Cercospora* y la mancha púrpura de la semilla en soja, son dos enfermedades causadas por una única especie: *C. kikuchii*. En consecuencia, sugerimos un nuevo nombre para la enfermedad, el Síndrome Purpúreo en Soja o en inglés "*Soybean Purple Syndrome*".

Palabras clave: Tizón foliar, Patometría, Haplotipos, Variabilidad genética.

ABSTRACT

The morphological and molecular characterization of *Cercospora kikuchii* is necessary for a better understanding of the pathogen in Argentina se recomienda (a better understanding of this pathogen in Argentina). To analyze morphologically and molecularly the isolates se recomienda (analyze the isolates morphologically and molecularly) of *C. kikuchii* collected from petioles and seeds during the years 2015 and 2016 across the different soybean regions of Argentina. The morphological analyzes of the 528 isolates and the molecular analyzes of the 96 isolates were carried out in the Biotechnology and Phytopathology laboratories, in Pergamino, Buenos Aires, Argentina during 2015 to 2021 se recomienda (from 2015 to 2021). The morphological characterization took into account the region and organ of origin, the year and pathometric variables. The molecular characterization was carried out with seven nuclear and one mitochondrial target sequences. The genetic structure of the population was examined through the STRUCTURE software and Analysis of Molecular Variance (AMOVA). The length/width ratio of the conidia was higher in the isolates from the northern region, compared to those from the northern pampa and southern pampa regions. The morphogenetic analysis of the isolates indicated that they belong to the species *C. kikuchii*. No structure was found in the population of *C. kikuchii* from Argentina. The isolates of *C. kikuchii* showed substantial morphological and molecular variation although not associated with the organ of origin: petiole and seed. Molecular information indicates that the haplotype variants had greater homology with previously described sequences of *C. kikuchii* than with sequences from other species. Taken together, the data show that in Argentina *Cercospora* leaf blight and purple seed stain in soybean are two diseases caused by a single species: *C. kikuchii*. Consequently, we suggest a new name for the disease, *Soybean Purple Syndrome*.

Keywords: Leaf blight, Pathometry, Haplotypes, Genetic variability.



Creative Commons Attribution 4.0
International (CC BY 4.0)

Introducción

La caracterización morfogénica de *Cercospora kikuchii* permite un conocimiento del patosistema que facilita su manejo en un ambiente agrosustentable. El género *Cercospora* ha sido identificado por criterios taxonómicos clásicos como forma y tamaño de los conidios, color y velocidad de crecimiento de las colonias (Agrios, 2005). Para la identificación de *C. kikuchii* es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas, cuya formación puede ser inducida en medios de cultivo agarizados (Lavilla, Ivancovich & Diaz-Paleo, 2022).

El género *Cercospora*, presenta su fase sexual dentro del género *Mycosphaerella* de acuerdo a estudios filogenéticos (Crous et al., 2007). La mayoría de los géneros anamórficos de *Mycosphaerella* fueron polifiléticos, dificultando su agrupación en especies. Una excepción fue *Cercospora*, que formó un grupo monofilético basado en características anamórficas (Price et al., 2015). Las especies presentes dentro del género *Cercospora* producen una toxina denominada cercosporina. La capacidad de producir esta toxina tiene un único origen evolutivo ya que no fue encontrada en otros géneros de hongos (Goodwin et al., 2001).

El análisis de 405 aislamientos a través de marcadores AFLP determinó la presencia de dos linajes (llamados I y III) estaban presentes en Japón y en América del Sur. En consecuencia, el patógeno habría sido introducido de Asia a América del Sur (Imazaki et al., 2006). *C. kikuchii* es una especie con amplia variabilidad genética en el mundo (Groenewald et al., 2013; Imazaki et al., 2006; Soares et al., 2015). La diversidad genética encontrada en América del Sur, también se encuentra en América del Norte. Se clasificaron dos linajes de *C. kikuchii* en el estado de Luisiana, E.E.U.U., a partir de 164 aislamientos (Cai & Schneider, 2005).

Los estudios filogenéticos exhaustivos de 360 aislamientos provenientes de 39 países identificaron diversas especies dentro del género *Cercospora* (Groenewald et al., 2013). A partir de aislamientos obtenidos de soja, se han identificado otras especies de *Cercospora* que potencialmente pueden infectar al cultivo (Soares et al., 2015). El objetivo fue analizar morfológica y molecularmente los aislamientos de *C. kikuchii* recolectados de pecíolos y semillas durante los años 2015 y 2016 a través de las diferentes regiones sojeras de Argentina. De este modo contrastar la hipótesis de que el tizón foliar por *Cercospora* (TFC) y la mancha púrpura de la semilla (MPS), son producidas en Argentina por la misma especie patógena que distribuye geográficamente sin constituir subpoblaciones.

Materiales y métodos

Origen de los aislamientos

Los aislamientos de *C. kikuchii* fueron obtenidos de semillas y pecíolos de plantas de soja, durante los años 2015 y 2016, de tres regiones productoras del cultivo en la Argentina ya descritas como: Norte (RG N), Pampa Norte (RG PN) y Pampa Sur (RG PS) (Lavilla et al., 2021). Se obtuvieron un total de 528 aislamientos que fueron analizados morfológicamente. Además, 96 de estos aislamientos fueron caracterizados molecularmente. Este último grupo estaba constituido por dos aislamientos por provincia, año y órgano; excepto en la Provincia de Buenos Aires, de donde se analizaron cuatro aislamientos para mejor representar la extensa región pampa sur (Lavilla et al., 2021).

Estudio morfológico de los aislamientos y variables patométricas de *C. kikuchii*

Se realizaron aislamientos, a partir de pecíolo y de semilla de soja, bajo cámara de flujo laminar con el mechero encendido, siendo incubados durante 10 días en una cámara de crecimiento a 24 ± 2 °C, con alternancia de 12 h de luz cercana a la ultravioleta y 12

h de oscuridad. El medio de cultivo utilizado fue V8, preparado con 100 ml de jugo V8, 15 g de Agar, 2 g de CaCO_3 , y agua destilada hasta llegar al volumen de un litro a pH 5,5 (Lavilla et al., 2021). Los aislamientos provenientes tanto de pecíolo como de semilla fueron analizadas a ojo desnudo y/o bajo estereoscopio y fueron descritos macroscópica y microscópicamente.

Las características morfológicas de color, densidad de micelio (abundancia del micelio), presencia de pigmentación rojiza se realizaron según las Figuras 1 y 2. El diámetro de las colonias (DC) se determinó en

centímetros. La evaluación morfológica de los conidios consideró la longitud, el ancho y la relación longitud/ancho (R L/A) bajo microscopio óptico a 400 x. Las medidas se realizaron mediante el programa Measure que disponía de una regla micrométrica (Stewart et al., 2014). La muestra de cada aislamiento fue de 10 conidios. Los valores de la variable cuantitativa R L/A utilizados en el análisis fueron aquellos por encima de la mediana (50 % de los datos con mayor R L/A), procurando así que los conidios considerados hubieran alcanzado el tamaño máximo al final de su conidiogénesis.

Figura 1.

Diferentes coloraciones de las colonias de los aislamientos de Cercospora kikuchii. a. blanco, b. gris claro, c. gris rosado, d. gris verdoso, e. gris oscuro, f. blanco con borde negro, g. negro grisáceo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

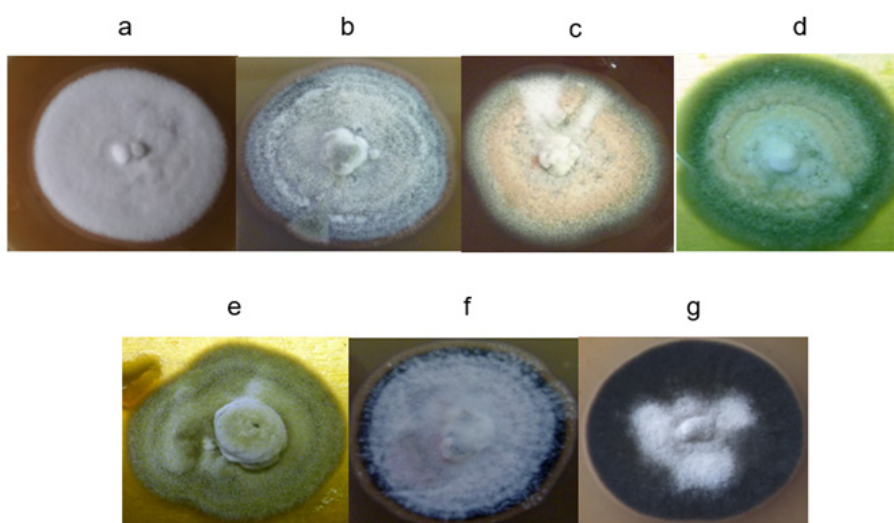
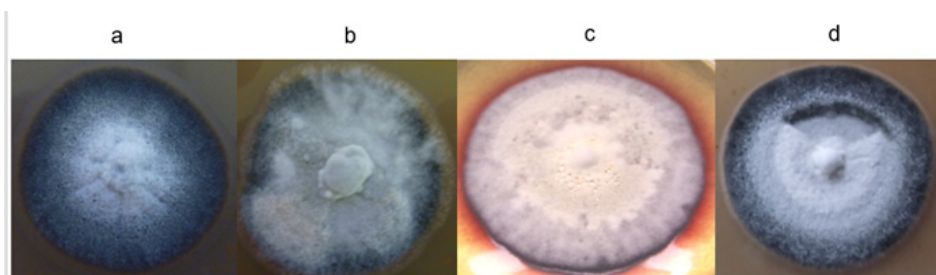


Figura 2.

Densidad del micelio (abundancia del micelio): a: compacta, b: abundante. Presencia de pigmentación rojiza de las colonias de Cercospora kikuchii c: con presencia y d: sin presencia. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021



Análisis de datos del estudio morfológico de *C. kikuchii*

La R L/A y el DC se analizaron estadísticamente bajo un modelo lineal generalizado mixto (Di-Rienzo et al., 2011), utilizando como fuente de variación regiones geográficas (RG), peciolo y semilla como órganos de origen (O) y años (A) 2015 y 2016. La significación de las medias se determinó a través de la prueba de diferencia mínima significativa restringida de Fisher (nivel de significancia: 0,05). Los paquetes estadísticos utilizados fueron InfoStat (Di-Rienzo et al., 2011) y el StatSoft (StatSoft, 2005). Las relaciones entre las variables cualitativas, color de las colonias (CC), densidad del micelio (DM), presencia de pigmentación rojiza (PPR) y las variables cuantitativas fueron analizadas por pruebas de independencia no paramétrica de Chi cuadrado de Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0,05$) según Di-Rienzo et al. (2011), mediante el uso de la RG, O y A como variables de clasificación.

Se aplicó el método de regresión lineal simple para analizar la asociación entre las variables incidencia de la MPS, la SEV del TFC en hoja y en peciolo con las R L/A de los conidios y el DC. Asimismo, se utilizó este método para evaluar si hay asociación entre la R L/A de los conidios y el DC. Los modelos lineales generalizados mixtos se usaron para asociar las tres variables patométricas

con las variables cualitativas CC, DM y PPR (Di-Rienzo et al., 2011).

Estudio molecular de los aislamientos de *C. kikuchii*

Se eligieron 96 aislamientos de los utilizados en la descripción de las características morfológicas para proseguir con el análisis molecular. De cada caja de Petri se muestrearon aproximadamente 50 mg de micelio fresco en crecimiento activo. A partir de ellos se realizó la extracción del ADN genómico siguiendo el protocolo propuesto por Liu et al. (2000) con modificaciones menores.

La calidad y concentración del ADN fue estimada en geles de agarosa al 0,8 %, teñidos con bromuro de etidio (0,5 g/mL), comparando con muestras de concentración conocida. El ADN extraído fue posteriormente utilizado en la amplificación de ocho secuencias parciales de genes conocidos (Cuadro 1) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados para amplificar las distintas regiones genómicas detalladas en el Cuadro 1 son: ITS e ITS4 (White et al., 1990), Ck_Betatub-F1 (Soares et al., 2015) y Bt516R (Albertini et al., 1999), CylH3F y CylH3R (Crous et al., 2003, F1771 y R2706 (Soares et al., 2015), ACT-512F y ACT-783R (Carbone & Kohn 1999), TEF_F1 y TEF_R1 (Soares et al., 2015), CAL-228F y CAL-737R (Carbone & Kohn, 1999), Cytb-F2 y Cytb-R1 (Imazaki et al., 2006).

Tabla 1.

Secuencias blanco (fragmento específico de ADN que es reconocido y unido por una proteína o enzima); el nombre de los cebadores Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

Gen/región genómica con su designación		Nombre de los cebadores
ITS	espaciadores transcriptos internos del gen 5.8S ARN _m .	ITS 1 e ITS 4 (White et al., 1990)
tub	b- tubulina 1	Ck_Betatub-F1 (Soares et al., 2015) y Bt516R (Albertini et al., 1999)
his	histona H3	CylH3F y CylH3R (Crous et al., 2004)
cfp	proteína facilitadora de la cercosporina	F1771 y R2706 (Soares et al., 2015).
act	Actina 1	ACT-512F y ACT-783R (Carbone & Kohn 1999).

<i>tef</i>	factor de elongación de la traducción	TEF_F1 y TEF_R1 (Soares et al., 2015)
<i>cal</i>	Calmodulina	CAL-228F y CAL-737R (Carbone & Kohn, 1999).
<i>cyb</i>	Citocromo b (mitocondrial)	Cytb-F2 y Cytb-R1 (Imazaki et al., 2006)

Para la amplificación mediante PCR, las muestras fueron colocadas en placas de 96 pocillos en un volumen de reacción de 30 µL. En cada reacción se utilizó 6,93 µL de ADN templado (10 ng/µL), 7,8 µL de mezcla de reacción, 0,36 µL (1,8 U) de Taq ADN Polimerasa Pegasus (PB-L, Argentina), 1,4 µL (10 uM) de cada cebador sentido y antisentido y 12,15 µL de agua. La mezcla de reacción en la mayoría de las secuencias blanco (ADN amplificado entre cebadores) fue realizada con 500 µL Buffer 10X, 150 µL de MgCl₂ (50 mM), 10 µL de cada uno de los dNTPs (100 mM) y se ajustó a un volumen final de 1300 µL con agua.

En el caso de *his* se disminuyó la concentración de MgCl₂ adicionando solo 100 µL (concentración final de 45 mM) y en *cfp* se aumentó con 200 µL (concentración final de 60 mM). Todos los reactivos utilizados eran de la marca Pegasus (PB-L, Argentina).

El programa de termociclado fue el siguiente: 5 min a 95 °C; 45 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a la temperatura de hibridación correspondiente a cada par de cebadores, 45 segundos a 72 °C y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos por PCR se conservaron en el congelador a -20 °C.

La temperatura de hibridación o *T_M* fue diferente para cada secuencia; *cyb*: 50 °C, *tef*: 60 °C, *cfp*: 60 °C, *act*: 53 °C, *cal*: 55 °C, *his*: 52 °C, ITS: 55 °C, *tub*: 57 °C. Previamente al envío de las muestras a secuenciar se analizó la calidad y la cantidad de ADN amplificado en geles de agarosa como previamente se describió, utilizando 1 µL del producto de PCR. Los productos de PCR se secuenciaron a través de la técnica de Sanger (Macrogen, Corea).

Obtención de haplotipos y análisis de polimorfismos

Las 96 secuencias obtenidas correspondientes a cada región genómica fueron alineadas y editadas manualmente con el programa BioEdi. (Hall, 1998). Posteriormente, con las secuencias editadas, incluyendo exones e intrones, se determinaron los haplotipos presentes y sus longitudes en pares de bases. Asimismo, se calculó el número de sitios polimórficos (SP), como aquellos sitios nucleotídicos con dos o más nucleótidos diferentes. El número de mutaciones (NM), definido como los nucleótidos diferentes en la secuencia.

La diversidad haplotípica (DH) de Nei; calculado como $DH = \{[n/(n-1)] [1 - \sum p_i^2]\}$ donde *n* es el número de individuos analizados en una población y *p_i* es la frecuencia del *i*-ésimo haplotipo en esa población (Nei, 1989). Los cálculos se realizaron con el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). Las homologías de las secuencias obtenidas fueron buscadas en las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y comparadas utilizando la herramienta BLAST (Johnson et al., 2008). Posteriormente se realizaron alineamientos múltiples utilizando la herramienta ClustalW del programa BioEdit (Thompson et al., 1994).

Análisis de conglomerado

Con la información de los haplotipos correspondientes a cada secuencia blanco se generó una matriz, la cual fue utilizada para realizar los conglomerados con el programa InfoGen versión 2016 (Balzarini & Di Rienzo, 2016). Las variables de clasificación utilizadas en la matriz de haplotipos fueron los años (2015 y 2016), las regiones geográficas (norte, pampa norte y pampa sur) y los órga-

nos de soja a partir de los cuales se aislaron las muestras (pecíolo y semilla). Se realizaron distintos análisis de conglomerados.

El primero se elaboró con las siete secuencias nucleares, utilizando la distancia a partir del coeficiente de apareamiento simple (*simple matching*) y la metodología de encadenamiento promedio (*average linkage* o UPGMA, *unweighted pair-group method using an arithmetic average*; Sokal & Michener, 1958). El segundo, además de las siete secuencias nucleares, incluyó las variables morfológicas cuantitativas (R L/A y DC) y cualitativas (CC, DM y PPR). El tercer análisis de conglomerado fue realizado con el gen *cyb* y las variables morfológicas cuantitativas y cualitativas del anterior. En los dos últimos casos se utilizó la distancia a partir del coeficiente de Gower (Gower & Ross, 1969), porque permite relacionar variables cuantitativas y cualitativas en el mismo análisis y la metodología de encadenamiento promedio ya mencionada.

Análisis de la estructura genética poblacional

Para determinar la estructura genética poblacional del conjunto de aislamientos de *C. kikuchii*, se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Se construyó una matriz de datos con los 96 aislamientos, que incluían los años, las regiones y el órgano de procedencia del aislamiento como variables de clasificación y a los haplotipos como marcadores genéticos. Los modelos de estructuras poblacionales generados por STRUCTURE se realizaron a partir de una serie de análisis independientes con los siguientes parámetros: valores de *clusters* o grupos (K) entre dos y diez, periodo de *burn-in* de 103 iteraciones, 106 iteraciones MCMC (Monte Carlo Markov Chain) posteriores y 5 repeticiones (*runs*, r) para cada valor K de subpoblaciones.

Los resultados de las simulaciones bayesianas se cargaron posteriormente en el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2011) para determinar el valor de

K más probable, que corresponde al número de grupos (subpoblaciones) que mejor se adaptan a los datos genotípicos (Evanno et al., 2005). Se obtuvieron asimismo r matrices Q, de tamaño $n \times k$, siendo r número de repeticiones, n número de individuos y k número de subpoblaciones. En el cuerpo de las mismas, se encontraron las probabilidades posteriores para cada aislamiento de formar parte de las distintas subpoblaciones. Esta probabilidad es también llamada valor de membresía o pertenencia.

El programa CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007) se utilizó para obtener la matriz Q ajustada para repeticiones sucesivas (r), ya que estas son independientes unas de otras y muestran desviaciones en los resultados obtenidos. STRUCTURE 2.3.4 admite la introducción de variables que contienen información previa (*a priori*) a través del modelo LOCPRIOR. Esa información previa puede ser de ubicación geográfica u otras condiciones, que podrían estar relacionadas a subestructuras poblacionales y ayudan al agrupamiento en un conjunto de datos en donde la señal de la estructura es relativamente débil (Hubisz et al., 2009). En el análisis se consideró a las localidades como información *a priori*.

Análisis de la varianza molecular

El análisis de la varianza molecular (AMO-VA; Excoffier et al., 1992) se realizó mediante el programa InfoGen (Balzarini & Di Rienzo, 2016). La distancia utilizada en el análisis fue la de apareamiento simple. Las variables descriptivas utilizadas fueron las variables morfológicas cualitativas y los haplotipos de las siete secuencias nucleares ya mencionados.

Resultados

Estudios morfológicos de los aislamientos de *Cercospora kikuchii*

La R L/A de los conidios fue mayor ($p \leq 0,05$) en los aislamientos provenientes de la RG N, comparada con las de las RG PN y PS.

Entre las regiones PN y PS no hubo diferencias significativas en la R L/A de los conidios (Cuadro 2). La R L/A de los conidios no presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los aislamientos provenientes de diferentes O, A y todas las interacciones. El DC

presentó variaciones significativas ($p \leq 0,05$) en todos los efectos principales (Cuadro 2), e interacciones donde la RG PN tuvo valores de 3,7 cm, en cambio, los DC promedio en las RG N y RG PS fueron de 4,6 cm y 4,4 cm, respectivamente.

Tabla 2.

Medias y significación estadística de la relación longitud/ancho (R L/A) de los conidios y del diámetro de las colonias (DC) de los aislamientos de Cercospora kikuchii de acuerdo a la región, el órgano de soja y el año. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

Variables independientes		Variables dependientes	
		Medias R L/A	Medias DC (cm)
Regiones geográficas	Norte (N)	65,3 A	4,6 A
	Pampa Norte (PN)	56,5 B	3,7 B
	Pampa Sur (PS)	53,6 B	4,4 A
Órganos	Pecíolo (P)	60,1 A	4,5 A
	Semilla (S)	56,5 A	4,0 B
Años	2015	58,7 A	4,4 A
	2016	57,9 A	4,1 B
Región*año	N*2015	66,3 A	4,5 B
	N*2016	64,3 A	4,4 B
	PN*2015	56,9 A	3,7 C
	PN*2016	56,0 A	3,8 C
	PS*2015	56,0 A	5,1 A
	PS*2016	51,3 A	4,0 BC

En la RG PN la R L/A de los conidios de *C. kikuchii* se encuentra relacionada ($p \leq 0,05$) con las características macroscópicas de las colonias como la PPR, la DM y la CC. Las colonias con PPR, DM compacta y coloración GC o GO tuvieron los conidios más pequeños. En cambio, en la RG N la R L/A de los conidios sólo se asocia significativa-

mente con la DM. En la RG N los valores más altos de la R L/A se encuentran relacionados con la DM abundante. La PPR se asoció significativamente con el DC para los aislamientos provenientes de pecíolo. Los mayores DC se observaron en aquellos aislamientos con PPR (Cuadro 3).

Tabla 3.

Asociación entre las variables cuantitativas y las variables cualitativas evaluadas en los diferentes aislamientos de Cercospora kikuchii. Las variables de clasificación son: región geográfica, órgano y año. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

Variable cualitativa	Variable cuantitativa									
	R L/A					DC (cm)				
	N	PN	PS	Pecíolo	Semilla	N 2015	PN 2015	PS 2015	N 2016	PN 2016

PPR	0,25	0,03		0,00	0,15	0,00	0,81	>0,9	0,20	
								9		
DM	0,00	0,09	0,12	0,26	0,84	0,44	0,00	0,21	0,67	
CC	0,36	0,00	0,33	0,00	0,00	0,04	0,00	0,28	0,01	0,13

Nota. modelo no paramétrico Chi cuadrado de Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0,05$). **R L/A:** relación longitud/ancho de los conidios; **DC:** diámetro de la colonia; **N:** región norte, **PN:** región pampa norte, **PS:** región pampa sur; **PPR:** presencia de pigmentación rojiza. **DM:** densidad del micelio; **CC:** color de la colonia / **Note:** non-parametric Kolmogorov-Smirnov Chi-square model ($p \leq 0.05$). **R L/A:** conidia length/width ratio; **DC:** colony diameter; **N:** northern region, **PN:** northern pampa region, **PS:** southern pampa region; **PPR:** presence of reddish pigmentation. **DM:** mycelium density; **CC:** color of the colony.

La coloración de colonia blanco con borde negro tuvo los menores DC en los aislamientos provenientes de pecíolos o semillas. Los DC menores se asociaron a la PPR y a la coloración blanca con borde negro de los aislamientos provenientes de la RG N del año 2015. Asimismo, en ese mismo año en la RG PN los menores DC se observaron en las colonias de color gris oscuro y con una DM abundante. El CC blanco se asoció a los DC menores de los aislamientos provenientes de la RG PN del año 2016 (Cuadro 3).

Las variables cuantitativas (R L/A y DC) no presentaron asociación significativa con las variables patométricas: SEV del TFC en hoja, SEV del TFC en pecíolo e I de la MPS (Cuadro 4). En general los coeficientes de determinación (R^2) fueron extremadamente bajos, es decir, que las relaciones entre las variables son prácticamente nulas. La pendiente de la regresión del DC sobre la R L/A fue 0,24 e indica que son independientes entre ellas (probabilidad=0,77). Las variables cualitativas (CC, DM y PPR) no mostraron una relación con las variables patométricas (Cuadro 5).

Tabla 4.

Regresiones lineales simples de las variables patométricas sobre las variables cuantitativas. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

Variable independiente	Variable dependiente	Estimación de Coeficientes	p-valor	R^2
R L/A	SEVTFC (hoja) %	Pendiente	0,17	0,0002
		Constante	53,51	<0,0001
	SEVTFC (Pecíolo) %	Pendiente	0,12	0,0373
		Constante	59,00	<0,0001
	IMPS%	Pendiente	-0,05	0,1119
		Constante	24,65	<0,0001
DC (cm)	SEVTFC (hoja) %	Pendiente	1,24	0,1617
		Constante	58,86	<0,0001
	SEVTFC (Pecíolo) %	Pendiente	0,41	0,7138
		Constante	64,82	<0,0001

IMPS%	Pendiente	-1,45	0,0258	0,01
	Constante	27,37	<0,0001	

SEVTFC: severidad del tizón foliar por Cercospora en hoja y en pecíolo; **IMPS:** incidencia de la mancha púrpura de la semilla; **R L/A:** relación longitud/ancho y **DC:** diámetro de la colonia en cm. Número de observaciones N = 528 / **SEVTFC:** Severity of Cercospora leaf blight on leaf and petiole; **IMPS:** incidence of purple seed stain; **R L/A:** length/width ratio, and **DC:** colony diameter in cm. Number of observations N = 528.

Tabla 5.

Severidad del tizón foliar por Cercospora (TFC) en hoja y en pecíolo, incidencia de la mancha púrpura de la semilla (MPS) y sus relaciones con las variables cualitativas. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

CC	SEVTFC H	SEVTFC P	IMPS
Negro grisáceo	74,4 ^a	75,2A	28,3A
Blanco con borde negro	66,4 ^a	71,6A	24,0A
Gris claro	63,1 ^a	67,8A	21,2A
Gris rosado	58,7 ^a	66,6A	21,0A
Blanco	54,6 ^a	66,6A	20,5A
Gris oscuro	50,6 ^a	58,0A	19,5A
Gris verdoso	49,6 ^a	55,8A	11,5A
DM	SEVTFC H	SEVTFC P	IMPS
Compacto	59,2 ^a	66,2A	21,6A
Abundante	59,0A	65,0A	19,0A
PPR	SEVTFC H	SEVTFC P	IMPS
Ausente	61,9 ^a	66,0A	23,1A
Presente	56,4 ^a	65,2A	17,7A

SEVTFC: severidad del tizón foliar por Cercospora en hoja (H) y en pecíolo (P); **IMPS:** incidencia de la mancha púrpura de la semilla; **CC:** color de la colonia; **DM:** densidad del micelio; **PPR:** presencia de pigmentación rojiza / **SEVTFC:** severity of Cercospora leaf blight on leaf (H) and petiole (P); **IMPS:** incidence of purple seed stain; **CC:** color of the colony; **DM:** mycelium density; **PPR:** presence of reddish pigmentation.

Obtención de haplotipos y análisis de polimorfismos

La secuencia nuclear de *act* fue la de menores sitios polimórficos y número de mutaciones. A su vez fue la más homogénea considerando que tiene el menor número y diversidad de haplotipos. En cambio, los genes nucleares *cfp*, *tub* y *cal*, como así también el gen mitocondrial *cyb* tuvieron más de un 20 % de sitios polimórficos y de

mutaciones. Asimismo, el gen nuclear con mayores mutaciones fue el *cfp* con un 98 % (Cuadro 6).

Tabla 6.

Descripción de las regiones de actina (act), b-tubulina 1 (tub), calmodulina (cal), proteína facilitadora de la cercosporina (cfp), histona H3 (his), factor de elongación de la traducción (tef), espaciadores transcritos internos (ITS); citocromo b (cyb). Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

	Número de secuencias analizadas	Haplotipos diferentes	Longitud en pares de bases	Número de sitios polimórficos	Número total de mutaciones	Diversidad haplotípica
<i>Act</i>	96	3	178	2	2	0.14
<i>His</i>	96	10	300	46	47	0.75
<i>Cyb</i>	96	11	688	211	263	0.56
<i>Tub</i>	96	15	380	228	257	0.77
<i>ITS</i>	96	20	429	45	53	0.66
<i>Tef</i>	96	38	532	65	67	0.9
<i>Cal</i>	96	57	285	79	111	0.96
<i>Cfp</i>	96	63	798	385	785	0.95

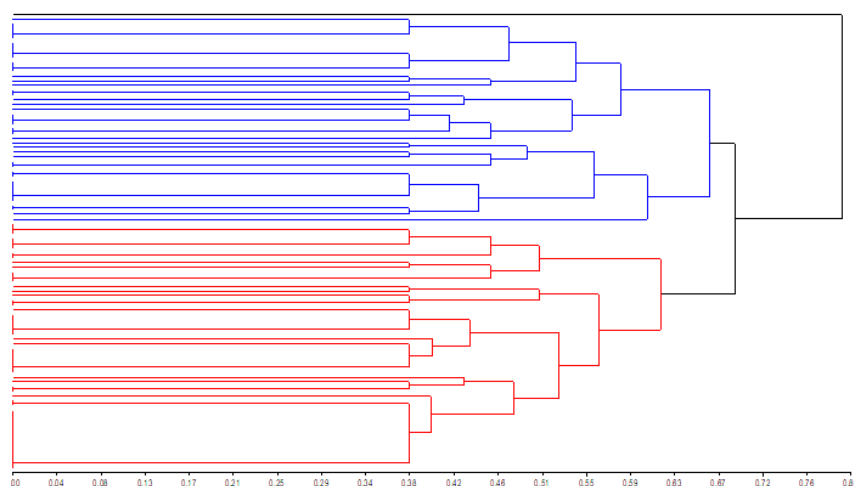
Análisis de conglomerado

En el análisis de conglomerado considerando los siete genes nucleares, se distinguieron tres grupos a la distancia arbitraria de 0,68 (Figura 3). El primer grupo constituido por un solo individuo que se separó del resto de

aislamientos a la distancia máxima de 0,79 (negro, Figura 3). A la mitad de la distancia máxima, el segundo grupo se dividió en 15 subgrupos (azul, Figura 3) y el tercer grupo, en 13 subgrupos (rojo, Figura 3) conservando variabilidad genética cada uno de ellos.

Figura 3.

Dendrograma del análisis de conglomerado con los haplotipos correspondientes a secuencias parciales de siete genes nucleares; utilizando la distancia derivada del coeficiente de emparejamiento simple $\sqrt{1-S}$ y la metodología de encadenamiento UPGMA. Correlación cofenética= 0,773. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021



El único aislamiento de *C. kikuchii* en el grupo negro de la Figura 3 exhibió un genotipo portador de los haplotipos menos frecuentes, con excepción del ITS que fue el más frecuente; resultados que explicarían la ubicación en el dendrograma. Todos estos haplotipos tuvieron mayor homología con las secuencias publicadas de la especie *C. kikuchii* en el NCBI. A su vez exhibió las características morfológicas más comunes y frecuentes en la población analizada: R L/A de 65,9, coloración de colonia blanca con borde negro, densidad del micelio compacta y no presenta pigmentación rojiza. Por lo tanto, no mostró características morfológicas extremas respecto a la media poblacional de *C. kikuchii*.

Asimismo, este aislamiento presenta una identidad del 100 % con la secuencia KP825082.1 publicada en el NCBI para el gen *cyb* correspondiente a *C. kikuchii*. En los grupos dos (azul; Figura 3) y tres (rojo; Figura 3) los aislamientos presentan una gran variabilidad genética ya sea dentro y entre grupos. La homología de las secuencias obtenidas en esta investigación para ambos grupos se ajustó a aquellas ya publicadas en el NCBI para *C. kikuchii*. Ocasionalmente algunas secuencias presentaron igual porcentaje de homología entre *C. kikuchii* y otras especies, tal es el

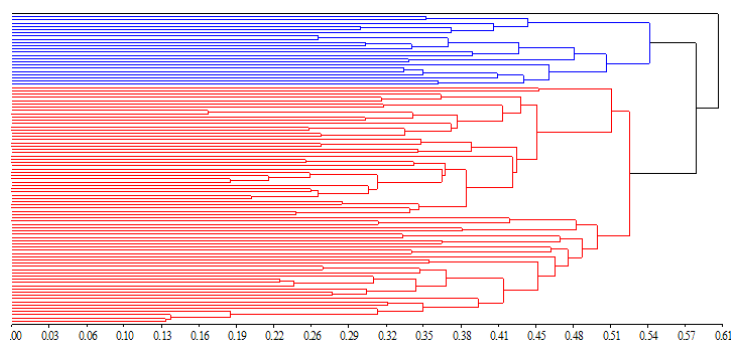
caso de una homología del 100 % con *C. canescens* (MK074844.1), *C. brassicicola* (MN209932.1), *C. capsici* (MN209931.1) y *C. apii* (MK027098.1).

El análisis de conglomerado realizado con los siete genes nucleares y las variables morfológicas cuantitativas y cualitativas presentó una correlación cofenética de 0,751 (Figura 4). Por lo tanto, existió una elevada asociación entre las distancias definidas por la métrica de árbol binario con las distancias originales entre los aislamientos de *C. kikuchii* cuando se utilizó la distancia de Gower y la metodología de encadenamiento UPGMA. La distancia máxima fue levemente inferior a la distancia obtenida con los haplotipos del genoma nuclear exclusivamente.

Este análisis clasificó a los 96 aislamientos de *C. kikuchii* en tres grupos diferentes a una distancia arbitraria de 0,525. El primer grupo (negro en la Figura 4) estuvo constituido únicamente por un aislamiento, pero presentó una identidad cercana al 100 % con las secuencias publicadas en el NCBI para *C. kikuchii*. Cuyas características morfológicas no difieren de las características más frecuentes de la población analizada, con excepción al color de colonia que en este caso fue blanco y fue de baja frecuencia en la población total.

Figura 4.

Dendrograma del análisis de conglomerado con los haplotipos correspondientes a secuencias parciales de los siete genes nucleares y las variables morfológicas cuantitativas (R L/A y DC (cm)) y cualitativas (CC, DM y PPR); utilizando la distancia derivada del coeficiente de Gower y la metodología de encadenamiento UPGMA. Correlación cofenética= 0,751. Distancia elegida arbitrariamente 0,56, se ubican los tres grupos en colores negro, azul y rojo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

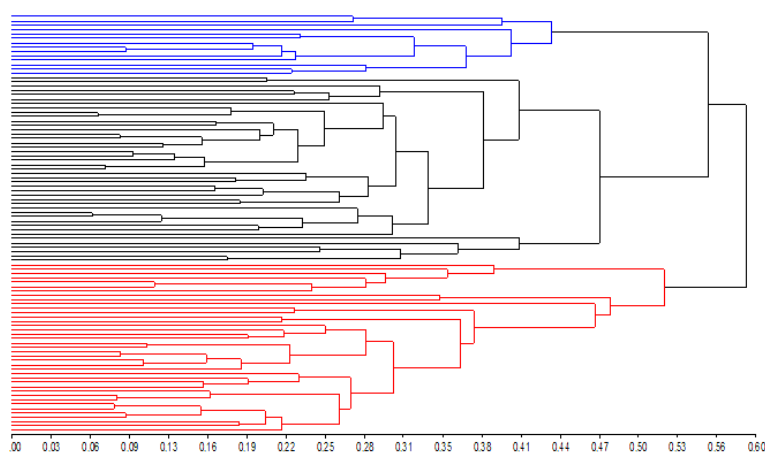


Se destaca la gran variabilidad genética dentro y entre grupos (Figura 5). Cuando se alinean las ocho secuencias blanco de cada individuo, que constituyen ambos grupos con las publicadas en el NCBI presentan una identidad mínima del 93 % y máxima del 100 % con *C. kikuchii*. Asimismo, las secuencias con un 93 % de identidad con *C. kikuchii* presentan una identidad aún menor con otras especies de *Cercospora* como por ejemplo *Cercospora fagopyri strain* (92 %), *Cercospora cf. physalidicola* (90 %), *Cercospora cf. richardiicola* (88 %) entre otras.

El análisis de conglomerado realizado con el gen mitocondrial *cyb* y las variables morfológicas cualitativas y cuantitativas dividió a los aislamientos en 3 grupos (distancia arbitraria=0,55). Los aislamientos fueron divididos en tres grupos por su variabilidad genética intrínseca. Las secuencias para el gen contrastadas con las del NCBI, presentaron una homología casi del 100 % con las publicadas para *C. kikuchii*.

Figura 4.

Dendrograma del análisis de conglomerado con los haplotipos del gen mitocondrial cyb y las variables morfológicas: cuantitativas (R L/A y DC) y cualitativas (CC, DM y PPR); utilizando la distancia derivada del coeficiente de Gower y la metodología de encadenamiento UPGMA. Correlación cofenética= 0,862. A la distancia elegida arbitrariamente 0,56, se ubican los tres grupos en colores negro, azul y rojo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021



Análisis de la estructura poblacional

Se aplicó el modelo LOCPRIOR con los haplotipos de las secuencias parciales de los siete genes nucleares y la información a priori de la localidad de origen de los aislamientos se determinó $k=4$ como el número más probable de subpoblaciones. Sin embargo, debido a que los valores de pertenencia de los aislamientos de *C. kikuchii* a

los subgrupos son bajos y relativamente homogéneos no se pudo detectar estructuración en la población analizada. Se observó que no existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la variabilidad genética de la población, evaluada con base en las variables morfológicas cualitativas y los haplotipos de las secuencias de los 7 genes nucleares (Cuadro 7).

Tabla 7.

Análisis molecular de la varianza (AMOVA) para la población de C. kikuchii. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 2015-2021

Fuente de Variación	SC	gl	CM	p-valor	CV	PV
Año	0,39	1	0,39	0,9975	0	0
Año>región	1,64	4	0,41	>0,9999	0	0
Año>región>órgano	2,75	6	0,46	0,065	1,70E-03	0,38
Dentro	37,37	84	0,44	0,995	0,44	99,62
Total	42,16	95	0,44		0,45	100

SC: suma de cuadrados, **gl:** grados de libertad, **CM:** cuadrado medio, **CV:** componentes de variación, **PV:** porcentaje de variación. / **SC:** sum of squares, **gl:** degrees of freedom, **CM:** mean square, **CV:** components of variation, **PV:** percentage of variation.

Discusión

Trabajos previos sobre *C. kikuchii* han estado concentrados en un tipo de análisis, ya sea sobre variables morfológicas o variaciones moleculares (Groenewald et al., 2013; Imazaki et al., 2006; Soares et al., 2015). Los resultados obtenidos representan el primer reporte publicado de asociaciones entre variables morfológicas (cualitativas y cuantitativas) y variaciones moleculares. A partir del análisis morfológico de las variables CC, la DM y la PPR; se verificó que la DM y el CC fueron independientes del órgano del cual se aislaron.

La PPR, indicadora de la síntesis de cercosporina, fue más frecuente en aislamientos procedentes de pecíolo y en los aislamientos de la región norte. Esto podría deberse a una adaptación del hongo a producir más pigmentación en ambientes más cálidos y húmedos (Jenns, 1989) con elevada radiación (Elvin et al., 2005). No se encontraron asociaciones significativas entre las variables patométricas SEV del TFC y la I de la MPS ni con las variables morfológicas cuantitativas (R L/A y DC), ni las variables cualitativas (CC, DM y PPR).

Es contradictoria la falta de asociación entre PPR y las variables patométricas, en especial por las relaciones ya discutidas entre PPR y la SEV en las regiones más próximas al norte de Argentina. Esto puede deberse a que la evolución de la enfermedad no sólo está condicionada por la virulencia del patógeno, sino también a las condiciones ambientales predisponentes y a la susceptibilidad del hospedante (Agrios, 2005). Las secuencias haplotípicas de las regiones analizadas se suponen neutrales en cuanto a la severidad e incidencia de TFC y MPS, con excepción de la secuencia de la proteína facilitadora de cercosporina, codificada por el gen *cfp*, que participa en forma directa en la virulencia de la cepa portadora (Soares et al., 2015).

A pesar de que se encontró una enorme variabilidad en el gen *cfp* (63 haplotipos diferentes de un total de 96 aislamientos), no existen trabajos previos que relacionen alelos específicos de este gen con las distintas virulencias que podrían exhibir las cepas. Los grupos y subgrupos formados en los análisis de conglomerados posicionaron los aislamientos provenientes de pecíolo y de semilla dispersos a través de ellos. Por lo tanto, TFC y MPS son causadas por la mis-

ma población patógena. De manera similar no se pueden asociar los grupos definidos en los dendrogramas a una región geográfica en particular (Lavilla et al., 2021).

El análisis de los aislamientos que en cada dendrograma se ubicaron como genotipos extremos, podrían en primera instancia, ser representativos de especies distintas o especies crípticas asociadas a *C. kikuchii*. Sin embargo, los aislamientos constituidos por los haplotipos menos frecuentes conservaban las características morfológicas más frecuentes en la población. Además, en el presente estudio los haplotipos exhibieron mayores homologías con la especie *C. kikuchii* que con el resto de las especies de *Cercosporas* en alineamientos con las secuencias previamente publicadas en el NCBI. En otras investigaciones en donde se analizaron molecularmente aislamientos de *C. kikuchii* obtenidos de hojas de soja y de semilla, no encontraron otras especies de *Cercospora* afectando el cultivo de soja en Argentina (Sautua et al., 2019).

En el continente americano y en contraste con los resultados obtenidos, se han reportado que tanto el TFC como la MPS son causadas por un complejo de especies de *Cercospora* (Albu et al., 2016; Albu et al., 2017). En otras se destaca *C. cf. Sigesbeckiae* reportada también en Argentina como causante de ambas enfermedades (Soares et al., 2015). Sin embargo, para corroborar que *C. cf. Sigesbeckiae* sea una especie verdaderamente patógena en el cultivo de soja no se constataron los postulados de Koch (Agrios, 2005).

En el estudio de la estructura poblacional de los aislamientos, no se encontraron subpoblaciones de *C. kikuchii*. También, a partir de la ausencia de estructuración se podría asimismo especular que *C. kikuchii* proviene de un único pool génico que dio origen a su población patógena en Argentina. Estos resultados podrían reforzar los observados por Imazaki et al., (2006), que encontró que los linajes I y III estaban presentes tanto

en América del Sur, como en Japón y que la especie *C. kikuchii* estaría constituida por un único pool génico a nivel mundial y que su variabilidad genética es natural a la especie.

Diversas enfermedades que afectan a las semillas y al follaje de la planta de soja no presentan diferentes nombres por afectar a un órgano u otro. Tal es el caso del tizón del tallo y de la vaina causado por el complejo compuesto por *Diaporthe spp.* y *Phomopsis spp.*, el mildiu causado por *Peronospora manshurica*, la mancha ojo de rana causada por *C. sojina*, entre otras (Lavilla, Ivanovich & Martinez, 2022). En consecuencia, debido a que tanto el TFC como la MPS son causadas por *C. kikuchii*, se sugiere unificar el nombre de ambas enfermedades en uno solo: el “Síndrome Purpúreo en Soja (SPS)” o en inglés “*Soybean Purple Syndrome*”.

Conclusión

Los aislamientos de *C. kikuchii* mostraron variación morfológica y molecular sustancial, aunque no asociada con el órgano de origen (pecíolo y semilla). La información molecular indica que las variantes de haplotipos tenían una mayor homología con secuencias de *C. kikuchii* descritas previamente que son secuencias de otras especies. Tomados en conjunto, los datos demuestran que en Argentina el tizón foliar por *Cercospora* (TFC) y la mancha púrpura de la semilla en soja (MPS), son dos enfermedades causadas por una única especie: *C. kikuchii*. En consecuencia, se sugiere un nuevo nombre para la enfermedad, el Síndrome Purpúreo en Soja o en inglés “*Soybean Purple Syndrome*”.

Bibliografía

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology (5.^a ed.). Academic Press.
- Albertini, C., Gredt, M., & Leroux, P. (1999). Mutations of the β -Tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 64(1), 17-31. <https://doi.org/10.1006/pest.1999.2406>

- Albu, S., Schneider, R. W., Price, P. P., & Doyle, V. P. (2016). *Cercospora* cf. *flagellaris* and *Cercospora* cf. *sigesbeckiae* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. *Phytopathology*, 106(11), 1376-1385. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0332-R>
- Albu, S., Sharma, S., Bluhm, B. H., Price, P. P., Schneider, R. W. & Doyle, V. P. (2017). Draft genome sequence of *Cercospora* cf. *sigesbeckiae*, a causal agent of *Cercospora* leaf blight on soybean. *American Society for Microbiology Journals* 5: 36. <https://doi.org/10.1128/genomea.00708-17>
- Balzarini, M. G., & Di Rienzo, J. A. (2016). InfoGen (Versión 2016) [Software]. Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.info-gen.com.ar>
- Cai, G., & Schneider, R. W. (2005). Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain in soybean. *Phytopathology*, 95(3), 257-261. <https://doi.org/10.1094/phyto-95-0257>
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), Article 553. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Crous, P., Braun, U., & Groenewald, J. (2007). *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies In Mycology*, 58(1), 1-32. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.01>
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J., Simoneau, P., & Hywel-Jones, N. L. (2003). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 50, 415-430. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.213>
- Di-Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). InfoStat. Grupo InfoStat. <http://www.infostat.com.ar>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2011). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Elvin, M., Loros, J. J., Dunlap, J. C., & Heintzen, C. (2005). The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock. *Genes & Development*, 19(21), 2593-2605. <https://doi.org/10.1101/gad.349305>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from genetic distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491
- Goodwin, S. B., Dunkle, L. D., & Zismann, V. L. (2001). Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology*, 91(7), 648-658. <https://doi.org/10.1094/phyto.2001.91.7.648>
- Gower, J. C. & Ross, P. G. N. (1969). Minimum spanning tree and single cluster analysis. *Applied Statistics*, 18, 54-64
- Groenewald, J., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H. D., Park, J. H., Jama, A., Groenewald, M., Braun, U., & Crous, P. (2013). Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology*, 75, 115-170. <https://doi.org/10.3114/sim0012>
- Hall, T. A. (1998). BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/ nt. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(2), 95-98. https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1322-1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Imazaki, I., Iizumi, H., Ishikawa, K., Sasahara, M., Yasuda, N., & Koizumi, S. (2006). Effects of thiophanate-methyl and azoxystrobin on the composition of *Cercospora kikuchii* populations with thiophanate-methyl-resistant strains. *Journal of General Plant Pathology*, 72(5), 292-300. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0285-9>
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>

- Jenns, A. E. (1989). Regulation of Cercosporin Accumulation in Culture by Medium and Temperature Manipulation. *Phytopathology*, 79(2), Article 213. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-213>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuik, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Suppl. 2), W5-W9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Lavilla, M., Ivancovich, A., & Díaz Paleo, A. (2021). Evaluación del tizón foliar y la mancha púrpura en semilla de soja en Argentina. *Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 619-628. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.43359>
- Lavilla, M., Ivancovich, A., & Díaz-Paleo, A. (2022). Tizón Foliar y la Mancha Púrpura de la semilla causados por *Cercospora kikuchii* en soja (*Glycine max* L. Merr.). *Agronomía Mesoamericana*, 33(3), Artículo 48494. <https://doi.org/10.15517/am.v33i3.48494>
- Lavilla, M. A., Ivancovich, A., & Martínez, M. (2022). Relación entre la cosecha demorada de soja y la presencia de patógenos en las semillas y en los rastrojos. *Agriscientia*, 39(1), 153-159. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v39.n1.20462>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471-471. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.1.471-471.2000>
- Nei, M. (1989). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Sautua, F. J., Gonzalez, S. A., Doyle, V. P., Berretta, M. F., Gordó, M., Scandiani, M. M., Rivarola, M. L., Fernandez, P., & Carmona, M. A. (2019). Draft genome sequence data of *Cercospora kikuchii*, a causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybeans. *Data in Brief*, 27, Article 104693. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104693>
- Soares, A. P. G., Guillin, E. A., Borges, L. L., Silva, A. C. T. D., Almeida, L. M. R. D., Grijalba, P. E., Gottlieb, A. M., Bluhm, B. H., & Oliveira, L. O. D. (2015). More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye. *PLoS ONE*, 10(8), Article e0133495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133495>
- Sokal, R. R., & Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38(6), 1409-1438. <http://en.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=146268>
- StatSoft. (2005). STATISTICA Data analysis software system. <https://statistica-update.software.informer.com/7.1/>
- Stewart, J. E., Timmer, L. W., Lawrence, C. B., Pryor, B. M., & Peever, T. L. (2014). Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), Article 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-38>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>

Cómo citar: Lavilla, M., Fernández, A. E., & Pratta, G. R. (2026). Análisis morfogenético de aislamientos de *Cercospora kikuchii* provenientes de distintas regiones de la Argentina. *Agrosilvicultura Y Medioambiente*, 4(1), 4-20. <https://doi.org/10.47230/agrosilvicultura.medioambiente.v4.n1.2026.4-20>