



Artículo Científico

# Etiología epidemiológica de *Erysiphe* sp. y de putativos síntomas virales y fitoplásmicos en frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus*)

María José Armenta-Cárdenas, Norma Ávila-Alistac<sup>1</sup>, María del Carmen Zúñiga-Romano, Gerardo Acevedo-Sánchez<sup>2</sup>, Alfonso Muñoz-Alcalá, Rene Gómez-Mercado, Juan José Coria-Contreras, Diana Gutiérrez-Esquivel, Serafín Cruz-Izquierdo<sup>3</sup>, Ivonne García-González, Oscar Bibiano-Nava, Gustavo Mora-Aguilera<sup>2\*</sup>. Programa de Fitosanidad-Fitopatología y <sup>2</sup>CP-LANREF, <sup>3</sup>Programa de Genética. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, CP 56230; <sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5, Texcoco, CP 56230. Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia:

Gustavo Mora-Aguilera  
morag@colpos.mx

Sección:  
Edición periódica

Recibido:  
30 Octubre, 2023

Aceptado:  
25 Enero, 2024

Publicado:  
12 Febrero, 2024

Cita:

Armenta-Cárdenas MJ, Ávila-Alistac N, Zúñiga-Romano MC, Acevedo-Sánchez G, Muñoz-Alcalá A, Gómez-Mercado R, Coria-Contreras JJ, Gutiérrez-Esquivel D, Cruz-Izquierdo S, García-González I, Bibiano-Nava O y Mora-Aguilera G. 2024. Etiología epidemiológica de *Erysiphe* sp. y de putativos síntomas virales y fitoplásmicos en frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus*). Revista Mexicana de Fitopatología 42(2): 11. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2310-7>



## RESUMEN

**Introducción/Objetivo.** El frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus*) tiene potencial como fuente de resistencia en programas de fitomejoramiento al exhibir mayor tolerancia a fitopatógenos que *P. vulgaris*. Sin embargo, su caracterización sanitaria es insipiente por lo que este trabajo tuvo como propósito realizar un diagnóstico etiológico-epidemiológico, con énfasis en síntomas presuntivos a organismos virales y fitoplásmicos, y a signos fungosos típicos de cenicilla polvosa.

**Materiales y Métodos.** Se seleccionó una parcela (50 x 62 m) de frijol Ayocote en floración. Se dividió en 80 (8 x 10) cuadrantes (6 x 6 m) y 720 subcuadrantes (2 x 2 m). A partir de 25 plantas con síntomas foliares tipo cenicilla se colectó micelio con cinta adhesiva para observación en microscopia de luz e identificación taxonómica. Se realizaron mediciones longitud-ancho en 60 conidios. Micelio puro colectado *in situ* y *ex situ* de 1-5 foliolos / planta se empleó para análisis genómico mediante PCR con iniciadores universales ITS1 e ITS4. Las muestras se secuenciaron con MacroGen Inc. Corea. Un total de 63 plantas y 121 hojas-trifoliadas con síntomas tipo viral y fitoplásmico se colectaron mediante muestreo dirigido. En 88/121 muestras se realizó análisis genómico mediante PCR con iniciadores universales para *Potyvirus* (1), *Begomovirus* (2) y Fitoplasmas (1). La edición y análisis de secuencias se realizó en SeqAssem y BLASTn/GenBank. Construcciones filogenéticas se realizaron en Mega 11 con MUSCLE, Máxima verosimilitud (ML) y modelo de sustitución HKY (1000-Bootstrap). Severidad putativa a cenicilla (%), daño en flor (%), adultos de *Macrodactylus* sp. y vigor de planta (%) se evaluaron en 80 cuadrantes (3subcuadrantes/cuadrante) con App-Monitor<sup>®</sup>v1.1 configurada

con escala de 5-clases. En GoldenSurfer® v10, se realizó análisis geostadístico Kriging para determinar la interrelación espacial entre estas variables.

**Resultados.** Se identificó a *Erysiphe vignae* asociado a cenicilla de *P. coccineus*. El hongo, con conidios hialinos, ovoides a elipsoides de  $31.74 \pm 0.3419 \mu\text{m} \times 15.11 \pm 0.1579 \mu\text{m}$ , sin presencia de cuerpos de fibrosina, tuvo homología genómica del 100 %. Este constituye el primer reporte en México. Con temperatura y humedad relativa promedio julio-agosto de  $16.3 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 5.8)$  y  $92.8 \% (\pm 10.7)$ , respectivamente, la cenicilla exhibió incidencia y severidad foliar de 65.3 y 22.7 % ( $\pm 16.9$ , rango: 0 – 66.5 %), respectivamente. El foco más inductivo (60–80 % severidad) tuvo un patrón agregado de 4-cuadrantes ( $96 \text{ m}^2$ ,  $lag = 4$  y  $\sigma^2-s = 450$ ). La dispersión de inóculo se asoció significativamente con vientos dominantes Norte-Sur y con vigor de planta ( $lag = 4$  y  $\sigma^2-s = 470$ ). Daño en flor no fue conclusivo en su asociación espacial con cenicilla y *Macrodictylus* sp., sugiriendo eventos no correlacionados. No se detectaron *Potyvirus*, *Begomovirus* o Fitoplasmas asociados a presuntivos síntomas tipo amarillamiento, distorsión foliar, mosaico, acortamiento de entrenudos, y otros observados *in situ*. Esto confirma la relativa tolerancia/resistencia reportada para *P. coccineus*.

**Conclusión.** Se reporta por primera vez en México a *E. vignae* (Erysiphales: Erysiphaceae) asociado a *P. coccineus* con niveles epidémicos de moderado a intenso, lo cual indica su condición susceptible a este hongo. Sin embargo, resultados negativos a *Potyvirus*, *Begomovirus* y Fitoplasmas, validan la aparente tolerancia/resistencia de *P. coccineus* a estos organismos.

**Palabras clave:** *Erysiphe vignae*, *Macrodictylus* sp., cenicilla, *Potyvirus*, *Begomovirus*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Phaseolus* (Fabaceae: Papilionoideae), con Mesoamérica y Sudamérica como centros de origen, está ampliamente distribuido en el mundo (Graham y Ranalli, 1997). Este género contiene 56 especies nativas de Mesoamérica (Mora-Aguilera *et al.*, 2023), de las cuales el frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus*) ostenta el tercer lugar en importancia económica después del frijol ancho (*P. lunatus*) y frijol común (*P. vulgaris*) (De Ron y Santalla, 2013; Santalla *et al.*, 2004). Además de México, materiales criollos o variedades de *P. coccineus* se cultivan en América Central, Sudamérica, África, Asia y Europa (Giurca, 2009; Watanabe y Tojo, 2006). El Ayocote es una planta semiperenne vigorosa, aporta 18.4 % de proteína,

cantidad menor al promedio del frijol común (Pérez *et al.*, 2002), posee tolerancia al frío y a fitopatógenos como *Colletotrichum* sp., *Uromyces* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* y *Xanthomonas campestris* (Vargas *et al.*, 2014; Giurca, 2009; Schwartz *et al.*, 2006). Es notorio que, a partir de genotipos introducidos de Japón, este frijol ha mostrado susceptibilidad a *Pythium myriotylum* con necrosis en tallo y raíz en plantaciones comerciales, y hasta 93-100 % de incidencia en inoculaciones controladas (Watanabe y Tojo, 2006). Este hongo, no se ha reportado en este cultivo en México. Respecto a enfermedades virales, se ha consignado al *Cowpea mild mottle virus* (Betaflexiviridae: Carlavirus) en condición sintomática (lesiones cloróticas, moteado moderado y severo, mosaico moderado y deformación foliar) y asintomática en colectas de Jalisco y Nayarit (Chiquito-Almanza *et al.*, 2018); sin embargo, la prevalencia de agentes virales en frijol Ayocote es menor al 20 %, mientras que en frijol común supera el 97 % en el occidente de México (Chiquito-Almanza *et al.*, 2021).

Estos trabajos permiten sustentar que *P. coccineus* exhibe mayor tolerancia a patógenos que *P. vulgaris*. Esta condición se puede deber a una limitada manipulación genética de la especie lo que ha permitido mantener su natural adaptación a factores de estrés parasítico. Por otra parte, *P. coccineus* exhibe mayor alogamia respecto al frijol común, lo que resulta en mayor diversidad genética expresada en su plasticidad fenotípica, duración de ciclos productivos, color y peso de grano (Vargas *et al.*, 2014). La tolerancia parasítica del frijol Ayocote ha justificado su incorporación a programas de fitomejoramiento en México, aunque con mayor énfasis a mejorar atributos productivos. Blanco Tlaxcala fue la primera variedad generada por Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con este enfoque manteniendo su tolerancia natural a roya y antracnosis (Vargas *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2002). No obstante, *P. coccineus* ha sido de interés como fuente de resistencia para el manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Bean golden yellow mosaic virus* (Osorno *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2006).

En el campo experimental de Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, en un lote de *P. coccineus* de 3100 m<sup>2</sup> establecido para producción de semilla con fines de mejoramiento genético, se detectó alta incidencia de un síntoma presuntivo a cenicilla, en adición a la presencia de distorsión y amarillamiento foliar putativos a infección viral y/o fitoplásmico. Debido a la reconocida tolerancia del Ayocote a fitopatógenos, y con el propósito de caracterizar el comportamiento parasítico para su consideración en futuros estudios de mejoramiento, este trabajo tuvo como propósito determinar la etiología de los síntomas descritos; y establecer el comportamiento espacial de contagio de la putativa cenicilla, el problema más prevalente, para determinar su aptitud epidemiológica considerando que la región de estudio está incluida en el centro de origen y diversificación de *P. coccineus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Unidad experimental.** En julio 2022, ciclo verano-otoño, se seleccionó una parcela experimental (50 x 62 m) de frijol Ayocote en etapa de floración ubicada en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo Texcoco, Estado de México (19°46'80''N, 98°89'76''O). Las plantas, rebrotes de segundo año, exhibían síntomas severos de una presuntiva cenicilla polvosa y de tipo viral/fitoplásmico (Figura 1). La parcela tuvo una densidad irregular, heterogeneidad en cobertura, manejo agronómico moderado, control químico de malezas y riego por inundación. Se tomó una imagen de 13mpx mediante un vuelo vertical de 50 m con dron Phantom 3 DJI® para diseñar el muestreo espacial. La parcela se dividió en 80 cuadrantes de 6x6 m y 720 subcuadrantes de 2x2 m para evaluar la severidad del síntoma tipo cenicilla y otros daños predominantes (Figura 1A). La delimitación de cuadrantes en campo se realizó con estacas de madera periferales y una red de listón de rafia (Figura 1B). En el centroide de parcela se colocó un sensor climático HOBO u23 Pro v2 para medir humedad relativa (HR) y temperatura (°C) a intervalos de 30 min entre 16-julio y 11-agosto de 2022.

### Identificación etiológica y genómica del hongo

**Identificación morfológica del hongo.** Se realizó un muestreo dirigido en 25 plantas con diferente grado de severidad del síntoma tipo cenicilla, único síntoma fungoso detectado. A partir de hojas sintomáticas, con la técnica de cinta adhesiva-solución acuosa, se prepararon portaobjetos directamente en campo y laboratorio para revisión de estructuras en microscopio compuesto (40x) e identificación del hongo a nivel género con claves taxonómicas (Barnet y Hunter, 1998). Se realizaron mediciones de 60 conidios con el software ImageJ® y se calculó la media  $\pm$  desviación estándar de largo y ancho de conidios mediante una muestra estimada con el programa Muestra-N Cuanti v.1 (CP-LANREF, 2020. No publicado). Las observaciones microscópicas se compararon con descripciones taxonómicas especializadas (Takamatsu, 2014; Cook y Braun, 2009; Glawe, 2008).

**Extracción de ADN e identificación genómica del hongo.** Mediante muestreo dirigido se seleccionaron 10 plantas distribuidas espacialmente en la parcela. Por planta, se colectaron 3-5 hojas con signos del hongo y se colocaron independientemente en bolsas polipapel para traslado a laboratorio donde de inmediato se fotografiaron y seleccionó un foliolo por cantidad y calidad de síntoma-signo. Para evitar contaminantes fungosos, de un foliolo por planta se raspó micelio superficial de infecciones jóvenes con signos activos y crecimiento vigoroso y se colocó en



**Figura 1.** Muestreo para identificar y evaluar intensidad de síntomas fungosos, putativos virales/fitoplásmicos, y entomológicos en *Phaseolus coccineus*. **A.** Imagen de 13mpx 50m con drone Phantom 3 DJI®, muestra la cuadrantización de la parcela experimental. En líneas amarillas cuadrantes de 6x6 m, y en blanco subcuadrantes de 2x2 m. Asteriscos indican subcuadrantes/cuadrante seleccionados aleatoriamente; **B.** Instalación *grid* para delimitación de cuadrantes en campo; **C.** Selección de subcuadrante colocando marco de madera 1x1 m para referencia de evaluación; **D.** Síntomas de mosaico punteado (izquierda) y aclaramiento de nervaduras (derecha), putativos a virosis. Plantas marcadas con estacas para trazabilidad; **E.** Amarillamiento generalizado con reducción de crecimiento (izquierda), mosaico con deformación foliar (derecha) presuntamente viral; **F.** Síntoma foliar con signo micelial fungoso blanquecino putativo a cenicilla; **G.** Haz de foliolo con signo micelial blanquecino. **H.** *Macroductylus* sp. adultos, y color-morfología floral de *P. coccineus*. Notar en algunos pétalos manchas pequeñas blanquecinas (ver flechas).

tubo Eppendorf con 600 µL de buffer AP y dos balines 1/8. Cada tubo constituyó una muestra/planta. El micelio del tubo se maceró en un disruptor a 30 frecuencias por 15 min. Se retiraron los balines y se agregó 1 µL de β-mercaptoetanol y se pasó por vórtex por 10 s. Se incubó a 56 °C por 45 min. Después se agregó 400 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó por vórtex. Se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó 500 µL de la fase acuosa y se agregó 500 µL de isopropanol y 50 µL de acetato de amonio, se mezcló por inmersión y se incubó a -20 °C por una noche. Posteriormente, se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó con 500 µL de etanol al 80 %. Se centrifugó a 13,500 rpm por 3 min. Se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla por 1 h y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas y se conservó a -20 °C. Por muestra se cuantificó la concentración y pureza de ácidos nucleicos totales con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA).

Para PCR, se utilizaron iniciadores ITS1 e ITS4 que amplifican la región ITS del ADN (Cuadro 1). La mezcla de reacción consistió en 10 µL de cada iniciador, 0.2 µL de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), 2 µL de ADN (40 ng µL<sup>-1</sup>) y 16.5 µL agua libre de nucleasas. Las condiciones de PCR incluyeron desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min y 31 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 90 s y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un

**Cuadro 1.** Iniciadores, secuencias y tamaño de amplicon para la identificación genómica de *Potyvirus*, *Begomovirus*, Fitoplasmas y microorganismos eucariontes en plantas de *P. coccineus* con signos de hongo tipo cenicilla, y síntomas putativos a virus y fitoplasma.

Organismo	Iniciador <sup>x</sup>	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencia
Hongo	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~500	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
Potyvirus	NIb2F	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA	350	Zheng <i>et al.</i> , 2008
	NIb3R	TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC		
Begomovirus	PBL1v2040	CARTGRTCKATCTTCATACA	500~650	Rojas <i>et al.</i> , 1993
	PCR1c	CATATTTACRARWATGCCA		
	AV494 AC1048	GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG GGRTTDGARGCATGHGTACATG	~550	Wyatt y Brown, 1996
Phytoplasmas	P1	AAGAGTTTGATCCTGCAGGAT	1,800	Deng y Hiruki, 1991; Samart <i>et al.</i> , 1996
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT		
	FU5	CGGCAATGGAGGAAACT	890	Lorenz <i>et al.</i> , 1995
	RU3N	TTCAGCTACTCTTTGTAACA		

<sup>x</sup> Se emplearon iniciadores universales.

fotodocumentador (UVP, Bioluming Systems, Epi Chemi II Darkroom). Cinco de 10 muestras amplificaron y se enviaron a secuenciar a MacroGen®, Corea del Sur. Cuatro secuencias de cinco amplicones tuvieron calidad para estudios de identificación (FAC6, FAC7, FAC8 y FAC9). Estas se editaron con el programa SeqAssem (<https://acortar.link/r0FdRx>) y se compararon en BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con secuencias del banco de genes (*GenBank*) para determinar identidad con base a similitud comparativa expresado en porcentaje de identidad y *e-value*.

**Análisis filogenético.** Una vez identificado a *Erysiphe* sp., para determinar la relación filogenética con otras especies de este género y confirmar la identificación, las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias descargadas del *GenBank* usando el algoritmo MUSCLE en Mega 11 (Cuadro 2). El análisis filogenético se realizó con mismo programa, el método estadístico Máxima verosimilitud (ML), y el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano con 1000 repeticiones Bootstrap. Se incluyó a *Oidium* sp. (número de acceso: EU377475) como grupo externo. El análisis involucró 12 secuencias de aproximadamente 561 pb.

**Cuadro 2.** Secuencias obtenidas del banco de genes NCBI utilizadas para generar la estructura filogenética y comparar con secuencias de amplicones obtenidos de cuatro muestras del hongo tipo cenicilla presente en plantas de *P. coccineus*.

Especie causante de cenicilla	Número <i>Genbank</i>	Planta Hospedante	Lugar y Fecha de reporte
<i>Erysiphe diffusa</i>	FJ378880	<i>Glycine max</i>	Australia, 2006
<i>E. fallax</i>	LC228618	<i>Carica papaya</i>	USA, 2017
<i>E. manihoticola</i>	MT106660	<i>Manihot esculenta</i>	Argentina
<i>E. pisi</i>	KR912079	<i>Pisum sativum</i>	China, 2016
<i>E. vignae</i>	MW293895	<i>Vigna radiata</i>	Australia, 2019
<i>E. vignae</i>	MT628286	<i>V. radiata</i>	Australia, 2019
<i>Erysiphe</i> sp.	JQ730709	<i>Senna septemtrionalis</i>	México, 2012
<i>Oidium</i> sp.	EU377475	<i>Knautia arvensis</i>	USA, 2009

## Identificación genómica de virus y fitoplasma

**Colecta de material vegetal.** En campo se seleccionaron plantas con síntomas presuntivos a *Potyvirus*, *Begomovirus* y Fitoplasma. Los síntomas consistieron en mosaicos tenues, deformación foliar moderada, amarillamiento generalizado, clorosis foliar, aclaramiento de nervaduras, reducción foliar, y coloración violácea en hojas, pedúnculos y tallos. Las plantas seleccionadas fueron marcadas con estacas y etiquetadas para su posterior muestreo. Se realizaron dos muestreos en diferentes

tiempos; en el primer muestreo, se colectaron dos hojas trifoliadas de 32 plantas, cada hoja como repetición (64 muestras) y en el segundo muestreo se colectaron 31 plantas.

**Extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN).** Tejido foliar de las 64 muestras del primer muestreo se maceró con nitrógeno líquido. Se pesó 0.1 g de 32 muestras seleccionadas por sintomatología y se realizó extracción de ARN total con el método modificado de Green y Sambrook (2012). Para el segundo muestreo, se realizó la extracción del ARN y ADN total por el método de CTAB 2 % (Yu, 2012; modificado por CP-LANREF, 2021). Por muestra, la concentración y pureza de los ácidos nucleicos fueron cuantificados con el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA).

**Identificación genómica de *Potyvirus*.** Se consideró ácido nucleico de 28 y 18 muestras del primer y segundo muestreo respectivamente. Se emplearon los iniciadores universales Nib2F y Nib3R (Cuadro 1) que amplifican parcialmente la región codificadora del genoma del género *Potyvirus* (350 pb) para la proteína B de inclusión nuclear (Nib) (Zheng *et al.*, 2008). Primeramente, se realizó la síntesis de ADNc a partir de ARN total y posteriormente la RT-PCR de acuerdo con el protocolo de Gonzalez-Cruces *et al.* (2022). Se realizó una mezcla de reacción de pre RT-PCR con 9.75 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 500 nM por iniciador y 2.5 µL de ARN total, incubado a 85 °C durante 3 min. Para RT-PCR, se añadió a la reacción en pre RT-PCR una mezcla con: 2 mM de mix dNTP's, 1X buffer-RT y 100 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV-RT), todos de Promega Corp. EUA para obtener un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones de RT-PCR fueron a 44 °C durante 60 min para incubación, seguido de 92 °C durante 10 min. El volumen final de reacción fue 25 µL constituido por: 12.5 µL de mix GoTaq® G2 Hot star, 500 nM de cada iniciador y 2.5 µL de ADNc. Se ejecutó un programa con desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min y 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 45 s, alineamiento a 45 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 45 s y una extensión final a 72 °C por 5 min.

**Identificación genómica de *Begomovirus*.** Se analizó material vegetal de 17 muestras (segundo muestreo). Se utilizaron dos pares de iniciadores universales para el género *Begomovirus*: PBL1v2040 / PCR1c (Rojas *et al.*, 1993) y Av494 / Ac1048 (Cuadro 1) (Wyatt y Brown, 1996). La mezcla de PCR con los iniciadores PBL1v2040 / PCR1c se realizaron con un volumen final de 25 µL: 1X de buffer GoTaq®, 0.2 mM de mix dNTP's, 300 nM de los iniciadores PBL1v2040 - PCR1c, 0.5 U de GoTaq® G2 y 2 µL de ADN. El volumen final se aforó con agua libre de nucleasas hasta obtener 25 µL. El programa incluyó desnaturalización inicial a



95 °C por 3 min y 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 50 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 45 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min. El PCR se realizó en el termociclador Arktik Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Para el caso de iniciadores AV494 / AC1048, la mezcla de PCR consistió en un volumen final de 25 µL: 15 µL de H<sub>2</sub>O, 5 µL de Buffer Green 5X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (7.5 mM), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de cada iniciador (10 mM), 0.25 µL de GoTaq® DNA Polimerasa (U µL<sup>-1</sup>) (Promega) y 2 µL de ADN. Las condiciones de PCR incluyeron desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min y 30 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 2 min, extensión a 72 °C por 60 s, y una extensión final de 72 °C por 10 min.

**Identificación genómica de fitoplasmas.** Se analizó material vegetal de 42 muestras (segundo muestreo). Para la primera etapa de PCR anidado se utilizaron los iniciadores P1 / P7 (Samart *et al.*, 1996; Deng y Hiruki, 1991). La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25 µL integrada por: 12 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 2.5 µL de Buffer 1X, 0.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de cada iniciador (10 mM), 0.4 µL de Taq DNA Polimerasa (U µL<sup>-1</sup>) (Invitrogen) y 5 µL de ADN. Se ejecutó un programa consistente en desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 75 s, extensión a 72 °C por 90 s y extensión final a 72 °C por 10 min. El PCR se realizó en el termociclador T-100 (BioRad).

En la segunda etapa de PCR anidado se utilizaron los iniciadores FU5 y RU3N dirigidos a la región amplificada 16S (Lorenz *et al.*, 1995). Los productos obtenidos en la PCR-directa se diluyeron (1:30) con agua destilada estéril y se utilizó como ADN molde con las mismas concentraciones anteriormente descritas. Se ejecutó un programa consistente en desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 90 s y extensión final a 72 °C por 5 min. El PCR se realizó en el termociclador T-100 (BioRad). El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio y se visualizó con luz UV en fotodocumentador (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).

### **Análisis epidemiológico**

**Muestreo y evaluación.** Por cuadrante, se seleccionaron 3/9 subcuadrantes como unidades de muestreo para evaluar variables de intensidad de daño y ocurrencia de adultos de *Macrodactylus* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) como posible agente dispersor de presuntiva cenicilla en estructuras florales. La selección de subcuadrantes se hizo mediante un método aleatorio con MS Excel Aleatoriza v1.0 (CP-LANREF, 2022. No publicado) (Figura 1A). Cada unidad de muestreo se delimitó con un marco de madera portátil de 1x1 m ubicado en el centroide del subcuadrante para

acotar el área de evaluación de variables (Figura 1C-D). En unidades de muestreo con menos del 25 % de cobertura foliar, el muestreo se direccionó a otra sección del subcuadrante correspondiente.

**VARIABLES EVALUADAS.** Se utilizó App-Monitor® v1.1 Android®, disponible en PlayStore® (CP-LANREF, 2022) para caracterizar la parcela experimental y medición de variables. Se registró coordenada geográfica, entidad federativa, municipio, localidad, nombre del cultivo, superficie, fenología, nivel de tecnificación, riego y densidad de plantación. Se configuró un muestreo de severidad de cenicilla, daño de flor y vigor de planta mediante una escala aritmética de 5-clases:  $I=0\%$ ,  $2=0.01-25\%$ ,  $3=25.01-50\%$ ,  $4=50.01-75\%$  y  $5=75.01-100\%$  (Figura 1F-G). Adicionalmente, se contabilizó el número de adultos de *Macrodactylus* sp. (Figura 1H). Las evaluaciones se realizaron integrando la cobertura total de tejido vegetal visible acotado al marco de muestreo, independiente del número de plantas.

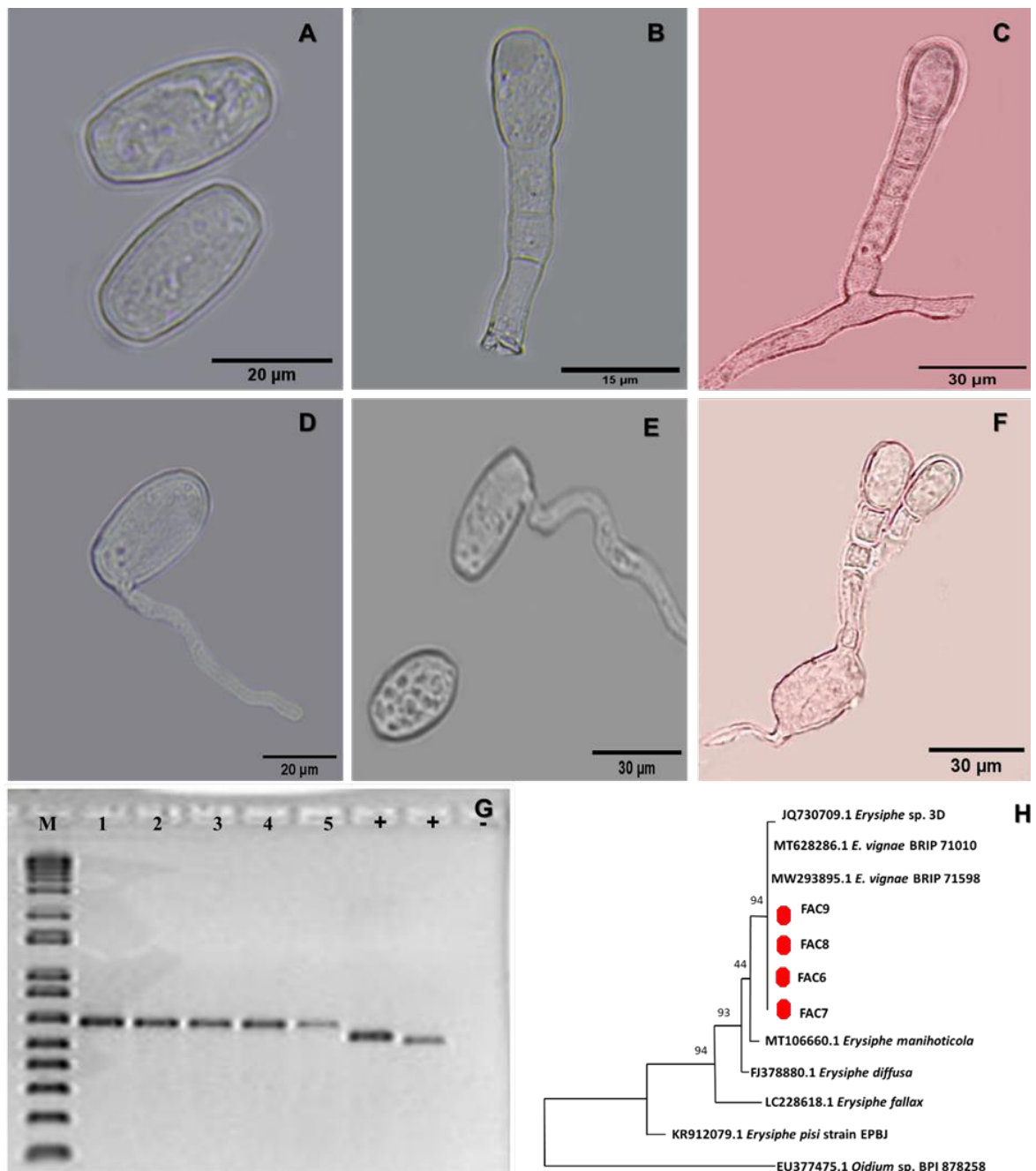
**ANÁLISIS GEOESPACIAL.** Los registros en App-Monitor®v1.1, se exportaron en MS Excel®. La matriz de datos se estructuró en formato espacial de tipo: X = filas (cuadrante- $i$ ), Y = columnas (subcuadrante- $j$ ) y Z = variables- $k$  para análisis espacial geoestadístico en Golden Surfer® v10. Para generar un valor por cuadrante, a partir de los tres subcuadrantes evaluados, se seleccionó el máximo obtenido con la escala aritmética de 5-clases para severidad de cenicilla, daño de flor y vigor de planta. Para *Macrodactylus* sp., se obtuvo el acumulado de insectos por cuadrante. El análisis geoestadístico por variable se realizó con el método Kriging representado en mapas de contornos. La dependencia y autocorrelación espacial se calculó mediante variogramas omnidireccionales ( $360^\circ$ ) ajustados a un modelo esférico. Se obtuvieron los indicadores variográficos *lag-distance* y *sill* o meseta ( $\sigma^2-s$ ) para determinar la dependencia espacial a nivel parcela (Gonzalez-Cruces *et al.*, 2021).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación morfológica y génica del hongo.** Los síntomas observados en campo consistieron en manchas irregulares de aspecto blanco polvoso sobre el haz foliar, principalmente en hojas del estrato medio y bajo de la planta. En síntomas avanzados se identificaron manchas de color amarillento. En hojas jóvenes, se observó una ligera distorsión y reducción de área foliar debido a mayor abundancia del hongo. En flores se presentó ligera distorsión foliar y manchas blanquecinas en ausencia del aspecto polvoso. También se observó presencia abundante de *Macrodactylus* sp., principalmente en la flor. Esta es una plaga de algunos cultivos como el maíz y frijol (Aragón *et al.*, 2021), por lo que potencialmente podría ser un dispersor fungoso debido a sus hábitos alimenticios y movilidad.

En microscopio compuesto se confirmó que el aspecto polvoso correspondió a signos del hongo representado por conidios, conidióforos e hifas (Figura 2A-C). En flor no se logró obtener estructuras fungosas. Los conidióforos fueron cilíndricos y erectos, con célula basal recta o ligeramente curva seguidas por dos células apicales más cortas. Exhibieron conidiogénesis tipo *Pseudoidium* (maduración de conidios asincrónica, uno a la vez) (Figura 2B-C). Conidios hialinos, ovoides a elipsoides de  $31.74 \pm 0.3419 \mu\text{m} \times 15.11 \pm 0.1579 \mu\text{m}$  sin presencia de cuerpos de fibrosina (Figura 2A-E). Tubos germinativos con longitud de 1-2 veces el largo de los conidios, con desarrollo terminal o subterminal y ápices lobulados (Figura 2D-E). De acuerdo a las características morfológicas se determinó que el hongo pertenece al género *Erysiphe* (Bradshaw *et al.*, 2020; Tovar-Pedraza *et al.*, 2018; Takamatsu, 2014; Cook y Braun, 2009; Glawe, 2008). No se observaron estructuras sexuales. Electroforesis en gel de agarosa confirmó la amplificación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADN ribosómico nuclear (~500 pb) de cinco muestras de ADN del hongo, así como ADN de controles positivos de PCR pertenecientes a los géneros *Alternaria* y *Fusarium* (Figura 2G). Cuatro secuencias tuvieron la calidad para análisis comparativo con acervos del *GenBank* mediante BLASTn. Este análisis permitió confirmar al género y determinar que el agente causal de cenilla en frijol Ayocote fue *Erysiphe vignae* con porcentaje de homología del 100 % (*e-value* = 0). Las secuencias fueron registradas en *GenBank* con números de acceso OQ448664 (FAC6), OQ448665 (FAC7), Q448666 (FAC8), y OQ448667 (FAC9). Asimismo, con una confiabilidad del 94 %, las cuatro secuencias se agruparon con dos secuencias pertenecientes a *Erysiphe vignae* (MW293895, MT628286) asociadas a *Vigna radiata* (*Fabaceae*) de Australia (Figura 2H). Los resultados morfológicos y genómicos de este estudio fueron consistentes con las características reportadas para esta especie por Kelly *et al.* (2021) y Deng *et al.* (2022).

Además de reportes de *E. vignae* infectando *Vigna radiata* (Kelly *et al.*, 2021), se ha consignado en otras fabáceas como en frijol negro (*V. mungo*) en Australia, espelón (*V. unguiculata*) en Brasil, y en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Sudamérica y China (Deng *et al.*, 2022; Kelly *et al.*, 2021). En Sinaloa, México, se ha reportado a *E. diffusa* como agente causal de la cenicilla en frijol común con incidencias de hasta el 10 % del área sembrada (Félix-Gastélum *et al.*, 2017; Félix-Gastélum *et al.*, 2011). Sin embargo, no existen reportes de *E. vignae* afectando a fabáceas en México (Schoch *et al.*, 2020). Por lo anterior, este trabajo representa el primer reporte de *E. vignae* asociado al frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus*) en condiciones del Altiplano central mexicano. Este género, y en general los Erysiphales, son parásitos obligados con relativa especificidad de hospedero (Deng *et al.*, 2022; Félix-Gastélum *et al.*, 2017), por lo que puede ser asumido que la asociación hongo-planta es indicativo de causalidad. No obstante, estudios etiológicos formales deben ser conducidos en el futuro para determinar la patogénesis y para evaluar



**Figura 2.** Identificación morfológica y genómica de la cenicienta en frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus*). **A.** conidios hialinos, ovoides a elipsoides; **B-C.** conidióforos cilíndricos y erectos; **D-F.** conidios en germinación; **G.** Amplificación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADN ribosómico nuclear (~500 pb) de cinco muestras de ADN de cenicienta (1-5), dos controles positivos de PCR (+) pertenecientes a la región ITS del género *Alternaria* y *Fusarium*, marcador de peso molecular (M) de 1 kb plus Invitrogen y control negativo de PCR (-); **H.** árbol filogenético realizado por Máxima verosimilitud (ML) y el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano con 1000 repeticiones Bootstrap, basado en la región ITS de secuencias de hongos pertenecientes al género *Erysiphe* (Cuadro 2). Las secuencias de estudio son: FAC6, FAC7, FAC8 y FAC9 (punto rojo). Se incluyó a *Oidium* sp. (número de acceso: EU377475) como grupo externo.

el comportamiento de acervos de *P. coccineus* a la infección del hongo, análogo a trabajos con frijol común (Deng *et al.*, 2022).

El frijol Ayocote ha sido reconocido en general por su resistencia y tolerancia a plagas, enfermedades y al frío (Chiquito-Almanza *et al.*, 2021; 2018; Schwember *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2014; Giurca, 2009; Osorno *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2006). Por ejemplo, Ruíz-Salazar y colaboradores (2019) resaltan que el frijol Ayocote presenta resistencia al tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) y antracnosis (*Colletotrichum lindemutianum*). Sin embargo, en ningún trabajo se reporta *E. vignae*. La cenicilla, causada por otras especies de *Erysiphe*, es un factor limitante del rendimiento en algunas regiones productoras de frijol común a nivel mundial y puede causar hasta 69 % de pérdidas (Deng *et al.*, 2022; Félix-Gastélum *et al.*, 2017).

**Identificación genómica de virus y fitoplasmas.** Con los iniciadores universales empleados (Zheng *et al.*, 2008), no se detectó la presencia de *Potyvirus* en un total de 46 folíolos con síntomas de mosaico, amarillamiento, deformación foliar y aclaramiento de nervaduras (Figura 1D, F). Similarmente, con dos pares de iniciadores universales (Wyatt y Brown, 1996; Rojas *et al.*, 1993), no se detectó al género *Begomovirus* en 17 muestras con síntomas de amarillamiento generalizado y ligera deformación (Figura 1E). En frijol común, ambos géneros se han reportado en México por lo que fueron enfatizados en este estudio y por coincidencia de algunos centros de origen y cultivación entre éste y el Ayocote (Mora-Aguilera *et al.*, 2023). En particular, el muestreo se incrementó para *Potyvirus* por la mayor prevalencia del *Bean common mosaic virus*, posiblemente por su aptitud de transmisión por semilla y por varias especies de áfidos (Hemitera: Aphididae) (Gonzalez-Cruces *et al.*, 2022; Chiquito-Almanza *et al.*, 2021). La ocurrencia de *Begomovirus*, i.e. *Bean golden yellow mosaic virus*, ha declinado a partir de los 90's cuando tuvo impacto epidémico en frijol (Chiquito-Almanza *et al.*, 2021; Rojas *et al.*, 1993). En frijol común se ha reportado a nivel mundial 23 especies virales pertenecientes a nueve géneros (*Potyvirus*, *Comovirus*, *Nepovirus*, *Sobemovirus*, *Alfamovirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Begomovirus* y *Curtovirus*), predominando 11 especies del género *Potyvirus* como principales enfermedades virales en frijol (Meziadi *et al.*, 2017).

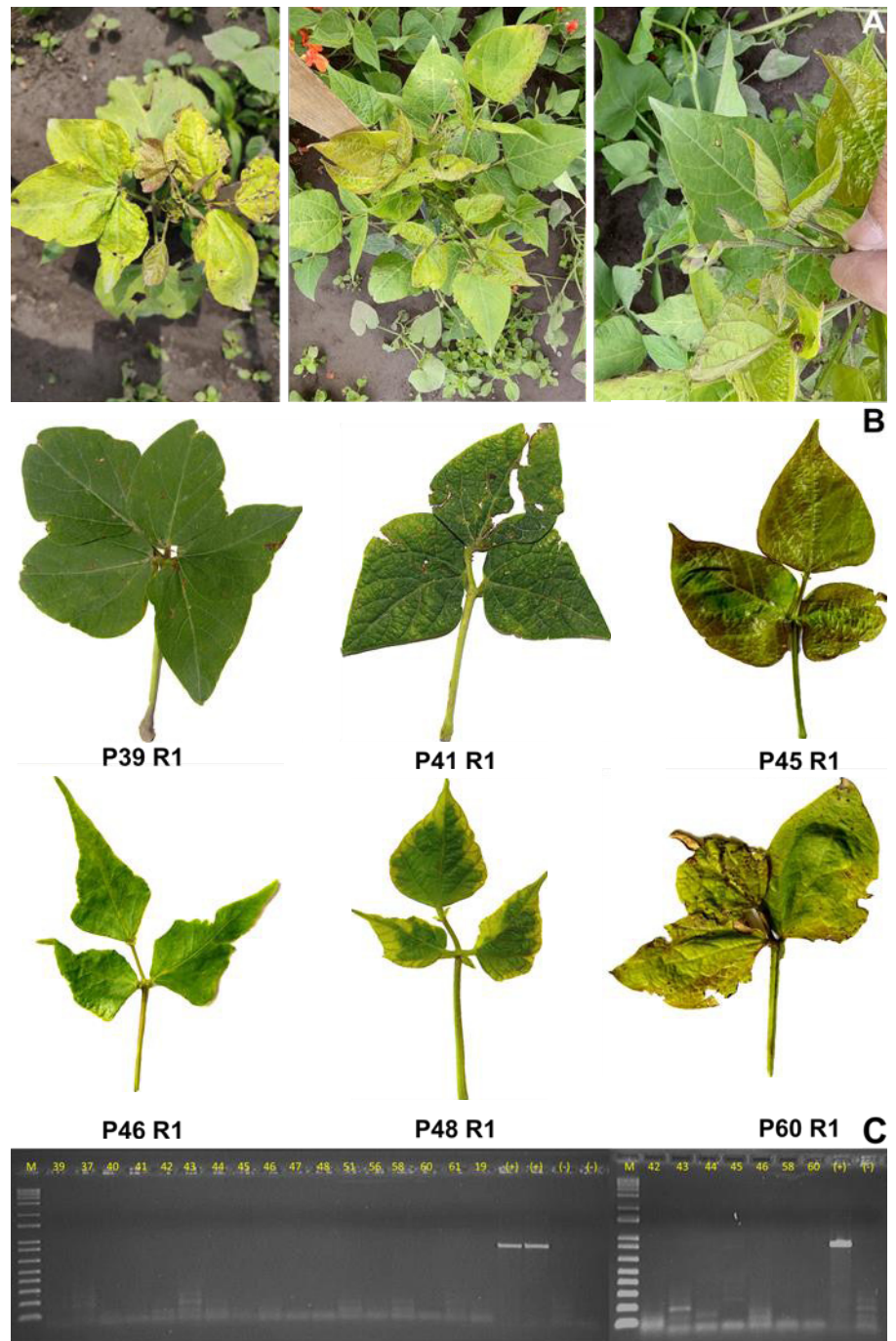
En frijol Ayocote existen escasos estudios etiológicos virales en México (Chiquito-Almanza *et al.*, 2021; 2018). Osorno y colaboradores (2007) sugieren que *P. coccineus* exhibe resistencia al *Bean golden yellow mosaic virus*, debido a dos genes. Un gen recesivo, que confiere resistencia a clorosis foliar y un gen dominante que evita la deformación de vainas infectadas con el virus. Sin embargo, el *Cowpea mild mottle virus* (Betaflexiviridae: Carlavirus), con *Bemisia tabaci* (Hemitera: Aleyrodidae) como vector, se ha reportado en Jalisco y Nayarit en condición sintomática (lesiones cloróticas, moteado severo y moderado, moderado mosaico y deformación foliar) y asintomática (Chiquito-Almanza *et al.*, 2018). Ese virus no

fue analizado en este estudio por lo que se debe considerar en el futuro. No obstante, los resultados de este trabajo y otros sugieren la tolerancia y/o resistencia de *P. coccineus* a patógenos virales. Por ejemplo, en un estudio regional al occidente de México se determinó que la incidencia de plantas con síntomas virales en esta especie fue menor al 20 %, consignándose únicamente al *Cowpea mild mottle virus*, mientras que en frijol común superó el 97 % asociado al menos a 1/9 especies de un total de cinco géneros de virus identificados (Chiquito-Almanza *et al.*, 2021).

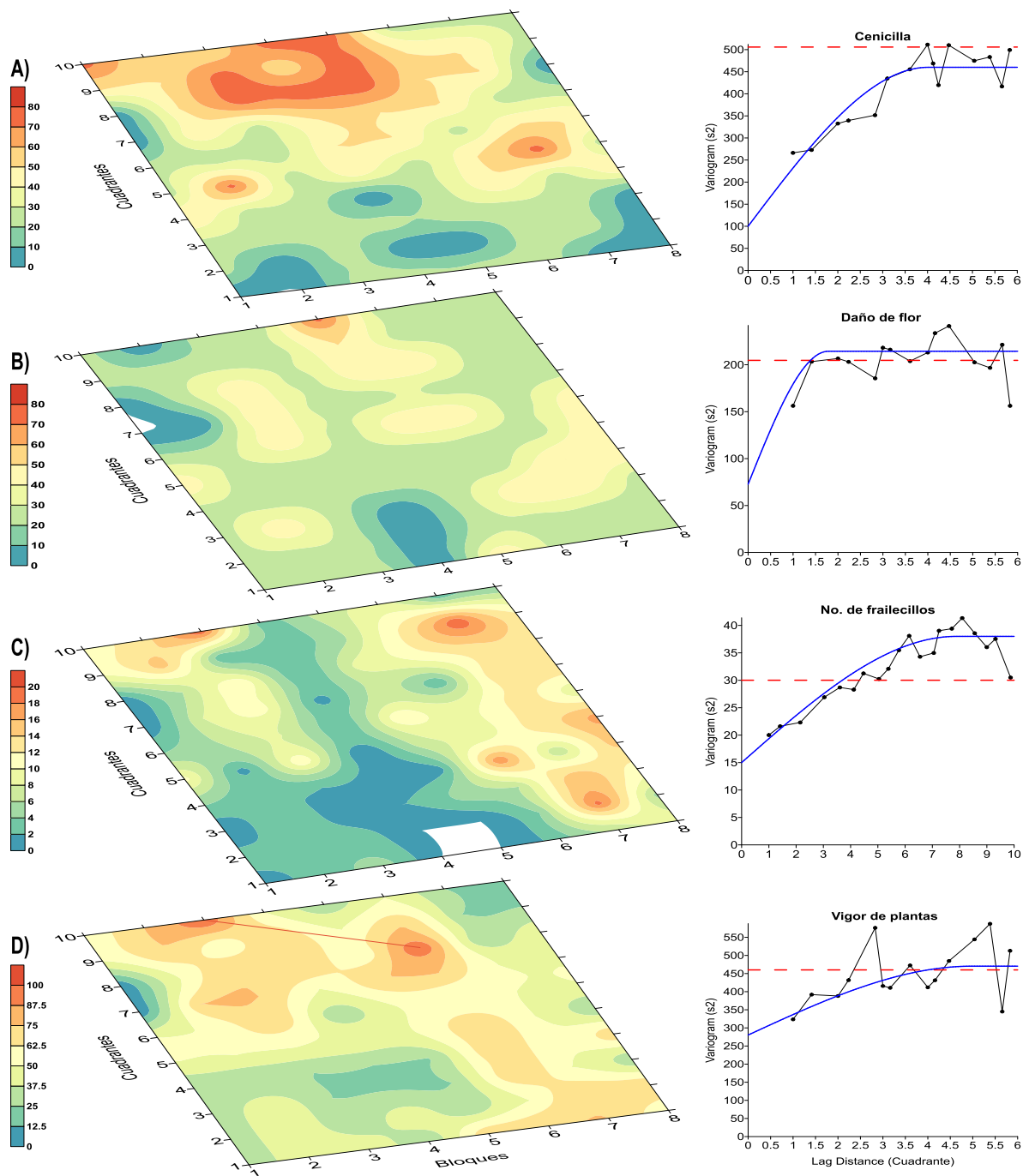
El diagnóstico para fitoplasma también resultó negativo en 42 muestras analizadas con iniciadores universales y PCR anidado (Samart *et al.*, 1996; Lorenz *et al.*, 1995; Deng y Hiruki, 1991). Este análisis se repitió varias veces, con ajuste del protocolo PCR y remuestreo en campo, debido a los síntomas observados, en general asociados con estos organismos. Estos incluyeron deformación foliar, coloración café o violeta, con evidente coloración violácea en nervaduras del envés de hojas más jóvenes, achaparramiento y acortamiento de entrenudos, ligero amarillamiento en hojas del estrato medio, y aborto y/o retraso de emisión floral (Figura 3A-B). Sin embargo, la electroforesis en gel de agarosa para los productos PCR obtenidos sólo mostró bandas del testigo positivo (Figura 3C). Actualmente, solo se ha reportado a ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ en las fabáceas *Macroptilium lathyroides* (Alves *et al.*, 2018) y *Crotalaria juncea* (Bianco *et al.*, 2014), con síntomas de reducción foliar, amarillamiento y atrofia. Así mismo, se ha reportado a las chicharritas *Empoasca kraemeri*, *E. fabae* y *E. papayae* (Hemiptera: Cicadellidae) asociados a un complejo de síntomas de tipo viral y fitoplásmico en frijol común (Lozano-Gutiérrez *et al.*, 2017; Sánchez-Castro *et al.*, 2016).

En este trabajo se detectó presencia de adultos de chicharritas, pero no se procedió a su identificación. Esto sugiere la necesidad de investigaciones futuras para descartar la presencia de fitoplasma(s) en frijol Ayocote con empleo de mayor número de unidades productivas y muestras vegetales, y establecer la asociación de estos mollicutes en potenciales insectos vectores. La relevancia principal, más que productiva, podría ser en el empleo de *P. coccineus* como eventual fuente de resistencia en estudios de mejoramiento con frijol común, lo cual requiere una completa caracterización fitosanitaria en esta especie.

**Análisis geoespacial.** El análisis geoestadístico por el método Kriging y variogramas omnidireccionales de inductividad epidémica de la cenicilla, daño en flor, densidad de frailecillo y vigor de planta evidenciaron claramente la alta capacidad infectiva de la cenicilla (*E. vignae*), en frijol Ayocote considerando que los presuntivos síntomas virales y fitoplásmicos no fueron etiológicamente confirmados (Figura 4A-C). La incidencia de cenicilla fue 65.3 % (unidad subcuadrante) con severidad promedio de 22.7 % ( $\pm 16.9$ , rango: 0 – 66.5 %). Estos niveles de daño son moderados a altos por lo que *E. vignae* debe considerarse un patógeno de alto riesgo para *P. coccineus*.



**Figura 3.** Síntomas en campo presuntivos a infección por fitoplasma en frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus*). A. Síntomas putativos a fitoplasmas. Incluye deformación foliar, coloración café o violeta, con evidente coloración violácea en nervaduras del envés de hojas jóvenes, achaparramiento, ligero amarillamiento foliar B. Ejemplo de seis hojas trifoliadas con síntomas presuntivos a fitoplasmas incluidas en diagnóstico PCR; C. Electroforesis en gel de agarosa de 24 muestras procesadas por PCR anidado. Únicamente los testigos positivos amplificaron por PCR.



**Figura 4.** Mapas de contorno geostatístico Kriging y variogramas gráficos de variables fitosanitarias y vigor en frijol Ayocote. **A.** Severidad de cenicilla, **B.** Daño en flor, **C.** Densidad de frailecillo (*Macrodactylus* sp.) y, **D.** Vigor de planta. Para el análisis de frailecillos se obtuvo la suma de tres subcuadrantes analizados por cuadrante. Para el análisis de severidad de cenicilla, daño de flor, y vigor de planta se consideró el daño máximo obtenido por cuadrante. Variogramas omnidireccionales se obtuvieron por el método esférico. Eje X = lag de distancia en cuadrantes y Y = la varianza ( $\sigma^2$ ).



El contagio de la cenicilla exhibió un patrón de agregados con dependencia espacial máxima de cuatro cuadrantes en el foco principal (96 m<sup>2</sup>,  $lag = 4$  y  $\sigma^2-s = 450$ ) y de 1-2 cuadrantes en los focos secundarios (48 m<sup>2</sup>,  $lag = 2$  y  $\sigma^2-s = 350$ , Figura 4A). El foco principal, exhibido por la continuidad del color rojo de la escala de daño, tuvo un rango de severidad 60 – 80 % y un marcado efecto de orilla asociado al mayor porcentaje de vigor de planta (entre 50-75 %) (Figura 4D). Esta aseveración se evidencia con la coincidencia en general de los contornos colorimétricos de mayor valor en la escala entre los cuadrantes (*c*) 6-10 y bloques (*b*) 2-6 (Figura 4A y 4D). Esto concuerda con la naturaleza foliar infecciosa de estos hongos, los cuales garantizan la reinfección a mayor biomasa ya que esta favorece condiciones microclimáticas aptas para el patógeno como la posibilidad de reducir la exposición directa a luz solar la cual inhibe la germinación de esporas (Craig y Weyne, 2012; Hückelhoven y Panstruga, 2011). En este trabajo, la cenicilla en campo se presentó con una temperatura y humedad relativa promedio (julio-agosto) de 16.3 °C ( $\pm 5.8$ ) y 92.8 % ( $\pm 10.7$ ), respectivamente. La dependencia espacial direccional, y la forma de los agregados; sin embargo, también validó el efecto de vientos dominantes Norte-Sur para la conformación de gradientes. Es también conocida la alta aptitud epidemiológica de los Erysiphales debido a la abundante producción intermitente de conidios con fácil liberación y dispersión aérea (Deng *et al.*, 2022; Glawe, 2008). La heterogeneidad del vigor en planta, quizás debido al segundo año de cultivación o la plasticidad fenotípica (Vargas *et al.*, 2014), explicó la conformación de agregados diferenciados de vigor y la identificación de dependencia espacial ( $lag = 4$  y  $\sigma^2-s = 470$ ) (Figura 4D). Epidemiológicamente, el daño de flor no fue conclusivo en su asociación con la incidencia de cenicilla. Esto concordó con la ausencia de signos a nivel microscópico. Espacialmente, este daño tuvo una distribución aleatoria de focos moderados con dependencia de 1-2 cuadrantes y 30 – 40 % severidad ( $lag = 1.5$  y  $\sigma^2-s = 250$ ) (Figura 4B). La ausencia de correspondencia colorimétrica de este mapa de contorno con el de cenicilla foliar (Figura 4A) sugiere que estos eventos no están infecciosamente correlacionados.

Análogamente, la densidad espacial de adultos de *Macroductylus* sp., aunque fue heterogénea y se observaron dos grandes agregados principales, entre 1-10 *c* y 6-8 *b*, y entre 5-10 *c* y 1-3 *b*, con uno y cuatro focos ( $> 18$  insectos/centroide), respectivamente (Figura 4C), tampoco se asoció con el mapa de contorno de dispersión de daño en flor, o de cenicilla en hoja, como se hipotetizó originalmente. No se detectó daño por alimentación del insecto en flores, órgano donde se le detectó con mayor prevalencia (Figura 1H). Su rol como posible polinizador, importante en *P. coccineus*, no fue evaluado. Se ha reportado que *Macroductylus* sp. en etapas adultas pueden alimentarse de flores, frutos, granos de polen y secreciones de savia dulce de diversos cultivos como maíz y frijol común (Aragón *et al.*, 2021). La implicación del frailecillo en la dispersión de *E. vignae* no puede considerarse concluyente. Para ese fin, es necesario conducir estudios espacio-temporales extensivos.

## CONCLUSIONES

El patógeno asociado a cenicilla en *Phaseolus coccineus* fue *Erysiphe vignae* (Erysiphales: Erysiphaceae). Este representa el primer reporte en frijol Ayocote en México. La cenicilla exhibió incidencia del 65.3 % y severidad promedio de 22.7 % ( $\pm 16.9$ , rango: 0 – 66.5 %). Estos niveles de daño son moderados a altos por lo que *E. vignae* debe considerarse un patógeno de riesgo para *P. coccineus*. El patrón agregado de contagio de *E. vignae* estuvo asociado con vigor de planta y direccionalidad de vientos dominantes. Este patrón no se relacionó con otros daños como manchas blanquecinas en flores y ocurrencia de *Macrodactylus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *E. vignae* podría también ser de riesgo para frijol común (*P. vulgaris*) en México ya que no se ha reportado. No se detectaron especies del género *Potyvirus* y *Begomovirus*, ni mollicutes de tipo fitoplasma asociados a síntomas de amarillamiento, distorsión foliar, mosaico moderado, acortamiento de entrenudos y coloración morada foliar y de tallo lo que valida la tolerancia/resistencia reportada en general para *P. coccineus*. La importancia potencial alimenticia del frijol Ayocote, y su aplicabilidad en programas de resistencia, obliga a incentivar investigaciones etiológico-epidemiológicas en *P. coccineus*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del equipo CP-LANREF y participantes del curso COLPOS de Epidemiología Agrícola FIT612; al MC Jorge Valdez por su guía en mediciones microscópicas y edición fotográfica; Al CONAHCYT por becas otorgadas y al COLPOS por la oportunidad de realizar estudios de postgrado.

## LITERATURA CITADA

- Alves MS, de Souza AN, Ribeiro GM and Carvalho CM. 2018. First report of a 'Candidatus Phytoplasma asteris' isolate associated with *Macroptilium lathyroides* yellow leaf disease in Brazil. *New Disease Reports* 37: 11. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.037.011>
- Aragón-Sánchez M, Aragón-García A, Arce-Pérez R, Pérez Torres BC, Cuate-Mozo VA, López-Olguín JF. 2021. Actualización de las especies del género *Macrodactylus* Dejean (Coleoptera: Melolonthinae: Macrodactylini) para el estado de Puebla, México. *Acta zoológica mexicana* 37: e3712403. Epub 21 de febrero de 2022. <https://doi.org/10.21829/azm.2021.3712403>
- Bianco LF, Martins EC, Toloy RS, Coletti DAB, Teixeira DC and Wulff NA. 2014. First report of phytoplasmas groups 16SrI and 16SrXV in *Crotalaria juncea* in Brazil. *Diseases Notes*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1190-PDN>
- Bradshaw M, Braun U, Götz M, Takamatsu S, Brand T, Cabrera MG, Dirchwolf P, Kummer V, Medina R, Moparhi S and Salcedo-Sarmiento S. 2020. Contributions to the knowledge of the phylogeny and taxonomy of the Erysiphaceae (powdery mildews) –part 1. *Sydowia* 73:89-112. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia73-2020-0089>
- Barnet HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society. USA. 240p.

- Chiquito-Almanza E, Caballero-Pérez J, Acosta-Gallegos JA, Montero-Tavera V, Mariscal-Amaro LA and Anaya-López JL. 2021. Diversity and distribution of viruses infecting wild and domesticated *Phaseolus* spp. in the mesoamerican center of domestication. *Viruses* 13(6):1153. <https://doi.org/10.3390/v13061153>.
- Chiquito-Almanza E, Caballero-Pérez J, Guevara-Olvera L, Acosta-García G, Pérez-Pérez MCI, Acosta-Gallegos JA and Anaya-López JL. 2018. First report of *Cowpea mild mottle virus* infecting cultivated and wild *Phaseolus* in the Central-Western region of Mexico. *Plant Disease* 102:1047. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-0990-PDN>
- Cook RT A and Braun U. 2009. Conidial germination patterns in powdery mildews. *Mycological Research* 113(5): 616-636. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.010>
- Craig A and Weyne WF. 2012. Effects of sunlight exposure on grapevine powdery mildew development. *Phytopathology* 102(9): 857-866. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0205>
- CP-LANREF. 2022. App-EMonitor. Ver 2.1. Autores: Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras JJ, Flores-Colorado OE, Guzmán-Hernández E, Mora-Aguilera G. No. Registro INDAUTOR: 03-2022-061611452600-01. <https://shorturl.at/hiRS5>.
- De Ron AM and Santalla M. 2013. *Phaseolus vulgaris* (Beans). In: Maloy S and Hughes K. *Brenner's encyclopedia of Genetics*. Second Edition. Academic Press. Elsevier.
- Deng D, Sun S, Wu W, Duan C, Wang Z, Zhang S and Zhu Z. 2022. Identification of causal agent inciting powdery mildew on common bean and screening of resistance cultivars. *Plants* 11(7): 7. <https://doi.org/10.3390/plants11070874>
- Deng S and Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of microbiological methods* 14(1): 53-61.
- Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Beltran-Peña H, Apodaca-Sánchez MA, Espinoza-Matías S, Martínez-Valenzuela MC, Longoria-Espinoza RM and Olivás-Peraza NG. 2017. Powdery mildews in agricultural crops of Sinaloa: Current status on their identification and future research lines. *Mexican Journal of Phytopathology* 35: 106-129. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1607-4>
- Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Herrera-Rodríguez G, Martínez-Valenzuela C, Espinosa-Matías S, Cordero-Ramírez JD and Martínez-Álvarez JC. 2011. Powdery mildew on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Northern Sinaloa, Mexico. *Sydowia* 63(2): 169-182. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84856681084&origin=inward&txGid=ff970fdfb3ec9dc061b2e27296e844a4>
- Glawe DA. 2008. The powdery mildews: A review of the World's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46(1): 27-51. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740>
- González-Cruces A, Arista-Carmona E, Díaz-Arias KV, Ramírez-Razo K, Hernández-Livera A, Acevedo-Sánchez G, Mendoza-Ramos C and Mora-Aguilera G. 2022. Epidemiology of *Bean common mosaic virus* and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(2): 188-220. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-8>
- Giurca DM. 2009. Morphological and phenological differences between the two species of the *Phaseolus* genus (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*). *Cercetari Agronomice Moldova* 42: 39-45. [http://www.uaiasi.ro/CERCET\\_AGROMOLD/ro/fisiere/2009/V2/CA2-09-04.pdf](http://www.uaiasi.ro/CERCET_AGROMOLD/ro/fisiere/2009/V2/CA2-09-04.pdf)
- Graham PH and Ranalli P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Ranalli P and Graham PH. *Field crops Research* 53(1-3): 131-146. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00112-3)
- Hückelhoven R and Panstruga R. 2011. Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Current Opinion in Plant Biology* 14(6): 738-746. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.08.002>
- Kelly LA, Vaghefi N, Bransgrove K, Fechner NA, Stuart K, Pandey AK, Sharma M, Németh MZ, Liu SY, Tang SR, Nair RM, Douglas CA and Kiss L. 2021. One crop disease, how many pathogens? *Podosphaera xanthii* and *Erysiphe vignae* sp. nov. identified as the two species that cause powdery mildew of mungbean (*Vigna radiata*) and black gram (*V. mungo*) in Australia. *Phytopathology* 111(7): 1193-1206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-20-0554-R>
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U and Seemüller E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Lozano-Gutiérrez J, España-Luna MP, Lara-Herrera A, Álvarez-Robles F y Martínez-Contreras CA. 2017. La chicharrita *Empoasca kraemeri* (Ross y Moore) (Hemiptera: Cicadellidae) y su parasitoide nativo *Anagrus* sp. Haliday, 1833 (Hymenoptera: Mymaridae) en el cultivo de frijol en Zacatecas. *Agroecología* 46-49. <https://www.repositorionacionalcti.mx/recurso/oai:localhost:20.500.11845/1438>

- Meziadi C, Blanchet S, Geffroy V and Pflieger S. 2017. Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L.: State of the art and future prospects. *Plant Science* 265: 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.08.009>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, González-Cruces A. 2023. Riesgos a la diversidad de razas y producción de frijol común por incidencia de fitopatógenos. In: Ávila-Alistac N, Rivas-Valencia P, Espinosa-Calderón A (Eds.). 2023. El Maíz y Frijol en México: Etiología, Epidemiología y Mejoramiento Genético. Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF) – Consejo Nacional de Ciencias Humanidades y Tecnología. Primera Edición. ISBN (en trámite). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-1>.
- Osorno JM, Muñoz CG, Beaver JS, Ferwerda FH, Bassett MJ, Miklas PN, Olczyk T and Bussey B. 2007. Two genes from *Phaseolus coccineus* confer resistance to *Bean golden yellow mosaic virus* in common bean. *Journal American Society Horticulture Science* 132(4): 530-533. <https://doi.org/10.21273/JASHS.132.4.530>
- Pérez HP, Esquivel EG, Rosales SR y Acosta-Gallegos JA. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 52: 172-180. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222002000200009](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000200009)
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russel DR and Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0340>
- Ruíz-Salazar R, Vargas-Vázquez MLP, Hernández-Delgado S, Muruaga-Martínez JS y Mayek-Pérez N. 2019. Detección de marcadores genéticos asociados a la resistencia a patógenos en frijol Ayocote de Puebla, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(7): 1591-1602. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1956>.
- Sánchez-Castro A, Miranda I, Quiñones ML, Piñol BE y Fernández BM. 2016. Saltahojas (Typhlocybinæ) y su relación con los síntomas de enfermedades en un campo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Protección Vegetal* 31: 153-158. <https://n9.cl/uoxdl>
- Santalla M, Monteagudo AB, González AM and De Ron AM. 2004. Agronomical and quality traits of runner bean germplasm and implications for breeding. *Euphytica* 135: 205-215. <https://link.springer.com/article/10.1023/B:EUPH.0000014912.07993.e7>
- Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S and Karsch-Mizrachi I. 2020. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020: baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schwartz HF, Otto K, Terán H, Lema M and Singh SP. 2006. Inheritance of white mold resistance in *Phaseolus vulgaris* × *P. coccineus* crosses. *Plant Disease* 90(9):1167-1170. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1167>. PMID: 30781097.
- Schwember AR, Carrasco B and Gepts P. 2017. Unraveling agronomic and genetic aspects of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Field Crops Research* 206: 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.02.020>
- Takamatsu S. 2014. Molecular phylogeny reveals phenotypic evolution of powdery mildews (Erysiphales, Ascomycota). *Journal of General Plant Pathology* 79. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0447-5>
- Tovar-Pedraza JM, Rosas-Saito GH, García-Ruiz MT, Camacho-Tapia M y Leyva-Mir SG. 2018. Observaciones con MEB de cinco especies de Erysiphales en plantas ornamentales y frutales en México. *Scientia fungorum* 48:33-43. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.48.1197>
- Vargas VMLP, Muruaga MJS, Mayek PN, Pérez GA y Ramírez-Sánchez SE. 2014. Caracterización de frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(2): 191-200. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342014000200002](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000200002)
- Watanabe K and Tojo M. 2006. Stem and root rot of scarlet runner bean (*Phaseolus coccineus*) caused by *Pythium myriotylum*. *Journal Genetic Plant Pathology* 72: 126-128. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0258-4>
- White TJ, Bruns TD, Lee SB and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. California, USA. 460 p.
- Wyatt SD and Brown JK. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polimerasa chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1293.
- Zheng L, Wayper PJ, Gibbs AJ, Fourment M, Rodoni BC and Gibbs MJ. 2008. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. *PLoS ONE* 3(2): 1586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001586>