



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENCIA DE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS EN 11 COLECTAS DE SEMILLAS DE FRIJOL NATIVO DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



Presenta:

ALEJANDRA SÁNCHEZ ESTRADA

Bajo la dirección de:

DR. LUCIANO MARTÍNEZ BOLAÑOS



Chapingo, Estado de México, junio 2026

PRESENCIA DE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS EN 11 COLECTAS DE SEMILLAS DE FRIJOL NATIVO DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA

Tesis realizada por **ALEJANDRA SÁNCHEZ ESTRADA** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:


DR. LUCIANO MARTÍNEZ BOLAÑOS

CO-DIRECTOR:


DRA. NERI YOANA AGUILAR PANIAGUA

ASESOR:


M.C. LUIS EMILIO CASTILLO MÁRQUEZ

Chapingo, Estado de México, junio de 2026

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
DEDICATORIA	xiii
AGRADECIMIENTOS.....	xiv
DATOS BIOGRÁFICOS	xv
RESUMEN GENERAL	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Justificación	3
1.2. Objetivo general.....	4
1.2.1. Objetivos específicos.....	4
1.3. Hipótesis	5
1.4. LITERATURA CITADA	6
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Descripción general del cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8
2.2. Clasificación taxonómica del frijol	9
2.3. Descripción botánica, condiciones edáficas y climáticas	9
2.4. Diversidad genética	10
2.5. Importancia mundial del cultivo.....	11
2.6. Importancia nacional del cultivo.....	11
2.7. Principales enfermedades bacterianas y fúngicas en el cultivo de frijol transmitidas por semillas	12

2.7.1. Principales enfermedades fúngicas en el cultivo de frijol transmitidas por semillas	13
2.7.2. Principales enfermedades bacterianas en el cultivo de frijol transmitidas por semilla.....	28
2.8. LITERATURA CITADA	40
CAPITULO III. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS A PARTIR DE SEMILLAS NATIVAS DE FRIJOL DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA.....	53
RESUMEN.....	53
ABSTRACT	54
3.1. INTRODUCCIÓN.....	55
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	56
3.2.1. Obtención y selección de muestras.....	56
3.2.2. Aislamiento y Purificación	57
3.2.3. Identificación morfológica preliminar	59
3.2.4. Pruebas de patogenicidad.....	59
3.2.5. Identificación molecular	62
3.2.6. Caracterización morfológica	70
3.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN	71
3.3.1. Obtención y selección de muestras.....	71
3.3.2. Aislamiento y purificación	73
3.3.3. Identificación morfológica preliminar	77
3.3.4. Pruebas de patogenicidad.....	78
3.3.5. Identificación molecular y análisis filogenético	84

3.3.6. Caracterización morfológica	94
3.3.7. Mapas “Sierra Norte de Puebla”	117
3.3.8. DISCUSIÓN	122
3.4. CONCLUSIONES	123
3.5. LITERATURA CITADA	125
CAPITULO IV. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS A PARTIR DE SEMILLAS NATIVAS DE FRIJOL DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA	132
Resumen	132
Abstract	133
4.1. INTRODUCCIÓN.....	134
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	135
4.2.1. Obtención y selección de muestras.....	135
4.2.2. Aislamiento y Purificación.....	136
4.2.3. Reacción de hipersensibilidad en tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) ..	136
4.2.4. Identificación morfológica y pruebas bioquímicas	137
4.2.5. Identificación molecular	138
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	141
4.3.1. Obtención y selección de muestras.....	141
4.3.2. Aislamiento y Purificación	141
4.3.3. Reacción de hipersensibilidad en tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) ..	142
4.3.4. Identificación morfológica y pruebas bioquímicas	142
4.3.5. Identificación molecular	143
4.3.6. Mapas “Sierra Norte de Puebla”	143

4.3.7. DISCUSIÓN	145
4.4. CONCLUSIONES	147
4.5. LITERATURA CITADA	148

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores utilizados, programa de amplificación para PCR y referencias empleadas.....	65
Cuadro 2. Secuencias de referencia incluidas en el análisis filogenético.	67
Cuadro 3. Variables de los modelos seleccionados para los análisis filogenéticos.	70
Cuadro 4. Colectas seleccionadas mediante muestreo aleatorio estratificado.	72
Cuadro 5. Registro de aislamiento y características de crecimiento micelial de hongos aislados a partir de semillas incubadas en medio PDA.....	74
Cuadro 6. Registro de aislamiento y características de crecimiento micelial de hongos aislados a partir de semillas sembradas en peat moss.	75
Cuadro 7. Cebadores utilizados y programa de amplificación para PCR.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento fúngico en ambas metodologías de semillas en peligro de extinción: (a – d) Z5M5-5; (e – h) Z5M22-14; (i – l) Z5M16-4; (m – o) Z6M31-3; (p – s) Z6M45-4.....	76
Figura 2. Crecimiento fúngico en semillas incubadas en PDA de semillas nativas: (t – u) Z2M20-6; (w – y) Z6M35-5; (z) Z3M23-1; (*) Z6M4-2.....	76
Figura 3. Aislamientos fúngicos seleccionados para el estudio.....	78

Figura 4. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Fusarium* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. y cortes transversales de los tallos. a-b) Testigo; c-d) Z5M5-5 P18; e-f) Z5M22-14 P10; g-h) Z6M45-4 P6; i-j) Z5M22-14 P3; k-l) Z5M16-4 P1; m-n) Z6M45-4 P11; ñ-o) Z5M16-4 P15; p-q) Z6M31-3 P8. 79

Figura 5. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Fusarium* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. y cortes transversales de los tallos. a-b) Testigo; c-d) Z6M45-4 P20; e-f) Z5M22-14 P7; g-h) Z5M16-4 P17. 80

Figura 6. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Fusarium* en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b) Z5M5-5 P18; c) Z5M22-14 P10; d) Z6M45-4 P6; e) Z5M22-14 P3; f) Z5M16-4 P1; g) Z6M45-4 P11; h) Z5M16-4 P15; i) Z6M31-3 P8; j) Z6M45-4 P20; k) Z5M22-14 P7; l) Z5M16-4 P17. 80

Figura 7. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Rhizoctonia* y *Macrophomina* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. y cortes transversales de los tallos. a-b) Testigo; c-d) *Rhizoctonia solani* Z6M35-5; e-f) *Macrophomina phaseolina* Z2M20-6..... 82

Figura 8. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Rhizoctonia* y *Macrophomina* en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b) *Rhizoctonia solani* Z6M35-5; c) *Macrophomina phaseolina* Z2M20-6. 82

Figura 9. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Alternaria* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b – c) Z5M22-14; d – e) Z6M31-3; f – g) Z6M35-5; h – i) Z6M45-4..... 83

Figura 10. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Alternaria* en folíolos de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b) Z5M22-14; c) Z6M31-3; d) Z6M35-5; e) Z6M45-4..... 84

Figura 11. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género <i>Alternaria</i> en semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. a) Testigo; b) Z5M22-14; c) Z6M31-3; d) Z6M35-5; e) Z6M45-4.....	84
Figura 12. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región ITS de 17 aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i> y outgroups. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.05 sustituciones por sitio. Enraizado con <i>Botryosphaeria</i> spp. y <i>Guignardia</i> spp. .	86
Figura 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región TEF-1 α de 28 aislamientos del género <i>Fusarium</i> y outgroups. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.20 sustituciones por sitio. Enraizado con <i>Neonectria ditissima</i> , <i>Stylonectria norvegica</i> , <i>Nectria cyanostoma</i> , <i>Nectriaceae</i> y <i>Fusarium zealandicum</i>	88
Figura 14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región RPB2 de 17 aislamientos del género <i>Rhizoctonia</i> y un outgroup. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.50 sustituciones por sitio. Enraizado con <i>Botryobasidium simile</i>	91
Figura 15. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región RPB2 de 12 aislamientos del género <i>Alternaria</i> y tres outgroups. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.02 sustituciones por sitio. Enraizado con <i>Stemphylium herbarum</i> , <i>Pleospora herbarum</i> y <i>Alternaria alternantherae</i>	93
Figura 16. Caracterización morfológica de <i>Fusarium clavum</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c) conidios; d) conidióforo y fiálides; e – f) macro y microconidios. Barra (c) = 10 μ m.....	94

Figura 17. Caracterización morfológica de <i>Fusarium</i> sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) macroconidios y clamidosporas. Barra (c) = 10 µm.	95
Figura 18. Caracterización morfológica de <i>Fusarium</i> sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos, fiálides, macroconidios y clamidosporas. Barra (c) = 10 µm.	96
Figura 19. Caracterización morfológica de <i>Fusarium verticillioides</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) Conidióforo, fiálide, macro y microconidios. Barra (c) = 10 µm.	98
Figura 20. Caracterización morfológica de <i>Fusarium verticillioides</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 µm.	100
Figura 21. Caracterización morfológica de <i>Fusarium temperatum</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 µm.	101
Figura 22. Caracterización morfológica de <i>Fusarium temperatum</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Macroconidios. Barra (c) = 10 µm.	103
Figura 23. Caracterización morfológica de <i>Fusarium</i> sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) Conidióforos, fiálides, conidios y clamidosporas. Barra (c) = 10 µm.	104

Figura 24. Caracterización morfológica de <i>Fusarium terricola</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) Conidióforos, fiálides y conidios. Barra (c) = 10 µm.....	105
Figura 25. Caracterización morfológica de <i>Fusarium</i> sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 µm.	106
Figura 26. Caracterización morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 µm.....	108
Figura 27. Caracterización morfológica de <i>Macrophomina phaseolina</i> . a – b) Morfología colonial en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) microesclerocios. Barra (c) = 10 µm.	109
Figura 28. Caracterización morfológica de <i>Rhizoctonia solani</i> . a – b) Morfología colonial en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – e) Hifas septadas con ramificación en ángulo de 90°; f) Células monilioides.....	111
Figura 29. Caracterización morfológica de <i>Alternaria</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos, cadenas de conidios, y conidios (en medio V8). Barra (c) = 20 µm.....	112
Figura 30. Caracterización morfológica de <i>Alternaria</i> . a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a	

25°C); c – f) conidióforos, cadenas de conidios, y conidios (en medio V8). Barra (c) = 20 µm..... 113

Figura 31. Caracterización morfológica de *Alternaria*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos, cadena de conidios, y conidios. Barra (c) = 20 µm. 115

Figura 32. Caracterización morfológica de *Alternaria*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos y cadena de conidios (en medio V8). Barra (c) = 20 µm. 116

Figura 33. Mapas de la Sierra Norte de Puebla que muestran la distribución altitudinal de los municipios, con la localización de hongos fitopatógenos en semillas de frijol. (A) semillas clasificadas como en peligro de extinción. (B) nativos. Los círculos indican la presencia de los distintos géneros de hongos. 121

Figura 34. Relación entre variedades de frijol y especies fúngicas aisladas. El signo (*) indica la presencia de la especie fúngica en la variedad analizada.. 122

Figura 35. Cepas bacterianas en medio BK aisladas mediante la metodología de inóculo suspensión a partir de semillas. (a) Z5M5-5; (b) Z5M22-14; (c) Z5M16-4; (d) Z6M31-3; (e) Z6M45-4; (f) Z6M35-5; (g) Z4M10-13; (h) Z1M9-6; (i) Z3M23-1; (j) Z6M4-2; (k) Z2M20-6..... 141

Figura 36. Reacción positiva de hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum* 48 h después de la inoculación de las bacterias. (a) Z2M20-6; (b) Z4M10-13. 142

Figura 37. Cepas bacterianas puras correspondientes al género *Pseudomonas* spp. (a) Z2M20-6; (b) Z4M10-13..... 143

Figura 38. Mapas de la Sierra Norte de Puebla que muestran la distribución altitudinal de los municipios, con la localización de bacterias fitopatógenas en semillas de frijol. (A) semillas clasificadas como en peligro de extinción. (B) nativos. El círculo rosa indica la presencia de *Pseudomonas*..... 144

DEDICATORIA

A DIOS, por iluminar mi camino y darme fortaleza en cada etapa de mi vida; por sostenerme en los momentos de angustia, duda y tristeza y darme aliento para seguir adelante. Por su gran amor incondicional, por nunca soltar mi mano y haber colocado en mi camino a personas maravillosas que me guiaron y enseñaron durante la realización de este trabajo.

A mi mamá, Martha Sánchez Estrada por ser el motor de mi vida, mi inspiración y mi mayor fortaleza. Por acompañarme en cada paso, por su amor y apoyo incondicional, por levantarme en cada tropiezo, y por enseñarme con su ejemplo el valor de la perseverancia y la entrega. Por cada sacrificio, cada consejo y cada enseñanza que han guiado mi camino. Tenerte como madre es una de las mayores bendiciones de mi vida.

A mi familia, por ser parte fundamental de mi vida, por creer siempre en mí, y acompañarme en cada etapa de este camino.

Al **Dr. Dimas Mejía Sánchez**, por creer incondicionalmente en mí, y acompañarme a lo largo de este camino. Por su apoyo, sus consejos, las enseñanzas compartidas, la confianza y amistad brindados durante este proceso. Este trabajo también le pertenece.

A **Luis Martín Rivera Sosa**, por creer en mí, por sus palabras, su tiempo, su dedicación, sus consejos, sus ánimos e incluso por los regaños que me ayudaron a crecer y seguir adelante. Por ser parte fundamental de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)**, por brindarme el financiamiento para realizar mis estudios de Maestría, así como por el apoyo otorgado a esta investigación mediante el proyecto “Caracterización de la riqueza biocultural del frijol criollo de la Sierra Norte de Puebla para la agro diversidad sustentable”.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, por continuar siendo mi segundo hogar, especialmente al **Programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal**, por la preparación académica y profesional brindada.

A mi comité asesor: **Dr. Luciano Martínez Bolaños, Dra. Neri Yoana Aguilar Paniagua, y M.C. Luis Emilio Castillo Marquez**, por su orientación, apoyo y valiosas observaciones en la revisión de esta tesis.

Al **Ing. Agrónomo, TEF en Bacteriología, Luis Martín Rivera Sosa**, por su valiosa orientación, acompañamiento y asesoría técnica durante esta investigación, así como por compartir sus conocimientos en el área de la fitopatología, biología molecular y análisis filogenético.

Al **Dr. Dimas Mejía Sánchez**, por brindarme la confianza para permanecer en el Laboratorio de Bacteriología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola, así como por su orientación profesional al inicio de este proyecto.

Al **Dr. Camilo Hernández Juárez**, por su apoyo, consejos y enseñanzas, así como por la colaboración brindada en el área de bacteriología y micología durante la investigación.

A la **M.C. Victoria Ayala Escobar**, por su apoyo y orientación en el área de micología.

A mi amigo **Sebastián Ortiz Saavedra**, por su apoyo, consejos, y amistad.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Alejandra Sánchez Estrada

Fecha de nacimiento: 10 de noviembre de 2001

Lugar de nacimiento: Texcoco, Estado de México, México

CURP: SAEA011110MMCNSLA2

Profesión: Ingeniera agrónoma especialista en Parasitología Agrícola

Cédula profesional: 13968586

FORMACIÓN ACADÉMICA PROFESIONAL

Inició sus estudios profesionales en 2019 en la Universidad Autónoma Chapingo, en el Departamento de Parasitología Agrícola, concluyéndolos en 2024. Realizó su servicio social en el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Interacción Planta-Patógeno-Vector y Control Biológico del Colegio de Postgraduados, así como una estancia preprofesional en la OISA de Mazatlán, Sinaloa. Obtuvo el título de Ingeniera Agrónoma Especialista en Parasitología Agrícola con la tesis “Etiología de la mancha foliar del chayote (*Sechium edule* Jacq Sw.) en Texcoco, México” e ingresó en 2024 a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal para continuar su formación académica y profesional.

RESUMEN GENERAL

PRESENCIA DE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS EN 11 COLECTAS DE SEMILLAS DE FRIJOL NATIVO DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más importantes para la alimentación básica y la seguridad alimentaria mexicana. México está considerado como centro de origen y como el lugar donde hay más variedades del género *Phaseolus*. La Sierra Norte de Puebla alberga una gran diversidad de variedades nativas que los productores locales han mantenido por generaciones, sin embargo, en los últimos treinta años casi toda la investigación se ha enfocado en los frijoles comerciales, haciendo a un lado a los criollos y exponiéndolos a la pérdida de diversidad genética y a que estén más susceptibles a fitopatógenos. Tanto las bacterias como los hongos que causan enfermedades pueden disminuir el rendimiento, afectar la calidad del grano e incluso hacer que la semilla no logre germinar. Por lo anterior, el objetivo general se centró en identificar hongos y bacterias en colecciones de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla, mediante la caracterización patogénica, morfológica y genética para determinar la presencia de fitopatógenos. Se estudiaron 11 colectas de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla clasificadas dentro de los grupos “en peligro de extinción” y “nativas”, las cuales fueron seleccionadas mediante un muestreo aleatorio estratificado. Se aislaron hongos y bacterias, se purificaron, se probó su patogenicidad y se identificaron las cepas mediante morfología y análisis molecular. Este análisis identificó la presencia de cuatro géneros de hongos fitopatógenos; *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, y *Macrophomina*, y un género de bacterias fitopatógenas correspondiente a *Pseudomonas*. Los resultados indican que existe una gran variedad de patógenos que se transmiten por semillas nativas, por lo que se sugiere la implementación de estrategias de manejo para reducir los riesgos en la producción y favorecer la conservación de variedades nativas y su biodiversidad.

Palabras clave: *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Pseudomonas*, molecular.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias, Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Alejandra Sánchez Estrada

Director de tesis: Luciano Martínez Bolaños

ABSTRACT

PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI PRESENCE IN 11 SEED COLLECTIONS OF NATIVE BEAN FROM SIERRA NORTE DE PUEBLA

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most important crops for basic nutrition and food security in Mexico. Mexico is considered center of origin and the place with the greatest diversity of varieties within the *Phaseolus* genus. The Sierra Norte de Puebla harbors a wide array of native varieties that local farmers have maintained for generations; however, over the past thirty years, most research has focused on commercial beans, sidelining the native varieties and exposing them to a loss of genetic diversity and increased susceptibility to phytopathogens. Both bacteria and fungi cause diseases that can reduce yields, affect quality, and even prevent seed germination. Therefore, the general objective of this study was to identify fungi and bacteria in native bean seed collections from the Sierra Norte de Puebla through pathogenic, morphological, and genetic characterization, to determine presence of phytopathogens. Eleven collections of native bean seeds from the Sierra Norte de Puebla, classified within the “endangered” and “native” groups, were studied and selected through stratified random sampling. Fungi and bacteria were isolated, purified, tested for pathogenicity and strains were identified based on morphology and molecular analysis. This analysis identified the presence of four genera of phytopathogenic fungi: *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, and *Macrophomina*, and one phytopathogenic bacteria genus corresponding to *Pseudomonas*. These results indicate a wide diversity of pathogens transmitted through native seeds; therefore, the implementation of management strategies is recommended to reduce production risks and promote the conservation of native varieties and their biodiversity.

Keywords: *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Pseudomonas*, molecular.

²Master’s Thesis in Plant Protection Sciences, Autonomus University of Chapingo

Author: Alejandra Sanchez Estrada

Thesis director: Luciano Martinez Bolaños

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de importancia global debido a su alto valor nutricional y a su contribución a la seguridad alimentaria (Sarkar *et al.*, 2026). Presenta una amplia diversidad genética; y se considera la región de Mesoamérica y los Andes como centros de domesticación (Uebersax *et al.*, 2022).

Existen hallazgos arqueológicos que demuestran que su domesticación empezó en el Valle de Tehuacán, Puebla, hace más o menos 7000 años (Kaplan, 1965). En México, el cultivo de frijol es fuente de desarrollo de muchos productores, sin embargo, su mayor importancia radica en que es un alimento rico en proteínas para las personas (Cid-Ríos *et al.*, 2025). En México los principales estados productores de frijol son: Chiapas, Puebla y Zacatecas, entre los tres conforman el 64% de la superficie nacional (SIAP, 2024). En Puebla, además de ser parte fundamental de la dieta en las comunidades rurales (Mendoza-Robles & Hernández-Romero, 2020), destaca porque aún guarda una gran diversidad de variedades nativas.

Las semillas de las plantas no solo sirven para generar la siguiente generación, sino que también cargan con microorganismos de una planta a otra. Eso las convierte en una fuente primaria de inóculo para muchas enfermedades en los cultivos (Barret *et al.*, 2016). Cuando hongos y bacterias patógenas viajan en la semilla, pueden hacer mucho daño provocando la decoloración de la testa o reducción significativa en la tasa de germinación (Barret *et al.*, 2016). Las principales formas de contaminación por semillas son: contacto directo de la semilla con partes enfermas de la planta o con restos vegetales contaminados, a través del sistema vascular (del funículo hasta el hilio), y por la vía floral entrando por el estigma y llegando al micropilo (Chen *et al.*, 2021).

Los hongos más frecuentes transmitidos por semilla en el frijol incluyen contaminantes externos como *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., y *Cladosporium* spp., patógenos más severos como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. y el complejo *Diaporthe* / *Phomopsis* (Dell'Olmo *et al.*, 2023). Con el cambio climático y el calentamiento global, se están viendo brotes de nuevas enfermedades fúngicas que antes no se veían (Dell'Olmo *et al.*, 2023). Y la variabilidad en la aparición de las enfermedades depende mucho de factores ambientales como el clima, la altitud, la temperatura, la precipitación y la humedad del lugar (Degu *et al.*, 2023).

En el caso de las principales bacterias fitopatógenas transmitidas por semillas en frijol son *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (tizón del halo), *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (tizón bacteriano común), y *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (marchitez bacteriana). Aunque los porcentajes de transmisión pueden ser bajos, cuando se presentan estas bacterias causan pérdidas económicas muy graves en todo el mundo, a veces hasta del 100% (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

En México, la información reciente sobre hongos fitopatógenos en semillas de frijol todavía está muy limitada, y en variedades nativas es inexistente. Por ejemplo, en Aguascalientes un estudio encontró que *Fusarium* era el hongo más importante (Groenewold-Labrada *et al.*, 2003), mientras que, en bacterias fitopatógenas en semillas de frijol en México, prácticamente no hay publicaciones específicas. Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue identificar hongos y bacterianas en colecciones de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla, mediante la caracterización patogénica, morfológica y genética para determinar la presencia de fitopatógenos. Las hipótesis (1) las colectas de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla no presentan hongos y bacterias fitopatógenas, versus las colectas presentan hongos y bacterias fitopatógenas (2) la altitud no tiene impacto sobre la diversidad de bacterias y hongos fitopatógenos, versus la altitud si tiene impacto.

1.1. Justificación

Los genotipos nativos de frijol en México representan un componente esencial de la riqueza genética del país (Muñoz-Velázquez *et al.*, 2009). Están adaptados a las condiciones locales, tienen mucha variación en forma, rendimiento y calidad nutricional, y las personas en las comunidades rurales los siembra sobre todo para autoconsumo y mercados locales. No solo se aprovecha el grano seco, sino también se comen los ejotes, las hojas tiernas, se usan como forraje, rastrojo, abono verde y germinados. Todo esto fortalece la seguridad alimentaria y mantiene vivos los sistemas agrícolas tradicionales.

Sin embargo, los microorganismos fitopatógenos que son transmitidos por semillas son una amenaza real para estas variedades. Estos patógenos pueden impedir su germinación, matar plántulas, dañar sus raíces y sistema vascular e interrumpir el transporte de agua y nutrientes (Bevilacqua *et al.*, 2021). En condiciones favorables las pérdidas pueden llegar al 100%. Además, desde un punto de vista epidemiológico, la transmisión de microorganismos fitopatógenos por semilla representa una forma importante de dispersión de patógenos y propagar enfermedades (Barret *et al.*, 2016). Factores como el cambio climático, variaciones de altitud, temperatura, precipitación y humedad regulan la presencia y adaptabilidad de estos organismos, especialmente en zonas montañosas como la Sierra Norte de Puebla.

A pesar de lo valioso que es el frijol nativo, en México seguimos con muy poca información actualizada sobre hongos y bacterias en sus semillas, y casi nada específico para variedades criollas de regiones como la Sierra Norte de Puebla. Esta falta de datos complica todo: desde diseñar estrategias de manejo integrado hasta conservar el germoplasma o usarlo en programas de mejoramiento genético.

Por eso mismo, este estudio se centra en identificar hongos y bacterias fitopatógenos en semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla. Los resultados pueden ayudar a sentar bases científicas para informar a los

productores locales sobre riesgos potenciales, promover prácticas fitosanitarias más adecuadas y contribuir a la conservación de estas variedades tan importantes para nuestra biodiversidad agrícola y para futuros trabajos de mejoramiento.

1.2. Objetivo general

Identificar hongos y bacterias en colecciones de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla, mediante la caracterización patogénica, morfológica y genética para determinar la presencia de fitopatógenos.

1.2.1. Objetivos específicos

- 1) Aislar hongos y bacterias fitopatógenas a partir de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla utilizando medios semi selectivos y generales con la técnica de siembra y purificación para su posterior caracterización.
- 2) Inocular los aislamientos puros de hongos y bacterias aisladas del frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla en plantas indicadoras y hospedantes homólogos bajo condiciones de invernadero para determinar la patogenicidad.
- 3) Caracterizar morfométrica, bioquímica y fisiológicamente las bacterias y hongos que resulten fitopatógenos aislados en las 11 colectas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla para identificarlos.
- 4) Caracterizar genéticamente a los hongos y bacterias fitopatógenos mediante la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa y secuenciación para identificarlos.

1.3. Hipótesis

Las colectas de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla no presentan hongos y bacterias fitopatógenas.

Las colectas de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla presentan hongos y bacterias fitopatógenas.

1.4. LITERATURA CITADA

- Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A., & Jacques, M.-A. (2016). Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), 791-795. <https://doi.org/10.1111/mpp.12382>
- Bevilacqua, V., Vitti, A., Logozzo, G., Marzario, S., Gioia, T., & Nuzzaci, M. (2021). Influence of cultivation areas on the seed-borne pathogens on two local common bean ecotypes of "Fagioli di Sarconi" PGI (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biology and Life Sciences Forum*, 4(1), 57. <https://doi.org/10.3390/IECPS2020-08593>
- Chen, N.W.G., Ruh, M., Darrasse, A., Foucher, J., Briand, M., Costa, J., Studholme, D.J., & Jacques, M.-A. (2021). Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology*, 22(12), 1464-1480. <https://doi.org/10.1111/mpp.13067>
- Cid-Ríos, J.Á., Acosta-Gallegos, J.A., Echavarría-Cháirez, F.G., Bañuelos-Valenzuela, R., & Prado-García, A. A. (2025). Identification of bean lines (*Phaseolus vulgaris*) with low genotype-environment interactions under rainfed in two semiarid sites of north-central Mexico. *Agronomy*, 15(5), 1160. <https://doi.org/10.3390/agronomy15051160>
- Degu, T., Alemu, T., Desalegn, A., Amsalu, B., & Assefa, A. (2023). Association of cropping practices, cropping areas, and foliar diseases of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100765. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100765>
- Dell'Olmo, E., Zaccardelli, M., Basile, B., Corrado, G., & Sigillo, L. (2023). Identification and characterization of new seedborne pathogens in *Phaseolus vulgaris* landraces of Southern Italy. *Pathogens*, 12(1), 108. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010108>
- Groenewold-Labrada, B., Mayek-Pérez, N., & Padilla-Ramírez, J.S. (2003). Hongos asociados a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 375-378. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221320.pdf>
- Kaplan, L. (1965). Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). *Economic Botany*, 19, 358-368. <https://doi.org/10.1007/BF02904806>
- Mendoza-Robles, R., & Hernández-Romero, E. (2020). El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) and the runner bean (*Phaseolus coccineus* L.): Opciones productivas para los pequeños agricultores de la microrregión Los Volcanes en Puebla, México. *Agroproductividad*, 13(5), 3 – 10. <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1427>
- Muñoz-Velázquez, E.E., Rubio-Hernández, D., Bernal-Lugo, I., Garza-García, R., & Jacinto-Hernández, C. (2009). Caracterización de genotipos nativos de frijol del estado de Hidalgo, con base a calidad del grano. *Agricultura*

Técnica en México, 35(4), 429-438.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172009000400008

- Navarrete-Maya, R., Aranda-Ocampo, S., Rodríguez-Mejía, M- de L., Moya-Hernández, S. L., & González-Ochoa, M.G. (2014). Bacterias fitopatógenas en semillas: Su detección y regulación. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 75-88. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200075
- Sarkar, S., Meza, C., Carrasco, B., Delgado, M., Okoth, P., & Banerjee, A. (2026). Common bean in a changing world: Biogeography, nutrition, and microbiome innovations for future food security. *Trends in Food Science & Technology*, 168, 105496. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.105496>
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2024). Escenario mensual de productos agroalimentarios: Frijol (Dirección de Análisis Estratégicos). Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/938463/Frijo_Julio.pdf (consultado el 29 de septiembre de 2025).
- Uebersax, M.A., Cichy, K.A., Gomez, F.E., Porch, T.G., Heitholt, J., Osorno, J.M., Kamfwa, K., Snapp, S.S., & Bales, S. (2022). Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security – A review. *Legume Science*. <https://doi.org/10.1002/leg3.155>

CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción general del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa, perteneciente a la familia Fabaceae. De acuerdo con los datos reportados por Hernández-López *et al.* (2013), y con base en información procedente de restos fósiles, así como en características morfológicas, agronómicas y genéticas, se ha establecido que el origen de *Phaseolus vulgaris* se sitúa en Mesoamérica y que su domesticación ocurrió entre los años 5000 y 2000 a.C. Este proceso tuvo lugar en dos regiones principales del continente americano: Mesoamérica (México y Centroamérica) y la región andina (Sudamérica). Kaplan (1965) señaló que el frijol fue domesticado en el Valle de Tehuacán, Puebla, México, hace aproximadamente 7000 años, probablemente en asociación con el cultivo de maíz (Hernández-López *et al.*, 2013).

Actualmente, si bien existe una amplia diversidad de semillas mejoradas de frijol (SNICS, 2022), resulta importante conservar, mantener y caracterizar las variedades nativas que aún se cultivan en las regiones agrícolas de México. Esta conservación puede contribuir a la identificación de genotipos con rasgos deseables, útiles para su incorporación en programas de mejoramiento genético y estrategias de conservación (Ayala *et al.*, 2021).

Asimismo, los recientes cambios socioeconómicos, principalmente en las comunidades rurales donde actualmente se cultivan variedades nativas de frijol, hacen que la caracterización morfoagronómica y edafoclimática de estos materiales represente una estrategia para asegurar el autoconsumo de familias de bajos ingresos (García-Narváez *et al.*, 2020).

Finalmente, el continuo proceso de domesticación y adaptación del frijol a diversos ambientes ha propiciado el desarrollo de procesos coevolutivos con distintos organismos patógenos. En particular, se han reportado al menos 36 especies de hongos fitopatógenos, nueve oomycetos, 26 virus, 22 nematodos y seis bacterias, estos organismos pueden ser endémicos, y pueden presentarse

en infecciones mezcladas, afectando notoriamente la producción y la estabilidad de las diferentes variedades de frijol (Gonzales-Cruces *et al.*, 2022).

2.2. Clasificación taxonómica del frijol

Dominio: Eukaryota

Reino: Viridiplantae

Phylum: Streptophyta

Subfilo: Streptophytina

Superdivisión: Embryophyta

División: Tracheophyta

Subdivision: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Papilionoideae

Tribu: Phaseoleae

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* L., 1753

(NCBI, 2025).

2.3. Descripción botánica, condiciones edáficas y climáticas

La planta de frijol silvestre es de hábito indeterminado trepador y predominan las flores de color morado, sus vainas son pequeñas, delgadas, dehiscentes y con semillas pequeñas, las cuales muestran una gran diversidad de colores uniformes o jaspeados, se pueden encontrar desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina con rango altitudinal de 500 a 2000 m, y precipitaciones anuales de 500 a 1800 mm, por otro lado la planta de frijol domesticado es anual, herbácea con hábito arbustivo, o bien trepador para las siembras asociadas con maíz, se cultiva desde Argentina hasta Canadá desde el nivel del mar hasta los 3200 m de altura, y es susceptible a heladas (Lépiz- Ildefonso *et al.*, 2010). La temperatura óptima para el desarrollo del cultivo de frijol se encuentra entre 10 a

27°C, lo ideal es sembrar en suelos de textura ligera y bien drenados. En cuanto al pH oscila entre 6.5 y 7.5 considerado como el óptimo. (SADER, 2017).

2.4. Diversidad genética

El género *Phaseolus* comprende aproximadamente 150 especies a nivel mundial, de las cuales 70 se distribuyen en México, considerado centro de diversidad del frijol. De estas, cinco especies han sido domesticadas y pueden encontrarse en forma silvestre y cultivada: frijol común (*P. vulgaris* L.), frijol corredor (*P. coccineus* L.), frijol de año (*P. polyanthus* G.), frijol de Lima (*P. lunatus* L.) y frijol tépari (*P. acutifolius* A.) (Gepts, 1998; SNICS, 2016).

Como resultado de los procesos de domesticación, selección y adaptación, se ha generado una amplia diversidad intraespecífica. A nivel mundial se han reportado más de 40,000 variedades de frijol (Jones, 1999). En este contexto, el estado de Puebla destaca como una de las entidades con mayor diversidad de frijol en México (Cárdenas, 1989).

Diversos autores han señalado que las poblaciones nativas de frijol han coevolucionado dentro de sistemas tradicionales mediante selección empírica, lo que ha favorecido una mayor diversidad genética en características como tamaño, forma, color de la semilla, forma de la vaina, estructura de la planta, ciclo de madurez y la adaptación (García-Urióstegui *et al.*, 2025; Mex-Álvarez *et al.*, 2021).

México alberga un amplio acervo de germoplasma nativo de frijol. La producción y el consumo provienen tanto de genotipos nativos o criollos como de variedades mejoradas, debido a las ventajas agronómicas y de calidad que ambos presentan. En el caso de los genotipos nativos (cultivos principalmente para autoconsumo), es frecuente que, además de la producción de grano seco, se aproveche el cultivo para obtener ejote (Muñoz-Velázquez *et al.*, 2009).

2.5. Importancia mundial del cultivo

El frijol es un alimento básico y estratégico en muchas regiones del mundo, debido a su composición (ICAMEX, 2025). Se considera un elemento importante en la dieta de la población en amplias regiones de Centroamérica, Sudamérica y África, debido a que constituye una fuente rica en proteínas y otros nutrientes esenciales en algunos estratos de población que consumen una limitada cantidad de proteína animal (FIRA, 2022). Además de proporcionar carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales (Matúl-Ramos *et al.*, 2024).

Esta leguminosa también contribuye a mejoras sostenibles del medio ambiente cuando se cultiva en rotación o intercalada, debido a su capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FAO, 2026). Particularmente, el frijol favorece la fertilidad del suelo mediante la fijación de nitrógeno facilitada por especies de *Rhizobium* y su capacidad de movilizar el fósforo, nutrientes y micronutrientes esenciales. Asimismo, mejora la estructura física del suelo gracias a su sistema radicular profundo (Chhetri *et al.*, 2025).

Según datos reportados por FAOSTAT (2025) a nivel mundial, la producción de frijol en el año 2024 fue de 30.28 millones de toneladas. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural y DGSIAP (2025) reportaron que el cultivo del frijol se produce en 109 países; India produce 21.8% de la leguminosa y su cosecha es 6.3 veces mayor a la de Brasil, el cual ocupa la segunda posición. Cabe destacar que México ocupa el 11° productor global, con el 2.4% del total.

2.6. Importancia nacional del cultivo

El cultivo de frijol se considera básico para la población mexicana. Se siembra en casi todas las regiones del país y es clave por sus funciones alimentarias y socioeconómicas, ocupando el segundo lugar en superficie después del maíz (Ayala *et al.*, 2021).

En el año 2024, la producción nacional de frijol en México fue de 996,393 toneladas (FAOSTAT, 2025). Zacatecas destacó como el principal estado productor con 342, 452 toneladas (33.0%), seguido de Sinaloa con 172,239 toneladas (20.5%), Nayarit con 70,051 toneladas, Chiapas con 69,712 toneladas,

Durango con 58,575 toneladas, Guanajuato con 40,347 toneladas, San Luis Potosí con 38,467 toneladas y Puebla con 37,907 toneladas (SADER & DGSIA, 2025).

Las variedades de frijol negro, pinto y azufrado son las de mayor producción en México. En Zacatecas predomina el frijol negro (51.3%) y el pinto (25.9%), en Durango, el pinto (72.7%) y en Sinaloa, el azufrado (82.1%) (FIRA, 2022).

El frijol común es cultivado por aproximadamente 570,000 productores, generando 382,000 empleos permanentes, y un valor de producción de 17 mil millones de pesos mexicanos (SIAP, 2024).

México importa principalmente frijol negro y pinto de Estados Unidos (89.4% del volumen total), seguido de Canadá (8.5%) y Argentina (2.1%). No obstante, según el USDA, México es considerado el principal exportador de frijol a nivel mundial (FIRA, 2022).

2.7. Principales enfermedades bacterianas y fúngicas en el cultivo de frijol transmitidas por semillas

El cultivo de frijol está sometido a diversos factores de estrés biótico y abiótico que limitan significativamente su rendimiento. Entre los factores bióticos, las enfermedades fúngicas son las más comunes y destructivas, seguidas por las de origen bacteriano y viral (Wani *et al.*, 2023). Se estima que aproximadamente el 90% de las plantas cultivadas a nivel mundial se propagan por semillas (Navarrete-Maya *et al.*, 2014), las cuales representan un medio altamente eficiente para albergar y diseminar patógenos causantes de enfermedades destructivas (Kumar & Gupta, 2020). Los patógenos transmitidos por semillas son una grave amenaza tanto para la agricultura como para las colecciones de germoplasma, ya que pueden afectar a las semillas de forma directa o indirecta (Dell'Olmo *et al.*, 2023a).

Es fundamental contextualizar las principales enfermedades bacterianas y fúngicas que afectan al frijol, ya que representan una de las principales limitantes para su producción. Los hongos y las bacterias pueden colonizar las semillas, induciendo síntomas visibles y provocando la pérdida del valor comercial del

grano. Además, pueden permanecer latentes, inhibir la germinación y transmitirse a la plántula, causando su muerte o dañando raíces y el sistema vascular, lo que reduce el rendimiento y genera grandes pérdidas económicas (Dell'Olmo *et al.*, 2023a). Las semillas son uno de los principales agentes de diseminación de nuevos patógenos en áreas previamente no afectadas, lo que representa un riesgo para otros cultivos (Dell'Olmo *et al.*, 2023a).

2.7.1. Principales enfermedades fúngicas en el cultivo de frijol transmitidas por semillas

Las semillas pueden tener una gran diversidad de microorganismos, en especial hongos, que puede ocasionar muchos problemas sanitarios. Es por esto por lo que la calidad y la longevidad de las semillas pueden verse afectadas por hongos que pueden colonizar antes o después de la cosecha. Algunos de los hongos asociados a las semillas tienen la capacidad de producir micotoxinas, las cuales pueden generar efectos negativos en humanos, animales y en las propias semillas (Martín *et al.*, 2022). Además, estos hongos pueden reducir la capacidad germinativa de las semillas (Almarales Antúnez *et al.*, 2022).

Los hongos patógenos transmitidos por las semillas causan pérdidas significativas en el rendimiento y la calidad del frijol a nivel mundial; entre los principales patógenos se encuentran *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Naseri, 2008).

2.7.1.1. Antracnosis del frijol

Agente causal: *Colletotrichum lindemuthianum*

Clasificación taxonómica

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum lindemuthianum* (Briosi & Cavara, 1889)

(NCBI, 2025)

Importancia

A nivel mundial, la antracnosis causada por el patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* es una de las principales enfermedades que afecta a diversas variedades de frijol común, pudiendo ocasionar pérdidas de rendimiento de hasta el 100% (Morelos-Martínez *et al.*, 2024). El porcentaje de estas pérdidas depende de la susceptibilidad del hospedante y de la presencia de condiciones climáticas favorables para el desarrollo del patógeno (Romero *et al.*, 2024).

La patogenicidad de aislados de *C. lindemuthianum* ha sido reportada en diferentes partes del mundo; sin embargo, la mayor variación patogénica se ha observado en las regiones mesoamericana y andina, las cuales son consideradas los centros de origen del frijol (Pastor-Corrales *et al.*, 1995). Asimismo, se ha mencionado que los patotipos mesoamericanos de *C. lindemuthianum* presentan un rango de virulencia más amplio y afectan principalmente a cultivares mesoamericanos de semillas pequeñas, mientras que los patotipos andinos tienen un rango de virulencia más estrecho y atacan principalmente a cultivares de frijol común de semillas más grandes de origen andino (Ansari *et al.*, 2004).

Morfología colonial y celular

Las colonias que crecen en medio PDA presentan una coloración que varía de gris a gris oscuro, con color naranja en el centro y hacia el margen una tonalidad

de amarillo parduzco a gris pálido. El margen de las colonias es irregular y la masa conidial muestra una coloración naranja a salmón oscuro. En el reverso, las colonias son de color gris pálido en el centro, que va cambiando a naranja claro y gris pálido u oscuro hacia el margen (Gupta *et al.*, 2022).

El género *Colletotrichum* tiene acérvulos discoidales o en forma de cojín, de aspecto céreo y subepidérmico, típicamente con espinas o setas oscuras en el borde o asociadas a los conidióforos. Los conidióforos son simples y alargados, mientras que los conidios son hialinos, unicelulares, y de forma ovoides a alargada. Este género se diferencia de *Gloeosporium*, principalmente por la presencia de sus espinas (Barnett & Hunter, 1998, p.188).

Síntomas

Los síntomas de la antracnosis se caracterizan por la presencia de lesiones oscuras y hundidas, asociada con acérvulos de color salmón, así como por necrosis en pecíolos, vainas y hojas, además de estrangulamiento del hipocótilo y decoloración de las semillas (Romero *et al.*, 2024).

En las etapas iniciales de la enfermedad, los primeros síntomas se presentan como lesiones de color rojo ladrillo a marrón oscuro a lo largo de las nervaduras en la superficie abaxial de las hojas; después, las lesiones se desarrollan en los pecíolos y en la superficie adaxial de la hoja (Mohammed, 2013). Conforme la enfermedad avanza en el tallo, aparecen lesiones longitudinales de color marrón oscuro; en plántulas jóvenes estas pueden desprenderse del tallo justo por debajo de las hojas primarias, mientras que en las plantas más viejas las vainas van a desarrollar la enfermedad poco después de la infección del tallo (Sansala *et al.*, 2024). Las lesiones en las vainas se presentan inicialmente como lesiones de color marrón oscuro, las cuales tienden a fusionarse y formar lesiones hundidas, rodeadas por márgenes oscuros ligeramente elevados (Sansala *et al.*, 2024).

Ciclo de la enfermedad

El proceso de infección de *C. lindemuthianum* se divide en dos etapas principales. La primera es la fase biotrófica, durante la cual el hongo forma apresorios y penetra en el tejido de la planta en las primeras 24 horas. Posteriormente, entre las 48 y 72 horas después de la infección, se desarrolla la vesícula infectiva (Romero *et al.*, 2024).

La segunda etapa corresponde a la fase necrotrófica. En esta fase, las hifas primarias se convierten en hifas secundarias, que crecen tanto entre las células como dentro de ellas, generalmente entre las 72 y 96 horas posteriores a la penetración (O'Connell *et al.*, 1985).

Para que ocurra la infección, se requieren condiciones de alta humedad relativa (superior al 70%) y temperatura entre 15 y 22 °C. Bajo estas condiciones, los conidios germinan al entrar en contacto con las partes aéreas de la planta y penetrar gracias a la formación del apresorio. Una vez dentro, se desarrollan las hifas formando un micelio compacto, el cual se alimenta de las células del hospedante.

Conforme avanza la infección, se forman los acérvulos, estructuras que al madurar se rompen y liberan grandes cantidades de conidios que se dispersan a través de gotas de agua y el viento, por lo que facilitará la diseminación del patógeno hacia otras plantas. Los conidios pueden sobrevivir durante varios años en el suelo y en restos de cosecha, mientras que sus hifas pueden sobrevivir en estado latente dentro de la testa de la semilla; por ello, las semillas se consideran un mecanismo importante de propagación de la enfermedad en el espacio y el tiempo (Pérez-Vega *et al.*, 2010).

Control

La prevención y el manejo de la antracnosis causada por *C. lindemuthianum* se basa principalmente en estrategias integrales, tanto profilácticas como de manejo, como el uso de semillas limpias y no infectadas, la siembra de

variedades resistentes, la rotación de cultivos y la aplicación de fungicidas (Sansala *et al.*, 2024). No obstante, el enfoque más eficaz para la protección de los cultivos de frijol infectados por el patógeno *C. lindemuthianum* es el uso de cultivares resistentes (Nunes *et al.*, 2021).

En México, diversas variedades comerciales de frijol han demostrado resistencia en campo a *C. lindemuthianum*; entre ellas se encuentran las variedades Negro Zacatecas, Bayo Río Grande, Bayo Zacatecas, Bayo Los Llanos, Bayo Durango y Canario 72, reportadas para el estado de Zacatecas (León, 2009).

2.7.1.2. Pudrición radicular

Agente causal: *Fusarium* sp.

Clasificación taxonómica

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium* (Link, 1809)

(NCBI, 2025)

Importancia

Fusarium es un género con una alta riqueza de especies que constituye uno de los grupos más importantes de patógenos vegetales micotoxigénicos (Munkvold *et al.*, 2021). Las especies de *Fusarium* representan uno de los grupos más

importantes de patógenos transmitidos por semillas, además de tener la capacidad para persistir y diseminarse a través del suelo (Petrović *et al.*, 2024). Este género comprende un complejo de especies anamórficas que abarca desde saprofitos hasta colonizadores de plantas, y es el segundo grupo de cepas con capacidad para vivir dentro de las raíces de las plantas como endófitos o infectar y causar enfermedades en muchos cultivos importantes (Casado-Del Castillo *et al.*, 2023). Se han reportado grandes pérdidas significativas en el rendimiento del frijol común hasta del 84%, asociadas a la podredumbre radicular causada por *Fusarium* (Chen *et al.*, 2020). Entre las especies más relevantes de este género que ocasionan grandes pérdidas en el cultivo de frijol común destacan *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Porteous-Álvarez *et al.*, 2020).

Morfología colonial y celular

El género *Fusarium*, se caracteriza por presentar un micelio extenso y algodonoso en medios de cultivo, con frecuencia de tonalidades rosadas, púrpuras o amarillas. Sus conidióforos son variables, delgados y simples, o bien robustos, cortos y ramificados de manera irregular, además de presentar un verticilo de fiálides, ya sea de forma solitaria o agrupados en esporodoquios. Los conidios son hialinos, variables, y se producen principalmente de dos tipos, a menudo en pequeñas cabezas húmedas. Los macroconidios son pluricelulares, ligeramente curvados o doblados con extremos puntiagudos y en forma de canoa; mientras que los microconidios son unicelulares, de forma ovoide u oblonga, solitarios o en cadenas; algunos conidios intermedios, bi o tricelulares, de forma oblonga o ligeramente curvada. Asimismo, el género presenta clamidosporas de pared gruesa (Barnett & Hunter, 1998).

Síntomas

Los síntomas causados por *Fusarium* sp. se asocian principalmente con la pudrición radicular, la cual se observa mediante la aparición de lesiones longitudinales de color rojo – marrón en los hipocótilos, con fisuras o grietas

longitudinales; asimismo, los tejidos radicales muertos adquieren una coloración rojo – marrón. Las plantas infectadas presentan clorosis que inician en las hojas primarias, además de retraso en el crecimiento y en casos graves, la marchitez total o senescencia prematura (Erima *et al.*, 2025). El patógeno invade la planta penetrando a través de los tejidos de la raíz y posteriormente se propaga mediante el sistema vascular hacia las raíces y los tallos e incluso puede colonizar toda la planta, es por eso por lo que esta infección conduce a la obstrucción del floema, hasta el marchitamiento (Kamel *et al.*, 2025). Además, este hongo es capaz de provocar la pudrición de semillas, lo cual va a contribuir a su diseminación y persistencia (Ekwomadu & Mwanza, 2023).

Ciclo de la enfermedad

Fusarium es un hongo que se transmite principalmente por el suelo, que habita o invade los tejidos radicales de las plantas. Puede persistir en el suelo en estado latente mediante la formación de clamidosporas, las cuales se desarrollan en micelios maduros o senescentes y en tejidos vegetales infectados, especialmente bajo condiciones de estrés. El hongo puede sobrevivir durante más de seis de años en el suelo, en residuos de cultivos e incluso en suelos en barbecho, donde su longevidad puede incrementarse; además puede infectar malezas dicotiledóneas sin causar síntomas. La semilla infectada constituye una fuente importante de inóculo primario, y desempeña un papel clave para la propagación a larga distancia del patógeno y la introducción en nuevas regiones geográficas. La propagación a corta distancia ocurre a través del viento, agua, maquinaria agrícola y actividad humana. La infección inicia poco después de la siembra, cuando el hongo penetra en semillas germinantes y plántulas en suelos infestados; al invadir el sistema vascular, coloniza los tejidos del xilema de raíces y tallos, provocando una decoloración interna y finalmente, el marchitamiento de la planta. Durante el avance de la enfermedad el patógeno se disemina por los vasos mediante el desarrollo de hifas, la producción de microconidios transportados por la corriente de transpiración y micelios laterales. En etapas avanzadas de la infección se produce una abundante formación de

clamidosporas en los tejidos afectados, las cuales son liberadas al suelo después de la descomposición de los restos vegetales, permitiendo la continuidad del ciclo del patógeno a través de infecciones temporales en hospederos y no hospederos, así como por su desarrollo saprofítico del hongo estimulado por la secreción de exudados radiculares y desechos de materia orgánica del suelo (Lal *et al.*, 2024).

Control

El control de esta enfermedad resulta complejo debido a la alta durabilidad y viabilidad de las clamidosporas en el suelo y en los restos vegetales, lo que favorece la persistencia del patógeno por periodos prolongados (Zitnick-Anderson *et al.*, 2020). Entre las estrategias de manejo se incluyen: tratamiento químico de semillas, evitar campos infestados, rotación de cultivos y siembra de semillas certificadas. En este contexto, la resistencia genética se considera el enfoque más sostenible y duradero para el control de la enfermedad (Zitnick-Anderson *et al.*, 2020), ya que el uso de cultivares tolerantes o resistentes puede reducir significativamente la presión de la enfermedad y mejorar la productividad del cultivo (Kamel *et al.*, 2025).

Las prácticas culturales como la rotación de cultivos, constituye una alternativa eficaz para el control de la pudrición radicular; no obstante, el intervalo requerido de cuatro a cinco años se considera poco práctico para la mayoría de los agricultores (Huster *et al.*, 2021). Asimismo, el uso de tratamientos químicos y otras prácticas de manejo localizadas contribuyen principalmente a la prevención, pero no a la erradicación de la infestación, además de que su rentabilidad suele ser baja. En este contexto, también se ha recomendado el uso de agentes de biocontrol (Porteous-Álvarez *et al.*, 2020).

El desarrollo de cultivares resistentes representa una alternativa prometedora, ya que son fácilmente adoptados por los productores, además de que no causan riesgos ambientales (Paulino *et al.*, 2021). En plantas resistentes, los síntomas suelen ser poco expresivos y se ha observado material oclusivo en los vasos del

xilema, lo cual se asocia con un retraso en la colonización del hongo en el hospedero (Sasseron *et al.*, 2020).

2.7.1.3. Pudrición del pie

Agente causal: *Macrophomina phaseolina*

Clasificación taxonómica

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Botryosphaeriales

Familia: Botryosphaeriaceae

Género: *Macrophomina*

Especie: *Macrophomina phaseolina* (Goid., 1947)

(NCBI, 2025)

Importancia

Macrophomina phaseolina es un hongo generalista presente en todo el mundo (Márquez *et al.*, 2021). Se caracteriza por presentar una amplia gama de hospedantes, que incluye más de 700 especies vegetales (Dell’Olmo *et al.*, 2023b). Este patógeno se considera principalmente transmitido por el suelo, debido a su capacidad de persistir durante periodos prolongados en forma de microesclerocios; no obstante, también puede transmitirse por semilla y en algunos hospedantes, propagarse de plántula a plántula (Sigillo & Dell’Olmo, 2025). La podredumbre carbonosa ha provocado pérdidas de rendimiento de

hasta aproximadamente el 65% en áreas de cultivo de frijol común (Sodji *et al.*, 2025).

Morfología colonial y celular

M. phaseolina forma colonias de color negro en medio agar papa dextrosa (PDA) y presenta un crecimiento abundante en un rango de temperatura de 15 a 40°C; sin embargo, su crecimiento óptimo ocurre entre 30 y 35°C (Babu *et al.*, 2010). Este patógeno se caracteriza por la presencia de hifas inicialmente hialinas y de paredes delgadas, que posteriormente van a adquirir una coloración marrón claro a marrón oscuro o negro, con septos de 1.5 a 2.5 µm de ancho. Las ramas de las hifas principales se originan en ángulo recto sobre las hifas progenitoras, presentando una constricción en el punto de ramificación. Por otro lado, los microesclerocios, que en conjunto forman una masa compacta de micelio fúngico endurecido, son de forma esférica, ovalada u oblonga; de color marrón claro en etapas jóvenes y se oscurecen de marrón a negro conforme envejecen. Los picnidios suelen ser más grandes que los microesclerocios; son de color marrón oscuro a negro, rugosos, con formas globosas o irregulares, generalmente picudos y ostiolados (Lakhran *et al.*, 2018).

Síntomas

En plántulas, los síntomas aparecen inicialmente en el tallo, a nivel del suelo, como pequeñas lesiones de color negro, irregulares y hundidas. Estas lesiones pueden aparecer antes o poco después de la emergencia; posteriormente, en la parte aérea de la planta, la infección se disemina hacia arriba a partir del cancro original. Conforme el avance de la enfermedad, varios cancos pueden agrandarse, coalescer y rodear el tallo, causando la muerte total de la planta. Los cancos presentan márgenes bien definidos, frecuentemente con anillos concéntricos. El marchitamiento, la clorosis y la muerte de las hojas pueden manifestarse más pronunciadas de un lado de la planta que de otro. En los cancos envejecidos de color gris, se van a formar varios esclerocios pequeños de color negro o picnidios. En las vainas y en las semillas también se van a

desarrollar lesiones de color gris en las áreas afectadas (Sigillo & Dell'Olmo, 2025).

Ciclo de la enfermedad

El ciclo de vida de *M. phaseolina* se divide en cuatro etapas principales: germinación, penetración, fase parasítica y fase saprofítica (Sigillo & Dell'Olmo, 2025). Durante la fase saprofítica, el patógeno sobrevive en el suelo en forma de microesclerocios, los cuales constituyen la fuente primaria de inóculo. Cuando existen las condiciones ambientales favorables, estos microesclerocios germinan en la superficie de las raíces y penetran en las células del hospedante entre la lámina y el espacio intracelular mediante la formación de apresorios, proceso que corresponde a la etapa de penetración (Sigillo & Dell'Olmo, 2025).

En algunos casos este hongo puede infectar a las plantas durante la emergencia de las semillas, afectando principalmente los cotiledones y las raíces. Una vez que el patógeno coloniza los tejidos vegetales, puede obstruir los vasos del xilema mediante la formación de hifas y microesclerocios, etapa denominada como la fase parasítica. Esta obstrucción dificulta la absorción y el transporte de agua y nutrientes, lo que provoca síntomas como marchitez, clorosis foliar y finalmente la muerte de la planta (Alizadeh *et al.*, 2025; Basandrai *et al.*, 2021).

A medida que los tejidos vegetales infectados se descomponen, el hongo produce más microesclerocios, que son liberados nuevamente al suelo, completando el ciclo de la enfermedad, debido a que estas estructuras del patógeno van a infectar nuevos hospedantes en la siguiente temporada (Alizadeh *et al.*, 2025).

Control

Entre las principales estrategias de prevención de la pudrición carbonosa se recomienda el uso de variedades resistentes, el tratamiento de semillas, la rotación de cultivos y un manejo adecuado del riego (Bojórquez-Armenta *et al.*, 2021). Diversas prácticas agronómicas han mostrado eficacia en el control de *M.*

phaseolina, entre ellas la biosolarización, la cual reduce o estabiliza la población de microesclerocios en el suelo (Chamorro *et al.*, 2015).

El uso de especies del género *Trichoderma*, son eficaces contra varios patógenos fúngicos del suelo, incluido *M. phaseolina* (Márquez *et al.*, 2021). Además, el uso de la fertilización con fósforo ha demostrado reducir la severidad de la enfermedad (Spagnoletti *et al.*, 2018).

Se han aislado bacterias rizosféricas y asociadas a la raíz con actividad antagonista contra *M. phaseolina*, varias de las cuales han sido eficaces en la reducción de la incidencia de la enfermedad. Entre los géneros más destacados se encuentran *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Serratia* (Hussain & Khan, 2020; Kumar *et al.*, 2007; Mmbaga *et al.*, 2018; Vasebi *et al.*, 2013). Finalmente, el uso de extractos vegetales de *Prosopis africana*, *Anacardium occidentale* y *Nigella sativa* ha sido evaluado contra *M. phaseolina*, observándose una inhibición significativa de su crecimiento (Márquez *et al.*, 2021).

2.7.1.4. Pudrición de raíz

Agente causal: *Rhizoctonia solani*

Clasificación taxonómica

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Cantharellales

Familia: Ceratobasidiaceae

Género: *Rhizoctonia*

Especie: *Rhizoctonia solani* (JG Kühn, 1858)

(NCBI, 2025)

Importancia

Rhizoctonia solani es un hongo que habita en el suelo, considerado altamente destructivo para las plantas (Abdelaziz *et al.*, 2023). Este patógeno puede afectar a más de 500 especies vegetales, incluidas plantas cultivadas y silvestres, ocasiona damping off en los cultivos, así como lesiones necróticas en raíces, semillas y tallos, además de lesiones foliares, con una distribución a nivel mundial (Díaz-Díaz *et al.*, 2022). Las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad se han estimado hasta un 100% entre los productores de frijol (Parajuli *et al.*, 2025). A diferencia de otros patógenos que afectan a cultivos leguminosos, *R. solani* es capaz de infectar a sus hospederos bajo un amplio rango de condiciones de temperatura y humedad del suelo (Ghoneem *et al.*, 2023). Por ello, *R. solani* se considera una de las especies más importantes del género *Rhizoctonia* y se clasifica como un hongo transmitido por el suelo, con una amplia variabilidad en sus características culturales, rango de hospederos y grado de virulencia (Ghoneem *et al.*, 2023).

Con base en la fusión de hifas, la morfología del cultivo, la patogenicidad o virulencia y la homología del ADN, *R. solani* es considerado un complejo de especies y se ha dividido en 13 grupos somáticamente incompatibles, también denominados grupos de anastomosis (AG) (Akber *et al.*, 2023). La fusión hifal, denominada anastomosis, ocurre únicamente entre aislados del mismo AG.

Los AG se subdividen, a su vez, en subgrupos con base en la frecuencia de anastomosis, así como en características fisiológicas, morfológicas, y patogénicas, además de características biomoleculares, bioquímicas y genéticas, incluyendo la homología del ADN (Akber *et al.*, 2023).

El grupo AG-4 es el grupo más frecuente responsable de causar el tizón hilachoso y la pudrición de la raíz en plantas de frijol a nivel mundial, seguido de los grupos AG-1 y AG-2 (Palacioğlu *et al.*, 2024).

Morfología colonial y celular

R. solani se caracteriza por presentar hifas septadas, las cuales presentan un aspecto hialino en etapas jóvenes, pero conforme el micelio madura se torna de una tonalidad marrón (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018). Las hifas muestran ramificaciones típicamente en ángulo recto con una constricción en el punto de ramificación (Parajuli *et al.*, 2025). Las células del micelio son generalmente alargadas, y los septos de las ramificaciones suelen originarse a partir de las hifas principales (Barnett & Hunter, 1998, p.196).

Las células del micelio son multinucleadas con tres a ocho núcleos por célula. Asimismo, *R. solani* forma esclerocios en diferentes cantidades, desde escasos hasta numerosos, los cuales presentan una coloración que va de marrón oscuro a negro (Palacioğlu *et al.*, 2024).

Síntomas

R. solani es un hongo transmitido por semillas que provoca marchitamiento de las plántulas de frijol y se manifiesta mediante varios daños en la semilla, como aborto, semillas contraídas, disminución del tamaño, podredumbre y necrosis, así como amarillamiento, disminución de la capacidad germinativa y alteraciones metabólicas (Elwakil *et al.*, 2009).

Este patógeno afecta principalmente a las plántulas jóvenes, siendo menos frecuente en tejidos de las plantas adultas. En el tallo y el hipocótilo de las plantas afectadas se observan canchales de color marrón rojizo, de tamaño variable y generalmente delimitados por un borde oscuro; con el avance de la enfermedad, estos tejidos se tornan rugosos, se secan y llegan a colapsar, ocasionando la destrucción de los tejidos vegetales (Díaz-Díaz *et al.*, 2022). Asimismo, este

patógeno afecta a las raíces, por lo que causa la podredumbre del pie o tallo de la planta (Díaz-Díaz *et al.*, 2022).

Ciclo de la enfermedad

El hongo sobrevive en el suelo principalmente en forma de micelio y esclerocios, así como en restos vegetales y semillas infectadas, los cuales constituyen las principales fuentes de inóculo y diseminación de la enfermedad. Cuando existen las condiciones ambientales favorables, la infección por *Rhizoctonia* comienza, mediante la germinación y crecimiento de las hifas, mientras que las estructuras de reproducción sexual, como basidios y basidiosporas son poco comunes. Posteriormente, el micelio se dirige hacia el huésped, en respuesta a los exudados radiculares del cultivo, las hifas crecen a lo largo de las paredes celulares epidérmicas, formando ramificaciones en forma de T con una estructura similar a apresorios, para penetrar en las raíces, generalmente cerca de la línea del suelo (Abbas *et al.*, 2022a). Una vez dentro del huésped el hongo coloniza los espacios inter e intracelulares, y prolifera principalmente en la corteza, causando necrosis en los tejidos. Como consecuencia, se forman esclerocios en los tejidos infectados y se manifiestan diferentes síntomas en los tallos y raíces, además de clorosis, tizones, retraso del crecimiento y, en casos severos, la muerte de la planta. Asimismo, *R. solani* puede infectar semillas, las cuales presentan una baja probabilidad de germinación, o bien, si germinan, las plántulas resultantes probablemente morirán poco después de la emergencia. Finalmente, se producen nuevos esclerocios que completan el ciclo de la enfermedad, y sobreviven durante varios años aún bajo ambientes extremos de calor o frío y en presencia de productos químicos o altos niveles de radiación (Abbas *et al.*, 2022b).

Control

La enfermedad causada por *R. solani* representa un riesgo significativo para la producción de frijol debido a diversas razones como su epidemiología, la persistencia del patógeno y la evolución de nuevas cepas con resistencia a los

fungicidas disponibles. Por eso las estrategias integradas de manejo resultan fundamentales para el control de esta enfermedad. El uso correcto y efectivo de productos químicos, en combinación con agentes de biocontrol y el uso de variedades resistentes o razas locales, han demostrado tener un alto potencial para controlar la pudrición de raíz en frijol. Asimismo, la aplicación conjunta de agentes de biocontrol con enmiendas orgánicas y fungicidas, se considera altamente efectiva para el manejo de patógenos transmitidos por el suelo y por las semillas (Parajuli *et al.*, 2025). No obstante, el uso de variedades resistentes continúa siendo el enfoque más práctico, económico y ecológico para el manejo de enfermedades del suelo (Singh *et al.*, 2020a).

Parajuli *et al.* (2025) reportan que el uso de los fungicidas químicos como SAAF (carbendazim 12%+ mancozeb 63% WP), Vitavax (carboxin 37.5% + thiram 37.5% DS) y Nativo (tebuconazole 50% + trifloxystrobin 25% WG) presentan una mayor eficacia para el control de la enfermedad. Particularmente, Nativo ha demostrado efecto superior en el aumento del rendimiento de grano en comparación con otros fungicidas.

2.7.2. Principales enfermedades bacterianas en el cultivo de frijol transmitidas por semilla.

La longevidad de las bacterias fitopatógenas es mayor en las semillas que en el suelo o en los residuos de cosecha. Esto facilita que las infecciones primarias se establezcan temprano en los cultivos. Las bacterias transmitidas por semillas son un problema importante a nivel mundial, porque incluso si solo un pequeño porcentaje de semillas está infectado, las pérdidas pueden llegar hasta el 100%. Además, estas bacterias contribuyen a la reaparición de enfermedades, a la dispersión de patógenos entre continentes y a la introducción de nuevas enfermedades en zonas que antes estaban libres de ellas (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

Las bacterias fitopatógenas se consideran el segundo grupo de patógenos más importantes, después de los hongos, debido a su capacidad de causar

enfermedades graves en vegetales importantes (Singh & Rathaur, 2020b). La transmisión bacteriana por semilla ocurre cuando los microorganismos se encuentran adheridos sobre o dentro de las semillas, donde penetran en sus tejidos para después permanecer en estado de reposo, por lo que, al sembrar las semillas, la infección en la nueva planta va a provenir de la semilla infectada. En otros casos, las bacterias solo infestan a las semillas a nivel superficial o se encuentran mezcladas con ellas, lo que no necesariamente implica transmisión a la siguiente generación, pero si puede favorecer su desarrollo en las áreas de siembra (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

Las bacterias pueden penetrar a las semillas a través de diferentes vías, incluyendo la pared del ovario, el pericarpio, los tegumentos, y los haces vasculares, así como mediante la testa, y el micropilo. Una vez en el interior, pueden localizarse en distintas estructuras, como el embrión, el endospermo, la testa, el pericarpio o el rafe. La infección bacteriana puede desarrollarse a nivel intraembrional, dando lugar a infecciones sistémicas o locales; o a nivel extraembrional, provocando lesiones locales (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

Finalmente, es importante destacar que, en muchos casos, las bacterias asociadas a semillas no se pueden detectar a simple vista. Por eso cuando se moviliza la semilla de una región a otra, sin que antes se haya sometido el material a cuarentena y sin que se hayan efectuado las pruebas de sanidad, se propicia el desarrollo de nuevas enfermedades (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

2.7.2.1. Tizón bacteriano común del frijol

Agente causal: *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) y *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (Xcf)

Clasificación taxonómica

Dominio: Bacteria

Reino: Pseudomonadati

Filo: Pseudomonadota

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Lysobacterales

Familia: Lysobacteraceae

Género: *Xanthomonas*

Especie: *Xanthomonas phaseoli* (Smith 1897)

Xanthomonas citri (Schad *et al.*, 2007) Constantin *et al.* 2016

Patovares: *phaseoli* & *fuscans*

(NCBI, 2025)

Importancia

El tizón bacteriano común fue reportado por primera vez en Estados Unidos por Beach en 1892 (Fourie, 2024). De acuerdo con la European & Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, 2025) esta enfermedad está distribuida a nivel mundial y se considera una de las cinco enfermedades bacterianas más severas que afectan al frijol (Ndifon, 2025). El tizón común del frijol afecta todas las partes aéreas de la planta, ocasionando lesiones acuosas, defoliación y pérdidas significativas de rendimiento, especialmente bajo condiciones ambientales favorables para el patógeno, por lo que se han registrado pérdidas de rendimiento que oscilan entre el 22% hasta el 71%, dependiendo de la susceptibilidad del cultivo y las condiciones ambientales (Sakshi *et al.*, 2025); en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, las pérdidas pueden alcanzar entre el 80% e incluso el 100% (Yang *et al.*, 2022).

El hospedero principal del patógeno causante del tizón común bacteriano del frijol es *Phaseolus vulgaris* L., pero también infecta a otras especies del género

Phaseolus de los acervos genéticos secundarios y terciarios, como el frijol tépari y corredor (Yang *et al.*, 2022).

Morfología colonial y celular

Las células de *Xanthomonas*, son bacilos rectos que miden aproximadamente de 0,4 a 1,0 por 1,2 a 3 μm , móviles por medio de un flagelo polar (Oliver *et al.*, 2024). No obstante, se han aislado variantes no móviles de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (Fourie, 2024). Tanto *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* son bacterias aeróbicas, y gram negativas que no forma esporas, y desarrollan colonias de color amarillo, convexas y de apariencia viscosa en medios que contiene glucosa, la apariencia que tiene de ser viscosa se debe a la producción de un polisacárido extracelular, llamado goma xantana, en medios que contienen glucosa, por su parte, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* puede distinguirse por la producción de un pigmento difusible de color marrón oscuro en medios que contienen tirosina entre otros compuestos (Goodwin & Sopher, 1994).

Síntomas

Los síntomas del *tizón* bacteriano común del frijol pueden presentarse en plántulas, hojas, tallos, vainas y semillas del frijol (Chen *et al.*, 2021). *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* y *X. citri* pv. *fuscans* causan inicialmente pequeñas manchas acuosas en las hojas, visibles entre 4 a 10 días después de la infección; posteriormente estas manchas se expanden, el centro se torna necrótico y de color marrón, y los tejidos alrededor de la lesión pueden volverse flácidos (Goodwin & Sopher, 1994). En infecciones severas causan defoliación e incluso muerte de la planta (Chen *et al.*, 2021), siendo característico que las lesiones se encuentren rodeadas por una estrecha banda de tejido amarillo brillante. Aunque con menor frecuencia, la infección puede desarrollarse en los tallos, donde comienza como una mancha acuosa que después se convierte en lesiones de tonalidad marrón rojiza; el patógeno puede invadir el xilema lo que provoca un marchitamiento. En las vainas, las lesiones comienzan como

manchas acuosas hundidas que adquieren una coloración marrón rojiza y, bajo condiciones de alta humedad se puede desarrollar una secreción bacteriana de color amarillo. Las semillas afectadas tienden a arrugarse y presentan una germinación deficiente o bien dar origen a plántulas débiles; en variedades de frijol de semilla blanca, se observan manchas amarillas o marrones en la testa, principalmente cerca del hilio, mientras que, en variedades de semilla oscura, esta decoloración no es visible, y es importante mencionar que las semillas también pueden ser asintomáticas (Yoshii,1980).

Ciclo de la enfermedad

La principal fuente de inoculo del tizón bacteriano común del frijol son las semillas infectadas, ya que ambos patógenos pueden localizarse tanto en la cubierta seminal como en el embrión (Darrasse *et al.*, 2018). Estas bacterias pueden sobrevivir en la semilla hasta 30 años, dependiendo de las condiciones de almacenamiento, particularmente la temperatura y humedad (Chen *et al.*, 2021). Asimismo, los patógenos pueden persistir en residuos de cultivos, malezas y de forma epífita en plantas hospederas (Chen *et al.*, 2021). La infección de brotes florales y vainas jóvenes favorecen la transmisión vascular hacia la semilla, provocando las infecciones internas (Fourie,2024). La supervivencia de las bacterias se ve facilitada por la formación de biopelículas y, bajo condiciones ambientales favorables, las bacterias ingresan al hospedero a través de aberturas naturales o heridas, para posteriormente multiplicarse hasta alcanzar poblaciones elevadas y ocasionar la colonización vascular y la marchitez en infecciones severas (Chen *et al.*, 2021).

Control

Las estrategias de control del tizón bacteriano común se centran en la exclusión, que comprende el uso de prácticas culturales y de genotipos tolerantes o resistentes (Chen *et al.*, 2021). En el control cultural se recomienda la rotación de cultivos y la siembra de semillas libres de patógenos; sin embargo, en la actualidad el enfoque se ha orientado hacia la selección de recursos de

germoplasma resistente, la exploración de genes de resistencia y el cultivo de variedades resistentes, los cuales se consideran métodos más eficaces y sostenibles para el manejo de esta enfermedad (Yang *et al.*, 2022).

En cuanto a la resistencia genética, la variación patogénica de *Xanthomonas* spp. ha representado una limitante para el desarrollo de genotipos resistentes de amplia adaptación, por ello hasta el momento en México no se han obtenido genotipos con resistencia completa, inespecífica u horizontal, observándose únicamente resistencia vertical a las cepas locales (Hernández-Cruz *et al.*, 2024).

2.7.2.2. Tizón del halo

Agente causal: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*

Clasificación taxonómica

Dominio: Bacteria

Reino: Pseudomonadati

Filo: Pseudomonadota

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: *Pseudomonas savastanoi*

Patovares: *phaseolicola*

(NCBI, 2025)

Importancia

El tizón del halo fue descrito por primera vez por Burkholder en 1926 (Fourie, 2025). Actualmente esta enfermedad es considerada como la principal limitante en el cultivo de frijol (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2025). Esta enfermedad se ha

reportado en diversas regiones productoras de México, particularmente en el Valle de México y Sinaloa, donde su agresividad ha ocasionado pérdidas de rendimiento hasta del 55% de la cosecha (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2025).

Morfología colonial y celular

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos aeróbicos gram negativos, no esporulantes, rectos o curvos, con dimensiones de 0,5 a 1,0 por 1,5 a 4,0 μm , y presentan movilidad por medio de uno o varios flagelos polares (Oliver *et al.*, 2024). En medio agar King's B, las colonias son de color blanco cremoso y bajo luz ultravioleta, producen un pigmento verde fluorescente. Bioquímicamente, estas bacterias son negativas a la prueba de oxidasa y a la arginina dihidrolasa, mientras que resultan positivas para la prueba de producción de levana y provocan una reacción de hipersensibilidad en tabaco (Fourie, 2025).

Síntomas

La bacteria se presenta a lo largo de los distintos estados fenológicos de la planta de frijol, afectando a hojas, tallos, vainas y semillas. En las hojas, los primeros síntomas son la aparición de pequeñas lesiones acuosas que después evolucionan a áreas necróticas; y al cabo de una semana de la infección, dichas lesiones se encuentran rodeadas por un halo clorótico, mientras que en las vainas también se desarrollan lesiones acuosas y hundidas de color marrón rojizo, las cuales son de suma importancia debido a su capacidad de transmitirse a las semillas, causando que estas se contraigan, decoloren o se vuelvan más pequeñas de lo normal (Chacón-López *et al.*, 2025). Cabe destacar que la presencia del halo clorótico el cual caracteriza a la enfermedad es ocasionada por la faseolotoxina, una fitotoxina producida por *P.syringae* pv. *phaseolicola* (Mitchell, 1976).

Ciclo de la enfermedad

El patógeno causante del tizón del halo sobrevive en hospederos alternativos, semillas infectadas y restos vegetales provenientes de temporadas anteriores;

sin embargo, las semillas infectadas constituyen el principal mecanismo de supervivencia y diseminación a larga distancia. El patógeno puede invadir la planta de frijol a través de aberturas estomáticas, así como por heridas y lesiones ocasionadas por factores mecánicos, tales como lluvias intensas, viento, o el uso de maquinaria agrícola. La enfermedad se propaga principalmente mediante salpicaduras de lluvia, el contacto entre hojas mojadas, el agua de riego, y el movimiento de personas y animales a través de cultivos infestados. Las salpicaduras de lluvia desempeñan un papel determinante en la transmisión de la patógeno, especialmente en condiciones de viento predominante, ya que facilita su dispersión a largas distancias. El desarrollo de la enfermedad se ve favorecido por temperaturas moderadamente bajas, entre 18-26°C con periodos de alta humedad relativa (Abdullah & Douglas, 2021).

Para invadir la planta de frijol, el patógeno utiliza el sistema de secreción tipo III (T3SS), el cual permite la translocación de un conjunto diverso de proteínas efectoras como aquellas codificadas por el grupo de genes *hrp/hrc*, responsables de inducir la respuesta de hipersensibilidad directamente hacia las células vegetales (Arnold *et al.*, 2011). Estas proteínas efectoras suprimen las defensas inmunitarias del huésped y favorecen la colonización bacteriana. Una vez establecida la infección, la bacteria se multiplica exponencialmente en los espacios intercelulares; posteriormente, entra en una fase estacionaria, durante la cual el tejido colonizado se encuentra cubierto de polisacárido extracelular (Fourie, 2025). Los síntomas de la enfermedad se desarrollan generalmente entre 6 a 10 días después de la infección, bajo condiciones de temperatura de 24-28°C (Fourie, 2025). Sin embargo, a temperaturas que oscilan entre los 18 y 20 °C se presentan los síntomas más severos, ya que el descenso de la temperatura induce la producción de faseolotoxina (Arnold *et al.*, 2011).

Control

Se considera que la estrategia más efectiva es el uso de semillas certificadas y libres de enfermedades, debido a que el patógeno se transmite principalmente por semillas (Fourie, 2025). Se recomienda el uso de variedades resistentes (Félix-Gastélum *et al.*, 2016). Cabe mencionar que se ha identificado un frijol nativo de Puebla como resistente a la raza 6 de *Psph* (Ghising *et al.*, 2014). De igual forma, es importante considerar la rotación de cultivos con cereales durante un periodo mínimo de dos o tres años, ya que esto ayudara a reducir la supervivencia de la bacteria en el suelo (Fourie, 2025). Además, se debe realizar un saneamiento adecuado del campo y evitar el riego por aspersión con el fin de disminuir la diseminación del patógeno (Fourie, 2025).

2.7.2.3. Marchitez bacteriana del frijol común

Agente causal: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Clasificación taxonómica

Dominio: Bacteria

Reino: Bacillati

Filo: Actinomycetota

Clase: Actinomycetes

Orden: Micrococcales

Familia: Microbacteriaceae

Género: *Curtobacterium*

Especie: *Curtobacterium flaccumfaciens*

Patovares: *flaccumfaciens* (Hedges, 1922)

(NCBI, 2025)

Importancia

Curtobacterium es un género bacteriano muy diverso, que comúnmente suele vivir como endófito en plantas; no obstante, también puede encontrarse en la filosfera, la rizosfera y en tejidos vegetales muertos de la hojarasca, desde donde tiene la capacidad de colonizar nuevas plantas (Bultreys & Gheysen, 2024).

La marchitez bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* se considera una enfermedad de importancia fitosanitaria debido a que representa una amenaza para la industria mundial de las leguminosas comestibles. Su manejo ha constituido un problema importante desde su primera descripción en 1922, principalmente por su eficiente transmisión a través de semillas infectadas, lo que facilita la diseminación del patógeno a largas distancias (Osdaghi *et al.*, 2020).

Morfología colonial y celular

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Cff) es una bacteria gram-positiva, aeróbica y móvil, gracias a que tiene de uno a tres flagelos polares. Presenta morfología de bacilos cortos, con dimensiones aproximadamente de 0,3 a 0,5 por 0,6 a 3,0 μm (Evtushenko & Takeuchi, 2006). Las colonias sembradas en medio YPGA son circulares, lisas, planas o ligeramente convexas, opacas y poco viscosas, mientras que la coloración de las colonias puede variar entre pigmentación amarilla, naranja, rosa y roja (Osdaghi *et al.*, 2020).

Síntomas

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* es un patógeno vascular que coloniza de manera sistémica a las leguminosas, provocando inicialmente clorosis foliar que progresa a necrosis, la cual generalmente inicia en los márgenes de las hojas y deriva en una marchitez, retraso en el crecimiento y, en casos severos la muerte de la planta (Saad *et al.*, 2025). La marchitez de brotes se considera un síntoma característico de la enfermedad y es consecuencia de

la colonización y obstrucción del xilema, que impide el paso de la savia bruta desde las raíces hacia las hojas (Puia *et al.*, 2025).

La enfermedad es más severa en plántulas y plantas jóvenes, especialmente cuando se origina a partir de semillas infectadas; en estos casos, los síntomas pueden observarse desde los cotiledones o en la etapa de la segunda hoja trifoliada, y la supervivencia de las plántulas es poco frecuente; por otro lado en las plantas infectadas que logran completar su ciclo, la infección da lugar a semillas decoloradas, particularmente en los cultivares de semilla blanca, donde la testa puede presentar una decoloración amarilla, naranja, rosa o púrpura. Bajo condiciones favorables para el patógeno, también puede presentarse marchitez en las flores (Osdaghi *et al.*, 2020).

Ciclo de la enfermedad

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* puede sobrevivir en residuos vegetales y la infección puede iniciarse principalmente a partir de semillas infectadas, así como por la penetración del patógeno en raíces y hojas a través de heridas y aberturas naturales (Osdaghi *et al.*, 2020). Las semillas infectadas se consideran el principal medio de introducción del inóculo, ya que la bacteria puede infectar el ovulo a través de los tejidos vasculares del funículo y el rafe o bien ingresando directamente por el micropilo, estableciéndose debajo de la cubierta de la semilla o sobre la superficie de la semilla (Osdaghi *et al.*, 2020).

La enfermedad se presenta con mayor frecuencia bajo condiciones ambientales favorables, como veranos calurosos, con alta humedad y precipitaciones, por lo que la presencia de altos niveles de humedad en las hojas ya sea por la lluvia o el riego por aspersión, facilita la diseminación del patógeno de planta a planta (Osdaghi *et al.*, 2020).

Control

El manejo de la marchitez bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* se basa en la erradicación de hospedantes alternativos, el uso

de semilla certificada, la siembra de cultivares resistentes y la rotación de cultivos (Puia *et al.*, 2025). Las pruebas de sanidad de semillas son esenciales para prevenir la introducción y diseminación del patógeno, ya que su erradicación del suelo resulta prácticamente imposible. La identificación rápida y precisa del patógeno en plantas y en semillas es una estrategia fundamental para reducir el riesgo de infestación de suelo y la propagación del patógeno (de Oliveira *et al.*, 2025).

2.8. LITERATURA CITADA

- Abbas, A., Mubeen, M., Sohail, M.A., Solanki, M.K., Hussain, B., Nosheen, S.,... Fang, X. (2022a). Root rot: A silent alfalfa killer in China: Distribution, fungal, and oomycete pathogens, impact of climatic factors and its management. *Frontiers in Microbiology*, 13, 961794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.961794>
- Abbas, A., Mubeen, M., Zheng, H., Sohail, M.A., Shakeel, Q., Solanki, M.K., ...Zhou, L. (2022b). *Trichoderma* spp. Genes involved in the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 884469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.884469>
- Abdelaziz, A.M., El-Wakil, D.A., Hashem, A.H., Al-Askar, A.A., AbdElgawad, H., & Attia, M.S. (2023). Efficient role of endophytic *Aspergillus terreus* in biocontrol of *Rhizoctonia solani* causing damping-off disease of *Phaseolus vulgaris* and *Vicia faba*. *Microorganisms*, 11(6), 1487. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061487>
- Abdullah, A.S., & Douglas, C. (2021). Halo blight of mungbean in Australia. *Crops*, 1(1), 3-7. <https://doi.org/10.3390/crops1010002>
- Ajayi-Oyetunde, O.O., & Bradley, C.A. (2018). *Rhizoctonia solani*: Taxonomy, population biology and management of *rhizoctonia* seedling disease of soybean. *Plant Pathology*, 67(1), 3-17. <https://doi.org/10.1111/ppa.12733>
- Akber, M.A., Mubeen, M., Sohail, M.A., Khan, S.W., Solanki, M.K., Khalid, R.,...Zhou, L. (2023). Global distribution, traditional and modern detection, diagnostic, and management approaches of *Rhizoctonia solani* associated with legume crops. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1091288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1091288>
- Alizadeh, M., Khodadadi Manesh, S., Fathi, P., Karimi, H., Tavakol Noorabadi, M., Roshanroo, M.,...Vasebi, Y. (2025). Biology and host ranges of the plant pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*: A comprehensive review. *Journal of Crop Health*, 77, 50. <https://doi.org/10.1007/s10343-024-01106-4>
- Almarales Antúnez, M., Lorenzo Nicao, M.E. & Martín Vasallo, C.V. (2022). Presencia de hongos fitopatógenos en semillas de diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. en la provincia de Cienfuegos, Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 37(1). <https://censa.edicionescervantes.com/index.php/RPV/article/view/1231>
- Ansari, K.I., Palacios Rojas, N., Araya, C.A., Langin, T., Egan, D., & Doohan, F.M. (2004). Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum*

- lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathology*, 53(5), 635-642. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01057.x>
- Arnold, D.L., Lovell, H.C., Jackson, R.W., & Mansfield, J.W. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: From “has bean” to supermodel. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), 617-627. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00697.x>
- Ayala-Garay, A.V., Acosta-Gallegos, J.A., & Reyes-Muro, L. (2021). El cultivo del frijol: presente y futuro para México (Libro técnico No.1). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/media/librotecnico/12319_5085_El_cultivo_del_frijol_presente_y_futuro_para_M%C3%A9xico.pdf
- Babu, B.K., Saikia, R., & Arora, D.K. (2010). Molecular characterization and diagnosis of *Macrophomina phaseolina*: A charcoal rot fungus. En Y. Gherbawy & K.Voigt (Eds.), *Molecular identification of fungi* (pp. 179 – 191). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8>
- Barnet, H.L. & Hunter, B.B (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed.). APS Press.
- Basandrai, A.K., Pandey, A.K., Somta, P., & Basandrai, D. (2021). *Macrophomina phaseolina*-host interface: Insights into an emerging dry root rot pathogen of mungbean and urdbean, and its mitigation strategies. *Plant Pathology*, 70(6), 1263-1275. <https://doi.org/10.1111/ppa.13378>
- Bojórquez-Armenta, Y. de J., Mora-Romero, G.A., López-Meyer, M., Maldonado-Mendoza, I.E., Castro-Martínez, C., Romero-Uriás, C. de los A., Cordero-Ramírez, J.D., & Martínez-Álvarez, J.C. (2021). Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. *Journal of General Plant Pathology*, 87, 377- 386. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-01019-4>
- Bultreys, A., & Gheysen, I. (2024). High diversity of *Curtobacterium flaccumfaciens* in poinsettia and detection of three pathogenicity plasmids for identification of *C.flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*. *Phytobiomes Journal*, 8(3), 378-400. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-10-23-0104-R>
- Cárdenas, R.F.A. (1989). El banco de germoplasma de frijol en México. En: *Memorias del Taller Internacional del Mejoramiento Genético en Frijol. Temas actuales en mejoramiento genético de frijol* (pp.45-77). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Casado-Del Castillo, V., Benito, E.P., & Díaz-Mínguez, J.M. (2023). The role of the *Fusarium oxysporum* FTF2 transcription factor in host colonization and

- virulence in common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Pathogens*, 12(3), 380. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030380>
- Chacón-López, A., Hernández-Flores, J.L., Montalvo-González, E., & Aguilera-Aguirre, S. (2025). Aspectos moleculares de la biosíntesis de la faseolotoxina producida por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 43(1),47. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2308-2>
- Chamorro, M., Miranda, L., Domínguez, P., Medina, J.J., Soria, C., Romero, F., López Aranda, J.M., & De los Santos, B. (2015). Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. *Crop Protection*, 67, 279-286. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.021>
- Chen, L., Wu, Q., He, T., Lan, J., Ding, L., Liu, T.,...Chen, T. (2020). Transcriptomic and metabolomic changes triggered by *Fusarium solani* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genes*, 11(2),177. <https://doi.org/10.3390/genes11020177>
- Chen, N.W.G., Ruh, M., Darrasse, A., Foucher, J., Briand, M., Costa, J., Studholme, D.J., & Jacques, M.-A. (2021). Common bacterial blight of bean: A model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology*, 22(12), 1464 – 1480. <https://doi.org/10.1111/mpp.13067>
- Chhetri, A.B., Lal, J.P., Nair, R.M., & Singh, A.K. (2025). Genetic diversity for pod and seed traits in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Discover Plants*, 2, article 228. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00316-y>
- Darrasse, A., Barret, M., Cesbron, S., Compant, S., & Jacques, M.-A. (2018). Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant and Soil*, 422(1-2), 115-128. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3329-3>
- de Oliveira, M.I.S., de Paula, K.L.M., Ferreira, S.R., Lobo Junior, M., & Wendland, A. (2025). Multiplex PCR to detect *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* and the common bean root pathogens *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* and *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. *Tropical Plant Pathology*, 50,65. <https://doi.org/10.1007/s40858-025-00754-9>
- Debouck, D.G., & Hidalgo, R. (1985). Morfología de la planta de frijol común. En M. López, F.Fernández, & A.van Schoonhoven (Eds.), *Frijol: investigación y producción* (pp. 7-41). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)/ Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).

- Dell'Olmo, E., Tiberini, A., & Sigillo, L. (2023b). Leguminous seedborne pathogens: Seed health and sustainable crop management. *Plants*, 12(10), 2040. <https://doi.org/10.3390/plants12102040>
- Dell'Olmo, E., Zaccardelli, M., Basile, B., Corrado, G., & Sigillo, L. (2023a). Identification and characterization of new seedborne pathogens in *Phaseolus vulgaris* landraces of Southern Italy. *Pathogens*, 12(1), 108. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010108>
- Díaz-Díaz, M., Bernal-Cabrera, A., Trapero, A., Medina-Marrero, R., Sifontes-Rodríguez, S., Cupull-Santana, R.D., García-Bernal, M., & Agustí-Brisach, C. (2022). Characterization of actinobacterial strains as potential biocontrol agents against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, the main soil-borne pathogens of *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Plants*, 11(5), 645. <https://doi.org/10.3390/plants11050645>
- Ekwomadu, T.I., & Mwanza, M. (2023). *Fusarium* fungi pathogens, identification, adverse effects, disease management, and global food security: A review of the latest research. *Agriculture*, 13(9), 1810. <https://doi.org/10.3390/agriculture13091810>
- Elwakil, M.A., El-Refai, I.M., Awadallah, O.A., El-Metwally, M.A., & Mohammed, M.S. (2009). Seed-borne pathogens of faba bean in Egypt: Detection and pathogenicity. *Plant Pathology Journal*, 8(3), 90-97. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20093344929>
- EPPO. (2025). Distribution of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (XANTPH). EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/XANTPH/distribution>
- Erima, S., Nyine, M., Edema, R., Nkuboye, A., Habiba, N., Candiru, A., & Paparu, P. (2025). Molecular characterisation of *Fusarium* species causing common bean root rot in Uganda. *Journal of Fungi*, 11(4), 283. <https://doi.org/10.3390/jof11040283>
- Evtushenko, L.I., & Takeuchi, M. (2006). The family Microbacteriaceae. En M.Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (Vol.3, pp.1020-1098). *Springer*. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_43
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2026). Bean. <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/bean/en/> (consultado el 27 de abril 2026).
- FAOSTAT Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2025). FAOSTAT statistical

database: Crops and livestock products.
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (consultado el 27 de abril 2026).

Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I.E., Navarrete-Maya, R., Olivas-Peraza, N.G., Brito, H., & Acosta-Gallegos, J.A. (2016). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* as the causal agent of halo blight in yellow beans in northern Sinaloa, Mexico. *Phytoparasitica*, 44 (3), 365-370. <https://doi.org/10.1007/s12600-016-0530-5>

FIRA Fideicomiso Instituido en Relación con la Agricultura. (2022). Panorama agroalimentario: Frijol 2022. [Informe] <https://sursureste.org.mx/wp-content/uploads/2023/01/Panorama-Agroalimentario-Frijol-2022.pdf> (consultado el 5 de enero 2026)

Fourie D. (2024). *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (tizón del frijol). *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.56962>

Fourie, D. (2025). *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (halo blight of beans). In *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.44987>

García-Narváez, A.L., Hernández-Delgado, S., Chávez-Servia, J.L., & Mayek-Pérez, N. (2020). Variabilidad morfológica y agronómica de germoplasma de frijol cultivado en Oaxaca, México. *Revista Bio Ciencias*, 7, e876. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e876>

García-Urióstegui, A., García-Nava, J.R., Uscanga-Mortera, E., García-Esteva, A., Kohashi-Shibata, J., & García de los Santos G. (2025). Rendimiento, biomasa y fenología de la cruza entre frijol silvestre y domesticado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 16(2), e3507. <https://doi.org/10.29312/remexca.v16i2.3507>

Gepts, P. (1998). Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. *HortScience*, 33, 1124-1130. <https://journals.ashs.org/hort/hort/published/rest/pdf-watermark/v1/journals/hortsci/33/7/article-p1124.pdf/watermark-pdf/>

Ghising, K., Osorno, J.M., McPhee, K., Pasche, J.S., & Lamppa, R. (2014). Screening the USDA core collection of common beans for resistance to halo blight under greenhouse and field conditions. CSA meeting 2014, Long Beach Convention Center, Long Beach, CA, United States.

Ghoneem, K.M., El-Wakil, D.A., Ahmed, M.I.M., Kamel, H.M., Rashad, E.M., Al-Askar, A.A., Elsherbiny, E.A., & Ibrahim, A.A. (2023). Biodiversity of *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* sedes in East Delta of Egypt. *Agronomy*, 13(5), 1317. <https://doi.org/10.3390/agronomy13051317>

- Gonzales-Cruces, A., Arista-Carmona, E., Díaz-Arias, K.V., Ramírez-Razo, K., Hernández-Livera, A., Acevedo-Sánchez, G., Mendoza-Ramos, C., & Mora-Aguilera, G. (2022). Epidemiology of Bean common Mosaic virus and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(2), 188-220. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2202-8>
- Goodwin, P.H., & Sopher, C.R. (1994). Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentisic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(1), 28-34. <https://doi.org/10.1139/m94-005>
- Gupta, C., Salgotra, R.K., Damm, U., & Rajeshkumar, K.C. (2022). Phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* causing anthracnose of *Phaseolus vulgaris* cv. Bhaderwah-Rajmash from northern Himalayas, India. 3 *Biotech*, 12(8), Article 169. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03216-0>
- Hernández-Cruz, F.A., Cruz-Izquierdo, S., Corona-Torres, T., & Sandoval-Islas, J.S. (2024). Caracterización fenotípica de germoplasma elite de frijol para resistencia al tizón común. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 47(29), 157-165. <https://doi.org/10.35196/rfm.2024.2.x>
- Hernández-López, V.M., Vargas-Vázquez, M.L.P., Muruaga-Martínez, J.S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 95-104. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000200002&lng=es&tlng=es
- Hussain, T., & Khan, A.A. (2020). Determining the antifungal activity and characterization of *Bacillus siamensis* AMU03 against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Indian Phytopathology*, 73(3), 507-516. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00239-6>
- Huster, A.R., Wallace, L.T., & Myers, J.R. (2021). Associated SNPs, heritabilities, trait correlations, and genomic breeding values for resistance in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to root rot caused by *Fusarium solani* (Mart.) f.sp. *phaseoli* (Burkholder). *Frontiers in Plant Science*, 12, 697615. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.697615>
- ICAMEX Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México. (2025). Guía para el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Estado de México (1.ª ed.). Gobierno del Estado de México. <https://icamex.edomex.gob.mx/sites/icamex.edomex.gob.mx/files/files/publicaciones/2025/Frijol%202025.pdf> (consultado el 27 de abril de 2026).

- Jones, A. L. (1999). *PHASEOLUS BEAN* Post-harvest Operations. En D. Mejia (Ed. técnico) & B. Lewis (Ed. de idioma y estilo), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) / FAO. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/f298d18a-182b-4ded-9863-6d0b60bf3024/content>
- Kamel, T.A., Yasser, M.M., Taha, N.A., Alkhalifah, D.H.M., Marzouk, M.A., Hozzien, W.N., & Abdelghany, W.R. (2025). Integrating morphological, pathogenic, and molecular approaches to characterize *Fusarium* root rot pathogens of common bean in Egypt. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(10), 803. <https://doi.org/10.3390/cimb47100803>
- Kumar, R., & Gupta, A. (Eds.). (2020). Seed – Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management. *Springer Nature Singapore*. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9046-4>
- Kumar, V., Kumar, A., & Kharwar, R.N. (2007). Antagonistic potential of fluorescent pseudomonads and control of charcoal rot of chickpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Environmental Biology*, 28(1), 15-20.
- Lakhran, L., Ahir, R.R., Choudhary, M., & Choudhary, S. (2018). Isolation, purification, identification and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid caused dry root rot of chickpea. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 3314-3317. https://www.researchgate.net/publication/343252203_Isolation_purification_identification_and_pathogenicity_of_Macrophomina_phaseolina_Tassi_goid_caused_dry_root_rot_of_chickpea
- Lal, D., Devanshu, D., Kumari, S., Pandey, S., Aparna, Sharma, N.,...Singh, A. (2024). *Fusarium* wilt pandemic: current understanding and molecular perspectives. *Functional & Integrative Genomics*, 24, Artículo 41. <https://doi.org/10.1007/s10142-024-01319-w>
- León, I. (2009). La antracnosis y la macha angular del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Temas de Ciencias y Tecnología*, 13(39), 45-54.
- Márquez, N., Giachero, M.L., Declerck, S., & Ducasse, D.A. (2021). *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 634397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634397>
- Martín, I., Gálvez, L., Guasch, L., & Palmero, D. (2022). Fungal pathogens and seed storage in the dry state. *Plants*, 11(22), Article 3167. <https://doi.org/10.3390/plants11223167>

- Matúl-Ramos, K., Fonseca Hernández, D., Acevez Mares, L.C., Alcázar Valle, E.M., Lugo Cervantes, E., & Mojica Contreras, L.A. (2024). Importancia cultural y nutricional de especies de frijol (*Phaseolus*) endémicas de México. *Enfoques Transdisciplinarios: Ciencia y Sociedad*, 2(2), 93 – 108. <https://doi.org/10.5281/zenodo.12774554>
- Mex-Álvarez, R.M. de J., Garma-Quen, P.M., Yáñez-Nava, D., Guillén-Morales, M.M., & Novelo-Pérez, M.I. (2021). Caracterización morfométrica de *Phaseolus vulgaris* en Campeche, México. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 52(1), 32-38. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502021000100032&lng=es&tlng=es.
- Mitchell, R.E. (1976). Isolation and structure of a chlorosis-inducing toxin from *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry*, 15, 1941-1947.
- Mmbaga, M.T., Mackasmiel, L.M., & Mrema, F.A. (2018). Evaluation of biological agents for control of *Macrophomina* root rot and powdery mildew in flowering dogwood (*Cornus florida* L.). *HortScience*, 53(10), 1461-1466. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13071-18>
- Mohammed, A. (2013). An overview of distribution, biology and the management of common bean anthracnose. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 4(8), 193. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000193>
- Morelos-Martínez, M.I., Cano-Camacho, H., Díaz-Tapia, K.M., Simpson, J., López-Romero, E., & Zavala-Páramo, M.G. (2024). Comparative genomic analyses of *Colletotrichum lindemuthianum* pathotypes with different virulence levels and lifestyles. *Journal of Fungi*, 10(9), Article 651. <https://doi.org/10.3390/jof10090651>
- Munkvold, G.P., Proctor, R.H., & Moretti, A. (2021). Mycotoxin production in *Fusarium* according to contemporary species concepts. *Annual Review of Phytopathology*, 59, 373-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-102825>
- Muñoz-Velázquez, E.E., Rubio-Hernández, D., Bernal-Lugo, I., Garza-García, R., & Jacinto-Hernández, C. (2009). Caracterización de genotipos nativos de frijol del estado de Hidalgo, con base a calidad del grano. *Agricultura Técnica en México*, 35(4), 429-438. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172009000400008
- Naseri, B. (2008). Root rot of common bean in Zanjan, Iran: Major pathogens and yield loss estimates. *Australasian Plant Pathology*, 37, 546-551. <https://doi.org/10.1071/AP08053>

- Navarrete-Maya, R., Aranda-Ocampo, S., Rodríguez-Mejía, M- de L., Moya-Hernández, S.L., & González-Ochoa, M.G. (2014). Bacterias fitopatógenas en semillas: Su detección y regulación. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 75-88. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200075
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=317013> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=319> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=138532> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=290576> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5506> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=35725> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=3885> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=456999> (consultado el 10 de noviembre 2025).
- Ndifon, E.M. (2025). Estudio de la eficacia de los extractos de plantas y agentes bactericidas aplicados contra, *Xanthomonas axonopodis*, el agente causante del tizón del frijol. La Granja, *Revista de Ciencias de la Vida*, 42(2), 61-77. <https://doi.org/10.17163/lgr.n42.2025.04>
- Nunes, M.P.B.A., Goncalves-Vidigal, M.C., Martins, V.S.R., Xavier, L.F.S., Valentini, G., Bisneta, M.V., & Vidigal Filho, P.S. (2021). Relationship of

Colletotrichum lindemuthianum races and resistance loci in the *Phaseolus vulgaris* L. genome. *Crop Science*. <https://doi.org/10.1002/csc2.20601>

- O'Connell, R.J., Bailey, J.A., & Richmond, D.V. (1985). Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, 27(1), 75-98. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(85\)90058-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(85)90058-X)
- Oliver, R.P., Hükelhoven, R., Del Ponte, E.M., & Di Pietro, A. (Eds.) (2024). *Agrios' plant pathology* (Sixth Edition., p.479). *Elsevier Academic Press*.
- Osdaghi, E., Young, A.J., & Harveson, R.M. (2020). Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Molecular Plant Pathology*, 21(5), 605-621. <https://doi.org/10.1111/mpp.12926>
- Palacioğlu, G., Cankara, B., Bayraktar, H., & Özer, G. (2024). Genetic and pathogenic characterization of *Rhizoctonia solani* AG-4 isolates obtained from common bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 131, 102277. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102277>
- Parajuli, P., Yadav, R.K., Manandhar, H.K., & Parajulee, M.N. (2025). Management of root rot (*Rhizoctonia solani* Kühn) of common bean using host resistance and consortia of chemicals and biocontrol agents. *Biology*, 14(3), 235. <https://doi.org/10.3390/biology14030235>
- Pastor-Corrales, M.A., Otoyá, M.M., Molina, A., & Singh, S.P. (1995). Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. *Plant Disease*, 79(1), 63-67. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0063>
- Paulino, J.F.C., Almeida, C.P., Bueno, C.J., Song, Q., Fritsche-Neto, R., Carbonell, S.A.M., Chiorato, A.F., & Benchimol-Reis, L.L. (2021). Genome – wide association study reveals genomic regions associated with *Fusarium* wilt resistance in common bean. *Genes*, 12(5), 765. <https://doi.org/10.3390/genes12050765>
- Pérez-Vega, E., Campa, A., & Ferreira, J.J. (2010). Control de la antracnosis en el cultivo de faba granja asturiana. *Tecnología Agroalimentaria*, (7), 7-11. SERIDA. <https://ria.asturias.es/RIA/bitstream/123456789/530/1/Archivo.pdf>
- Petrović, K., Orzali, L., Krsmanović, S., Valente, M.T., Tolimir, M., Pavlov, J., & Riccioni, L. (2024). Genetic diversity and pathogenicity of the *Fusarium* species complex on soybean in Serbia. *Plant Disease*, 108(6), 1851-1860. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-23-2450-RE>

- Porteous-Álvarez, A.J., Mayo-Prieto, S., Álvarez-García, S., Reinoso, B., & Casquero, P.A. (2020). Genetic response of common bean to the inoculation with indigenous *Fusarium* isolates. *Journal of Fungi*, 6(4), 228. <https://doi.org/10.3390/jof6040228>
- Puia, J.D., Carvalho, M.A. de, Moreira, A.M. da S., Vigo, S.C., & Canteri, M.G. (2025). Endophytic survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in cultivated plants. *Ciencia Rural*, 55(9), e20230463. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20230463>
- Quiñones-Aguilar, E.E., Reyes-Tena, A., Rincón-Enríquez, G., Rico-Aguilar, J.C., & López-Pérez, L. (2025). Extracto de actinomicetos contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* en *Phaseolus vulgaris*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 43(4), 73. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-02>
- Romero, G., González, S., Royero, W., & González, A. (2024). Morphological and transcriptional analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* race 7 during early stages of infection in common bean. *Genetics and Molecular Biology*, 47(1), e20220263. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2022-0263>
- Saad, A., Vaghefi, N., Poudel, B., Young, A.J., Kelly, L.A., & Knight, N.L. (2025). Plasmid copy number variation impacts pathogenicity and quantification of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* infecting mung bean [Preprint]. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2025.01.22.634406>.
- SADER Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural & Dirección General del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (DGSIAP). (2025). Panorama agroalimentario 2025: Fortaleciendo la estadística agroalimentaria desde la raíz. Gobierno de México. https://nube.agricultura.gob.mx/panorama_dgsiap/2025.pdf (consultado el 28 de abril de 2026).
- SADER Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). Frijol [Ficha técnica]. Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256428/B_sico-Frijol.pdf (consultado el 01 de octubre de 2025).
- Sakshi, S., Kansal, S., Parwan, S., Gupta, S., Barwal, A., & Thakur, S. (2025). Prevalence and survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* causing bacterial blight in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Scientific Research and Reports*, 31(8), 64-70. <https://doi.org/10.9734/jsrr/2025/v31i83351>
- Sansala, M., Kuwabo, K., Hamabwe, S.M., Kachapulula, P., Parker, T., Mukuma, C., & Kamfwa, K. (2024). Race structure and molecular diversity of *Colletotrichum lindemuthianum* of common bean in Zambia. *Plant Disease*, 108(4), 857-865. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-23-0143-RE>

- Sasseron, G.R., Benchimol-Reis, L.L., Perseguini, J.M.K.C., Paulino, J.F.C., Bajay, M.M., Carbonell, S.A.M., & Chiorato, A.F. (2020). *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* genetic variability assessed by newly developed microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2), e20190267. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0267>
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2024). Frijol: Escenario mensual de productos agroalimentarios [Informe]. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/953032/Frijol_Sep_2024.pdf (consultado el 05 de octubre de 2025).
- Sigillo, L., & Dell'Olmo, E. (2025). *Macrophomina phaseolina* (charcoal rot of bean/tobacco) [Datasheet]. *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.32134>
- Singh, B.P., Singh, G., Kumar, K., Nayak, S.C., & Srinivasas, N. (2020a). Management of fungal pathogens in pulses: Current status and future challenges. *Springer International*.
- Singh, D., & Rathaur, P.S. (2020b). Detection of seed and propagating material-borne bacterial diseases of economically important crops. In R. Kumar & A. Gupta (Eds.), *Seed-borne diseases of agricultural crops: Detection, diagnosis & management* (pp. 143-167). *Springer*. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9046-4_6
- SNICS Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (2016). Diversidad de frijol en México. <https://www.gob.mx/snics/articulos/diversidad-de-frijol-en-mexico> (consultado el 08 de octubre 2025).
- SNICS Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (2022). Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. <https://www.gob.mx/snics/articulos/catalogonacional-de-variedades-vegetales-cnvv-2022> (consultado el 25 de septiembre 2025).
- Sodji, F., Tengey, T.K., & Kwoseh, C.K. (2025). Identification of new sources of resistance to charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in cowpea. *BMC Plant Biology*, 25, 659. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06628-1>
- Spagnoletti, F.N., Leiva, M., Chiocchio, V., & Lavado, R.S. (2018). Phosphorus fertilization reduces the severity of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) and the arbuscular mycorrhizal protection in soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 181(6), 899-907. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700569>

- Vasebi, Y., Safaie, N., & Alizadeh, A. (2013). Biological control of soybean charcoal root rot disease using bacterial and fungal antagonists in vitro and greenhouse condition. *Journal of Crop Protection*, 2(2), 139-10.
- Wani, S., Nisa, Q., Fayaz, T., Nabi, N., Nabi, A., Lateef, I.,...Padder, B.A. (2023). An overview of major bean diseases and current scenario of common bean resistance. *En Diseases in Legume Crops: Next Generation Breeding Approaches for Resistant Legume Crops* (pp.99-123). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3358-7_5
- Yang, P., Chang, Y., Wang, L., Wang, S., & Wu, J. (2022). Regulatory mechanisms of the resistance to common bacterial blight revealed by transcriptomic analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12, 800535. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.800535>
- Yoshii, K. (1980). Common and fuscous blights. En H.F.Schwartz & G.E. Gálvez (Eds.), Problemas de producción de frijol: Enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris* (pp. 155-171). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Zitnick-Anderson, K., Oladzadabbasabadi, A., Jain, S., Modderman, C., Osorno, J.M., McClean, P.E., & Pasche, J.S. (2020). Sources of resistance to *Fusarium solani* and associated genomic regions in common bean diversity panels. *Frontiers in Genetics*, 11, 475. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00475>

CAPITULO III. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS A PARTIR DE SEMILLAS NATIVAS DE FRIJOL DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA

RESUMEN

La Sierra Norte de Puebla representa una de las regiones con mayor diversidad de frijol nativo en México, material genético con gran importancia cultural y agrícola cultivado principalmente por pequeños productores para autoconsumo. No obstante, la mayoría de los estudios fitopatológicos se han enfocado en variedades comerciales, y no nativas, limitando el conocimiento sobre enfermedades que afectan su conservación en campo y la calidad de la semilla.

Los hongos fitopatógenos constituyen los principales agentes causales de pérdidas en el cultivo de frijol, siendo transmitidos en la mayoría de los casos por semilla. El objetivo de esta investigación fue identificar hongos en colecciones de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla, mediante caracterización patogénica, morfológica y genética para determinar la presencia de fitopatógenos. Se evaluó como hipótesis la presencia o ausencia de hongos fitopatógenos en las 11 colectas analizadas y si la altitud influía sobre su diversidad.

Las semillas fueron analizadas mediante incubación en medio de cultivo PDA y pruebas de germinación. La identificación mezcló análisis morfológico (basado en literatura especializada), pruebas de patogenicidad en plántulas y semillas de frijol y secuenciación molecular de los genes Translation elongation factor 1-alpha (TEF1 α) (*Fusarium*), RNA polymerase second largest subunit (RPB2) (*Alternaria* y *Rhizoctonia*), e Internal transcribed spacer (ITS) (*Macrophomina*). Se identificaron un total de 17 especies fúngicas. De estas, 11 correspondieron al género *Fusarium*, distribuidas en los complejos de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC; n = 3), *Fusarium chlamydosporum* (FCSC; n = 1), *Fusarium fujikuroi* (FFSC; n = 6) y *Fusarium oxysporum* (FOSC; n = 1). Cuatro aislamientos pertenecieron al género *Alternaria*, todos agrupados a la sección *Alternaria* dentro del complejo de especies *Alternaria alternata*. Además, se identificó un aislamiento de *Macrophomina phaseolina* y uno de *Rhizoctonia solani*.

Palabras clave: *Fusarium*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria*, secuenciación molecular.

³ Tesis de Maestría en Ciencias, Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Alejandra Sánchez Estrada
Director de tesis: Luciano Martínez Bolaños

CHAPTER III. DETECTION AND IDENTIFICATION OF PLANT-PATHOGENIC FUNGI IN NATIVE BEAN SEEDS FROM THE SIERRA NORTE DE PUEBLA

ABSTRACT

The Sierra Norte de Puebla is one of the regions with the greatest diversity of native beans in Mexico; this genetic material is of great cultural and agricultural importance and is cultivated primarily by small-scale farmers for their own consumption. However, most phytopathological studies have focused on commercial varieties rather than native ones, limiting our understanding of the diseases that affect their conservation in the field and seed quality.

Plant pathogenic fungi are the primary agents causing losses in bean crops, transmitted in most cases via seed. The objective of this research was to identify fungi in collections of native bean seeds from the Sierra Norte de Puebla through pathogenic, morphological, and genetic characterization to determine the presence of plant pathogens. The hypothesis evaluated was the presence or absence of phytopathogenic fungi in the 11 collections analyzed and whether altitude influenced their diversity.

The seeds were analyzed through incubation in PDA culture medium and germination tests. Identification combined morphological analysis (based on specialized literature), pathogenicity tests on bean seedlings and seeds, and molecular sequencing of the Translation elongation factor 1-alpha (TEF) (*Fusarium*), RNA polymerase second largest subunit (RPB2) (*Alternaria* and *Rhizoctonia*), and Internal Transcribed Spacer (ITS) (*Macrophomina*). A total of 17 fungal species were identified. Of these, 11 belonged to the genus *Fusarium*, distributed among the species complexes *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC; n=3), *Fusarium chlamydosporum* (FCSC; n=1), *Fusarium fujikuroi* (FFSC; n=6), and *Fusarium oxysporum* (FOSC; n=1). Four isolates belonged to the genus *Alternaria*, all grouped in the *Alternaria* section within the *Alternaria alternata* species complex. In addition, one isolate of *Macrophomina phaseolina* and one of *Rhizoctonia solani* were identified.

Keywords: *Fusarium*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* spp., Molecular sequencing

⁴ Master's Thesis in Plant Protection Sciences, Autonomus University of Chapingo
Author: Alejandra Sanchez Estrada
Thesis director: Luciano Martinez Bolaños

3.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de frijol se enfrenta a diversas limitantes, entre las que destacan las enfermedades, las cuales afectan de manera significativa su productividad (Granados-Montero *et al.*, 2021). En este contexto los hongos transmitidos por semilla representan un riesgo a nivel mundial, ya que pueden causar marchitamiento y otros daños severos en las plantas (Mahmoud *et al.*, 2013). Los patógenos fúngicos que afectan a las semillas se clasifican en patógenos de campo y de almacenamiento (Amza, 2018). Los hongos de almacenamiento deterioran las semillas hasta el punto de volverlas inadecuadas tanto para su consumo como para la siembra (Almeida *et al.*, 2022), mientras que los hongos de campo contaminan las semillas durante su desarrollo en la planta madre o después de la maduración de los frutos (Almeida *et al.*, 2022).

En una investigación enfocada en la detección de hongos fitopatógenos asociados a semillas de colecciones nativas de frijol en México, se reportó la presencia de nueve géneros fúngicos: *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Talaromyces*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Cephalosporium* y *Aspergillus*, siendo *Fusarium* y *Penicillium* los géneros de mayor relevancia debido a su alta incidencia (Vásquez-Siller *et al.*, s.f.).

En otro estudio realizado con diferentes variedades de frijol, entre ellas Flor de Mayo M38, Azufrado Tapatío, Pinto Zapata y Pinto Villa, en el estado de Aguascalientes, se identificaron hongos fitopatógenos en el siguiente orden de importancia: *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Pythium*. En dicho estudio, la variedad Azufrado Tapatío mostró el mayor nivel de infección en la semilla y el menor rendimiento de grano (Groenewold-Labrada *et al.*, 2003).

Existen estudios enfocados a la sanidad de las semillas de frijol comercial, mientras que las semillas nativas han sido poco estudiadas en México, a pesar de su gran relevancia agrícola, cultural, social y genética. Sin embargo, no existe información acerca de la presencia de hongos fitopatógenos asociados a semillas

de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla. Usualmente estas semillas suelen ser destinadas al autoconsumo y los productores las utilizan como material de siembra en ciclos agrícolas subsecuentes, por lo tanto, incrementa el riesgo de la diseminación de enfermedades y logra afectar el rendimiento del siguiente cultivo. Debido a que los patógenos transmitidos por semilla representan una fuente importante de inóculo primario, su detección temprana resulta fundamental para prevenir la propagación de enfermedades.

Con base en estos antecedentes el objetivo de la presente investigación fue detectar e identificar los hongos fitopatógenos que se encuentran en las semillas nativas de frijol de la Sierra Norte de Puebla, una región que no ha sido previamente estudiada y que se caracteriza por tener una amplia diversidad de semillas nativas de frijol, esto con el fin de obtener información acerca de la diversidad de hongos fitopatógenos que existen en la zona. Por ello, los resultados de este experimento contribuirán a la investigación fitosanitaria del frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla, como base para el diseño de un manejo integrado de enfermedades fúngicas, para posteriores investigaciones y para la conservación de las semillas nativas en el país.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Obtención y selección de muestras

El experimento se realizó con muestras de la colección del banco de germoplasma de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla, resguardado en la Universidad Autónoma Chapingo. Los grupos de semillas que se ocuparon para la presente investigación correspondieron a peligro de extinción y nativas.

Para la selección de las muestras del banco de germoplasma se realizó un muestreo aleatorio estratificado, con el propósito de garantizar que la muestra de la población fuera representativa (Makwana *et al.*, 2023). La estratificación del muestreo se realizó con base a la altitud de cada colecta, ya que, de acuerdo con

Bonfim *et al.* (2016), los factores bióticos y abióticos que influyen en la diversidad del microbiota varían según la alta diversidad de plantas y la variación altitudinal, lo que genera una amplia variedad de hábitats para los hongos.

La altitud se segmentó en intervalos de 500 m.s.n.m., definidos como estratos, considerando que dentro de este rango podrían presentarse diferencias en la presencia o ausencia de especies de hongos fitopatógenos, lo que garantizó una representación adecuada de la población. Posteriormente, se seleccionó de manera aleatoria una colecta por estrato y a partir de cada colecta, se tomaron 20 semillas al azar para su análisis.

3.2.2. Aislamiento y Purificación

Las semillas se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 3 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (1 min por enjuague). Una vez finalizado el proceso, las semillas se colocaron sobre papel absorbente estéril durante 1h a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad.

Para el aislamiento de los hongos fitopatógenos se emplearon dos metodologías. La primera consistió en el método de incubación en medio de cultivo, siguiendo el protocolo de diagnóstico: “Detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de semillas” (DGSV, 2018). Se sembraron 20 semillas por colecta en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) acidificado (12 gotas de ácido láctico al 85% por cada 500 mL de medio, incorporado antes de vaciar en las cajas). Se colocaron cuatro semillas por caja, fijándolas adecuadamente al agar para evitar su movimiento durante la incubación. Las cajas se incubaron a 25°C durante un periodo máximo de ocho días. Las semillas se examinaron diariamente bajo microscopio estereoscópico y las que presentaron crecimiento fúngico, se seleccionaron para la transferencia del micelio a medio de cultivo PDA. Los aislamientos obtenidos se purificaron mediante el método de punta de hifa.

La segunda metodología empleada fue la prueba de germinación (Zhang *et al.*, 2023). Se sembraron 20 semillas por colecta en vasos de unicel con una mezcla estéril de tierra y peat moss. Los vasos se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, monitoreando y controlando la temperatura con un termómetro digital (Steren). Para tener condiciones de alta humedad favorables al desarrollo de hongos, cada vaso se cubrió con una bolsa de polipapel perforada (en forma de microtúnel), ajustándola conforme crecían las plántulas para evitar daños mecánicos. Diariamente se asperjó agua destilada estéril con atomizador. Las semillas y plántulas se observaron durante 30 días.

Cuando se observaron síntomas de hongos, se realizaron distintos métodos de aislamiento según el sitio de manifestación. Para semillas no germinadas, estas se trasladaron al laboratorio y se examinaron mediante un microscopio estereoscópico; aquellas con micelio visible en la testa o el hilo se utilizaron para transferir el micelio a PDA, seguido de su purificación por punta de hifa.

Por otro lado, las plantas de frijol que presentaron hojas con síntomas de manchas necróticas rodeadas por halos cloróticos se trasladaron al laboratorio. Las hojas se lavaron con agua corriente y posteriormente se cortaron fragmentos cuadrados de aproximadamente 0.5 cm x 0.5 cm, tomados del avance de la enfermedad y se desinfestaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min, seguidos de tres enjuagues con agua destilada estéril (1 min cada uno). Los fragmentos se dejaron secar sobre papel absorbente estéril cerca de un mechero Fisher. Una vez secos, se transfirieron a cajas Petri con PDA e incubaron a 25°C durante siete días. Al observar crecimiento micelial, los aislamientos se purificaron por punta de hifa.

Todas las cepas purificadas se incubaron bajo luz blanca a temperatura ambiente para inducir su esporulación y facilitar la identificación morfológica.

3.2.3. Identificación morfológica preliminar

Una vez obtenidos los cultivos puros derivados de los aislamientos fúngicos, se realizaron montajes temporales con la técnica de cinta adhesiva, de acuerdo con DGSV (2018).

Con base a la identificación preliminar, los aislamientos correspondientes al género *Alternaria* sp. se transfirieron a medio de cultivo jugo de verduras V8 Agar (V8), preparado con 340 ml de jugo de verduras V8, 5 g de CaCO_3 , y 15 g de agar por litro de agua destilada, esto con el objetivo de inducir la esporulación conforme a lo mencionado por Simmons (2007). Para el resto de las especies se utilizó medio Papa Dextrosa Agar (PDA; BD Bioxon). Todas las cepas se incubaron bajo luz blanca a temperatura ambiente.

3.2.4. Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad con los aislados representativos con el objetivo de evaluar si las especies aisladas eran patógenas. Antes de realizar las pruebas, se llevó a cabo una revisión de literatura con la finalidad de identificar las enfermedades asociadas a cada género de hongo previamente identificado, y así, seleccionar la metodología de inoculación más idónea.

Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron semillas de frijol negro comercial marca La Merced. Las semillas se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 1 min; posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril hasta que se eliminaran los residuos de cloro y se colocaron sobre papel absorbente estéril durante 1 h para que se secaran.

Una vez desinfestadas, las semillas se sembraron en vasos de unicel con una mezcla estéril de suelo y peat moss. Se emplearon tres plantas por cada hongo aislado; durante las etapas de plántula y desarrollo vegetativo, se mantuvieron condiciones de invernadero y se regaron cada tercer día.

Para los hongos pertenecientes al género *Fusarium*, causantes de la marchitez radicular, las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo mediante la metodología de inmersión de raíces descrita por Ángel-García *et al.* (2018), con algunas modificaciones. Primero se lavaron las raíces de las plantas cuidadosamente con agua corriente tratando de eliminar todos los residuos de suelo. Posteriormente, se realizó una poda cortando aproximadamente el 60% de la longitud de las raíces, utilizando tijeras estériles.

Se preparó la suspensión conidial colocando 150 mL de agua destilada estéril en un vaso de licuadora pequeño (Oster) por cada caja Petri, junto con el micelio ya purificado. Este se recolectó raspando cuidadosamente con una aguja de disección estéril, procurando no arrastrar restos del medio de cultivo. La mezcla se licuó durante 20 s, se filtró en una coladera de malla fina, para evitar el paso de residuos del medio y se colocaron dos gotas de adherente dispersante Tween 20.

Se transfirió la suspensión conidial a tubos de ensayo estériles de vidrio (Pyrex), hasta rebasar ligeramente la mitad de su capacidad. Las plantas se sumergieron individualmente hasta la base del tallo. Las plantas testigo recibieron la misma poda que las plantas inoculadas, pero se sumergieron solo en agua destilada estéril. Todas permanecieron sumergidas 24h a temperatura ambiente en el laboratorio. Posteriormente, se trasplantaron a vasos de unicel con mezcla estéril de tierra y peat moss.

Las plantas se colocaron en condiciones de invernadero con bolsas de polipapel, las cuales se asperjaron todos los días con agua destilada estéril, con el fin de mantener las condiciones de temperatura y de humedad óptimas para el desarrollo del hongo inoculado. Las plantas se regaron cada tercer día y fueron analizadas diariamente.

En los hongos pertenecientes a los géneros *Rhizoctonia* y *Macrophomina*, las pruebas de patogenicidad se realizaron conforme al procedimiento de inoculación descrito por Velásquez-Valle y Medina-Aguilar (2003), con algunas

modificaciones. La inoculación se realizó en plantas de frijol, usando discos miceliales de 0.5 cm de diámetro por planta, extraídos con sacabocado estéril de colonias puras con crecimiento activo. Se hizo una pequeña incisión en cada planta, cerca de la base del tallo, con ayuda de un bisturí estéril. El disco micelial se colocó en medio de la herida, y se selló con Parafilm M. Las plantas testigo no fueron inoculadas.

Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, cubiertas con una bolsa de polipapel, que se asperjó todos los días con agua destilada estéril, con el fin de generar las condiciones ideales para el desarrollo de la enfermedad, se regaron cada tercer día y fueron observadas a diario para el registro de síntomas.

Para el género *Alternaria*, agente causal de manchas foliares, se realizó la prueba de patogenicidad conforme a Matić *et al.* (2020). La suspensión conidial se preparó según el procedimiento previamente descrito para *Fusarium*. Posteriormente, se procedió a realizar pequeñas heridas en la superficie adaxial de las hojas con aguja estéril. La inoculación consistió en la aspersión de 10 mL de la suspensión conidial por planta sobre el follaje, con tres repeticiones por cepa. Las plantas testigo se asperjaron solo con agua destilada estéril. Las plantas se colocaron bajo condiciones de invernadero; a cada planta se le colocó una bolsa de polipapel, y se asperjó todos los días con agua destilada estéril.

Asimismo, para el género *Alternaria*, se realizó una metodología basada en lo descrito por González-Cruces *et al.* (2022). Se seleccionaron y cortaron, con tijeras esterilizadas, tres folíolos aparentemente sanos por planta, con medidas aproximadas de 4.5 – 6.5 cm de ancho y 6.5 – 8.0 cm de largo. Los folíolos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril, de 1 min cada uno. Después se secaron sobre papel absorbente durante 1 h.

Una vez secos, los folíolos se colocaron individualmente en el centro de cajas Petri de vidrio previamente esterilizadas, acondicionadas como cámara húmeda. En cada caja Petri se colocó un círculo de papel filtro estéril, humedecido con

agua destilada estéril; sobre este se colocó un cuadro de malla plástica de 5 cm x 5 cm, y encima se colocó un foliolo por cada caja Petri. Se realizaron tres repeticiones por cada cepa. Sobre la superficie adaxial de cada foliolo se colocaron tres discos miceliales de 0.5 cm de diámetro, extraídos mediante sacabocado estéril. Los controles consistieron en foliolos sin inocular. Las cajas se sellaron con Parafilm M e incubaron a 25°C con fotoperiodo 12:12 h por siete días. Posteriormente se registraron los síntomas.

En todos los géneros de hongos aislados y mencionados anteriormente, se aplicó inoculación directa sobre semillas de frijol negro comercial (marca La Merced), previamente desinfestadas. Se utilizaron tubos Falcon estériles de 15 ml, con algodón estéril hasta casi completar su volumen. Se colocó una semilla por tubo, realizándose tres repeticiones por cepa. Se inocularon con 300 µL de suspensión conidial por tubo. Se agregó agua destilada estéril cada dos días para evitar desecación, y se realizaron observaciones diarias.

Tras concluir el periodo experimental de las pruebas de patogenicidad, y una vez recolectados los datos, fotografías y observaciones de los síntomas característicos de cada hongo, se procedió al reaislamiento de los patógenos. El procedimiento consistió en cortar tejido vegetal de la zona de avance de donde se encontraban los síntomas. El tejido se desinfestó y se sembró en cajas Petri con medio PDA. En casos donde había micelio visible en los síntomas, se extrajo una pequeña porción con aguja de disección estéril y se sembró directamente en el medio. Logrado el crecimiento fúngico, se compararon la morfología colonial y la conidial del aislado inicial con el reaislado mediante montajes para su identificación, confirmando el cumplimiento de los postulados de Koch.

3.2.5. Identificación molecular

3.2.5.1. Extracción de DNA

Aislamiento y lisis celular

El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) al 2% descrito por Lee y Taylor (1990), con optimizaciones para tejidos fúngicos recalcitrantes. Se utilizó micelio fresco obtenido de cultivos puros y jóvenes (7-10 días de crecimiento) en medio Papa Dextrosa Agar (PDA). Para minimizar la transferencia de polisacáridos del medio, el micelio se recolectó mediante raspado superficial con una espátula estéril y se transfirió a un mortero estéril preenfriado, donde se maceró mecánicamente con buffer CTAB al 2%.

Extracción y purificación

El homogeneizado se resuspendió en 1 ml de buffer CTAB al 2% precalentado. Para maximizar la lisis de la pared celular, se añadieron 100 µL de SDS al 10% y se incubó la mezcla en baño térmico a 65°C durante 60 – 90 min, aplicando agitación vigorosa mediante vórtex (Vortex-2 Genie Scientific Industries) cada 15 min. La purificación de los ácidos nucleicos se realizó mediante la adición de 800 µL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), seguida de una agitación por inversión durante 15 min para desnaturalizar proteínas y separar las fases.

Precipitación y lavado

Tras la centrifugación (Eppendorf 5424 R) a 13 523 ×g por 15 min a 4°C, el sobrenadante se recuperó cuidadosamente. El ADN se precipitó mediante la adición de un volumen igual de isopropanol absoluto frío, incubándose a -20°C durante toda la noche para maximizar el rendimiento. El precipitado se recuperó por centrifugación a 13 523 ×g durante 20 min. El pellet resultante se lavó dos veces con etanol al 70% (v/v) para eliminar sales residuales, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µL de agua grado biología molecular.

Control de calidad

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v). La concentración (ng/µL) y los índices de pureza (A260/A280 y A260/A230)

se determinaron mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Solo las muestras que cumplieron con criterios adecuados de integridad, calidad y concentración fueron seleccionadas para las aplicaciones de PCR posteriores.

3.2.5.2. PCR, Secuenciación, y edición de secuencias

Se amplificaron y secuenciaron en ambas direcciones tres loci diferentes: TEF1 (translation elongation factor 1-alpha) (O'Donnell *et al.*, 1998), utilizado para los aislamientos pertenecientes al género *Fusarium*; RPB2 (RNA polymerase second largest subunit) (Liu *et al.*, 1999), empleado para los géneros *Alternaria* y *Rhizoctonia*; e ITS (internal transcribed spacer) (Schoch *et al.*, 2012), utilizado para el género *Macrophomina*. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad DNA Engine. Los pares de cebadores, así como los programas de amplificación por PCR se enlistan en el Cuadro 1.

Para los tres pares de cebadores, la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL. Cada mezcla de reacción contenía 5 µL de buffer PCR 1x (Promega), 1.5 µL de MgCl₂ (1.5 mM) (Promega), 0.5 µL de dNTP's (0.2mM) (Promega), 1.25 µL de cada cebador (forward y reverse) (IDT) a una concentración final de 0.5 µM, 0.125 µL de Taq ADN polimerasa (2.5U) (Promega), 2 µL de ADN (2 – 40 ng/ µL) y 13.375 µL de agua libre de nucleasas.

Al finalizar el programa de amplificación, se corrió la electroforesis a 70 V durante 90 minutos, en un gel de agarosa al 1.5%. Se cargaron 5 µL del producto de PCR mezclados con 3 µL de buffer de carga Blue/Orange teñido con GelRed. Como marcador de peso molecular se utilizó el 1kb DNA Ladder (Promega). Los fragmentos amplificados se observaron en un fotodocumentador Bio-Rad.

La purificación y secuenciación de los productos de PCR fue realizada por la empresa Macrogen con sede en Seúl, Corea del Sur.

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación se editaron y ensamblaron en secuencias consenso con ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, s.f.), resolviendo

ambigüedades por comparación de lecturas complementarias (forward y reverse).

Las secuencias consenso limpias de las regiones ITS (*Macrophomina*), RPB2 (*Rhizoctonia* y *Alternaria*) y TEF-1 α (*Fusarium* sp.) se analizaron mediante BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) para confirmar porcentajes de identidad (Altschul *et al.*, 1990; Camacho *et al.*, 2009). Se utilizó la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para ITS y RPB2, y adicionalmente la base de datos especializada FUSARIUM – ID v.3.0 para TEF-1 α (Torres-Cruz *et al.*, 2022), complementada con NCBI.

Las mismas bases de datos sirvieron para seleccionar y descargar secuencias de referencia, incluidas en alineamientos múltiples y reconstrucción filogenética posterior.

Cuadro 1. Cebadores utilizados, programa de amplificación para PCR y referencias empleadas.

Locus	Primer			Programa de amplificación	Referencias
	Nombre	Tamaño	Secuencia (5'-3')		
<i>tef 1</i>	EF1 EF2	750 pb	ATGGGTAAGGARGACAAGAC GGARGTACCAGTSATCATGTT	95°C 3min; 35 ciclos de 95°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 45 s; 72°C 10 min	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>rpb2</i>	RPB2-5F2 fRPB2-7cR	1000 pb	GGGGWGAYCAGAAGGC CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	95°C 5min; 30 ciclos de 95°C 1 min, 55°C 2 min, 72/Rampeo 1°C/s 2 min; 72°C 10 min	Dettman <i>et al.</i> , 2023 Peña-Zúñiga <i>et al.</i> (2025)
<i>ITS</i>	ITS1 ITS4	650 pb	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	95°C 3min; 35 ciclos de 95°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 45 s; 72°C 10 min	Dell'Olmo <i>et al.</i> , 2022

3.2.5.3. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron para los hongos de los géneros *Macrophomina*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Alternaria*. Las secuencias de regiones génicas seleccionadas; ITS para *Macrophomina*, TEF-1 α para *Fusarium*, y RPB2 para *Rhizoctonia* y *Alternaria*, se obtuvieron a partir de aislados de este estudio, secuencias de referencia y outgroups descargados del NCBI (Cuadro 2).

Para el análisis filogenético de *Macrophomina*, se incluyeron secuencias ITS de 16 aislados de referencia depositados en NCBI, un aislado de *M. phaseolina* obtenido en este estudio y siete outgroups pertenecientes a los géneros *Botryosphaeria* y *Guignardia*.

En el caso de *Fusarium*, se incluyeron secuencias del gen TEF-1 α de 17 aislados de referencia procedentes de NCBI y de la base de datos FUSARIUM – ID v.3.0, junto con las 11 secuencias de *Fusarium* generadas en este estudio y cinco secuencias de outgroups de los géneros *Nectria*, *Neonectria*, *Nectriaceae* (familia), *Stylonectria* y *Fusarium* (especie basal).

Para *Rhizoctonia*, se incluyeron secuencias del gen RPB2 de 16 aislados de referencia depositados en NCBI, un aislado de *Rhizoctonia solani* de este estudio y un outgroup del género *Botryobasidium*.

Finalmente, para *Alternaria*, se incluyeron secuencias del gen RPB2 de 8 aislados de referencia de NCBI, cuatro secuencias de *Alternaria* obtenidas en este estudio y tres outgroups correspondientes a los géneros *Stemphylium*, *Pleospora* y *Alternaria*.

Las secuencias se alinearon mediante el algoritmo MUSCLE implementado en el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 12) (Kumar *et al.*, 2024). Los alineamientos finales comprendieron 609 posiciones nucleotídicas para *Macrophomina*, 972 para *Fusarium*, 1040 para *Rhizoctonia* y 864 para *Alternaria*.

La selección del modelo de sustitución de nucleótidos se realizó en MEGA 12 utilizando el criterio de información bayesiano (BIC). Los modelos con mejor ajuste, junto con sus parámetros asociados (BIC, AICc, log-likelihood (lnL), proporción de sitios invariantes, parámetro de forma gamma cuando aplicable, razón de transición/transversión (R) y frecuencias nucleotídicas), se resumen en el siguiente Cuadro 3.

La reconstrucción filogenética se llevó a cabo mediante el método de máxima verosimilitud (ML) en MEGA 12, empleando el modelo seleccionado para cada análisis. Se realizaron 100 búsquedas heurísticas independientes y el soporte de los nodos se evaluó mediante 1000 réplicas de bootstrap. Los árboles se enraizaron con los outgroups correspondientes. La visualización y edición final de los árboles se realizó con el software Interactive Tree Of Life (iTOL v7) (Letunic & Bork, 2024).

Cuadro 2. Secuencias de referencia incluidas en el análisis filogenético.

Número de acceso de la cepa	Fuente de aislamiento	Origen	Números de acceso a GenBank
Macrophomina (ITS)			
-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kirguistán	MW193052
CPC 13086 = HMP 21-1	<i>Solanum melongena</i>	México	KF951700
-	<i>Pistacia vera</i>	California	MN097202
CPC 13084 = HMP 47-1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México	KF951698
-	<i>Pistacia vera</i>	California	MN097199
CPC 21524	<i>Hibiscus sabdarifa</i>	Senegal: San Luis	KF951799
-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nueva York	PV605619
-	<i>Morus alba</i>	India	HM990163
-	<i>Inula crithmoides</i>	España	HQ649831
-	<i>Pistacia vera</i>	California	MN097196
CPC 13085 = HMP 53	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México	KF951699
CPC 13080 = HMP 18 – 3	<i>Sesamum indicum</i>	México	KF951695
-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nicaragua	HQ625641
-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nueva York	PV605620
-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nueva York	PV605624
-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nicaragua	HQ625638
Z2M20-6*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	-
-	-	-	AY236949
-	-	-	JX646791
CBS 102374	-	-	FJ824767
CBS 111645			FJ824766
CBS 447.68			FJ824768
-	-	-	AY236943

CBS 164.96			AY640255
Fusarium (TEF-1 α)			
Z6M45-4*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
-	<i>Solanum tuberosum</i>	China	PQ823289
Z5M5-5*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
NRRL 43623	Humano	Colorado	GQ505661
NRRL 36548 = CBS 190.60	<i>Musa sapientum</i>	Congo	GQ505655
-	Suelo	Países Bajos	MZ921842
NRRL 26921 = CBS 731.87	<i>Triticum aestivum</i>	Alemania	GQ505600
NRRL 36269 = CBS 162.57	Plántula de <i>Pinus nigra</i>	Croacia	GQ505645
-	<i>Cucumis sativus</i>	China	PQ823111
Z5M22-14*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
Z5M22-14*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
NRRL 36495 = CBS 491.77	Suelo	Kuwait	GQ505421
Z5M22-14*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
CBS 531.95	<i>Zea mays</i>	-	MW402136
Z5M16-4*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
LC21650 = HSL4062	<i>Solanum lycopersicum</i>	China, Hebei Province, Handan City	PQ822610
Z6M45-4*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
CBS 119850	Suelo	Australia	MN534041
Z6M31-3*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
NRRL 46589	<i>Syagrus romanzoffiana</i> <i>Washingtonia robusta</i>	Florida	GQ154456
NRRL 45965	-	-	FJ985433
NRRL 53158	-	-	FJ985443
Z5M16-4*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
-	Liquen	China, Provincia de Guizhou	MW580500
Z6M45-4*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
Z5M16-4*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
NRRL25622	<i>Zea mays</i>	Sur de África	AF160301
CBS 135541	<i>Quercus humana</i>	México	MW402051
-	<i>Malus domestica</i>	Brasil	ON755866

-	Madera	Alemania	MT151785
CBS 101734	-	-	FJ474076
CBS 139395	<i>Sarcococca</i> spp.	Maryland, Estados Unidos	GCA_004380915
CBS 111.93	-	-	NG_060389
<i>Rhizoctonia</i> (RPB2)			
CBS 523.96	-	-	DQ301751
CBS 207.84	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Japón	DQ301748
CBS 206.84	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Japón	DQ301747
-	<i>Oryzae sativae</i>	Japón	DQ301696
CBS 154.35	<i>Café</i> sp.	India	DQ301715
CBS 136.82	<i>Taxus</i> sp.	EE. UU	DQ301710
-	Suelo	Japón	DQ301741
Z6M35-5*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
-	Suelo	Japón	DQ301740
-	Suelo	USA	DQ301742
CBS 970.96	<i>Solanum tuberosum</i>	USA	DQ301752
-	<i>Glycine max</i>	Brasil	DQ301755
-	<i>Glycine max</i>	Japón	DQ301734
CBS 346.84	<i>Espinacia oleracea</i>	Países Bajos	DQ301750
-	<i>Solanum tuberosum</i>	USA	DQ301735
CBS 200.25	<i>Solanum tuberosum</i>	-	DQ301746
	<i>Daucus carota</i>	Serbia	MN999545
-	<i>Botryobasidium simile</i>	Alemania	DQ898770
<i>Alternaria</i> (RPB2)			
-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Irán	KT889299
-	<i>Helianthus annuus</i>	India	OQ434737
-	<i>Zea mays</i>	China	MZ144833
-	<i>Arachis hypogaea</i>	India	KC584375
-	<i>Zea mays</i>	China	MZ293230
Z5M22-14*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
Z6M45-4*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
Z6M35-5*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
CBS 795.72	<i>Plantago aristata</i>	USA	KP124778
Z6M31-3*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México (Puebla)	
CBS 154.31	<i>Staphylea trifolia</i>	USA	KP124769
-	<i>Paeonia lactiflora</i>	Corea del Sur	PV640557
CBS 191.86	<i>Medicago sativa</i>	India	KC584471

-	<i>Sphaeria herbarum</i>	-	DQ247794
CBS 124392	<i>Solanum melongena</i>	China	KC584374

Nota: Los aislados de este estudio considerados en el análisis filogenético tienen el signo (*).

Cuadro 3. Variables de los modelos seleccionados para los análisis filogenéticos.

Género	Región génica	Modelo seleccionado	BIC	AICc	InL	Invariantes	Gamma	R	Frecuencias nucleotídicas
<i>Macrophomina</i>	ITS	K2+I	4367.395	4022.450	-1964.027	0.563	-	1.556	Iguals (0.25 cada base)
<i>Fusarium</i>	TEF-1 α	K2+G+I	12126.653	11609.791	-5738.659	0.079	2.883	1.692	Iguals (0.25 cada base)
<i>Rhizoctonia</i>	RPB2	K2+G+I	12264.320	11998.601	-5963.188	0.192	0.341	5.857	Iguals (0.25 cada base)
<i>Alternaria</i>	RPB2	K2+I	4062.760	3850.477	-1896.161	0.704	-	3.485	Iguals (0.25 cada base)

3.2.6. Caracterización morfológica

Con base en las características previas observadas de las estructuras de los hongos, se procedieron a realizar los montajes permanentes.

Para los géneros *Alternaria*, *Macrophomina*, y *Rhizoctonia*, se realizaron preparaciones permanentes directas. Para esto, se colocó una gota de glicerol sobre un portaobjetos y, con ayuda de un alfiler entomológico y un microscopio estereoscópico, se tomó una pequeña porción de micelio y se depositó en la gota. Después se colocó un cubreobjetos y se procedió a sellar la preparación con barniz transparente, dejándose secar para su observación.

En el caso del género *Fusarium*, se realizaron montajes permanentes mediante la técnica de microcultivo. Se utilizó una caja Petri de vidrio y se colocó en su interior papel absorbente, humedecido con agua destilada estéril. Sobre este se colocaron dos palillos de madera estériles, los cuales sirvieron de soporte para colocar un portaobjetos. Después, se colocó un cuadro de 1 x 1 cm de medio de cultivo PDA limpio sobre el portaobjetos. Posteriormente con ayuda de una aguja entomológica, se transfirió un poco de micelio del hongo aislado al cuadro de PDA y se colocó por encima un cubreobjetos. Los microcultivos se cerraron, se sellaron con Parafilm M y se colocaron bajo luz solar a temperatura ambiente

durante un periodo de siete días. Transcurridos los siete días de incubación, se preparó un nuevo portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y, con ayuda de unas pinzas de disección estériles, se transfirió el cubreobjetos colonizado del microcultivo al nuevo portaobjetos. Las preparaciones se observaron y fotografiaron con un microscopio compuesto (Olympus CX31).

Las mediciones de conidios se realizaron utilizando el software ImageJ, previamente calibrado. Para ello, se fotografiaron conidios por cada aislamiento fúngico en un microscopio compuesto a un aumento de 40X, con el objetivo de obtener los suficientes valores para promediar sus tamaños.

La identificación morfológica se basó en el tamaño, forma y color de los conidios, conidióforos, fiálides, hifas y en la morfología colonial en medio de cultivo. Para su posterior análisis se consultó la siguiente literatura; Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett & Hunter, 1998). Para el género *Fusarium*, The *Fusarium* Laboratory Manual (Leslie & Summerell, 2006), Fusarioid-ID Database (Crous *et al.*, 2021), A utilitarian approach to *Fusarium* identification (Summerell *et al.*, 2003), y FusaHelp (Infantino *et al.*, 2023), mientras que para el género *Alternaria*, *Alternaria: An Identification Manual* (Simmons, 2007). Además, se realizó la revisión de diferentes artículos científicos para corroborar la identificación de los hongos.

3.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

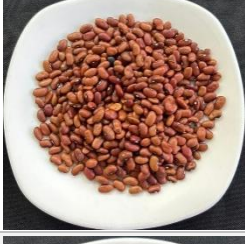
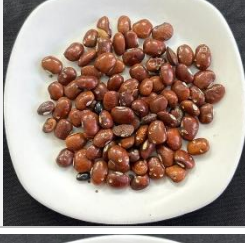
3.3.1. Obtención y selección de muestras

Mediante el método de muestreo aleatorio estratificado se seleccionaron al azar un total de 11 muestras de semillas de frijol, de las cuales cinco colectas correspondieron al grupo en “peligro de extinción” y seis colectas al grupo “nativo”, provenientes de la Sierra Norte de Puebla.

Las muestras elegidas al azar dentro de los intervalos altitudinales de 500 m.s.n.m. se muestran en la Cuadro 4.

Cuadro 4. Colectas seleccionadas mediante muestreo aleatorio estratificado.

Peligro de extinción			
Clave	Nombre del frijol	Altitud	Fotografía
Z5M5-5	Vaquita	10 m.s.n.m.	
Z5M22-14	Huarache-negro	560 m.s.n.m.	
Z5M16-4	Cimatl	1324.5 m.s.n.m.	
Z6M31-3	Conejillo	1960 m.s.n.m.	
Z6M45-4	Napual- negro	2180 m.s.n.m.	
Nativo			

Z2M20-6	Cuernito/Vainilla/Blanco	140 m.s.n.m.			
Z6M35-5	Ayocote morado	800 m.s.n.m.			
Z1M9-6	Rojo	1340 m.s.n.m.			
Z3M23-1	Gordo	1777 m.s.n.m.			
Z4M10-13	Mantequilla	2380 m.s.n.m.			
Z6M4-2	Ayocote	2750 m.s.n.m.			

3.3.2. Aislamiento y purificación

Durante el periodo de incubación de las semillas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), se observó la presencia de crecimiento fúngico en algunas

semillas, las cuales fueron evaluadas, mientras que otras no presentaron signos de hongos. Los aislamientos miceliales que se obtuvieron mostraron diferentes coloraciones (Cuadro 5).

Por otro lado, durante la prueba de germinación, se observaron semillas que no lograron germinar, algunas de las cuales se encontraban completamente cubiertas por micelio. Asimismo, se registró la presencia de plántulas con síntomas visibles, a partir de las cuales se realizaron los aislamientos (Cuadro 6).

Cuadro 5. Registro de aislamiento y características de crecimiento micelial de hongos aislados a partir de semillas incubadas en medio PDA.

Colecta	Grupo	Presencia de crecimiento fúngico	Origen de aislamiento	Días después de la siembra en que se aisló el crecimiento fúngico	Características del micelio
Z5M5-5	Peligro de extinción	Si	Semilla	8 días	-Blanco de textura pulverulenta. -Marrón con tonalidades amarillo claro y presencia de esclerocios color café claro.
Z5M22-14	Peligro de extinción	Si	Semilla	8 días	-Color verde oliva, con textura pulverulenta.
Z5M16-4	Peligro de extinción	Si	Semilla	8 días	-Color verde con tonalidades amarillo ocráceo, y de textura algodonosa.
Z6M31-3	Peligro de extinción	No			
Z6M45-4	Peligro de extinción	Si	Semilla	8 días	-Color café-grisáceo y textura aterciopelada.
Z2M20-6	Nativo	Si	Semilla	7 días	-Color gris, con textura algodonosa y con micelio abundante aéreo.
Z6M35-5	Nativo	Si	Semilla	8 días	-Conidióforos de color verde. -Color café algodonoso, y blanco.
Z1M9-6	Nativo	No			

Z3M23-1	Nativo	Si	Semilla	8 días	-Color verde oliva con tonalidades amarillo claro.
Z4M10-13	Nativo	No			
Z6M4-2	Nativo	Si	Semilla	8 días	-Color verde oliva pulverulento.

Cuadro 6. Registro de aislamiento y características de crecimiento micelial de hongos aislados a partir de semillas sembradas en peat moss.

Colecta	Grupo	Presencia de crecimiento fúngico	Origen de aislamiento	Días después de la siembra en que se aisló el crecimiento fúngico	Características de micelio
Z5M5-5	Peligro de extinción	Si	Cotiledón/ Semilla	13 días	-Color salmón pálido con textura algodonosa.
Z5M22-14	Peligro de extinción	Si	Semilla/ Hoja y Cotiledón	13 días	-Micelios color naranja, rosado, café oscuro y blanco con texturas algodonosas.
Z5M16-4	Peligro de extinción	Si	Semilla	19 días	-Micelios color blanco y rosado algodonoso.
Z6M31-3	Peligro de extinción	Si	Semilla/ Cotiledón	13 días	-Color rosado algodonoso. -Color café oscuro aterciopelado.
Z6M45-4	Peligro de extinción	Si	Semilla	9 días	- Color blanco y salmón algodonoso.
Z2M20-6	Nativo	No			
Z6M35-5	Nativo	No			
Z1M9-6	Nativo	No			
Z3M23-1	Nativo	No			
Z4M10-13	Nativo	No			
Z6M4-2	Nativo	No			



Figura 1. Crecimiento fúngico en ambas metodologías de semillas en peligro de extinción: (a – d) Z5M5-5; (e – h) Z5M22-14; (i – l) Z5M16-4; (m – o) Z6M31-3; (p – s) Z6M45-4.



Figura 2. Crecimiento fúngico en semillas incubadas en PDA de semillas nativas: (t – u) Z2M20-6; (w – y) Z6M35-5; (z) Z3M23-1; (*) Z6M4-2.

3.3.3. Identificación morfológica preliminar

A partir de las muestras de semillas de frijol criollo de la Sierra Norte de Puebla se obtuvieron un total de 37 aislamientos de hongos de ambos grupos analizados. Del total de aislamientos, 19 (51.35%) fueron identificados como pertenecientes al género *Fusarium*, los cuales se obtuvieron únicamente del grupo “peligro de extinción”.

Asimismo, nueve aislamientos (24.32 %) correspondieron al género *Alternaria*, de estos, siete se aislaron del grupo “en peligro de extinción” y dos del grupo “nativos”. En este último grupo también se identificó un aislamiento del género *Macrophomina* (2.70%) y uno del género *Rhizoctonia* (2.70%).

Siete aislamientos (18.91%) correspondieron al género *Aspergillus*, cuatro del grupo en “peligro de extinción” y tres del grupo “nativos”.

Todos los aislamientos fueron identificados en base a Barnett & Hunter, 1998.

Los géneros fúngicos que fueron analizados posteriormente correspondieron a *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia* y *Macrophomina*.

Mediante la técnica de cinta adhesiva se obtuvieron montajes directos de las colonias fúngicas, permitiendo una identificación previa basada en las características morfológicas macro y microscópicas. Los aislados se agruparon en grupos según sus similitudes fenotípicas.

De cada grupo morfológicamente similar se seleccionó una cepa representativa, para estudios posteriores, incluyendo: las preparaciones permanentes empleadas para la identificación morfométrica, la evaluación de patogenicidad (de acuerdo con el género fúngico previamente identificado), y el análisis molecular.

Se seleccionaron un total de 11 aislados representativos del género *Fusarium*, cuatro del género *Alternaria*, y los aislados únicos correspondientes a *Macrophomina* y *Rhizoctonia* (Figura 3).

Colecta/Grupo	Aislamiento en PDA	
Fusarium		
Z5M5-5 Planta 18/ Peligro de extinción		
Z5M22-14 Planta 3/ Peligro de extinción		
Z5M22-14 Planta 7/Peligro de extinción		
Z5M22-14 Planta 10/ Peligro de extinción		
Z5M16-4 Planta 1/ Peligro de extinción		
Z5M16-4 Planta 15/ Peligro de extinción		
Z5M16-4 Planta 17/ Peligro de extinción		
Z6M45-4 Planta 6/ Peligro de extinción		
Z6M45-4 Planta 11/Peligro de extinción		
Z6M45-4 Planta 20/ Peligro de extinción		
Z6M31-3 Planta 8/ Peligro de extinción		

Alternaria		
Z5M22-14 Planta 9/ Peligro de extinción		
Z6M31-3 Planta 10/ Peligro de extinción		
Z6M45-4 Semilla/Peligro de extinción		
Z6M35-5 Semilla/ Nativo		
Macrophomina		
Z2M20-6 Semilla/ Nativo		
Rhizoctonia		
Z6M35-5 Semilla/Nativo		

Figura 3. Aislamientos fúngicos seleccionados para el estudio.

3.3.4. Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad indicaron que las diecisiete especies de hongos evaluados fueron patógenas para *Phaseolus vulgaris* L. En las cepas correspondientes al género *Fusarium*, los síntomas se manifestaron en las tres

repeticiones realizadas. Su aparición se registró entre los 4 a 7 días posteriores a la inoculación, en ambas metodologías evaluadas.

En la mayoría de las cepas de *Fusarium* hubo presencia de síntomas como marchitez generalizada observada por el colapso y enrollamiento de las hojas primarias, así como el inicio de marchitez en la primera hoja trifoliada. Además, se observaron lesiones necróticas y pudrición en el cuello y raíces de la planta acompañado de poco desarrollo del sistema radical (Figura 4 y 5).

En las semillas inoculadas, se observó la presencia de micelio cubriendo la testa, lo que impidió su germinación en algunas de ellas. Las que lograron germinar mostraron pudrición y necrosis en el hipocótilo, radícula, cotiledones, y en hojas primarias en desarrollo (Figura 6).

Los síntomas observados corresponden a la pudrición radicular y en semilla, típica de la enfermedad causada por el género *Fusarium*. En comparación, no se observaron síntomas en los testigos.



Figura 4. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Fusarium* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. y cortes transversales de los tallos. a-b) Testigo; c-d) Z5M5-5 P18; e-f) Z5M22-14 P10; g-h) Z6M45-4 P6; i-j) Z5M22-14 P3; k-l) Z5M16-4 P1; m-n) Z6M45-4 P11; ñ-o) Z5M16-4 P15; p-q) Z6M31-3 P8.



Figura 5. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Fusarium* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. y cortes transversales de los tallos. a-b) Testigo; c-d) Z6M45-4 P20; e-f) Z5M22-14 P7; g-h) Z5M16-4 P17.

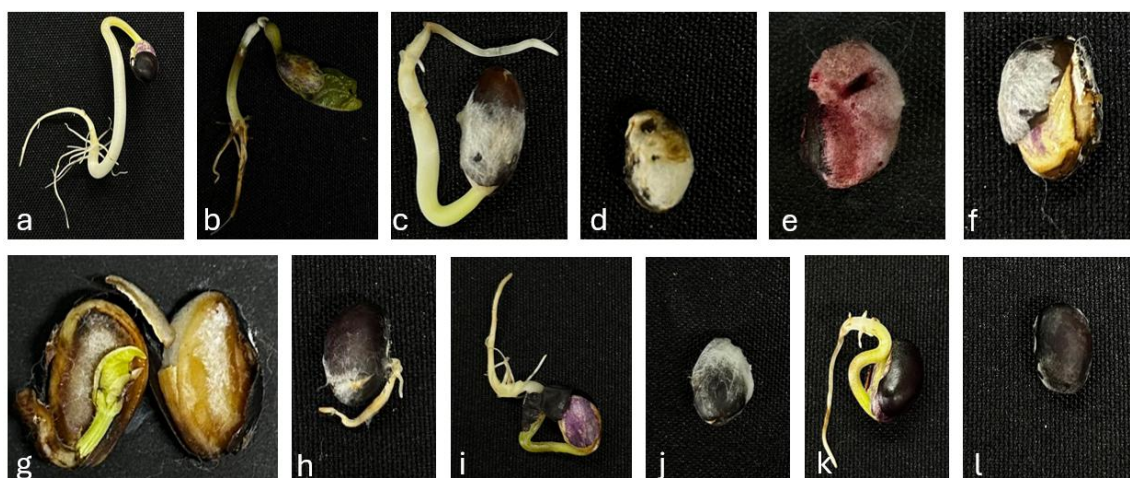


Figura 6. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Fusarium* en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b) Z5M5-5 P18; c) Z5M22-14 P10; d) Z6M45-4 P6; e) Z5M22-14 P3; f) Z5M16-4 P1; g) Z6M45-4 P11; h) Z5M16-4 P15; i) Z6M31-3 P8; j) Z6M45-4 P20; k) Z5M22-14 P7; l) Z5M16-4 P17.

Las plántulas y semillas inoculadas con las cepas correspondientes al género *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina* manifestaron síntomas en las tres repeticiones realizadas. Su aparición se registró entre los 8 y 9 días posteriores a la inoculación, en ambas metodologías evaluadas.

En plántulas, los síntomas correspondientes a la cepa de *Rhizoctonia solani*, se manifestaron inicialmente, en el sitio de inoculación, donde se observó una lesión de pudrición asociada con necrosis en el área de la herida. Posteriormente, la infección progresó hacia la parte basal del tallo y el sistema radical, donde se mostró una coloración marrón rojiza. Al inicio se presentó clorosis foliar, seguida de marchitamiento progresivo hasta el colapso total de las hojas. En el corte longitudinal del tallo se confirmó la presencia de pudrición con decoloración marrón rojiza de los tejidos internos y en algunas áreas con necrosis.

En las semillas inoculadas, aunque se registró germinación, se observó micelio superficial sobre la testa. En el hipocótilo, la radícula y las raíces secundarias se presentó pudrición severa de color marrón, con micelio blanco. La radícula presentó crecimiento raquítrico, con reducción significativa en grosor.

Por otro lado, en la cepa correspondiente a *Macrophomina phaseolina*, los síntomas en plántulas se manifestaron con una lesión necrótica en la zona de inoculación, acompañada de clorosis foliar y marchitamiento. En el corte longitudinal del tallo se evidenció la presencia de micelio y microesclerocios. Asimismo, en las semillas, tanto en el hilum como en los cotiledones, se observó necrosis con pudrición.

Los síntomas descritos corresponden con la manifestación de la enfermedad en plántulas y pudrición radicular, asociados a los patógenos *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*. No se observaron síntomas en los testigos.

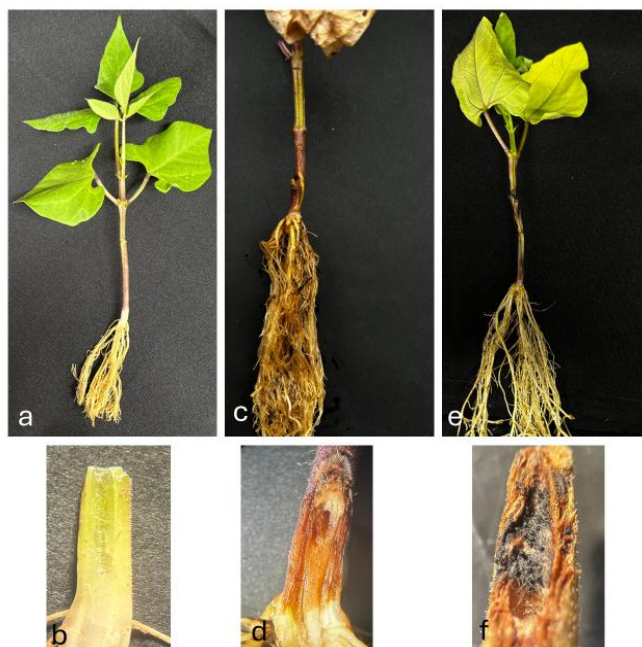


Figura 7. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Rhizoctonia* y *Macrophomina* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. y cortes transversales de los tallos. a-b) Testigo; c-d) *Rhizoctonia solani* Z6M35-5; e-f) *Macrophomina phaseolina* Z2M20-6.



Figura 8. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Rhizoctonia* y *Macrophomina* en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b) *Rhizoctonia solani* Z6M35-5; c) *Macrophomina phaseolina* Z2M20-6.

Las plántulas, foliolos y semillas inoculadas con las cepas de *Alternaria* manifestaron síntomas de manera consiste en las tres repeticiones. En inoculación por aspersión foliar, se observaron pequeñas manchas negras, en las hojas de las plántulas apenas perceptibles a simple vista, pero claramente visibles bajo microscopio estereoscópico. Estas lesiones fueron asociadas a un

crecimiento micelial escaso, pero característico de las fases iniciales de la infección por *Alternaria*.

En los folíolos se observaron halos cloróticos alrededor de los discos miceliales inoculados. El avance de la enfermedad provocó desecación foliar, necrosis, crecimiento micelial y finalmente, senescencia de la hoja.

Las semillas inoculadas lograron germinar, pero desarrollaron síntomas severos en cotiledones, hojas primarias, hipocótilo, radícula y raíces secundarias, como necrosis, pudrición y colonización del micelio. En algunos casos, la testa se encontró cubierta por micelio, acompañado de un desarrollo raquíptico del sistema radicular. Los testigos, no presentaron síntomas, durante el periodo de observación.

Los síntomas observados en las hojas y en las semillas coincidieron con los descritos para la mancha foliar por *Alternaria* sp., la pudrición de semillas y la marchitez de plántulas causadas por este género, respectivamente.

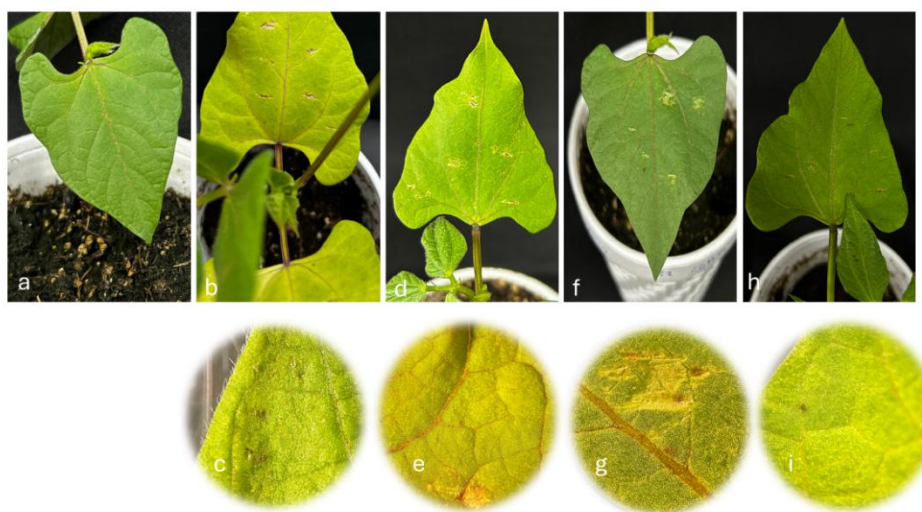


Figura 9. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Alternaria* en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b – c) Z5M22-14; d – e) Z6M31-3; f – g) Z6M35-5; h – i) Z6M45-4.

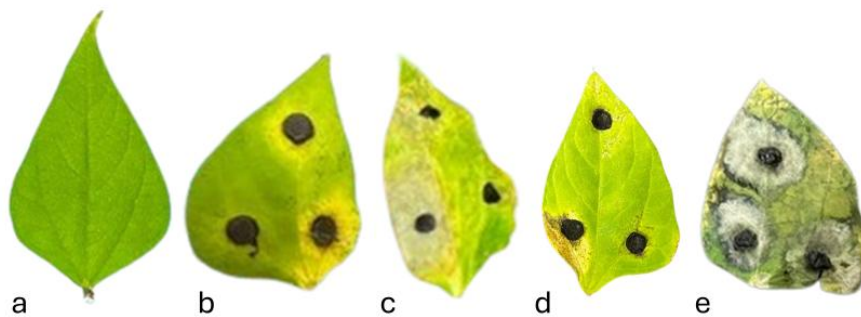


Figura 10. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Alternaria* en foliolos de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b) Z5M22-14; c) Z6M31-3; d) Z6M35-5; e) Z6M45-4.



Figura 11. Patogenicidad de las especies aisladas correspondientes al género *Alternaria* en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. a) Testigo; b) Z5M22-14; c) Z6M31-3; d) Z6M35-5; e) Z6M45-4.

Los reisolamientos realizados a partir de tejidos sintomáticos de todas las pruebas de patogenicidad produjeron hongos morfológicamente idénticos a los inoculados originales, confirmando así los postulados de Koch.

3.3.5. Identificación molecular y análisis filogenético

Macrophomina phaseolina

El análisis BLAST de la región ITS mostró 100% de identidad con secuencias de *Macrophomina phaseolina* depositadas en NCBI.

El análisis filogenético mediante máxima verosimilitud (modelo K2+I) generó un árbol bien resuelto (Figura 12). Todos los aislamientos de *Macrophomina*

phaseolina se agruparon en un clado monofilético con soporte bootstrap de 80%, claramente separado de los outgroups *Botryosphaeria* y *Guignardia*, cuyos nodos presentaron valores de bootstrap entre 77 – 100%. El aislamiento Z2M20-6, obtenido de frijol nativo en Puebla se ubicó dentro de este clado, confirmando su pertenencia a *M. phaseolina*. Este clado incluyó aislamientos provenientes de diversos hospedantes (*Phaseolus vulgaris*, *Solanum melongena*, *Pistacia vera*, *Prunus avium*, *Hibiscus saddarifa*, *Morus alba*, *Vitis vinifera* y *Sesamum indicum*), con soportes $\geq 80\%$ en nodos clave y algunos subgrupos con soporte moderado. En general, estos resultados muestran que existe una diversidad genética moderada y que no parece estar relacionada de manera clara con el tipo de planta hospedante ni con la región de origen.

Este resultado fue consistente con el árbol filogenético basado en la región ITS reportado por Dell'Olmo *et al.* (2022), en donde el estudio se enfocó en la identificación y caracterización de *Macrophomina phaseolina* en una leguminosa. En dicho estudio, todos los aislados de *M. phaseolina* se agrupan en un clado monofilético.

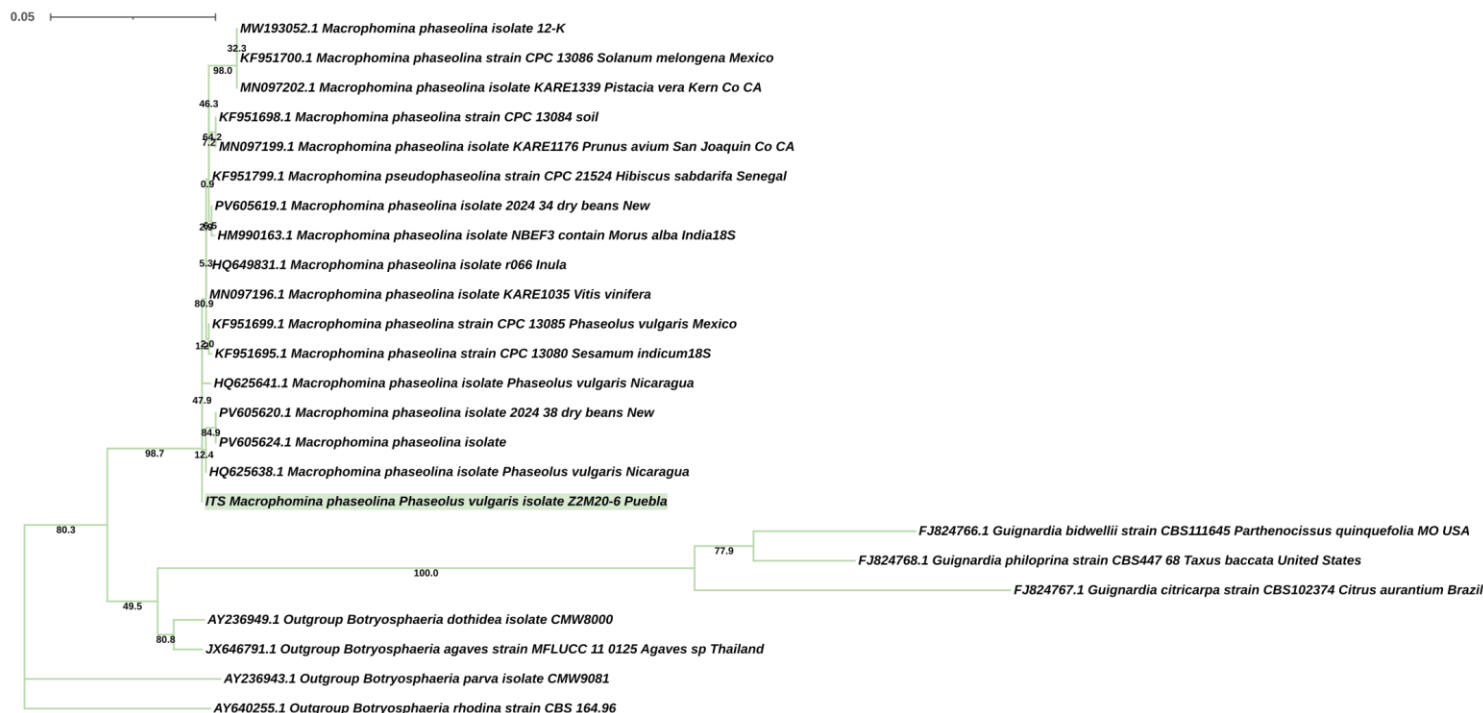


Figura 12. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región ITS de 17 aislamientos de *Macrophomina phaseolina* y outgroups. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.05 sustituciones por sitio. Enraizado con *Botryosphaeria* spp. y *Guignardia* spp.

***Fusarium* sp.**

El análisis BLAST de las secuencias parciales del gen TEF-1 α de los 11 aislados seleccionados mostró porcentajes de identidad del 99 – 100% con secuencias homólogas de *Fusarium* depositadas en la base de datos del NCBI. Específicamente, tres aislados mostraron mayor identidad con *Fusarium* sp., dos con *F. clavum*, dos con *F. verticillioides*, uno con *F. terricola*, dos con *F. temperatum* y uno con *F. oxysporum*.

El análisis filogenético realizado mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando el modelo K2+G+I, generó un árbol filogenético con topología bien

resuelta (Figura 13). El árbol evidenció cuatro clados principales bien soportados y claramente separados de los outgroups. Estos clados corresponden a complejos de especies reconocidos dentro del género *Fusarium*: el complejo *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) señalado de color rosa, el complejo *F. chlamydosporum* (FCSC) color amarillo, el complejo *F. oxysporum* (FOSC) color lila y el complejo *F. fujikuroi* (FFSC) color azul.

El clado superior del árbol filogenético con alto soporte bootstrap (>80% en la mayoría de los nodos internos), agrupó a las secuencias pertenecientes al FIESC. Dentro de este clado se distinguieron tres linajes; la cepa Z6M45-4 (*Fusarium* sp., Puebla) se agrupó con alto soporte junto a la secuencia de referencia de *F. paraclavum* (bootstrap = 97.2%); la cepa Z5M5-5 (*Fusarium* sp., Puebla) se asoció con la cepa de referencia *F. clavum* (bootstrap = 94.2%) y la cepa Z5M22-14 (*Fusarium* sp., Puebla), se ubicó junto a la cepa de referencia de *F. aflagelliforme* (bootstrap = 84.4%).

La cepa Z5M22-14 (*Fusarium* sp., Puebla), señalada en color amarillo en el árbol filogenético, formó un clado bien soportado junto a una secuencia de referencia de *Fusarium* sp., con un valor bootstrap de 99.8%. Este clado está asociado al FCSC.

La cepa Z5M16-4 (*F. oxysporum*, Puebla), destacada en color lila en el árbol, se agrupó junto con las demás secuencias correspondientes al FOSC, con un soporte bootstrap de 100%. Este resultado confirma su pertenencia al complejo.

El clado basal (inferior) del árbol, señalado en color azul, agrupó a las secuencias del FFSC, incluyendo seis aislados obtenidos en este estudio. Las cepas Z5M22-14 y Z5M16-4 (identificados como, *F. verticillioides*, Puebla) se agruparon con las secuencias de referencia de *F. verticillioides*, con un soporte bootstrap de 96.3%, confirmando su asignación a esta especie. Asimismo, la cepa Z6M45-4 (*F. terricola*, Puebla) se asoció con la cepa de referencia de *F. terricola*, con un soporte bootstrap de 99.8%; mientras que la cepa Z6M31-3 (*Fusarium* sp., Puebla) se ubicó dentro del FFSC, sin asociarse específicamente con ninguna

cepa de referencia disponible. Finalmente, los aislados Z6M45-4 y Z5M16-4 (identificados como *F. temperatum*, Puebla) se agruparon con cepas de referencia de *F. temperatum* procedentes de China, Africa y México.

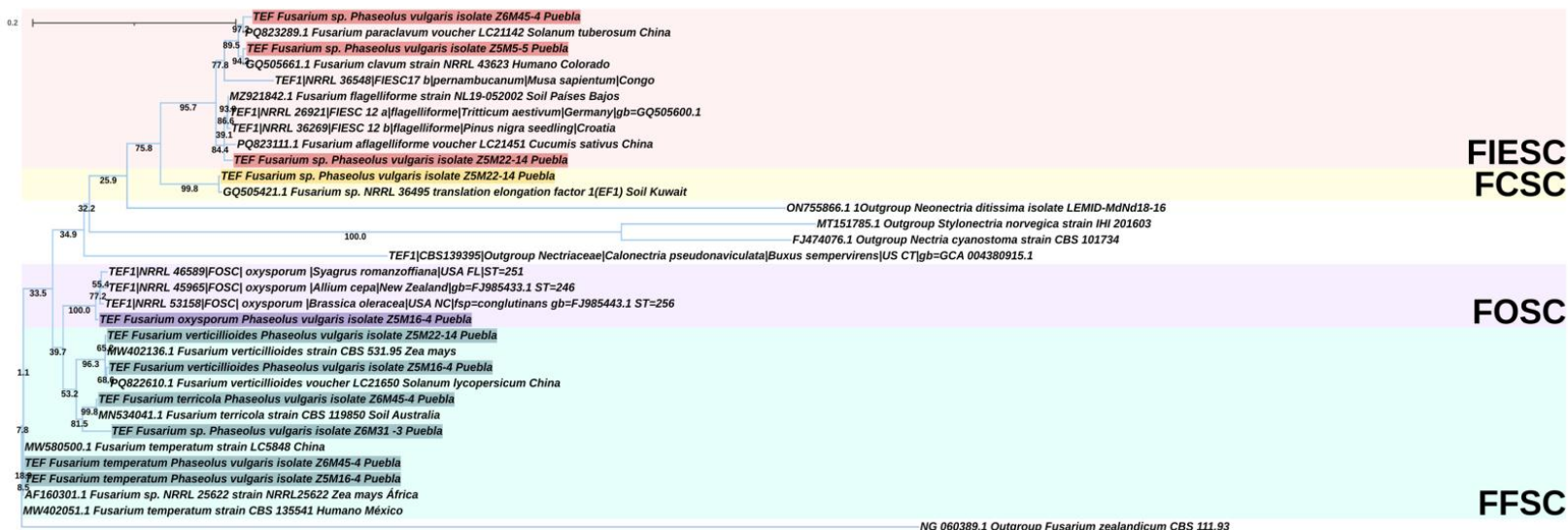


Figura 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región TEF-1 α de 28 aislamientos del género *Fusarium* y outgroups. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.20 sustituciones por sitio. Enraizado con *Neonectria ditissima*, *Stylonectria norvegica*, *Nectria cyanostoma*, *Nectriaceae* y *Fusarium zealandicum*.

Los resultados del árbol filogenético de *Fusarium* basados en TEF1- α coinciden con lo reportado por Ha *et al.* (2023), quienes caracterizaron la diversidad y patogenicidad de especies de este género aisladas de leguminosas en Corea. Aunque dicho estudio empleó la secuenciación de dos loci (TEF1- α y RPB2), el gen TEF1- α (utilizado exclusivamente en este estudio) es ampliamente reconocido como un marcador clave para la identificación de especies de *Fusarium* (Torres-Cruz *et al.*, 2022). En este contexto, la concordancia entre ambos estudios es esperable y corrobora su alta resolución. En ambos casos se identificaron varios complejos de especies, coincidencia particularmente en FOSC, FFSC y FIESC.

Además, en el árbol filogenético se observa que los clados FFSC y FOCS se agrupan como clados hermanos o estrechamente relacionados, lo que refleja su cercanía evolutiva. Estudios previos han señalado que la historia evolutiva que existe entre ambos complejos ha estado influenciada por eventos de flujo genético e introgresión, lo que contribuye a que frecuentemente se presenten como linajes adyacentes en las reconstrucciones filogenéticas (Brankovics *et al.*, 2020; Lizcano Salas *et al.*, 2024; Ha *et al.*, 2023).

El clado correspondiente al complejo de especies FCSC, agrupó una única cepa aislada en este estudio (TEF *Fusarium* sp. *Phaseolus vulgaris* isolate Z5M22-14 Puebla), la cual se agrupó con la secuencia de referencia GQ505421 (*Fusarium* sp. NRRL 36495, aislado de suelo en Kuwait). Dicha secuencia corresponde al aislado representativo de *F. humicola*, especie delimitada dentro del FCSC por Lombard *et al.* (2019) mediante análisis multilocus. En este trabajo, los autores redefinieron el complejo de nueve especies filogenéticas distintas, destacando su diversidad genética y su relevancia fitopatológica, particularmente en su capacidad para causar podredumbre radicular en plantas.

A pesar de que la rama correspondiente a la secuencia de referencia GQ505421 presentó una longitud ligeramente mayor, esta diferencia únicamente muestra la variabilidad entre la misma especie en el número de sustituciones nucleotídicas acumuladas dentro de *F. humicola*, que tiene que ver con la alta diversidad genética observada en especies del FCSC (O'Donnell *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2019). Sin embargo, la cercanía filogenética observada confirma que ambas secuencias pertenecen al mismo linaje filogenético.

Esta cercanía concuerda con lo reportado por O'Donnell *et al.* (2009), quienes generaron y depositaron la secuencia GQ505421 como parte de un esquema de tipificación multilocus (MLST) para el complejo. Es importante mencionar que, en el contexto de las leguminosas, datos similares se han reportado en semillas almacenadas de *Vigna unguiculata*, donde especies del FCSC se asocian con problemas de calidad, reducción de viabilidad y producción de micotoxinas (Viljoen *et al.*, 2025).

Rhizoctonia solani

El análisis BLAST de la región RPB2 mostró porcentajes de identidad del 97 – 99% con secuencias de *Rhizoctonia solani* y su teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* depositadas en NCBI.

El árbol filogenético obtenido mediante el método de máxima verosimilitud (modelo K2+G+I) mostró una topología general bien resulta, con valores de bootstrap altos (80 – 100%) en algunos de los nodos internos (Figura 14). Todos los aislados analizados formaron un clado monofilético claramente separado del outgroup. El aislado de este estudio, etiquetado como rpb2 *Rhizoctonia solani* *Phaseolus vulgaris* isolate Z6M35-5 Puebla, se agrupó dentro del clado correspondiente a la secuencia de referencia DQ301740 (*Thanatephorus cucumeris* AG-6HGI aislado de suelo en Japón), aunque con un soporte bootstrap moderadamente bajo (35%).

Aunque el gen RPB2 ha demostrado ser un marcador adecuado para la identificación filogenética del filo Basidiomycota (Matheny *et al.*, 2007), el bajo soporte bootstrap observado en este estudio sugiere que hubo una resolución limitada con un solo locus. Por lo tanto, para una identificación más precisa de grupos de anastomosis (AG) en *Rhizoctonia solani*, se recomienda utilizar análisis multilocus que incluyan ITS, TEF1 α , RPB1, RPB2, nucLSU, nucSSU, entre otros. Asimismo, se recomienda complementar con pruebas de anastomosis somática (fusión hifal) para confirmar la relación filogenética de este aislado con el grupo AG6 (Abbas *et al.*, 2022; Ferrucho *et al.*, 2012; Rentería – Martínez *et al.*, 2018; Sharon *et al.*, 2008; Woodhall *et al.*, 2022).

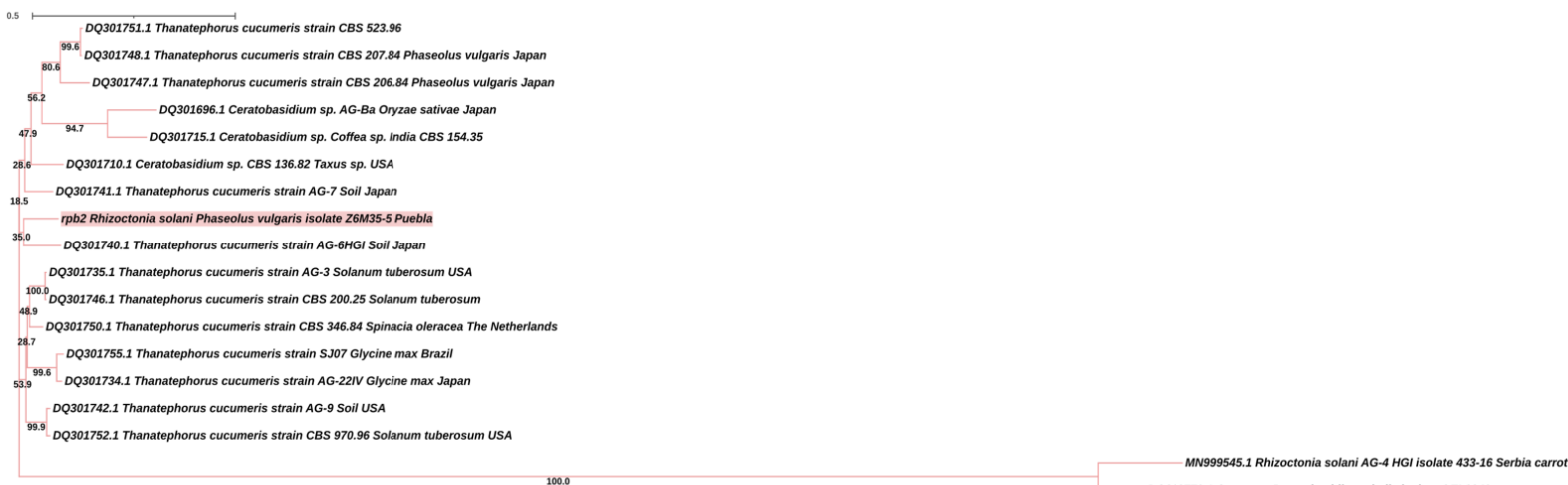


Figura 14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región RPB2 de 17 aislamientos del género *Rhizoctonia* y un outgroup. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.50 sustituciones por sitio. Enraizado con *Botryobasidium simile*.

***Alternaria* sp.**

El análisis BLAST de la región RPB2 mostró porcentajes de identidad del 99 – 100% con secuencias de *Alternaria tenuissima* y *alternata* depositadas en NCBI.

El análisis filogenético mediante máxima verosimilitud (modelo K2+I) generó un árbol con topología bien resuelta (Figura 15). Todos los aislados de *Alternaria* se agruparon en un clado monofilético, correspondiente al complejo de especies de esporas pequeñas de la sección *Alternaria* que incluye *A.alternata* y *A. tenuissima*, claramente separado de los outgroups *Alternaria alternantherae*, *Stemphylium herbarum*, y *Pleospora herbarum*, con un soporte bootstrap basal de 61%. Dentro de este clado se diferenciaron dos subclados bien soportados; uno con bootstrap de 98.8%, que agrupó a los aislados rpb2 *Alternaria* sp. *Phaseolus vulgaris* isolate Z5M22-14 y Z6M45-4 Puebla, junto con secuencias de referencia de China, India e Irán (de diversos hospedantes, incluyendo *Phaseolus vulgaris*), correspondientes a *A.alternata* y *A.tenuissima*. Otro con bootstrap de 95.1%, que incluyó a los aislados rpb2 *Alternaria* sp. *Phaseolus vulgaris* isolate

Z6M31-3 y Z6M35-5 Puebla, asociados con cepas de referencia de Estados Unidos identificados como *A. alternata*.

Una secuencia de referencia de *A. tenuissima* de *Paeonia lactiflora* (Corea) ocupó una posición hermana a estos dos subclados, manteniendo la monofilia general del clado.

El soporte bootstrap moderadamente bajo (61%) observado en el nodo basal del complejo de esporas pequeñas de la sección *Alternaria* refleja la limitada resolución filogenética que proporcionan loci individuales, como RPB2, en este grupo taxonómico. Esta baja robustez es consistente con la reducida divergencia genética entre las especies que integran el complejo (Woudenberg *et al.*, 2015).

El estudio pionero de Woudenberg *et al.* (2015), basado en un enfoque multilocus, demostró que la sección *Alternaria* comprende únicamente 11 especies filogenéticas bien definidas, mientras que las 35 morfoespecies descritas previamente no presentan diferencias genéticas suficientes y fueron sinonimizadas bajo *A. alternata*. Esto explica la falta de diferenciación entre *A. alternata* y *A. tenuissima* observada en el presente árbol filogenético, la cual es completamente consistente con estos hallazgos y destaca que la delimitación a nivel de especie dentro de este complejo requiere necesariamente enfoques multilocus o genómicos, capaces de superar la escasa variabilidad genética en los marcadores convencionales.

Adicionalmente, como lo menciona Dettman *et al.* (2023), la identificación precisa de especies dentro de la sección *Alternaria* es un verdadero desafío por dos razones principales: (1) las características morfológicas “diagnosticadas” tienden a ser fenotípicamente variables y se superponen entre especies, y (2) los marcadores moleculares tradicionales empleados en filogenia de hongos carecen de la resolución informativa necesaria para poder distinguir entre las especies de la sección *Alternaria*.

En consecuencia, los resultados obtenidos en este estudio, basados únicamente en la secuenciación del gen RPB2, no permite una asignación inequívoca a nivel de especie para los aislados agrupados en el subclado que incluye secuencias de referencia de ambas especies, lo cual refuerza la necesidad de estudios complementarios con múltiples loci, así como enfoques genómicos incluida la secuenciación del genoma completo para lograr una delimitación taxonómica precisa.



Figura 15. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región RPB2 de 12 aislamientos del género *Alternaria* y tres outgroups. Valores de soporte bootstrap (1000 réplicas) se muestran sobre las ramas. Barra de escala: 0.02 sustituciones por sitio. Enraizado con *Stemphylium herbarum*, *Pleospora herbarum* y *Alternaria alternantherae*.

3.3.6. Caracterización morfológica

Hongos pertenecientes al género *Fusarium*

Clave/ Nombre del frijol: Z5M5-5 P18/ Vaquita

Fusarium clavum Xia, Sandoval-Denis, Crous, Zhang & Lombard, 2019

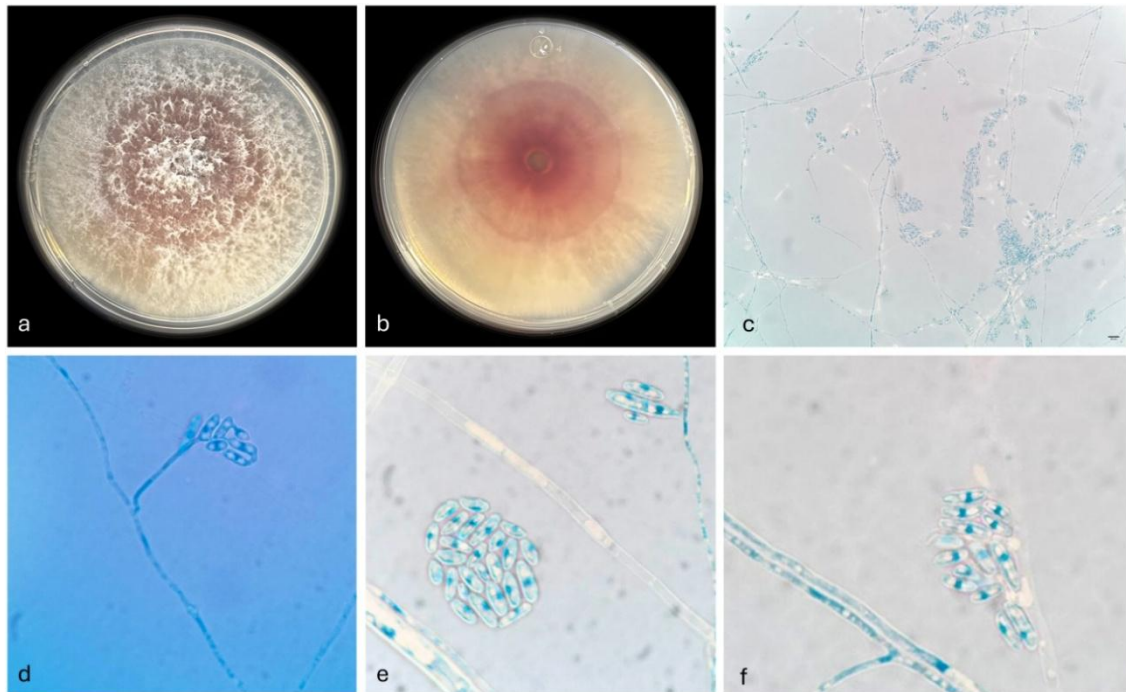


Figura 16. Caracterización morfológica de *Fusarium clavum*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c) conidios; d) conidióforo y fiálides; e – f) macro y microconidios. Barra (c) = 10 μm .

Descripción: Los conidióforos se originaron a partir de micelio aéreo, de 13.722 μm de alto, no ramificados, reducidos a monofialides laterales simples, de pared lisa y delgada. Los conidios se observaron hialinos, de pared lisa y delgada, falcados, suavemente curvados dorsiventralmente, con 1 septo; los cuales tuvieron un tamaño promedio de 10.70 μm x 2.72 μm (n = 10). No se observó la presencia de clamidosporas.

Características de la colonia: Inicialmente la colonia presentó micelio con una coloración salmón que conforme crecía se tornó rosado a salmón pálido, con una tonalidad más intensa hacia el centro y márgenes blanquecinos. La colonia presentó un crecimiento radial uniforme, con micelio aéreo abundante y textura afelpada a aterciopelada. En la cara reversa, el hongo se observó con una coloración salmón pálido a ligeramente violeta, siguiendo un patrón concéntrico con mayor intensidad en el centro y una tonalidad más tenue hacia los márgenes. Las características de la colonia en medio PDA coinciden con lo descrito por Xia *et al.* (2019).

Clave/ Nombre del frijol: Z5M22-14 P10/ Huarache – negro

Fusarium sp.

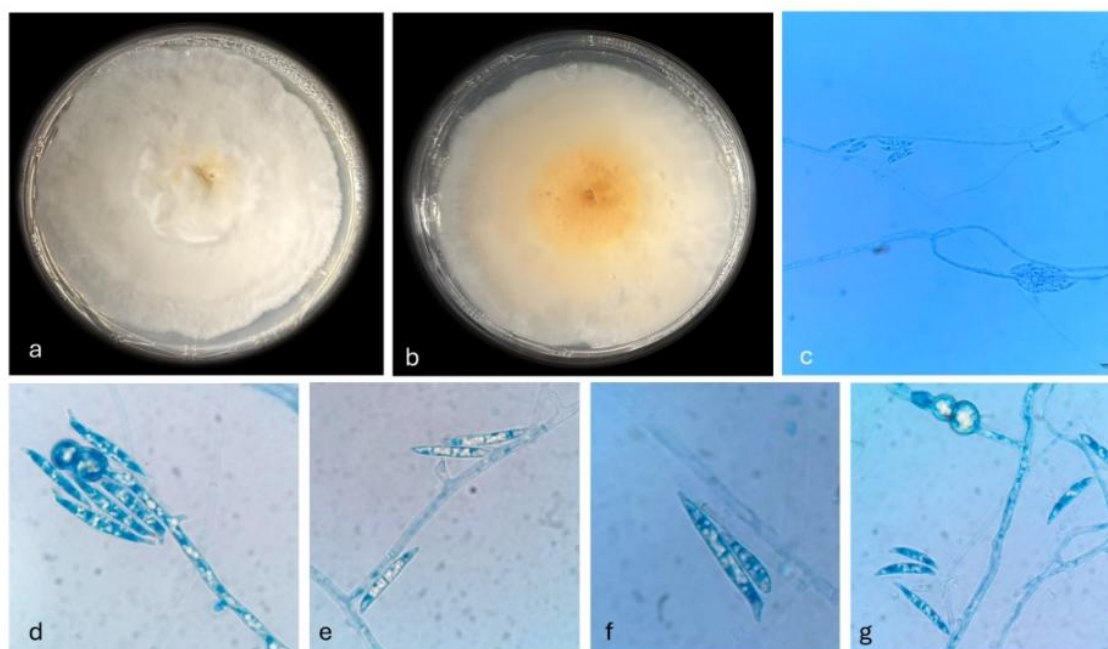


Figura 17. Caracterización morfológica de *Fusarium* sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) macroconidios y clamidosporas. Barra (c) = 10 μ m.

Descripción: Se observaron macroconidios falcados, curvados dorsiventralmente, estrechándose hacia ambos extremos, con una célula apical puntiaguda y una célula basal papilada o en forma de pie, con 1 y 3 septos, de

medidas promedio $15.067 \times 3.848 \mu\text{m}$ ($n = 1$), $31.96 \times 4.10 \mu\text{m}$ ($n = 10$), respectivamente. Clamidosporas abundantes, globosas, subglobosas a ovoides, subhialinas, lisas o algunas de paredes rugosas, terminales o intercalares, solitarias, en pares, formadas en cadenas, de $5 - 11 \mu\text{m}$ de diámetro. Las características observadas coinciden con las descritas recientemente por Han *et al.* (2025) para *Fusarium aflagelliforme*.

Característica de la colonia: La colonia mostró una coloración amarillo tenue a blanco, con crecimiento plano de aspecto afieltrado a aterciopelado, poco micelio aéreo y márgenes irregulares. En el reverso, la colonia mostró una coloración amarilla a anaranjado pálido, con mayor intensidad en el centro.

Clave/ Nombre del frijol: Z6M45-4 P6/ Napual-negro

Fusarium sp.

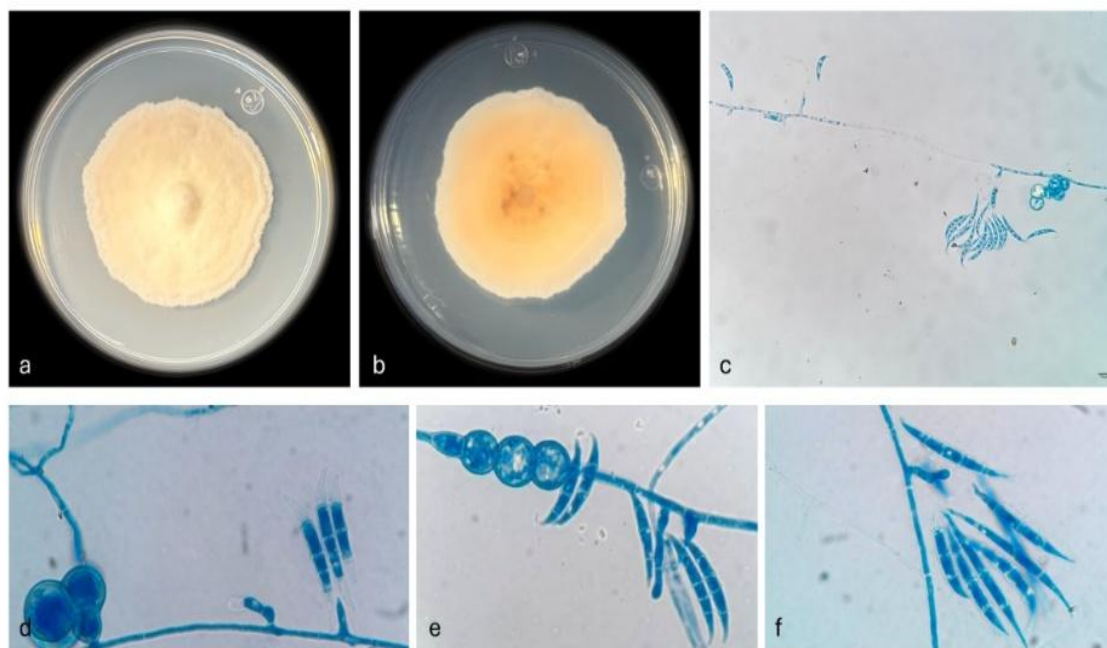


Figura 18. Caracterización morfológica de *Fusarium* sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos, fiálides, macroconidios y clamidosporas. Barra (c) = $10 \mu\text{m}$.

Descripción: Se observaron conidióforos de 6.341 μm de alto, rectos a sinuosos, erectos de paredes lisas y delgadas con fiálides terminales o laterales. Las fiálides se observaron monofiálidicas, subuladas a subcilíndricas de paredes lisas y delgadas. Los macroconidios fueron falcados, con la cara dorsal más curvada que la ventral, con célula apical roma y célula basal papilada, hialinos, con paredes lisas y delgadas, con 3 a 5 septos. Los macroconidios con 3 septos presentaron medidas promedio de 26.68 μm x 3.54 μm (n = 10), mientras que los de 4 septos midieron en promedio 31.42 μm x 3.52 μm (n = 5). Asimismo, se observaron clamidosporas abundantes, globosas, subglobosas a ovoides, subhialinas, la mayoría lisas, aunque algunas presentaron pared rugosa, terminales o intercalares, solitarias, en pares o formando cadenas, con diámetro de 9.8 a 13.4 μm .

Características de la colonia: La colonia presentó micelio aéreo plano. En el anverso, el micelio fue de color blanco; mientras que en el reverso se observó una coloración amarillo rosáceo en el centro y blanco rosáceo en el margen de la colonia.

Las características morfológicas coincidieron con lo descrito recientemente por Han *et al.* (2025) para *Fusarium paraclavum*.

Clave/ Nombre del frijol: Z5M22-14 P7/ Huarache – negro

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg, 1976

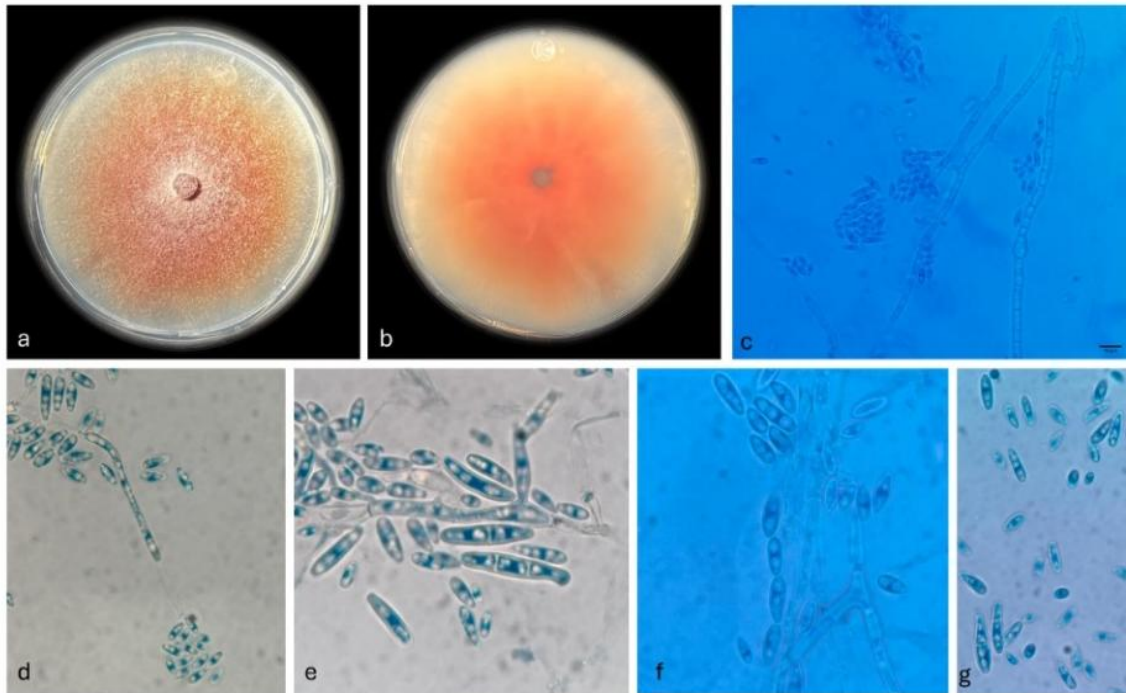


Figura 19. Caracterización morfológica de *Fusarium verticillioides*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) Conidióforo, fiálide, macro y microconidios. Barra (c) = 10 µm.

Descripción: Se observaron conidióforos de 17.93 µm de longitud, simples o ramificados, de paredes delgadas y lisas con monofiálides, algunas producidas en pares, dando la apariencia de “orejas de conejo”. Hubo presencia de muy pocos macroconidios, los cuales fueron relativamente largos, delgados, ligeramente curvados, de paredes delgadas. Las células apicales se presentaron curvadas con terminación en punta, mientras que las células basales mostraron forma de pie. Se observaron predominantemente con 3 septos, con medidas promedio de 23.867 µm x 3.394 µm (n = 5).

Por otra parte, los microconidios fueron más abundantes, hialinos, de forma ovalada a claviforme, con la base aplanada y generalmente de 0 a 1 septo, de medidas promedio $6.63 \mu\text{m} \times 2.90 \mu\text{m}$ ($n = 4$), $7.28 \mu\text{m} \times 2.49 \mu\text{m}$ ($n = 10$) respectivamente. Estos se visualizaron en pequeños grupos formando cadenas largas. No hubo presencia de clamidosporas. Todas las características coincidieron con lo descrito por Leslie y Summerell (2006).

Características de la colonia: Inicialmente, el micelio presentó una coloración blanca, pero conforme este se iba desarrollando adquirió tonalidades naranjas a salmón claro, con pigmentos difusibles en el medio y textura pulverulenta coincidiendo con lo descrito por Leslie y Summerell (2006). En el reverso de la colonia se mostró una coloración naranja más intensa en el área central.

Clave/ Nombre del frijol: Z5M16-4 P17/ Cimatl

Fusarium verticilloides (Sacc.) Nirenberg, 1976

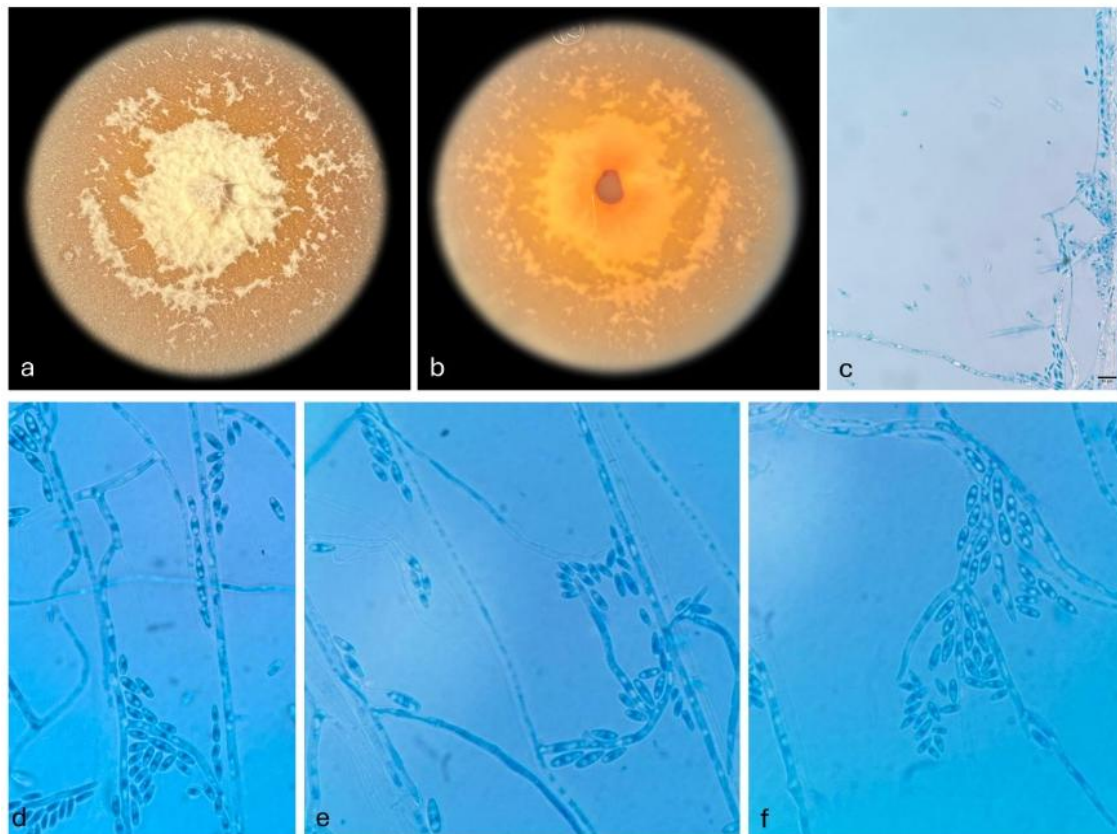


Figura 20. Caracterización morfológica de *Fusarium verticillioides*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 µm.

Descripción: Se observaron conidióforos de 20.42 µm de longitud, simples o ramificados, de paredes delgadas y lisas con monofiálides y polifialides. No se observaron macroconidios. Los microconidios fueron más abundantes, hialinos, de forma ovalada a claviforme, con la base aplanada y de 1 septo, de medidas promedio 6.44 µm x 2.26 µm (n = 10), se observaron en pequeños grupos formando cadenas largas. No hubo presencia de clamidosporas. Las características coincidieron con la cepa antes descrita y con Leslie y Summerell (2006).

Características de la colonia: A diferencia de la cepa previamente descrita de la misma especie, esta mostró variaciones en las características del micelio en medio PDA. La colonia mostró micelio de coloración blanco, adquiriendo pigmentos difusibles de tonalidad naranja. La textura fue algodonosa a aterciopelada, con mayor desarrollando micelial en el centro de la colonia, mientras que hacia la periferia se observaron pequeñas islas de crecimiento. En el reverso de la colonia se mostró una coloración naranja más intensa en el área central.

En base a las características de sus conidios coincidentes y debido a las variaciones macroscópicas observadas en la morfología colonial, esta cepa también se consideró representativa para el género *F. verticillioides*.

Clave/ Nombre del frijol: Z6M45-4 P11/ Napual – negro

Fusarium temperatum Scaufl & Munaut, 2011

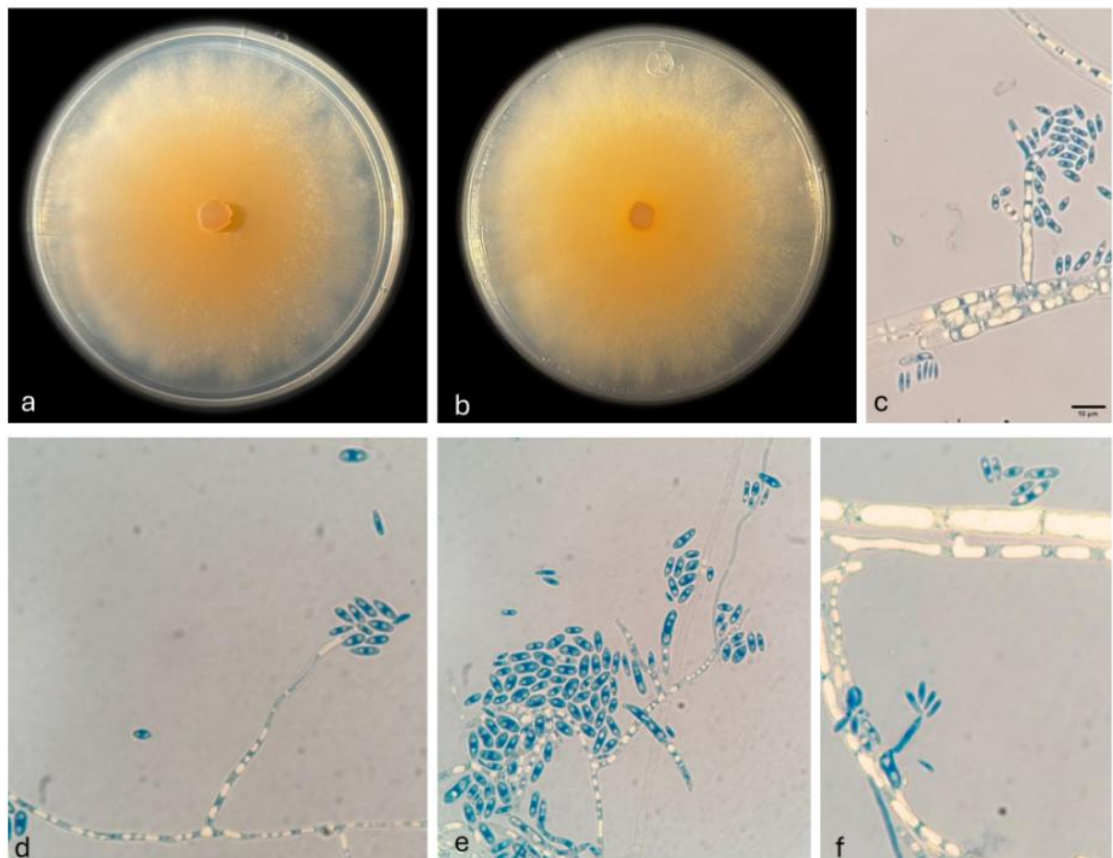


Figura 21. Caracterización morfológica de *Fusarium temperatum*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 μm .

Descripción: Se observaron conidióforos de 19.59 μm de longitud, simples o ramificados de paredes delgadas y lisas con monofiálides tanto terminales como intercalares. Los macroconidios presentaron paredes delgadas, siendo casi rectos a ligeramente curvados dorsiventralmente; con célula apical picuda, y célula basal en forma de pie, con 3 septos, de medidas promedio 25.52 x 3.0 μm (n = 4) y con 4 septos 44 x 3.156 μm (n = 1). No hubo presencia de clamidosporas.

Además, se visualizaron microconidios ovalados a elipsoidales ligeramente falcados, con 1 septo. Las medidas promedio oscilaron entre $9.14 \times 2.71 \mu\text{m}$ ($n = 50$). Las características morfológicas coincidieron con lo descrito por Orina *et al.* (2023).

Características de la colonia: La colonia en medio PDA presentó crecimiento radial, con desarrollo del micelio sumergido en el medio. Se observó una pigmentación difusible, mostrándose en el centro una coloración naranja intensa y un halo difuso hacia la periferia. El margen de la colonia mostró un aspecto plumoso. Por otra parte, el micelio aéreo fue escaso concentrándose principalmente en la región central. Al reverso, se presentó una coloración naranja intensa en el centro y blanca hacia el margen.

Clave/ Nombre del frijol: Z5M16-4 P1/ Cimatl

Fusarium temperatum Scaufl & Munaut, 2011

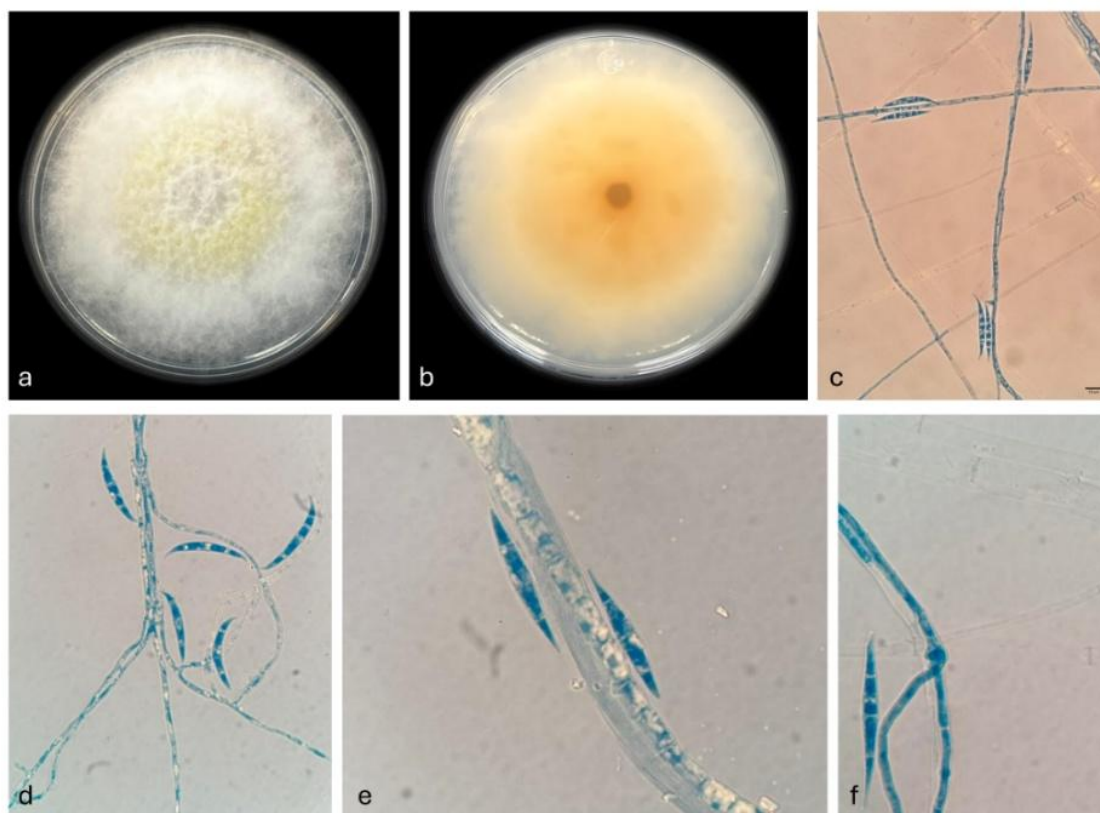


Figura 22. Caracterización morfológica de *Fusarium temperatum*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Macroconidios. Barra (c) = 10 µm.

Descripción: Se observaron conidióforos de 6.40 µm de longitud, simples, de paredes lisas y delgadas con monofiálides. Los macroconidios presentaron paredes delgadas, siendo casi rectos a ligeramente curvados dorsiventralmente, con célula apical aguda, y célula basal en forma de pie con 3 a 5 septos.

Los macroconidios con 3 septos presentaron medidas promedio 20.80 x 4.0 µm (n = 10); los de 4 septos, 32.0 x 3.99 µm (n = 5); y los de 5 septos, 34.53 x 4.04 µm (n = 2). No se observaron microconidios ni clamidosporas. Las características morfológicas coincidieron con lo descrito por Orina *et al.* (2023).

Características de la colonia: La colonia presentó una coloración blanca en el centro, rodeada por un halo amarillo; hacia el margen de la colonia nuevamente presento una tonalidad blanca. La textura fue algodonosa, con abundante micelio aéreo. En el reverso se observó una coloración naranja muy tenue, más concentrada en el centro mientras que en el margen la coloración se presenció blanca a ligeramente rosada.

En base a las diferencias macroscópicas observadas en la morfología colonial, esta cepa también se consideró representativa para el género *F.temperatum*.

Clave / Nombre del frijol: Z5M22-14 P3/ Huarache – negro

Fusarium humícola Lombard & Crous, 2019

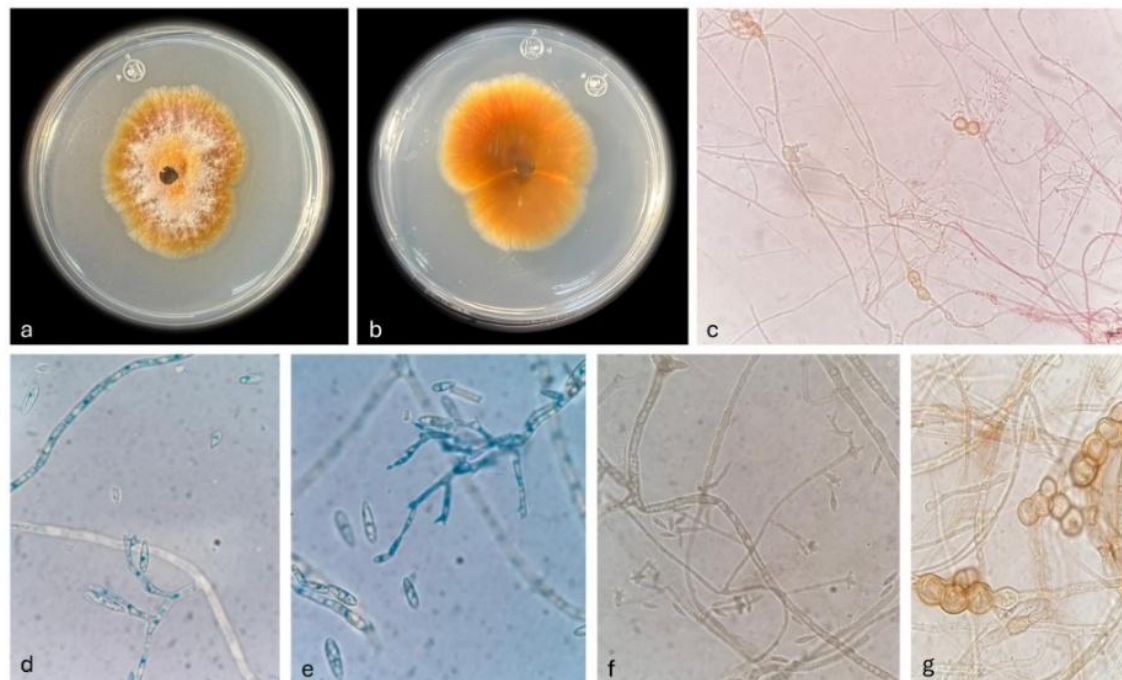


Figura 23. Caracterización morfológica de *Fusarium* sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) Conidióforos, fiálides, conidios y clamidosporas. Barra (c) = 10 μ m.

Descripción: Se observaron conidióforos ramificados y verticilados, con una fiálide terminal única o bien en verticilos de 2 a 3 fiálides. Los conidios que forman pequeñas falsas cabezas en el ápice de las fiálides; fueron hialinos, elipsoidales a ovoides, de paredes lisas y delgadas. Se observaron con 0 septos de medidas promedio $7.1159 \times 2.1047 \mu\text{m}$ ($n = 10$), y con 1 septo $11.5875 \times 3.3101 \mu\text{m}$ ($n = 6$). Hubo presencia de pseudoclamidosporas o células hifales engrosadas.

Características de la colonia: La colonia mostro una coloración naranja que conforme avanzaba al centro se tornaba de color ocre, convirtiéndose en tonalidades vino a rojo; hacia el margen, la coloración se tornó más clara. Presencia de micelio aéreo moderado, de aspecto lanoso a algodonoso. En el

reverso, se observó una coloración ocre a vino oscuro, más intensa hacia el centro.

Las características morfológicas coincidieron con lo descrito por Lombard *et al.* (2019) para *Fusarium humicola*.

Clave/ Nombre del frijol: Z6M45-4 P20/ Napual – negro

Fusarium terricola Al-Hatmi, S. A. Ahmed & de Hoog, 2017

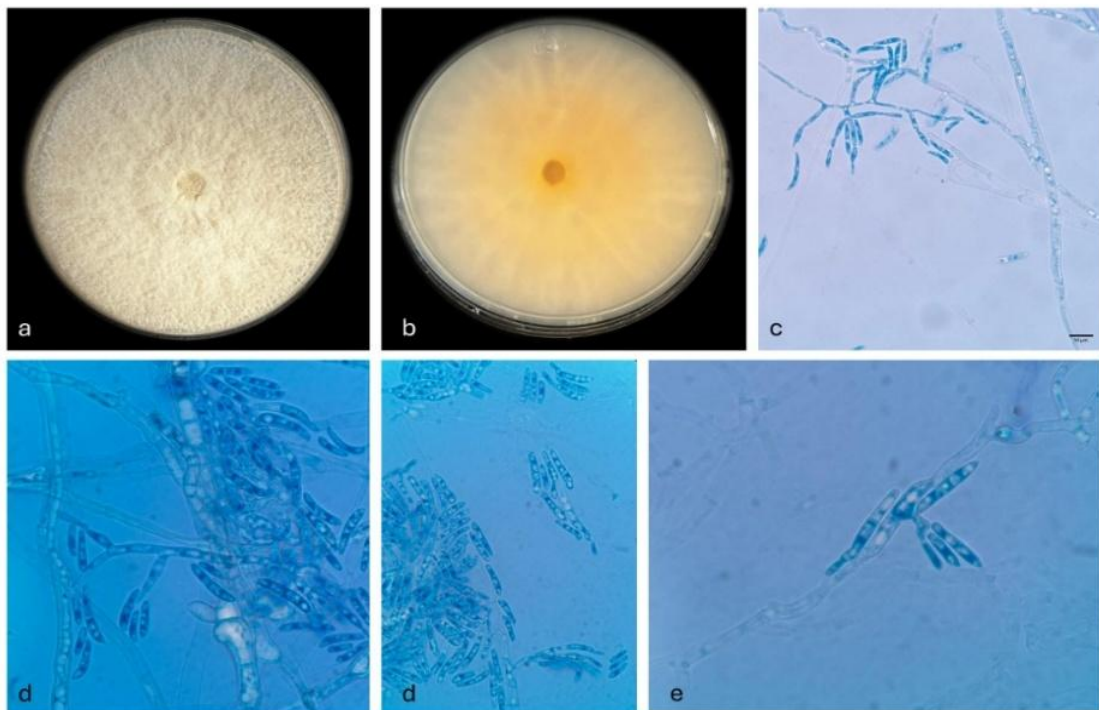


Figura 24. Caracterización morfológica de *Fusarium terricola*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – g) Conidióforos, fiálides y conidios. Barra (c) = 10 μ m.

Descripción: Se observaron conidióforos simples y ramificados verticiladamente, con monofialides. Los microconidios de forma ovoidal con medidas de 5.61 x 2.45 μ m (n = 6) y macroconidios de 3 a 4 septos, de medidas promedio 20.25 x 3.40 μ m (n = 4), 22.16 x 3.66 μ m (n = 4), respectivamente. No

se observaron clamidosporas. Características que coinciden con lo descrito por Moussa *et al.* (2017).

Características de la colonia: La colonia mostro una coloración totalmente blanca crema, de textura algodonosa y de aspecto denso. En el reverso, se observó una coloración tenue de amarillo pálido, la cual se fue distribuyendo radialmente, mientras que la región central mostro una coloración más intensa de color naranja, que el margen de la colonial.

Clave/ Nombre del frijol: Z6M31-3 P8/ Conejillo

Fusarium sp.

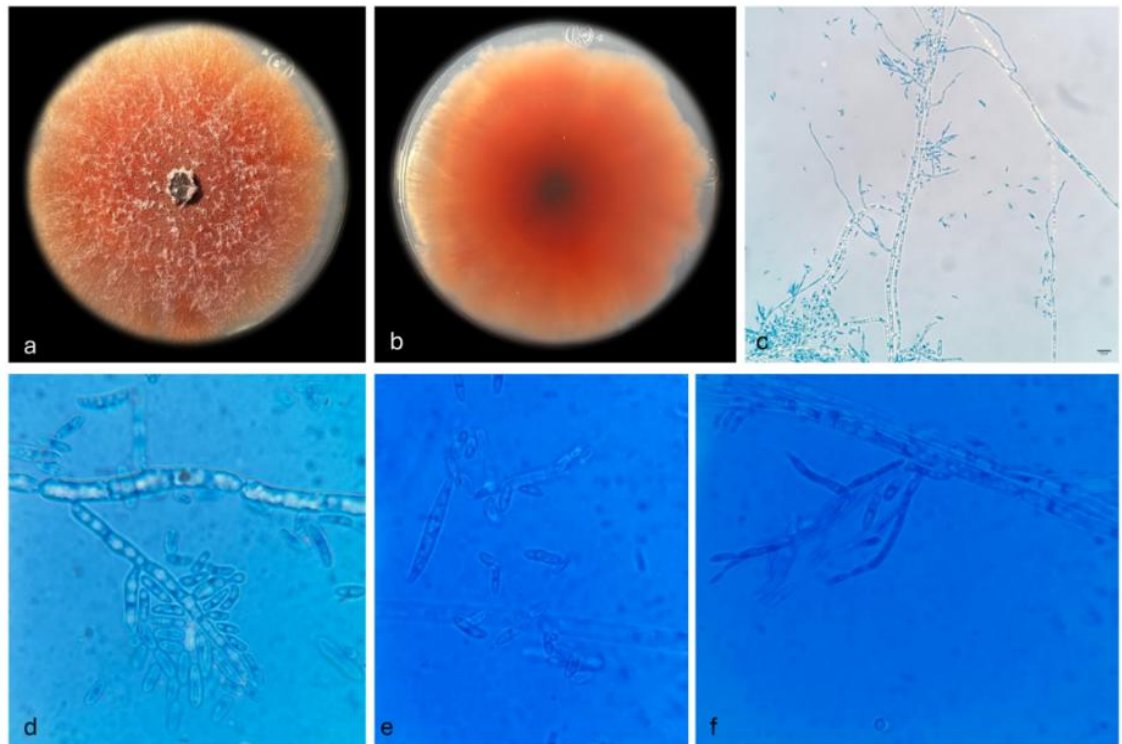


Figura 25. Caracterización morfológica de *Fusarium* sp. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 μ m.

Descripción: Se observaron conidióforos de 16.42 μ m de longitud, simples o ramificados de paredes lisas y delgadas, con monofialides tanto terminales como

intercalares. Los microconidios fueron abundantes, hialinos, de forma ovoide a elipsoidal, con 0 a 1 septo. Los aceptados presentaron medidas promedio de $7.44 \times 2.61 \mu\text{m}$ ($n = 5$), mientras que los de 1 septo midieron en promedio $8.0 \times 2.53 \mu\text{m}$ ($n = 10$). Los macroconidios se observaron con 3 – 6 septos; los de 3 septos con medidas promedio $20.10 \times 3.18 \mu\text{m}$ ($n = 4$), siendo casi rectos a ligeramente curvados dorsiventralmente. No hubo presencia de clamidosporas.

Características de la colonia: La colonia mostró desarrollo de micelio sumergido, con una pigmentación difusible de tonalidad rojiza intensa en la región central, tornándose más claro hacia la periferia. El micelio aéreo fue escaso y se concentró más en la región central, este se visualizó en pequeños agregados. Al reverso, la colonia presento una coloración rojiza generalizada; en la parte central el color fue más intenso, variando de vino oscuro a casi negro, mientras que hacia la periferia la tonalidad fue clara rojiza.

Clave/Nombre del frijol: Z5M16-4 P15/ Cimatl

Fusarium oxysporum Schltdl., 1824

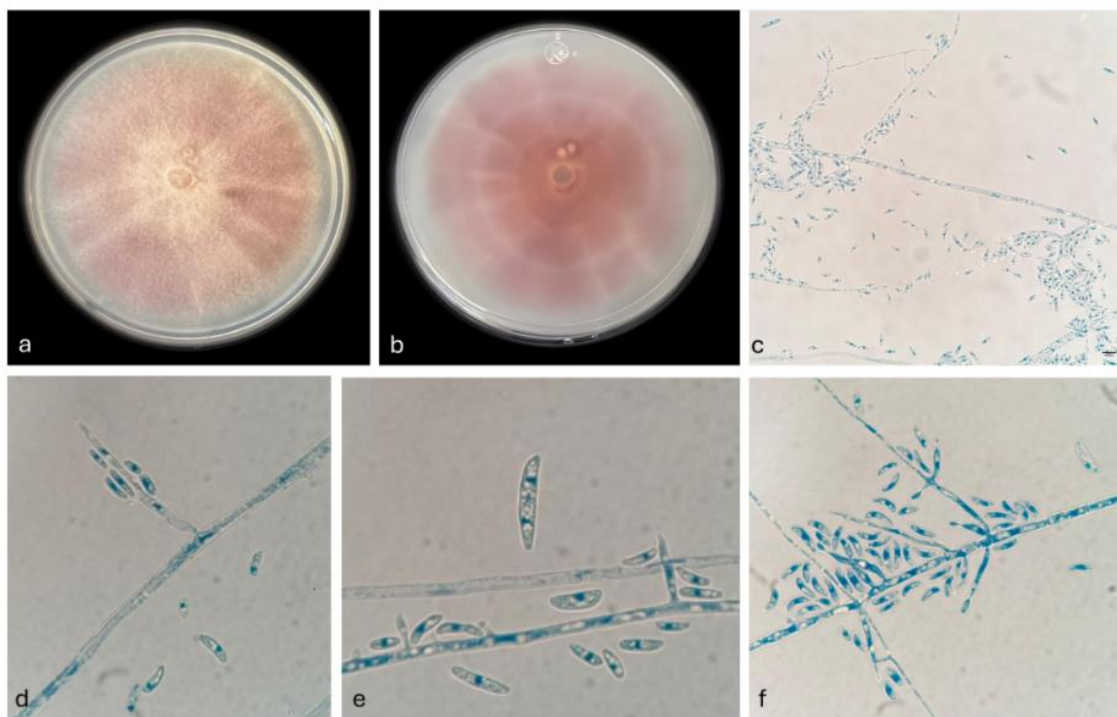


Figura 26. Caracterización morfológica de *Fusarium oxysporum*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) Conidióforos, fiálides, macro y microconidios. Barra (c) = 10 μm .

Descripción: Se observaron conidióforos de aproximadamente 8.60 μm de longitud, simples, rectos a ligeramente sinuosos, algunos erectos y otros ligeramente postrados, con paredes lisas y delgadas, desarrollando monofiálides terminales.

Se observó la presencia de micro y macro conidios. Los macroconidios presentaron de 2 a 3 septos, los de 2 septos midieron en promedio 13.97 x 2.25 μm (n = 2) y los de 3 septos 16.05 x 2.70 μm (n = 3), fueron ligeramente curvados a casi rectos, con célula apical ligeramente atenuada y célula basal en forma de pie. Los microconidios fueron ovalados a elipsoidales, alantoides a reniformes, con un solo septo de dimensiones promedio 7.35 x 2.35 μm (n = 11). No se observó la presencia de clamidosporas. Las características concuerdan con lo descrito por Leslie y Summerell (2006).

Características de la colonia: En medio PDA, la colonia presentó crecimiento circular y radial, con margen regular bien definido. El micelio aéreo fue abundante de textura algodonosa a floccosa y denso, se observó un patrón radial fibrilar que se extendía hacia la periferia. Hubo una coloración blanca – crema en la región central, con tonalidades rosadas pálido, las cuales fueron más intensas hacia la zona intermedia. En el reverso de la colonia se observó una pigmentación difusible de tonalidad violeta pálido siendo más intensa en la región central, rodeada por un halo concéntrico ligeramente más claro, la coloración se volvió más tenue hacia la periferia adquiriendo una tonalidad rosado pálido a blanquecina. Presentó patrones concéntricos, en forma de anillos de diferente intensidad de pigmentación.

Hongo perteneciente al género *Macrophomina*

Clave/ Nombre del frijol: Z2M20-6/ Cuernito/Vainilla/Blanco

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid., 1947

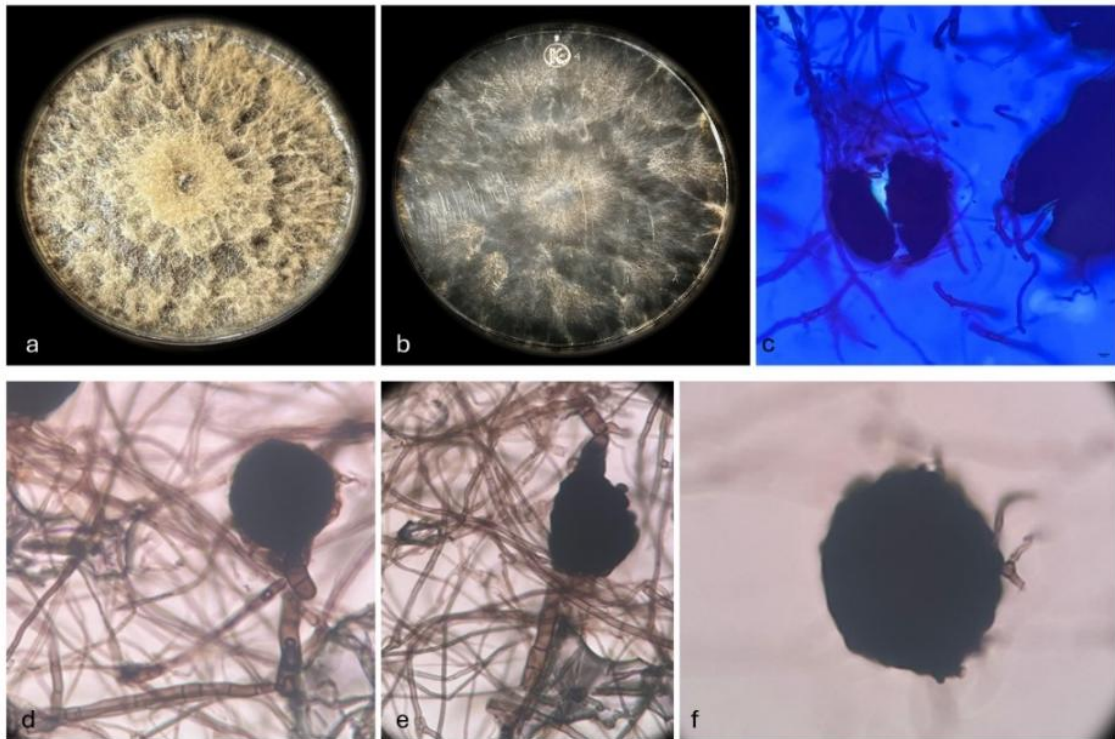


Figura 27. Caracterización morfológica de *Macrophomina phaseolina*. a – b) Morfología colonial en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) microesclerocios. Barra (c) = 10 μ m.

Descripción: Se observaron hifas hialinas de paredes delgadas, así como hifas de color marrón claro a oscuro con septos. Las ramificaciones se originaron en ángulo recto con respecto a la hifa principal, con una constricción en el punto de inserción, seguida por la formación de un septo. Asimismo, se observaron microesclerocios de forma esférica, ovalada u oblonga, con un ancho promedio de 133 μ m. En etapas iniciales presentaron una coloración marrón claro, tornándose con una coloración marrón oscuro a completamente negro, conforme maduraban. Las características morfológicas registradas coincidieron con las

descripciones previamente reportadas para *Macrophomina phasoelina* por Dell'Olmo *et al.* (2022) y Márquez *et al.* (2021).

Características de la colonia: La colonia presentó crecimiento muy rápido, cubriendo la placa en pocos días. Se observó un exceso de micelio aéreo, de textura algodonosa a floccosa y aspecto denso, con un patrón radial fibrilar bien definido. La coloración fue marrón oscuro a negra, ocasionada por el crecimiento abundante de microesclerocios, los cuales se observaron dispersos e incrustados en el medio de cultivo. En el reverso, la colonia presentó una coloración gris oscuro a negra, con distribución radial homogénea asociada a la formación de los microesclerocios.

Hongo perteneciente al género *Rhizoctonia*

Clave/ Nombre del frijol: Z6M35-5/ Ayocote morado

Rhizoctonia solani J. G. Kühn, 1858

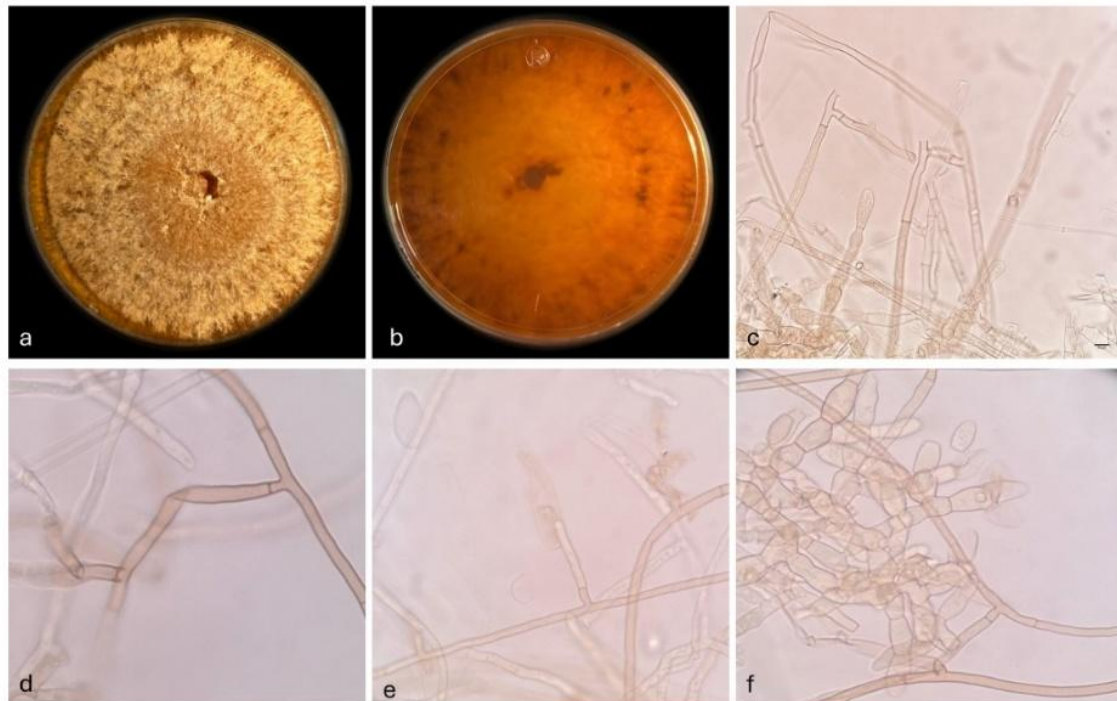


Figura 28. Caracterización morfológica de *Rhizoctonia solani*. a – b) Morfología colonial en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – e) Hifas septadas con ramificación en ángulo de 90°; f) Células monilioides.

Descripción: Se observaron hifas septadas; las jóvenes fueron hialinas, mientras que las de mayor edad presentaron coloración marrón claro a oscuro. Las ramificaciones se originaron en ángulo recto (90°), con una constricción en el punto de inserción y la formación de un septo cercano al origen de la rama, características típicas de *Rhizoctonia solani* (Shen *et al.*, 1991; Barnett & Hunter, 1998, p.196). Asimismo, hubo presencia de hifas indiferenciadas o células hinchadas monilioides, las cuales dieron origen a los esclerocios.

Características de la colonia: La colonia presentó crecimiento radial, con micelio abundante de textura algodonosa a aterciopelada, al inicio mostró una coloración beige, que conforme se desarrolló, se tornó marrón canela, con una región central más oscura y compacta. Se observó la formación de pequeños esclerocios superficiales de color marrón oscuro. Asimismo, el medio presentó pigmentación difusible de color ámbar.

En el reverso, la colonia presentó una pigmentación ámbar intensa a marrón anaranjado, con algunas áreas más oscuras.

Hongos pertenecientes al género *Alternaria*

Clave/ Nombre del frijol: Z5M22-14/ Huarache – negro

Alternaria sp.

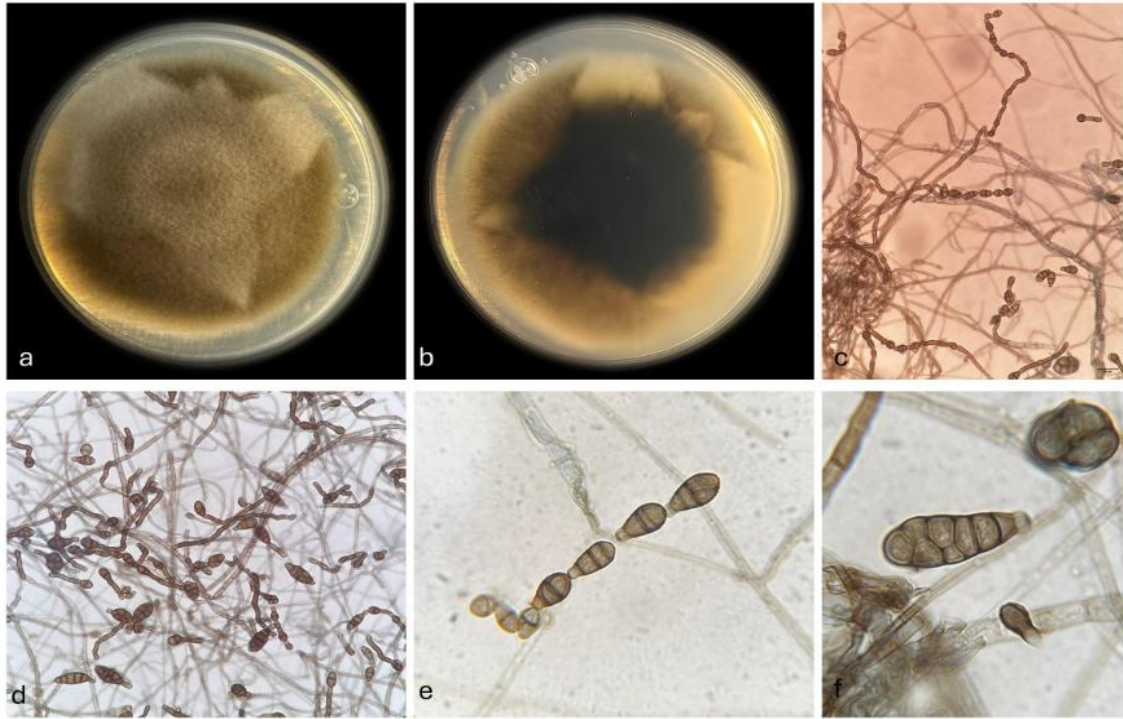


Figura 29. Caracterización morfológica de *Alternaria*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos, cadenas de conidios, y conidios (en medio V8). Barra (c) = 20 μ m.

Descripción: En medio de cultivo V8 se observaron conidióforos originados lateralmente a partir de hifas aéreas, de morfología cilíndrica, rectos a ligeramente curvados, septados y de color marrón claro, con medidas promedio de 41.524 x 4.573 μ m.

Los conidios se dispusieron en cadenas de 2 – 14 unidades, de color marrón y paredes lisas, con morfología claviforme, elipsoidal u ovoide, tanto cortos como alargados. Presentaron de 1 – 4 septos transversales y de 0 – 2 septos

longitudinales, con medidas promedio de $24.30 \times 9.5 \mu\text{m}$ ($n = 25$), con un pico apical corto redondeado a obtuso de $3 - 7 \mu\text{m}$ de longitud.

Características de la colonia: Las colonias en medio PDA presentaron un micelio de color pardo oliváceo, con la zona central ligeramente más oscura, y una tonalidad más tenue hacia el contorno de la colonia. Se observaron áreas radiales con formas triangulares de menor intensidad de coloración respecto al resto de la colonia. El margen fue irregular y el micelio se presentó con una superficie aterciopelada.

En el reverso, la colonia mostró una coloración pardo-negruzca intensa en la zona central, la cual fue más clara hacia la periferia, resaltando nuevamente las formas triangulares previamente descritas, con pigmentación difusible.

Clave/ Nombre del frijol: Z6M31-3/ Conejillo

Alternaria alternata (P.) Keissl., 1912

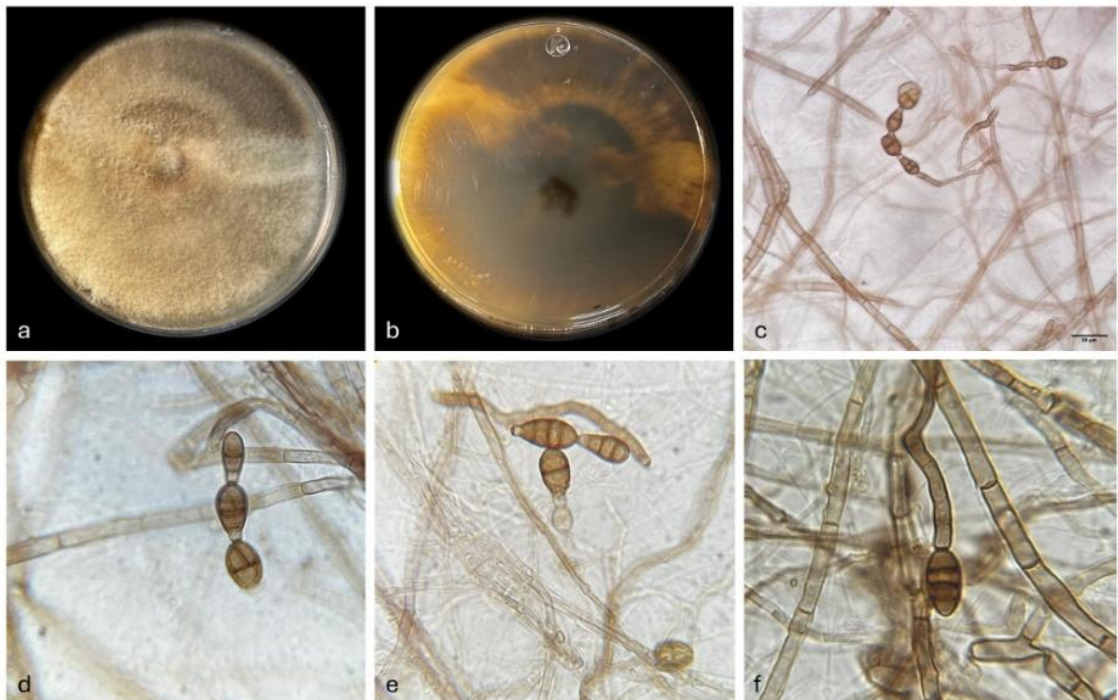


Figura 30. Caracterización morfológica de *Alternaria*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos, cadenas de conidios, y conidios (en medio V8). Barra (c) = $20 \mu\text{m}$.

Descripción: En medio de cultivo V8 se observaron conidióforos originados a partir de hifas aéreas, tanto terminales como laterales, de morfología cilíndrica, ligeramente curvados, septados, y de color marrón claro, con medidas promedio de 44.406 x 4.072 μm .

Los conidios se dispusieron en cadenas de 2 – 5 unidades, de color marrón, y paredes lisas; presentaron morfología claviforme a elipsoidal, tanto cortos como alargados, con 1 – 3 septos transversales y 0 – 1 septo longitudinal. Sus medidas promedio fueron de 16.61 x 8.0 μm (n = 35). En el extremo apical de los conidios algunos se mostraron sin pico mientras otros con un pico corto redondeado a obtuso de 3 – 5 μm de longitud.

Características de la colonia: Las colonias en PDA presentaron crecimiento radial concéntrico bien definido. El micelio fue abundante, de textura aterciopelada, con aspecto compacto. La coloración fue pardo oliváceo a beige grisácea, con la zona central ligeramente más oscura. Se observaron anillos concéntricos con tonalidades pardo claro a oscuro. El margen fue regular, con un contorno blanquecino.

En el reverso, la colonia mostró una coloración pardo-oscuro a negruzca en la zona central, con pigmentación difusible ámbar en el medio. Hacia la periferia la coloración fue más clara.

Las características morfológicas observadas coincidieron con lo reportado por Simmons (2007) para *Alternaria alternata*.

Clave/Nombre del frijol: Z6M35-5/ Ayocote morado

Alternaria alternata (P.) Keissl., 1912

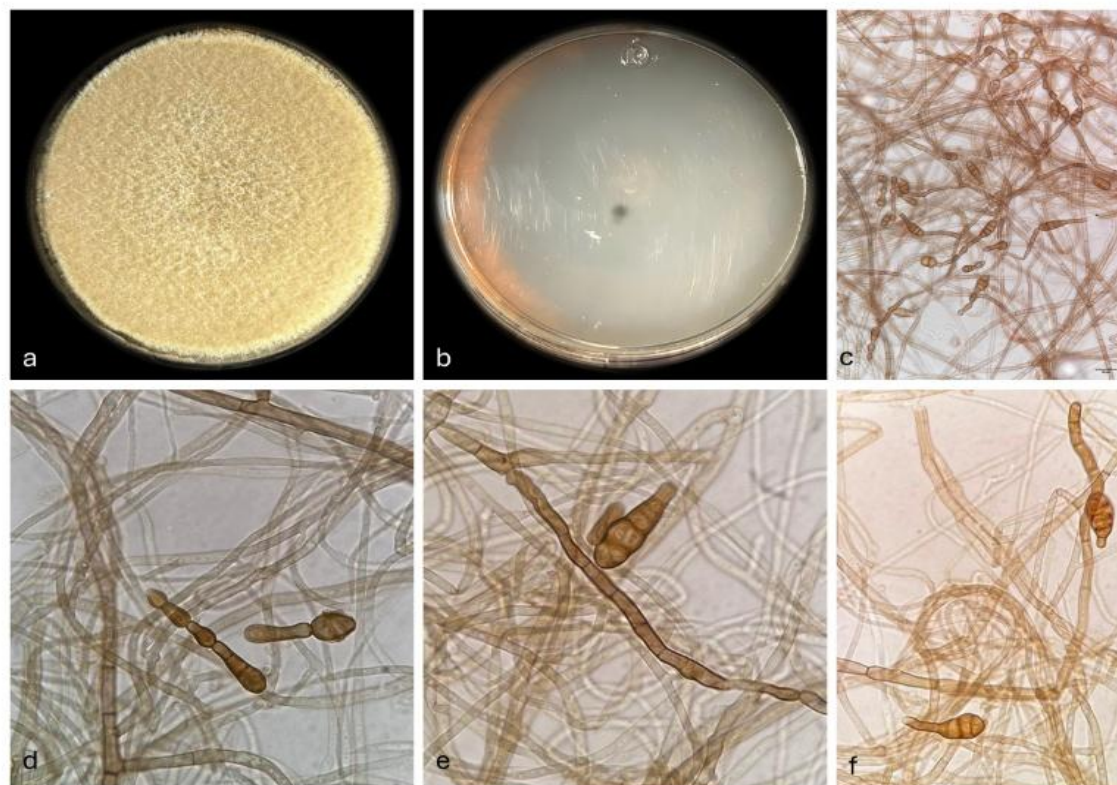


Figura 31. Caracterización morfológica de *Alternaria*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos, cadena de conidios, y conidios. Barra (c) = 20 μm .

Descripción: Se observaron conidióforos que surgieron lateralmente a partir de hifas aéreas, cilíndricos, rectos a ligeramente curvados, septados, y de color marrón claro, con medidas promedio de 34.484 x 3.564 μm .

Los conidios se dispusieron en cadenas de 2 – 4 unidades, de color marrón y paredes lisas; claviformes, elipsoidales largos a ovoides cortos. Mostraron 1 – 4 septos transversales y ausencia de septo longitudinales. Sus medidas promedio fueron de 20.236 x 8.352 μm (n = 28). Se observaron picos de 4 – 5 μm de longitud.

Características de la colonia: La colonia presentó crecimiento radial uniforme y micelio abundante, de textura afelpada y superficie densa. La coloración fue beige claro a crema, con margen regular y bien definido. El micelio aéreo se observó homogéneo.

En el reverso se apreció una coloración difusa en el medio, de color marrón pálido a grisáceo, hacia una parte lateral se observó coloración marrón claro a ámbar. Las características coincidieron con lo reportado por Simmons (2007) para *Alternaria alternata*.

Clave/Nombre del frijol: Z6M45-4/ Napual – negro

Alternaria sp.

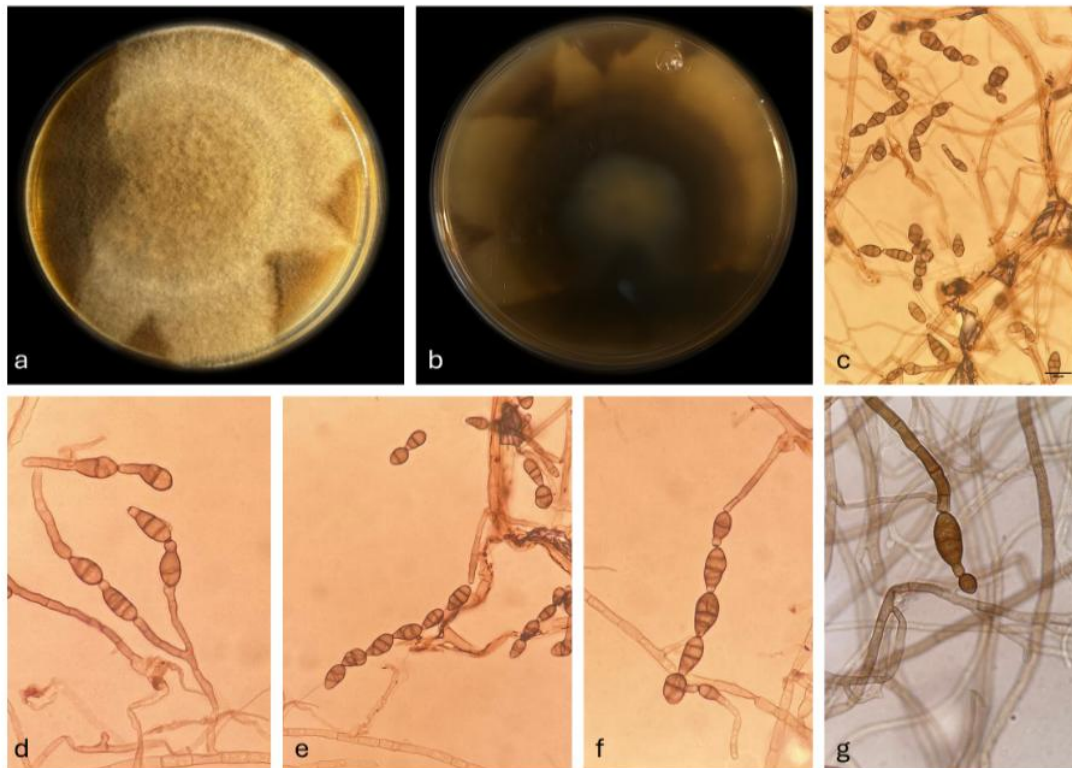


Figura 32. Caracterización morfológica de *Alternaria*. a – b) Colonia en medio PDA (anverso y reverso, respectivamente, bajo iluminación artificial blanca a 25°C); c – f) conidióforos y cadena de conidios (en medio V8). Barra (c) = 20 μ m.

Descripción: En medio V8 se observaron conidióforos que se originaron lateralmente a partir de hifas aéreas; estos fueron cilíndricos, rectos a ligeramente curvados, septados, y de color marrón, con medidas promedio de 51.743 x 3.705 μm .

Los conidios se dispusieron en cadenas de 2 – 6 unidades, de color marrón oscuro y paredes lisas; con morfología claviforme, elipsoidal alargada a ovoide corta. Mostraron 1 – 3 septos transversales y 0 – 1 septo longitudinal. Sus medidas promedio fueron de 18.628 x 8.601 μm (n = 30). Se observaron picos apicales cortos y obtusos de 4 – 5 μm de longitud.

Características de la colonia: La colonia presentó crecimiento radial concéntrico bien marcado. El micelio fue abundante, de textura afelpada a algodonosa, con superficie densa. La coloración predominante fue marrón claro, con áreas triangulares irregulares hacia la periferia de tonalidad más oscura. El margen fue irregular.

En el reverso se observó pigmentación difusa de color marrón pálido, con la región central aún más tenue. Se mostraron anillos concéntricos más pigmentados que el resto del medio. Asimismo, se mostraron áreas triangulares más oscuras, correspondientes a las observadas en el anverso.

3.3.7. Mapas “Sierra Norte de Puebla”

Los mapas representan la distribución altitudinal de los municipios de la Sierra Norte de Puebla. En ambas figuras, los municipios productores de frijoles analizados en este estudio se destacan con una línea negra más intensa. La figura A corresponde a los frijoles clasificados como “en peligro de extinción”, mientras que la figura B muestra los “nativos”.

En la figura A se observa que el género *Fusarium* (representado con círculos rojos) fue aislado en todos los frijoles analizados, abarcando todo el gradiente

altitudinal (0 – 2500 m.s.n.m.). Asimismo, los municipios representados en distintos colores podrían considerarse como posibles zonas en donde el patógeno podría estar presente. Estos resultados indican que *Fusarium* no presenta una restricción altitudinal definida en la región.

Por otro lado, en la figura B no se detectó la presencia de *Fusarium* en frijoles nativos; sin embargo, eso no excluye su posible ocurrencia en estas zonas, ya que, en frijoles en peligro de extinción ubicados en municipios dentro del mismo rango altitudinal, sí se registró la presencia de este patógeno. Por lo tanto, su presencia no puede descartarse, debido a su alta adaptabilidad ambiental y amplia distribución. De acuerdo con la literatura, *Fusarium* es un género cosmopolita que exhibe una adaptabilidad excepcional en diversas condiciones ambientales y sistemas agrícolas, estableciendo infecciones desde zonas climáticas tropicales hasta templadas (Tagyan *et al.*, 2025). Además, sus esporas pueden dispersarse por suelo, agua y aire encontrarse incluso a elevadas altitudes, lo que contribuye a su amplia distribución geográfica (Smith, 2007).

Por otra parte, el hongo *Alternaria* fue aislado tanto en frijoles en peligro de extinción como en frijoles nativos. En el caso de los primeros, su presencia se registró en rangos altitudinales de 501-1000 y 1501 – 2500 m.s.n.m., por lo que los municipios representados en color morado, naranja y verde claro podrían presentar condiciones favorables para la presencia de este patógeno.

No obstante, no se puede descartar que otras zonas también presenten riesgo, ya que *Alternaria*, es uno de los microorganismos más ampliamente distribuidos y ecológicamente flexibles, con una gran diversidad de estrategias de vida. La infección inicial en las plantas ocurre entre 8 y 32°C, con humedades del 80 al 100% (Vinogradova *et al.*, 2026), condiciones que son comparables a las de la Sierra Norte de Puebla. Asimismo, el incremento en la duración de la humectación foliar favorece la gravedad de la enfermedad en todas las temperaturas. Por otro lado, bajo condiciones desfavorables, como bajas temperaturas, falta de humedad o alta concentración de sustancias tóxicas en el

ambiente, el hongo puede formar esclerocios que le permiten sobrevivir al invierno en el suelo (Vinogradova *et al.*, 2026).

Macrophomina y *Rhizoctonia* fueron géneros que, como se observa en la figura B, se detectaron únicamente en colectas de frijoles correspondientes al grupo “nativos”. *Macrophomina* se registró en un rango altitudinal de 0- 500 m.s.n.m., mientras que *Rhizoctonia* se presentó entre 501-1000 m.s.n.m., lo que podría indicar una posible asociación de estos patógenos con los municipios representados en color azul y morado.

En el caso de *Macrophomina*, Ortiz *et al.* (2023) señalan que el desarrollo de la enfermedad se ve favorecido por las condiciones cálidas y secas, con colonización de raíz y tallo en frijol a temperaturas entre 28 y 35°C. Estas condiciones coinciden con las registradas en municipios ubicados entre 0- 500 m.s.n.m., particularmente durante los meses de marzo a junio, cuando las temperaturas oscilan entre 33 a 34°C, favoreciendo el establecimiento del hongo.

Por otra parte, Ghoneem *et al.* (2023) menciona que *Rhizoctonia solani* puede infectar leguminosas en un amplio rango de condiciones; no obstante, su mayor agresividad se presenta a temperaturas de 15 - 18°C y en suelos húmedos. Estas condiciones son comparables con las de municipios con rango de altitud entre 501 – 1000 m.s.n.m., lo cual explica su presencia en este intervalo altitudinal.

Por último, se identificó la presencia de *Aspergillus* (indicada con círculos amarillos) en municipios con un rango altitudinal de 501 a 3000 m.s.n.m., lo que indica su amplia distribución. En consecuencia, podría asociarse este patógeno en los municipios ubicados en este rango. Este género es típicamente cosmopolita y ha sido aislado de diversos hábitats en todo el mundo, incluyendo, suelo, aire, ambientes acuáticos, regiones árticas e incluso organismos vivos (Riedling *et al.*, 2025).

Los municipios que están resaltados de color rojo en el mapa correspondiente al grupo nativos indican que los frijoles nativos colectados en ese sitio no presentaron la presencia de hongos.

Estos resultados evidencian que la altitud influye en la distribución y abundancia de hongos fitopatógenos, principalmente mediante variaciones en la temperatura y la humedad relativa. No obstante, los cambios en temperatura y humedad inducidos por la altitud no actúan como barreras limitantes para estos hongos cosmopolitas, sino que modulan su abundancia permitiendo su establecimiento en distintos rangos altitudinales de la Sierra Norte de Puebla.

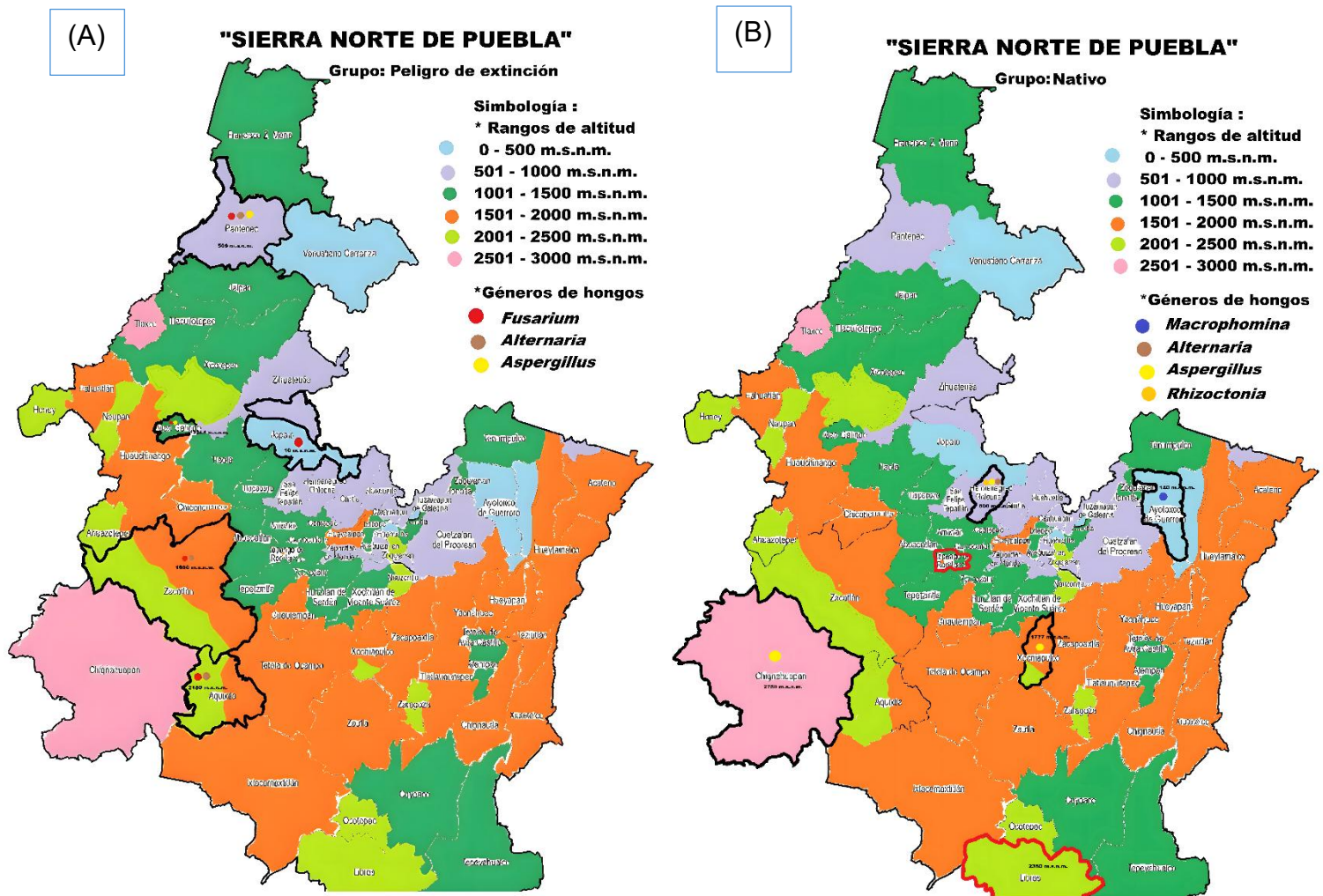


Figura 33. Mapas de la Sierra Norte de Puebla que muestran la distribución altitudinal de los municipios, con la localización de hongos fitopatógenos en semillas de frijol. (A) semillas clasificadas como en peligro de extinción. (B) nativos. Los círculos indican la presencia de los distintos géneros de hongos.

Variedad de frijol	<i>F. paraclavum</i>	<i>F. clavum</i>	<i>F. aflagelliforme</i>	<i>F. humicola</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. terricola</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. temperatum</i>	<i>M. phaseolina</i>	<i>R. solani</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Aspergillus</i>
Z5M5-5		*												
Z5M22-14			*	*	*								*	*
Z5M16-4					*			*	*					*
Z6M31-3							*					*		
Z6M45-4	*					*			*				*	
Z2M20-6										*				
Z6M35-5											*	*		*
Z1M9-6														
Z3M23-1														*
Z4M10-13														
Z6M4-2														*

Figura 34. Relación entre variedades de frijol y especies fúngicas aisladas. El signo (*) indica la presencia de la especie fúngica en la variedad analizada.

3.3.8. DISCUSIÓN

Phaseolus vulgaris L. representa un cultivo básico en México, cuyas variedades criollas se caracterizan por su precocidad, crecimiento postrado, adaptación al estrés hídrico y plasticidad fenológica (Cabral-Miramontes *et al.*, 2024). No obstante, los hongos asociados a las semillas constituyen un problema de gran relevancia, debido a los daños que ocasionan, como la inhibición de su germinación, la reducción del rendimiento y, en consecuencia, pérdidas económicas significativas (Dell’Olmo *et al.*, 2023). Esto es de suma importancia en la Sierra Norte de Puebla, donde la mayoría de la producción se destina principalmente al autoconsumo y al comercio local, lo que incrementa el impacto de la contaminación por hongos fitopatógenos.

En este contexto, es fundamental tener información actualizada sobre estos patógenos, a fin de contribuir al desarrollo de variedades resistentes, mejorar el diagnostico de las enfermedades fúngicas y establecer medidas de manejo adecuadas. A pesar de que en México existen pocos estudios sobre hongos fitopatógenos asociados a semillas de frijol, los reportes disponibles muestran resultados que coinciden con los obtenidos en este estudio. Por ejemplo, Groenewold *et al.* (2003) identificaron géneros como *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Pythium* sp., destacando *Fusarium* como

el más frecuente, en similitud con lo observado en este experimento. Asimismo, Vázquez-Siller *et al.*, (s.f.), al analizar semillas nativas mexicanas, reportaron una alta incidencia de *Fusarium*.

Marcenaro y Valkonen (2016) reportaron el aislamiento de diversos hongos patógenos en semillas de frijol, entre ellos *Macrophomina phaseolina*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, entre otros. En concordancia, el estudio realizado por Dell'Olmo *et al.* (2023), en variedades locales de frijol del sur de Italia, detectaron la presencia de *Fusarium*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum* y el complejo *Diaporthe/Phomopsis*, coincidiendo con varios de los géneros reportados en el presente estudio.

La relevancia del género *Fusarium* se basa en que continúa siendo uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a diferentes cultivos en México y el mundo, al representar una doble amenaza: ocasiona pérdidas de rendimiento y produce micotoxinas peligrosas, particularmente fumonisinas, que contaminan alimentos y forrajes y representan riesgos para la salud humana y animal (Tagyan *et al.*, 2025). Asimismo, se encontró al género *Alternaria*, reconocido por su capacidad de producir micotoxinas. En particular, *Alternaria alternata*, produce una amplia diversidad de micotoxinas de relevancia en la seguridad alimentaria; entre las más comunes se encuentran el ácido tenuazónico, el alternariol y las altertoxinas (Heflish *et al.*, 2020).

3.4. CONCLUSIONES

En general el estudio fitosanitario de colectas de semillas de frijol nativo y en peligro de extinción de la Sierra Norte de Puebla, presentó la incidencia de hongos fitopatógenos.

El género *Fusarium* presentó la mayor frecuencia de aislamiento y diversidad de especies afectando a las colectas de frijol, destacando: *F. paraclavum*, *F. clavum*,

F. aflagelliforme, *F. humicola*, *F. verticillioides*, *F. terricola*, *F. oxysporum*, y *F. temperatura*.

Otras especies identificadas fueron: *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani*.

Con base a los resultados, se sugiere generar una propuesta para el manejo integrado de hongos fitopatógenos que puedan diseminarse por semillas en el cultivo de frijol.

3.5. LITERATURA CITADA

- Abbas, A., Fang, X., Iqbal, S., Naqvi, S.A.H., Mehmood, Y., Rao, M.J., ... Negm, S. (2022). Population genetics and anastomosis group's geographical distribution of *Rhizoctonia solani* associated with soybean. *Genes*, 13(12), 2417. <https://doi.org/10.3390/genes13122417>
- Almeida, A.R.de, Medeiros, E.V. de, Gonçalves, E.P., Mosser, L.M., Mondego, J.M., Medeiros...Pinto, K.M.S. (2022). Alternatives and low-cost strategies to control of pathogens in bean seeds: A review. *Research, Society and Development*, 11(15), e153111536938. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i15.36938>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amza, J. (2018). Seed borne fungi: Food spoilage, negative impact and their management: A review. *Journal of Natural Sciences Research*, 8(1), 70 – 79. <https://iiste.org/Journals/index.php/FSQM/article/view/44999/46441>
- Ángel-García, C., Robledo-Buriticá, J., & Castaño-Zapata, J. (2018). Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium solani* f.sp. *passiflorae* en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica*, 21(1), 23-31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.659>
- Barnett, H.L., & Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (4th ed.). APS Press.
- Bonfim, J.A., Vasconcellos, R.L.F., Baldesin, L.F., Sieber, T.N., & Cardoso, E.J.B.N. (2016). Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. *Fungal Ecology*, 20, 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.01.008>
- Brankovics, B., van Diepeningen, A.D., de Hoog, G.S., van der Lee, T.A.J., & Waalwijk, C. (2020). Detecting introgression between members of the *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium oxysporum* species complexes by comparative mitogenomics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1092. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01092>
- Cabral-Miramontes, J.P., Martínez-Rocha, A.L., Rosales-Castro, M., Lopez-Rodriguez, A., Meneses-Morales, I., Del Campo-Quinteros, E., ... Ruiz-Baca, E. (2024). Antifungal activity of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) extracts from industrial waste residues on *Fusarium*

- spp. In bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agriculture*, 14(11), 1975. <https://doi.org/10.3390/agriculture14111975>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T.L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, Article 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Crous, P.W., Sandoval-Denis, M., Groenewald, J.Z., & Costa, M.M. (2021). Fusarioid-ID [Base de datos]. *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*. <https://www.fusarium.org/page/ID>
- Dell'Olmo, E., Tripodi, P., Zaccardelli, M., & Sigillo, L. (2022). Occurrence of *Macrophomina phaseolina* on chickpea in Italy: Pathogen identification and characterization. *Pathogens*, 11(8), 842. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080842>
- Dell'Olmo, E., Zaccardelli, M., Basile, B., Corrado, G., & Sigillo, L. (2023). Identification and characterization of new seedborne pathogens in *Phaseolus vulgaris* landraces of Southern Italy. *Pathogens*, 12(1), 108. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010108>
- Dettman, J.R., Eggertson, Q.A., & Kim, N.E. (2023). Species diversity and molecular characterization of *Alternaria* section *Alternaria* isolates collected mainly from cereal crops in Canada. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1194911. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194911>
- DGSV, Dirección General de Sanidad Vegetal. (2018). Protocolo de diagnóstico: Detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de semillas. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Área de Diagnóstico Fitosanitario, Laboratorio de Micología. (consultado el 02 de octubre de 2025).
- Ferrucho, R.L., Cifuentes, J.M., Ceresini, P., & García-Domínguez, C. (2012). *Rhizoctonia solani* AG-3PT is the major pathogen associated with potato stem canker and black scurf in Colombia. *Agronomic Colombiana*, 30(2), 204-211.
- Ghoneem, K.M., El-Wakil, D.A., Ahmed, M.I.M., Kamel, H.M., Rashad, E.M., Al-Askar, A.A., Elsherbiny, E.A., & Ibrahim, A.A. (2023). Biodiversity of *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* sedes in East Delta of Egypt. *Agronomy*, 13(5), 1317. <https://doi.org/10.3390/agronomy13051317>
- González-Cruces, A., Arista-Carmona, E., Díaz-Arias, K.V., Ramírez-Razo, K., Hernández-Livera, A., Acevedo-Sánchez, G., Mendoza-Ramos, C., & Mora-Aguilera, G. (2022). Epidemiología de *Bean common Mosaic virus* y *Alternaria alternata* en 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*. *Revista*

Mexicana de Fitopatología, 40(2), 188-220.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2202-8>

Granados – Montero, M. del M., Chaves-Barrantes, N., Chaverri, P., Hernández-Fonseca, J.C., & Escudero-Leyva, E. (2021). Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(2), 389-301.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2011-1>

Groenewold-Labrada, B., Mayek-Pérez, N., & Padilla- Ramírez, J.S. (2003). Hongos asociados a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 375-378. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221320.pdf>

Ha, M.S., Ryu, H., Ju, H.J., & Choi, H.W. (2023). Diversity and pathogenic characteristics of the *Fusarium* species isolated from minor legumes in Korea. *Scientific Reports*, 13(1),22516. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49736-4>

Han, S., Zhao, P., Wang, M., Jiang, X., Liu, F., Huang, J., & Cai, L. (2025). What is *Fusarium* forma specialis? *Mycology*, 16(4), 1522-1557. <https://doi.org/10.1080/21501203.2025.2528352>

Heflish, A.I.A., El Samra, I.A., & Youssef, N.H. (2020). Occurrence and control of *Alternaria alternata*, *Penicillium citrinum* and *Aspergillus flavus* mycotoxins in broad bean seeds by benzoic and sorbic acids. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G.Microbiology*, 12(2), 75-87. <https://eajbsg.journals.ekb.eg/>

Infantino, A., Grottoli, A., Bergamaschi, V., Oufensou, S., Burgess, L.W., & Balmas, V. (2023). FusaHelp: Aweb site program for the morphological identification of *Fusarium* species. *Journal of Plant Pathology*, 105, 429-436. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01349-6>

Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA 12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>

Lee, S.B., & Taylor, J.W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En M.A.Innis, D.H.Gelfand, J.J. Sninsky & T.J.White (Eds.), PCR protocols: A guide to methods and applications (pp. 282-287). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X>

Leslie, J.F., & Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing.

- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree Of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78-W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Liu, Y.J., Whelen, S., & Hall, B.D.(1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799-1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Lizcano Salas, A.F., Duitama, J., Restrepo, S., & Celis Ramírez, A.M. (2024). Phylogenomic approaches reveal a robust time-scale phylogeny of the Terminal *Fusarium* Clade. *IMA Fungus*, 15, 13. <https://doi.org/10.1186/s43008-024-00147-8>
- Lombard, L., van Doorn, R., & Crous, P.W. (2019). Neotypification of *Fusarium chlamydosporum*: A reappraisal of a clinically important species complex. *Fungal Systematics and Evolution*, 4, 183-200. <https://doi.org/10.3114/fuse.2019.04.10>
- Mahmoud, S.Y., Hosseiny, M.H., El-Shaikh, K.A.A., Obiadalla, A.H.A., & Mohamed, Y.A. (2013). Seed borne fungal pathogens associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and their impact on germination. *Journal of Environmental Studies*, 11, 19-26. <https://doi.org/10.21608/jesj.2013.192104>
- Makwana, D., Engineer, P., Dabhi, A., & Chudasama, H. (2023). Sampling methods in research: A review. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, 7(3), 762-768. https://www.researchgate.net/publication/371985656_Sampling_Methods_in_Research_A_Review
- Marcenaro, D., & Valkonen, J.P.T. (2016). Hongos patógenos transmitidos por semillas en frijol común (*Phaseolus vulgaris* cv.INTA Rojo) en Nicaragua. *PLOS ONE*, 11(12), e0168662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168662>
- Márquez, N., Giachero, M.L., Declerck, S., & Ducasse, D.A. (2021). *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 634397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634397>
- Matheny, P.B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J.M., Lim, Y.W., Nilsson, R.H., ... Hibbett, D.S. (2007). Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2), 430-451. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.024>

- Matić, S., Tabone, G., Garibaldi, A., & Gullino, M.L. (2020). *Alternaria* leaf spot caused by *Alternaria* species: An emerging problem on ornamental plants in Italy. *Plant Disease*, 104(8), 2275-2287. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0399-RE>
- Moussa, T.A.A., Al-Zahrani, H.S., Kadasa, N.M.S., Ahmed, S.A., de Hoog, G.S., & Al-Hatmi, A.M.S. (2027). Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 819-832. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0855-1>
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., & Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2044-2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Gueidan, C., Crous, P.W., & Geiser, D.M. (2009). A novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F.equiseti* and *F.chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 3851-3861. <https://doi.org/10.1128/jcm.01616-09>
- Orina, A.S., Gagkaeva, T.Y., & Gavrilova, O.P. (2023). Novel cruciferous plant host of *Fusarium temperatum*, a species mainly associated with maize. *Australasian Plant Disease Notes*, 18, 37. <https://doi.org/10.1007/s13314-023-00523-0>
- Ortiz, V., Chang, H.-X., Sang, H., Jacobs, J., Malvick, D.K., Baird, R.,...Chilvers, M.I. (2023). Population genomic analysis reveals geographic structure and climatic diversification for *Macrophomina phaseolina* isolated from soybean and dry bean across the United States, Puerto Rico, and Colombia. *Frontiers in Genetics*, 14, 1103969. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1103969>
- Peña-Zuñiga, E., Barriga-Medina, N., Ramírez-Villacís, D., Llerena-Llerena, S., Pieterse, C.M.J., Raaijmakers, J.M., & León-Reyes, A. (2025). First report of *Rhizoctonia solani* AG-3 causing black scurf on *Solanum tuberosum* cv. Superchola in Cotopaxi, Ecuador. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-24-2575-PDN>
- Rentería-Martínez, M.E., Guerra-Camacho, M.Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S.F., Varela-Romero, A., Gutiérrez-Millán, L.E., & Meza-Moller, A., del C. (2018). Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México. *Revista*

- Riedling, O.L., David, K.T., & Rokas, A. (2025). Global patterns of diversity and distribution in *Aspergillus* fungi are driven by human and environmental influences. *Current Biology*, 35(18), 4453-4466.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2025.07.081>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Naito, S., & Sneh, B. (2008). Classification of *Rhizoctonia* spp. Using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, 49(2), 93-114. <https://doi.org/10.1007/s10267-007-0394-0>
- Simmons, E.G. (2007). *Alternaria*: An identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Smith, S.N. (2007). An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bulletin*, 16, 97-120.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. St Paul, MN, USA: APS Press. EE. UU
- Summerell, B.A., Salleh, B., & Leslie, J.F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87(2), 117-128. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>
- Tagyan, A.I., AlAshaal, S., Alkhalifah, D.H.M., Abdelghany, W.R., & Hozzein, W.N. (2025). Estimating the climate change-driven global distribution of *Fusarium proliferatum* and mycotoxin risk assessment under future warming scenarios. *Frontiers in Forests and Global Change*, 8, 1673494. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2025.1673494>
- Technelysium Pty Ltd. (s.f.). ChromasPro (software de análisis de secuencias de ADN). <https://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>
- Torres-Cruz, T.J., Whitaker, B.K., Proctor, R.H., Laraba, I., Vaughan, M.M., McCormick, S.P.,... Geiser, D.M. (2022). FUSARIUM-ID v.3.0: An updated, downloadable resource for *Fusarium* species identification. *Plant Disease*, 106(6), 1610-1616. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2105-SR>

- Vásquez-Siller, L.M., Flores-Naveda, A., López-Benítez, A., Muñoz-Urbina, A., & Navarrete Maya, R. (s.f.). Asociación entre germinación y detección de hongos fitopatógenos en semilla de colecciones nativas mexicanas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología.
- Velásquez-Valle, R., & Medina-Aguilar, M.M. (2003). Patogenicidad de aislamientos de *Rhizoctonia* spp. sobre plántulas de chile (*Capsicum annuum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1), 79-82. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221113.pdf>
- Viljoen, J.J.F., Truter, M., & Kritzing, Q. (2025). Mycoflora and mycotoxins associated with stored cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) seeds from smallholder farmers in South Africa. *Phytoparasitica*, 53, 44. <https://doi.org/10.1007/s12600-025-01267-6>
- Vinogradova, S.A., Kiselev, K.V., & Suprun, A.R. (2026). An overview of the *Alternaria* genus: Ecology, pathogenicity and importance for agriculture and human health. *Journal of Fungi*, 12(1), 64. <https://doi.org/10.3390/jof12010064>
- Woodhall, J.W., Brown, L., Harrington, M., Murdock, M., Pizolotto, C.A., Wharton, P.S., & Duellman, K. (2022). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* associated with potatoes in Idaho. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-21-2683-RE>
- Woudenberg, J.H.C., Seidl, M.F., Groenewald, J.Z., de Vries, M., Stielow, J.B., Thomma, B.P.H.J., & Crous, P.W. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, forma especiales or pathotypes? *Studies in Mycology*, 82, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>
- Xia, J.W., Sandoval-Denis, M., Crous, P.W., Zhang, X.G., & Lombard, L. (2019). Numbers to names: Restyling the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43, 186-221. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.05>
- Zhang, M., Shi, Z., Chen, G., Cao, A., Wang, Q., Yan, D., Fang, W., & Li, Y. (2023). Detection and identification methods and control techniques for crop seed diseases. *Agriculture*, 13(9), 1786. <https://doi.org/10.3390/agriculture13091786>

CAPITULO IV. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS A PARTIR DE SEMILLAS NATIVAS DE FRIJOL DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA

RESUMEN

El frijol es considerado como uno de los cultivos con mayor diversidad e importancia en los municipios que conforman la Sierra Norte de Puebla, esto se debe a el papel fundamental que cumple en la dieta básica de la población y en la economía de los productores locales. No obstante, su producción puede verse afectada por diversos factores fitosanitarios, entre los que destacan las bacterias fitopatógenas. A pesar de su relevancia, no existe información sobre este tipo de patógenos en frijoles criollos de la región, ya que no se cuenta con estudios enfocados específicamente en variedades nativas de este cultivo.

Debido a que las bacterias representan uno de los principales agentes causales de pérdidas en el cultivo de frijol, consideradas como el segundo grupo de patógenos más importantes después de los hongos, el objetivo de este estudio fue identificar bacterias en colecciones de semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla, mediante caracterización patogénica, morfológica y genética para determinar la presencia de bacterias fitopatógenas. Asimismo, se planteó como hipótesis evaluar la presencia o ausencia de bacterias fitopatógenas en las 11 colectas analizadas y determinar si la altitud influye en su diversidad.

Las semillas fueron analizadas mediante el método de siembra a partir de suspensión de inóculo. La identificación bacteriana se realizó con base en la morfología colonial, la evaluación de patogenicidad mediante la reacción de hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum*, pruebas bioquímicas y la caracterización molecular del gen 16S rRNA.

Como resultado, se identificaron dos especies de bacterias, ambas pertenecientes al género *Pseudomonas*: una especie correspondiente a *Pseudomonas syringae*, y otra identificada a nivel de género como *Pseudomonas* sp.

Palabras clave: *Pseudomonas syringae*, *Nicotiana tabacum*, gen 16S rRNA, reacción de hipersensibilidad.

⁵ Tesis de Maestría en Ciencias, Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Alejandra Sánchez Estrada
Director de tesis: Luciano Martínez Bolaños

CHAPTER IV. DETECTION AND IDENTIFICATION OF PLANT-PATHOGENIC BACTERIA FROM NATIVE BEAN SEEDS FROM THE SIERRA NORTE DE PUEBLA

ABSTRACT

Beans are considered one of the most diverse and important crops in the municipalities that make up the Sierra Norte region of Puebla, due to the fundamental role they play in the local population's basic diet and in the economy of local producers. However, their production can be affected by various phytosanitary factors, notably phytopathogenic bacteria. Despite their relevance, there is no information on this type of pathogen in native beans from the region, as there are no studies specifically focused on native varieties of this crop.

Because bacteria represent one of the main causal agents of losses in bean crops – considered the second most important group of pathogens after fungi – the objective of this study was to identify bacteria in seed collections of native beans from the Sierra Norte de Puebla through pathogenic, morphological, and genetic characterization to determine the presence of phytopathogenic bacteria. Likewise, the hypothesis was to evaluate the presence or absence of phytopathogenic bacteria in the 11 collections analyzed and to determine whether altitude influences their diversity.

The seeds were analyzed using the inoculum suspension seeding method. Bacterial identification was based on colony morphology, and pathogenicity was assessed using the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum*, biochemical testing, and molecular characterization of the 16S rRNA gene.

As a result, two bacterial species were identified, both belonging to the genus *Pseudomonas*: one species corresponding to *Pseudomonas syringae*, and another identified at the genus level as *Pseudomonas* sp.

Keywords: *Pseudomonas syringae*, *Nicotiana tabacum*, 16S rRNA gene, hypersensitivity reaction.

⁶ Master's Thesis in Plant Protection Sciences, Autonomous University of Chapingo
Author: Alejandra Sanchez Estrada
Thesis director: Luciano Martinez Bolaños

4.1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bacterianas en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) generan pérdidas económicas significativas a nivel mundial; por ende, el método más importante para el manejo de dichas enfermedades es el uso de semillas libres de patógenos (Bastas & Sahin, 2017). Las bacterias fitopatógenas transmitidas por semillas sirven como inóculo primario, favoreciendo el desarrollo de epidemias tanto en condiciones de invernadero como en campo. Además, las semillas son portadoras pasivas de patógenos bacterianos de plantas a través de fronteras geopolíticas, siendo responsables de la introducción de enfermedades exóticas en nuevas áreas o de la reemergencia de enfermedades erradicadas (Dutta *et al.*, 2014). Es importante mencionar que incluso bajos niveles de contaminación en semillas pueden ser suficientes para permitir una colonización eficiente de las plantas por patógenos bacterianos (Barret *et al.*, 2016).

En una investigación realizada en Turquía se analizaron semillas de frijol, las cuales presentaron contaminación por diversas bacterias fitopatógenas, entre ellas *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* y *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, enlistadas de acuerdo con su frecuencia de aparición de mayor a menor, siendo *P.savastanoi* pv. *phaseolicola* la especie detectada con mayor frecuencia (Bastas & Sahin, 2017).

Por otro lado, en México, específicamente en el estado de Sinaloa, se realizó un estudio sobre las enfermedades bacterianas asociadas a semillas de frijol producidas en tres localidades del estado. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* presentaron mayor incidencia (Peña García, 2014).

A pesar de la relevancia fitopatológica de estas bacterias, hasta la fecha no se han reportado estudios sobre su presencia en semillas de frijol nativo de la Sierra Norte de Puebla. El conocimiento de las bacterias fitopatógenas asociadas a

estas semillas es esencial para la implementación de estrategias de manejo oportunas. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue detectar e identificar las bacterias fitopatógenas en semillas nativas de frijol de la Sierra Norte de Puebla, con la finalidad de caracterizar los patógenos a los que se enfrentan los productores locales y así mismo, establecer una base para el desarrollo de investigaciones futuras en germoplasma nativo de esta leguminosa.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Obtención y selección de muestras

El experimento se llevó a cabo empleando muestras de la colección de germoplasma de frijol nativo procedente de la Sierra Norte de Puebla, resguardado en la Universidad Autónoma Chapingo. Las muestras de semillas utilizadas en la presente investigación correspondieron a grupos clasificados en peligro de extinción y nativos.

Para la selección de las muestras del banco de germoplasma se realizó un muestreo aleatorio estratificado, para garantizar que la muestra de la población fuera representativa (Makwana *et al.*, 2023). La estratificación del muestreo se realizó con base a la altitud de cada colecta, tomando en cuenta que los cambios de altitud pueden modificar la diversidad bacteriana (Zakavi *et al.*, 2022).

La altitud de colecta se estratificó en intervalos de 500 m.s.n.m., bajo el supuesto de que dentro de este rango podrían presentarse diferencias en la presencia o ausencia de especies de bacterias fitopatógenas. Esta estratificación garantizó una representación adecuada de la variabilidad altitudinal presente en la colección de germoplasma y, por ende, en la diversidad del microbiota bacteriano. Posteriormente, se seleccionó de forma aleatoria una colecta por estrato. De cada colecta se extrajeron aleatoriamente 20 semillas para su análisis posterior.

4.2.2. Aislamiento y Purificación

Las semillas se desinfestaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 90 s, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, según las recomendaciones del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica, 2020).

Para el aislamiento de bacterias fitopatógenas se siguió la metodología de “siembra de suspensión de inóculo de semillas”, con modificaciones al protocolo descrito por Senasica (2020).

Se utilizaron 20 semillas por muestra las cuales se maceraron en vasos de precipitado con 50 mL de buffer de fosfatos (0.05 M, pH 7.5, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, 0.02% Tween 20, previamente esterilizado) y se incubaron durante 12 h a 4 °C. Posteriormente, las suspensiones se mantuvieron en agitación durante 1h a temperatura ambiente para favorecer la liberación de bacterias.

De cada suspensión se tomaron alícuotas de 100 µL y se sembraron por extensión en las cajas Petri con medio de cultivo B de King (BK; King *et al.*, 1954) y Agar nutritivo (AN) utilizando un triángulo de Drigalski estéril. Las cajas se incubaron a 28°C durante 48 a 72 h (Schaad *et al.* 2001).

La purificación de las colonias seleccionadas se realizó bajo condiciones estériles. Cada colonia individual se examinó bajo microscopio estereoscópico para confirmar su aislamiento puro y se resembró mediante estría cruzada en cajas Petri con medio BK. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h. Se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener cultivos puros, confirmados por la uniformidad morfológica de las colonias (Senasica, 2020).

4.2.3. Reacción de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Se evaluó la reacción de hipersensibilidad (HR) en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con el objetivo de confirmar la fitopatogenicidad de los aislados bacterianos obtenidos.

Bajo condiciones estériles, para cada aislado con 24 h de crecimiento se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada estéril, ajustada a una concentración de 1×10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), estandarizada mediante la escala de McFarland. La inoculación se realizó mediante infiltración con jeringa estéril en los espacios intercelulares de la superficie abaxial de hojas completamente desarrolladas y aparentemente sanas, realizando la aplicación a través de la nervadura central o directamente sobre la lámina foliar.

Las plantas se mantuvieron en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente (20 – 30 °C) y humedad relativa moderada durante 24 h. Transcurrido este periodo, se evaluó visualmente si hubo o no la presencia de HR, caracterizada por la formación de necrosis localizada y pérdida de turgencia en el área infiltrada (Rodríguez, 2009). Los aislados que indujeron HR fueron considerados como fitopatógenos. Como control negativo, se infiltraron hojas únicamente con agua destilada estéril.

4.2.4. Identificación morfológica y pruebas bioquímicas

Las colonias bacterianas previamente purificadas y cultivadas en medio BK fueron examinadas bajo microscopio estereoscópico para su caracterización morfológica colonial. Tras una incubación a 28°C durante 48 h, se registraron las características de las colonias bacterianas incluyendo forma, elevación, margen, superficie, consistencia, y color (Rodríguez, 2009).

Las pruebas bioquímicas se realizaron únicamente en los aislados que previamente resultaron positivos en las pruebas de RH. Dado que dichos aislados se asociaron al género *Pseudomonas*, se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas de oxidasa y dihidrolasa de arginina, siguiendo la metodología descrita por Rodríguez (2009).

La prueba de producción de citocromo oxidasa se realizó colocando una gota de solución acuosa al 1% de N, N-dimetil-p-fenilendiamina sobre una tira de papel

filtro. Posteriormente, con ayuda de un asa bacteriológica estéril, se depositó un poco de crecimiento bacteriano, previamente sembrado en medio BK, sobre el reactivo. La lectura se realizó a los 10 s mediante observación visual del cambio de color.

Por otro lado, la prueba de dihidrolasa de arginina se realizó a partir de un cultivo bacteriano puro. Se inoculó por picadura un tubo con medio de cultivo de arginina, y se preparó un tubo control sin inocular. Posteriormente, se adicionó aproximadamente 1 mL de aceite mineral estéril a cada tubo con el objetivo de generar condiciones anaerobias. Los tubos se incubaron a 28 °C durante 72 h, tras lo cual se evaluó el cambio de color del medio.

4.2.5. Identificación molecular

4.2.5.1. Extracción de DNA

El ADN total se extrajo a partir de cultivos puros de 24 h de crecimiento mediante el método basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2%, siguiendo el protocolo descrito por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2020). Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones de asepsia.

Aislamiento y lisis celular

Se tomaron tres porciones del cultivo puro con un asa bacteriológica estéril y se suspendieron en 1.5 mL de agua estéril grado biología molecular. La suspensión se transfirió a un microtubo estéril de 2 mL.

Extracción y purificación

Se añadieron 1.5 mL de buffer CTAB 2% (previamente calentado a 80 °C) y 100 µL de SDS al 10%. La mezcla se incubó en baño maría a 80 °C durante 30 min. Posteriormente, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron

a 16 000 ×g durante 5 min. Se recupero 1 mL del sobrenadante y se agregó 1 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v) y 30 µL de acetato de sodio 3M. Se mezclo por inversión y se centrifugó a 16 000 ×g durante 10 min. Se transfirieron 850 µL del sobrenadante a un nuevo microtubo estéril de 2 mL, se añadieron 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se mezcló nuevamente por inversión.

Precipitación y lavado

Tras centrifugación a 16 000 ×g durante 10 min, se recuperaron 850 µL del sobrenadante en un microtubo estéril de 1.5 mL. Se agregaron 500 µL de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C para precipitar el ADN. Al día siguiente se centrifugaron a 16 000 ×g por 10 min, se decantó el sobrenadante, cuidando de no tirar el pellet y se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 16 000 ×g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se resuspendió en 100 µL de agua estéril grado biología molecular.

Control de calidad

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (w/v). La concentración (ng/µL) y los índices de pureza (A260/A280 y A260/A230) se determinaron por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Únicamente las muestras con una relación A260/A280 entre 1.8 y 2.0 fueron seleccionadas para PCR.

4.2.5.2. PCR y Secuenciación

Se amplificó y secuenció un fragmento del gen 16S rRNA de aproximadamente 1485 pb, que abarca las regiones variables V1 a V9, a partir de aislados de *Pseudomonas* sp., utilizando los iniciadores universales 8F y 1492R (Turner *et al.*, 1999). La amplificación por PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad DNA Engine. Las secuencias de los cebadores, así como las condiciones de amplificación, se presentan en el Cuadro 1.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción contenía 2.5 µL de buffer PCR 1x (Invitrogen), 0.75 µL de MgCl₂ (1.5 mM) (Invitrogen), 0.4 µL de dNTPs (0.16 mM) (Invitrogen), 1.0 µL de cada cebador (forward y reverse) a una concentración final de 0.4 µM (Invitrogen), 0.3 µL de Taq ADN polimerasa (0.06U/µL) (Invitrogen), 5 µL de ADN (4-10 ng/ µL) y 14.05 µL de agua grado biología molecular.

Al finalizar la amplificación, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 150 V durante 70 min. Se cargaron 5 µL del producto de PCR mezclados con 3 µL de buffer de carga Blue/Orange teñido con GelRed. Como marcador de peso molecular se utilizó un 1kb DNA Ladder (Promega). Los fragmentos amplificados se visualizaron en un fotodocumentador Bio-Rad.

La purificación y secuenciación de los productos de PCR fue realizada por la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Cuadro 7. Cebadores utilizados y programa de amplificación para PCR.

Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Programa de amplificación
8F	GCGAATAAGCCCATATCAA	1500 pb	94°C 5min; 35 ciclos de 94°C 1min, 58°C 45s, 72°C 1min; 72°C 8min
1492R	CGTCAGGAGGTGCTAATA		

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación fueron editados y ensamblados para generar secuencias consenso utilizando el software ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, s.f.).

Las secuencias consenso limpias se analizaron mediante BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) con el objetivo de determinar sus porcentajes de identidad (Altschul *et al.*, 1990; Camacho *et al.*, 2009). Para ello, se utilizó la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Obtención y selección de muestras

Las colectas de semillas de frijol seleccionadas correspondieron a las mismas 11 utilizadas previamente en el análisis de hongos fitopatógenos. Cinco pertenecieron al grupo de variedades en peligro de extinción y seis al grupo de variedades nativas.

4.3.2. Aislamiento y Purificación

Se observó la presencia de colonias bacterianas con morfologías diferentes. La mayoría de las colonias se comenzaron a observar a las 24 h mientras que solo unas pocas a las 48 – 72 h, estas últimas con un aspecto fluido, brillante, mucoide y de coloración translúcida. Las colonias con perfiles a bacterias fitopatógenas fueron purificadas en medio BK y posteriormente inoculadas en plantas de tabaco.

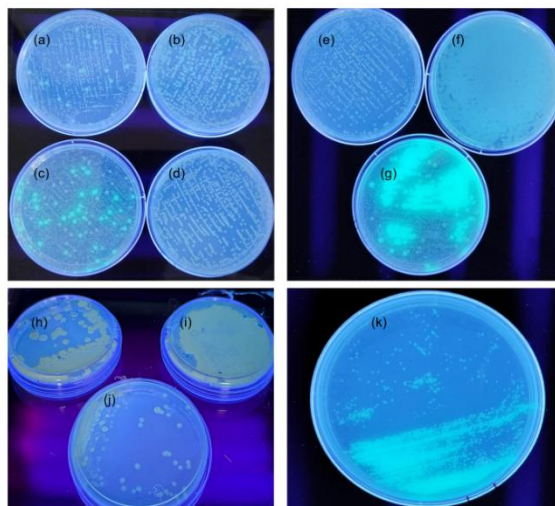


Figura 35. Cepas bacterianas en medio BK aisladas mediante la metodología de inóculo suspensión a partir de semillas. (a) Z5M5-5; (b) Z5M22-14; (c) Z5M16-4; (d) Z6M31-3; (e) Z6M45-4; (f) Z6M35-5; (g) Z4M10-13; (h) Z1M9-6; (i) Z3M23-1; (j) Z6M4-2; (k) Z2M20-6.

4.3.3. Reacción de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Cuarenta y ocho horas después de infiltrar las bacterias en las hojas de tabaco, solo dos de las cepas mostraron una reacción de hipersensibilidad. Se trató de las colectas Z2M20-6 y Z4M10-13. En ambas se observó necrosis en la zona infiltrada, acompañada de pérdida de turgencia en los tejidos (Figura 36).

Como apareció esta respuesta típica de hipersensibilidad, se consideró positiva la prueba. Esto nos indica que estas dos bacterias son fitopatógenas.

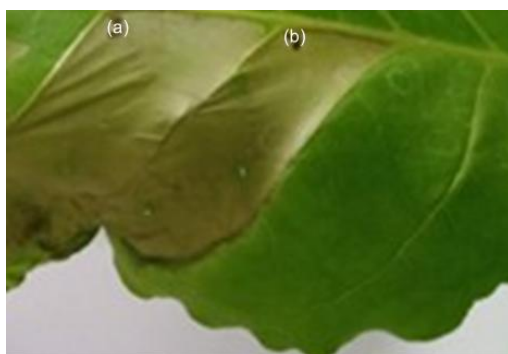


Figura 36. Reacción positiva de hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum* 48 h después de la inoculación de las bacterias. (a) Z2M20-6; (b) Z4M10-13.

4.3.4. Identificación morfológica y pruebas bioquímicas

Ambas cepas formaron colonias circulares, opacas, de color blanco lechoso y con bordes rugosos (Figura 37). Al observarlas bajo luz UV, mostraron una pigmentación fluorescente verde amarilla, característica que presentan cuando son sembradas en medio BK deficiente en hierro (SENASICA, 2021; Schaad *et al.*, 2001). Las bacterias fueron gram negativas y las pruebas de producción de citocromo oxidasa y de dihidrolasa de arginina resultaron negativas. Estas características permitieron asociar a las bacterias con el género *Pseudomonas* spp. (Arnold *et al.*, 2011).

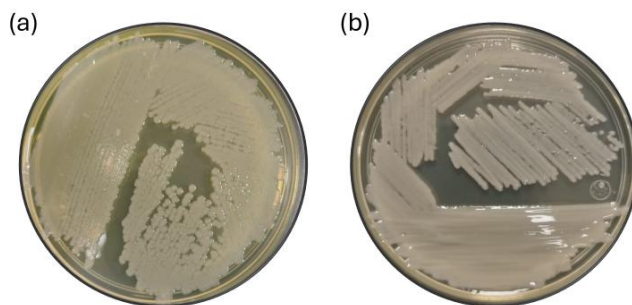


Figura 37. Cepas bacterianas puras correspondientes al género *Pseudomonas* spp. (a) Z2M20-6; (b) Z4M10-13.

4.3.5. Identificación molecular

Mediante la amplificación del gen 16S rRNA y el posterior análisis en BLAST con los valores más altos de identidad, se pudieron identificar dos aislados de bacterias fitopatógenas.

El análisis BLAST mostró para la cepa correspondiente a la colecta Z2M20-6 un porcentaje de identidad del 96.87% con secuencias de *Pseudomonas syringae* depositadas en NCBI. Mientras que la cepa correspondiente a la colecta Z4M10-13 se obtuvo un porcentaje de identidad del 98.14% con secuencias de *Pseudomonas* sp., confirmando así los resultados obtenidos en la identificación morfológica.

4.3.6. Mapas “Sierra Norte de Puebla”

Los mapas muestran la variación altitudinal en la Sierra Norte de Puebla. En ellos se delimitan los municipios productores de donde provienen las muestras de las semillas de frijol analizadas en este estudio, resaltando su contorno con color negro o rojo. En los municipios que están marcados con rojo corresponden a aquellos en los que no se detectó la presencia de bacterias fitopatógenas. Por ejemplo, en el mapa (A) grupo en “peligro de extinción”, en ninguna colecta analizada presentó la presencia de estos microorganismos.

En la figura (B) se presenta el mapa correspondiente a las colectas de frijoles “nativos”. Los municipios donde se detectó la presencia del género *Pseudomonas* están señalados con un círculo de color rosa. En la colecta Z2M20-6, proveniente de Ayotoxco de Guerrero (0-500 m.s.n.m.), se registró la presencia de este género bacteriano. De igual manera, en la colecta Z4M10-13, correspondiente al municipio de Libres (2001 a 2500 m.s.n.m.), también se detectó la presencia de *Pseudomonas*.

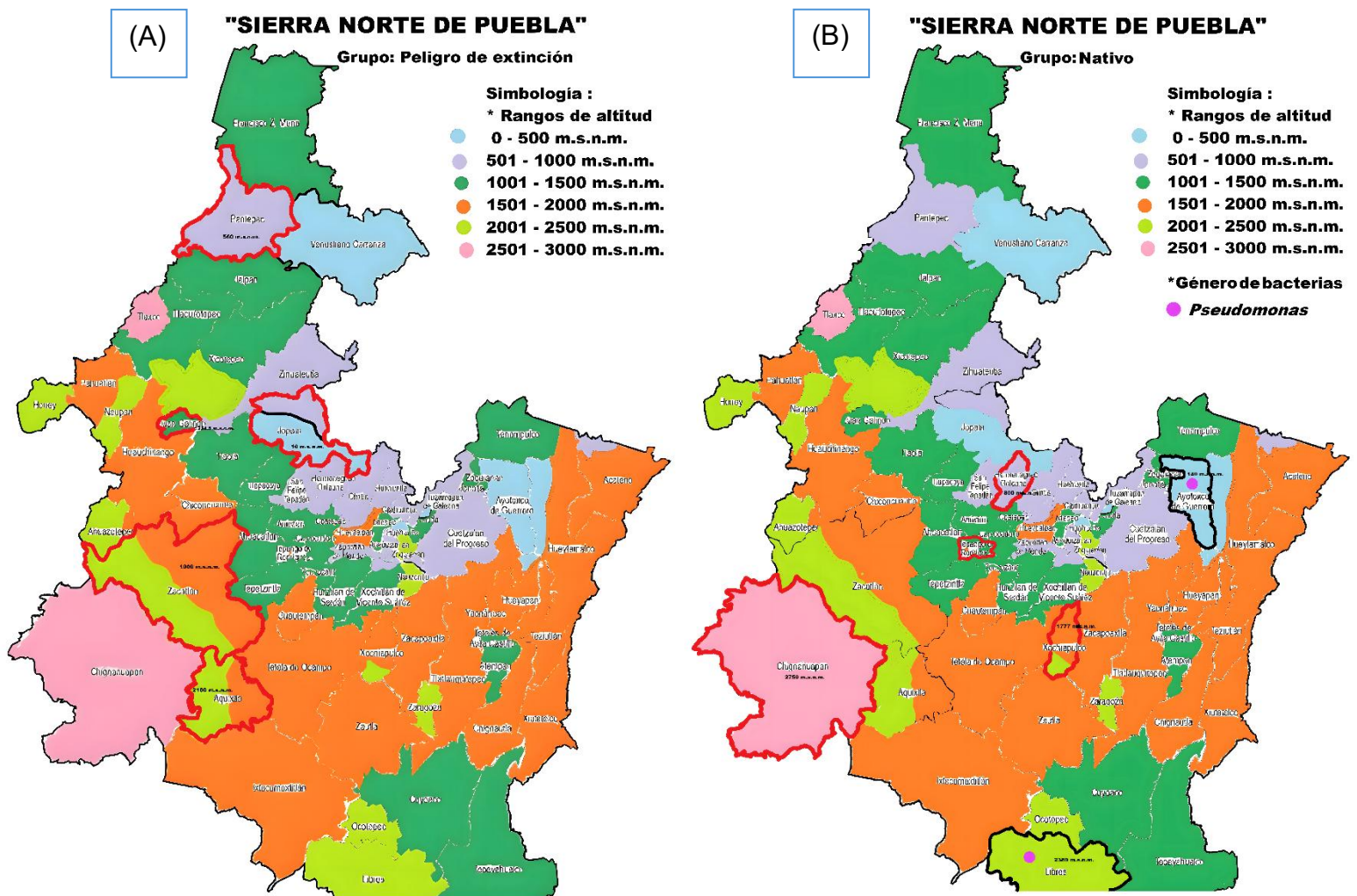


Figura 38. Mapas de la Sierra Norte de Puebla que muestran la distribución altitudinal de los municipios, con la localización de bacterias fitopatógenas en semillas de frijol. (A) semillas clasificadas como en peligro de extinción. (B) nativos. El círculo rosa indica la presencia de *Pseudomonas*.

4.3.7. DISCUSIÓN

La presencia del género *Pseudomonas* en dos de las colectas de semillas de frijoles nativos, uno en zona baja y otro en zona media alta, junto con su ausencia en las demás regiones altitudinales, sugiere que la altitud podría influir en la distribución de estas bacterias.

Pseudomonas syringae se adapta especialmente bien a gradientes altitudinales. Estudios mencionan que esta bacteria es frecuente en zonas productoras de frijol en altitudes medias a altas entre 1500 a 2500 m.s.n.m., similares al municipio de Libres, en donde las condiciones ambientales son frescas y húmedas, las cuales favorecen la supervivencia y transmisión de la bacteria, lo cual coincide con lo documentado para esta enfermedad en regiones templadas, y en zonas por encima de altitudes medias en los trópicos (Taylor *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 2011). Araujo *et al.*, 2019, mencionan que las proteínas de nucleación de hielo de *Pseudomonas syringae*, le confieren una ventaja adaptativa, al permitirle tolerar mejor las bajas temperaturas y sobrevivir en las condiciones propias de altitudes elevadas.

Por otra parte, en altitudes bajas, como por ejemplo la del municipio de Ayotoxco de Guerrero (0 – 500 m.s.n.m.) , la presencia de *Pseudomonas* podría verse favorecida por una mayor humedad relativa y por mecanismos de dispersión como salpicaduras o riego, esto se debe a que su ciclo de vida está estrechamente ligado al ciclo del agua, por lo que en la Sierra Norte de Puebla, algunos rangos altitudinales pueden actuar como nichos favorables para el desarrollo de esta bacteria en semillas nativas (Morris *et al.*, 2008).

La ausencia de bacterias fitopatógenas en las nueve colectas de las semillas de frijol es compleja porque puede deberse a varios factores, entre ellos puede ser que las variedades hayan acumulado cierta tolerancia o resistencia por selección realizada por los agricultores locales, pero el mencionar eso debe de requerir de muchos estudios más a fondo sobre su caracterización genética entre otras cosas.

Además, cabe mencionar, que las semillas estuvieron almacenadas durante aproximadamente 2 años a 4°C. Heet *et al.*, 2021 en su estudio sobre el microbioma de semillas señala que temperaturas de almacenamiento de 4°C provoca una pérdida más rápida de microorganismos. *Pseudomonas syringae* tiene alta viabilidad en condiciones frías por lo mencionado anteriormente con respecto a sus proteínas de nucleación de hielo. He (2010), menciona que la supervivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* es mejor a temperaturas bajas entre -18°C que a temperatura ambiente. Y la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* puede sobrevivir hasta 24 años en semillas de frijol almacenadas, pero a temperatura ambiente (Osdaghi *et al.*, 2020). Con esto es posible decir que las bacterias pudieron entrar en un periodo de latencia y que su viabilidad pudo haber disminuido durante ese tiempo, lo que hizo aún más difícil su aislamiento.

Finalmente, un estudio realizado por Peña (2014) en semillas de frijol de Sinaloa, identificó a los organismos bacterianos *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, siendo *Pseudomonas* el género de mayor presencia, por lo que este estudio coincide con la presente investigación.

4.4. CONCLUSIONES

El estudio bacteriológico a colectas de semillas de frijol nativo y en peligro de extinción de la Sierra Norte de Puebla determinó la presencia de *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas* sp.

Las bacterias se detectaron en semillas de dos ambientes de la Sierra Norte de Puebla: Libres, con una altitud de 2380 m.s.n.m. con clima templado subhúmedo y temperaturas entre 4°C y 23°C y Ayotoxco de Guerrero con altitud de 140 m.s.n.m. caracterizado por un clima cálido húmedo con temperaturas que oscilan entre 16°C y 34°C.

Finalmente, se recomiendan algunas estrategias de manejo para los productores locales que podrían ayudar a disminuir la incidencia de *Pseudomonas* en el cultivo de frijol, tales como la rotación de cultivos, la selección de semillas locales sanas, el manejo adecuado del riego, la eliminación de residuos de cosecha y, en condiciones de alta incidencia de la enfermedad considerar la aplicación de algunos tratamientos benéficos.

4.5. LITERATURA CITADA

- Araujo, G.G. de, Rodrigues, F., Gonçalves, F.L.T., & Galante, D. (2019). Survival and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* strains exposed to simulated high-altitude atmospheric conditions. *Scientific Reports*, 9(1), 7768. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44283-3>
- Arnold, D.L., Lovell, H.C., Jackson, R.W., & Mansfield, J.W. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: From “has bean” to supermodel. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), 617-627. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00697.x>
- Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A., & Jacques, M.-A. (2016). Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), 791-795. <https://doi.org/10.1111/mpp.12382>
- Bastas, K.K., & Sahin, F. (2017). Evaluation of seedborne bacterial pathogens on common bean cultivars grown in central Anatolia region, Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 147, 239-253. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0995-6>
- Chandel, A., Mann, R., Kaur, J., Norton, S., Edwards, J., Spangenberg, G., & Sawbridge, T. (2021). Implications of seed vault storage strategies for conservation of seed bacterial microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 784796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784796>
- Dutta, B., Gitaitis, R., Smith, S., & Langston, D.Jr. (2014). Interactions of seedborne bacterial pathogens with host and non-host plants in relation to seed infestation and seedling transmission. *PLOS ONE*, 9(6), e99215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099215>
- He, Y. (2010). Improved seed health tests for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean (Master's thesis, Iowa State University). Iowa State University. <https://dr.lib.iastate.edu/server/api/core/bitstreams/b602d604-eb8b-4453-bc12-cb397116cb05/content>
- King, E.O., Ward, M.K., & Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307.
- Makwana, D., Engineer, P., Dabhi, A., & Chudasama, H. (2023). Sampling methods in research: A review. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, 7(3), 762-768. https://www.researchgate.net/publication/371985656_Sampling_Methods_in_Research_A_Review
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A.,...Thompson, B.M.(2008). The life cycle of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal*, 2(3), 321-334. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.113>

- Osdaghi, E., Young, A.J., & Harveson, R.M. (2020). Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Molecular Plant Pathology*, 21, 605-621. <https://doi.org/10.1111/mpp.12926>
- Peña García, L.M. (2014). Enfermedades bacterianas asociadas a semillas de frijol, producidas en tres localidades de Sinaloa [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán]. <https://tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx/ptd2014/abril/0712055/0712055.pdf>
- Rodríguez, M.M.L. (2009). Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., & Chun, W. (Eds.). (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3rd ed.). *American Phytopathological Society Press*.
- SENASICA Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Ficha técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad (Versión 1.0) (consultado el 01 de octubre de 2025).
- SENASICA Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Ficha técnica: Metodologías para la extracción de DNA total (Versión 1.0) (consultado el 02 de noviembre de 2025).
- Taylor, J.D., Teverson, D.M., Allen, D.J., & Pastor – Corrales, M.A. (1996). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathology*, 45(3), 469-478. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-147.x>
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., & Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Zakavi, M., Askari, H., & Shahrooei, M. (2022). Bacterial diversity changes in response to an altitudinal gradient in arid and semi-arid regions and their effects on crops growth. *Frontiers in Microbiology*, 13, 984925. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.984925>