UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

UNIDAD REGIONAL LOS MOCHIS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

T E S I S:

MORFOLOGÍA, VIRULENCIA, COMPATIBILIDAD VEGETATIVA Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* DE CAMPOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA, MÉXICO.

QUE PRESENTA:

David Alonso Cota Rodríguez

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Hugo Beltrán Peña

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza

Los Mochis, Sinaloa, México. Septiembre de 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

VICERRECTORÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Asunto: **carta conclusión de tesis para opción de grado**.
Los Mochis, Sinaloa 07 de septiembre de 2020.

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

P r e s e n t e

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

Nombre del maestrante**: David Alonso Cota Rodríguez** Matricula**: 18021408.**

Nombre de Tesis: **MORFOLOGÍA, VIRULENCIA, COMPATIBILIDAD VEGETATIVA Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* DE CAMPOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA, MÉXICO.**

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

A t e n t a m e n t e.

Dr. Hugo Beltrán Peña
Director de Tesis

El presente trabajo de investigación titulado "**MORFOLOGÍA, VIRULENCIA, COMPATIBILIDAD VEGETATIVA Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* DE CAMPOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA, MÉXICO.**" realizado por el **Ing. David Alonso Cota Rodríguez** con matrícula **18021408**, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

COMITÉ DE TESIS:

Dr. Hugo Beltrán Peña
Director de Tesis

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza
Director de Tesis

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez
Asesora de Tesis

Dr. Rubén Félix Gastélum
Asesor de Tesis

Los Mochis, Sinaloa. Septiembre de 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día _10_ del mes _noviembre_ del año _2020_, quien suscribe _David Alonso Cota Rodríguez_ alumno del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente (Registro CONACyT 004128) con número de matrícula _18021408_, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de _Dr. Hugo Beltrán Peña y Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza_ y cede los derechos del trabajo titulado "Morfología, virulencia, compatibilidad vegetativa y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Sclerotium rolfsii* de campos de frijol en el norte de Sinaloa, México", a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

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

David Alonso Cota R.

David Alonso Cota Rodríguez

El presente trabajo de investigación, se desarrolló en:

El Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte (FAVF), Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa.

El Laboratorio de Fitopatología y Microbiología de la Universidad Autónoma de Occidente (UAdeO), Unidad Regional Los Mochis, Sinaloa.

El Laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Universidad Autónoma Chapingo (UACh), Texcoco, Estado de México.

El Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios Agroalimentarios y Forestales (LANISAF), Texcoco, Estado de México.

DEDICATORIA

A: Dios

A: Mi familia

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme vida y salud siempre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento durante mi programa de estudios de maestría.

Al Dr. Hugo Beltrán Peña y Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, por sus valiosas aportaciones en la elaboración de esta investigación y a mi vida profesional, por su excelente dirección en la planeación, realización y finalización de este proyecto, por la confianza y amistad.

Al Dr. Rubén Félix Gastélum y Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez, por el apoyo en diversas etapas de mi vida profesional.

Al Dr. Quintín Armando Ayala Armenta, por sus buenos consejos y amistad.

Al Dr. Moisés Camacho Tapia y al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir, por las facilidades durante mi estancia en la Universidad Autónoma de Chapingo, por su asesoría técnica en la extracción y amplificación de ADN y por su enorme amabilidad.

A mis maestros del posgrado en Fitopatología y Medio Ambiente: Dra. Rosa Longoria, Dra. Arlene Mora, Dr. Miguel Apodaca, Dr. Bardo Sánchez, Dr. Jesús Cordero, MC. José Bojórquez y MC. Cecilia Romero, por todo lo que les aprendí.

A mis compañeros y amigos del posgrado en Fitopatología y Medio Ambiente: Edgar, Felipe, Abelard, Daniela, Álvaro, Juan, Ángel, Daniel y Flavio por el apoyo brindado en los momentos que los requerí.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE CUADROS ..... **i**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **ii**

RESUMEN GENERAL ..... **v**

GENERAL ABSTRACT ..... **vi**

I. INTRODUCCIÓN GENERAL **1**

II. ANTECEDENTES **5**

III. REVISIÓN DE LITERATURA **7**

3.1. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 7

3.1.1. Origen y distribución 7

3.1.2. Importancia económica del frijol 8

3.1.3. Principales países productores, exportadores y consumidores 8

3.2. Enfermedades del frijol 9

3.2.1. Enfermedades causadas por bacterias 9

3.2.2. Enfermedades causadas por virus 10

3.2.3. Enfermedades causadas por nematodos 10

3.2.4. Enfermedades causadas por hongos y oomicetes 11

3.3. *Sclerotium rolfsii* 12

3.3.1. Importancia, distribución y hospedantes 12

3.3.2. Sintomatología 13

3.3.3. Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad 13

3.3.4. Ciclo de vida y patogénesis 14

3.3.5. Morfología 16

3.3.6. Diversidad genética de *Sclerotium rolfsii* 17

3.4. Estrategias y medidas de control 19
3.4.1. Control físico y cultural 20
3.4.2. Control biológico 21
3.4.3. Control químico 22
IV. JUSTIFICACIÓN 26
V. OBJETIVOS 27
5.1. Objetivo general 27
5.2. Objetivos específicos 27
VI. HIPÓTESIS 28
VII. REFERENCIAS 29

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN, VIRULENCIA Y COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* DE CAMPOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA, MÉXICO.

RESUMEN 45
ABSTRACT 46
1.1. INTRODUCCIÓN 47
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS 49
1.2.1. Recolección de muestras 49
1.2.2. Aislamiento, purificación y preservación de aislados 49
1.2.3. Caracterización morfológica 50
1.2.4. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) 51
1.2.5. Prueba de patogenicidad y virulencia 51
1.2.6. Análisis de datos 52
1.3. RESULTADOS 53
1.3.1. Síntomas e incidencia de la enfermedad 53
1.3.2. Morfología de la colonia y esclerocios 55

1.3.4. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) 61

1.4. DISCUSIÓN 64

1.5. CONCLUSIONES 70

1.6. REFERENCIAS 71

CAPÍTULO II. SENSIBILIDAD DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* OBTENIDOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA A LOS FUNGICIDAS TEBUCONAZOL Y METIL−TIOFANATO.

RESUMEN 77

ABSTRACT 78

2.1. INTRODUCCIÓN 79

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS 82

2.2.1. Origen y colección de aislados de *Sclerotium rolfsii* 82

2.2.2. Fungicidas 82

2.2.3. Sensibilidad a fungicidas 83

2.2.4. Análisis de datos 84

2.3. RESULTADOS 85

2.3.1. Distribución de la sensibilidad a tebuconazol 85

2.3.2. Distribución de la sensibilidad a metil-tiofanato 91

2.4. DISCUSIÓN 95

2.5. CONCLUSIONES 102

2.6. REFERENCIAS 103

CONCLUSIONES GENERALES 111

RECOMENDACIONES GENERALES 112

ÍNDICE DE CUADROS

Página

CAPÍTULO I

Cuadro 1. Incidencia y sitios de recolección de raíces y tallos de frijol cv. Azufrado Higuera con síntomas de pudrición para la obtención de aislados de *Sclerotium rolfsii*, en el norte de Sinaloa, México**……55**

Cuadro 2. Características morfológicas de la colonia y esclerocios de 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de raíces y tallos de plantas de frijol con síntomas de pudrición, en campos comerciales del norte de Sinaloa, México**……...……56**

Cuadro 3. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) y virulencia de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos de frijol cv. Azufrado Higuera distribuidos en el norte de Sinaloa**……64**

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Sitios de recolección de raíces y tallos de frijol cv. Azufrado Higuera con síntomas de pudrición para la obtención de aislados de *Sclerotium rolfsii*, en el norte de Sinaloa, México**. 83**

Cuadro 2. Medias de números de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* en colonias de 21 días de edad, de aislados pertenecientes a cada rango de concentración efectiva de tebuconazol que inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}), obtenidos de la distribución de frecuencia**……..……86**

Cuadro 3. Costo de adaptabilidad en la producción de esclerocios y crecimiento micelial, de aislados de *Sclerotium rolfsii* con respecto a la sensibilidad a tebuconazol**.....90**

Cuadro 4. Medias de número de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* a los 21 días de edad de la colonia, de aislados pertenecientes a cada rango de concentración efectiva de metil-tiofanato que inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}), obtenidos de la distribución de frecuencia**. 92**

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1. Ciclo de la enfermedad de *Sclerotium rolfsii* en cultivo de frijol……..……**16**

Figura 2. Morfología de *Sclerotium rolfsii*. a) Colonia joven de cuatro días de edad con esclerocios en formación de color blanco, en medio de cultivo papa dextrosa agar. b) Colonia madura de 10 días de edad. c) Esclerocios maduros color marrón. d) Conexión en argolla en septo de hifa primaria. e) Anastomosis hifal. f) Estructuras basidiales de la fase sexual: basidio (ba); basidiospora (bs); esterigma (es)……...……..**19**

CAPÍTULO I

Figura 1. Síntomas y signos de *Sclerotium rolfsii* en tejidos de frijol cv. Azufrado Higuera. a) Planta con síntomas de marchitez. b) Plantas muertas en etapa temprana. c) Lesión café oscura en tallo. d) Lesión café oscura en tallo, con micelio blanco y esclerocios. e) Hoja con lesión aguanosa con crecimiento micelial blanco. f) Ramas, peciolos y flores colonizados. g) Vaina y granos con lesión aguanosa**. 54**

Figura 2. Tipos de crecimiento micelial y coloración de esclerocios de aislados de *Sclerotium rolfsii* en medio de cultivo papa dextrosa agar, incubados a 25 °C. a) Crecimiento micelial esponjoso. b) Crecimiento micelial compacto. c) Crecimiento micelial fibroso. d) Esclerocios color marrón oscuro. e) Esclerocios color marrón rojizo. f) Esclerocios color marrón claro……**59**

Figura 3. Lesiones desarrolladas 5 días después de la inoculación de los aislados de *Sclerotium rolfsii* en tallos de frijol cv. Azufrado Higuera. a) Aislado de virulencia alta. b) Aislado de virulencia moderada. c) Aislado de virulencia baja. d) Control**. 60**

Figura 4. Virulencia de 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* en plantas de frijol cv. Azufrado Higuera infectadas de forma artificial**. 61**

Figura 5. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de tejidos sintomaticos de frijol. a) Reacción micelial incompatible. b) Reacción micelial compatible. c) Reacción micelial incompatible de un aislado representativo de cada uno de los seis GCVs: i) GCV I, ii) GCV II, iii) GCV III, iv) GCV IV, v) GCV V y vi) GCV VI**. 62**

Figura 6. Sitios de recolección de aislados de *Sclerotium rolfsii* asociados a pudrición de raíz y tallo del frijol en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México**.....63**

CAPÍTULO II

Figura 1. Distribución de frecuencia, de valores de concentración efectiva de tebuconazol a la cual se inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos de frijol en el norte de Sinaloa, México**. 85**

Figura 2. Efecto de tebuconazol sobre la producción de esclerocios *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. a) Aislado FAVF234 del municipio de Guasave. b) Aislado FAVF268 del municipio de Ahome**……86**

Figura 3. Valores de concentración efectiva de tebuconazol a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii*, distribuidos en 14 campos comerciales de frijol, en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México**……...87**

Figura 4. Sitios de recolección de aislados de *Sclerotium rolfsii* asociados a pudrición de raíz y tallo del frijol en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México**.....88**

Figura 5. Efecto de tebuconazol sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. a) Aislado FAVF268 del municipio de Ahome. b) Aislado FAVF234 del municipio de Guasave**……89**

Figura 6. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva para metil-tiofanato a la cual se inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos de frijol en el norte de Sinaloa, México**……92**

Figura 7. Efecto de metil-tiofanato sobre la producción de esclerocios *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. a) Aislado FAVF228 del municipio de Guasave. b) Aislado FAVF224 del municipio de Ahome**. 93**

Figura 8. Valores de concentración efectiva para metil-tiofanato a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii*, distribuidos en 14 campos comerciales de frijol, en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México**. 93**

Figura 9. Sitios de recolección de aislados de *Sclerotium rolfsii* asociados a pudrición de raíz y tallo del frijol en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México**.....94**

Figura 10. Efecto de metil-tiofanato sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. a) Aislado FAVF228 del municipio de Ahome. b) Aislado FAVF224 del municipio de Guasave**……95**

RESUMEN GENERAL

MORFOLOGÍA, VIRULENCIA, COMPATIBILIDAD VEGETATIVA Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* DE CAMPOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA, MÉXICO

El norte de Sinaloa es el principal productor de frijol en México y es recurrente la pérdida de producción causada por *Sclerotium rolfsii*, sin embargo, hay poca información sobre el patógeno. El objetivo de este estudio fue determinar la morfología, virulencia, grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) y sensibilidad a metil-tiofanato y tebuconazol de 50 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de 14 campos comerciales de frijol en el norte de Sinaloa. El análisis morfológico consistió en registrar los caracteres cualitativos y cuantitativos de las colonias y esclerocios. La virulencia se evaluó en tallos de plantas de frijol inoculados con discos miceliales. Los GCVs se determinaron por la confrontación del crecimiento micelial de todos los aislados entre sí. La sensibilidad se evaluó con una prueba *in vitro* para determinar la concentración efectiva que inhibe 50% del crecimiento micelial, para cada combinación de aislado-fungicida. Los resultados de la caracterización mostraron diferencias morfológicas como tamaño, color, forma y el número de esclerocios producidos por los diferentes aislados. La prueba de patogenicidad y virulencia indicó que todos los aislados fueron patogénicos y hubo diferencia en la virulencia de los aislados. La compatibilidad vegetativa arrojó seis grupos, demostrando gran diversidad genética en poblaciones de *S. rolfsii*. Los aislados de *S. rolfsii* presentaron valores de CE_{50}= 0.0299−0.5165 µg mL^{-1} (media= 0.1932 µg mL^{-1}) para tebuconazol y de CE_{50}= 152−7,666 µg mL^{-1} (media= 2,291 µg mL^{-1}) para metil-tiofanato. Los resultados revelaron la sensibilidad de aislados a tebuconazol (DMI) y poco sensibles a metil-tiofanato (MBC). Los datos obtenidos servirán para monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *S. rolfsii* de frijol a fungicidas DMIs y MBCs. Esta información muestra la estructura poblacional de *S. rolfsii* en campos agrícolas en el norte de Sinaloa y contribuirá al diseño de estrategias de manejo integrado de la enfermedad.

Palabras clave: *Sclerotium rolfsii*, *Phaseolus vulgaris*, virulencia, compatibilidad vegetativa, sensibilidad.

GENERAL ABSTRACT

MORFOLOGY, VIRULENCE, VEGETATIVE COMPATIBILITY AND SENSIBILITY TO FUGICIDES OF *Sclerotium rolfsii* ISOLATED FROM BEAN CROPS IN NORTHERN SINALOA, MEXICO.

Northern Sinaloa state, is the main bean (*Phaseolus vulgaris*) producer in México and the loss of production by *Sclerotium rolfsii* is frequently reported. However, there is little information about this pathogen. The aim of this study was to determine the morphology, virulence, vegetative compatibility groups (VCGs) and sensibility to methyl-thiophanate and tebuconazole of 50 *S. rolfsii* isolates obtained from 14 commercial bean crops in northern Sinaloa state. The morphological analysis was performed by the registration of qualitative and quantitative characters of the colonies and sclerotia. Virulence was tested in the stems of bean plants inoculated with mycelial plugs. The VCGs were determined by the confrontation of the mycelial growth between all the isolates. The sensibility was evaluated *in vitro* to determine the effective concentration to inhibit the 50% of the mycelial growth for each isolate-fungicide combination. Results obtained for the characterization showed morphological differences of size, color, shape and numbers of sclerotia produced by the isolates. Pathogenicity and virulence tests showed that all the isolates were pathogenic and there were differences in virulence. For the vegetative compatibility 6 groups were obtained, which means great genetic diversity in the *S. rolfsii* populations. The isolates showed values of CE_{50}= 0.0299−0.5165 µg mL^{-1} (mean= 0.1932 µg mL^{-1}) for tebuconazole and CE_{50}= 152−7,666 µg mL^{-1} (mean= 2,291 µg mL^{-1}) for methyl-thiophanate. These results showed the sensibility of the isolates to tebuconazole and the low sensibility to methyl-thiophanate. The data obtained showed the population structure of *S. rolfsii* in agricultural fields in northern Sinaloa state and will contribute to the design of strategies for the integrated management of the disease.

Key words: *Athelia rolfsii*, *Phaseolus vulgaris*, virulence, vegetative compatibility, sensibility.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de mayor importancia económica a nivel mundial, en Latinoamérica el frijol forma parte de la alimentación básica y su consumo satisface los requerimientos necesarios (SIAP, 2017). México ocupa el sexto lugar en producción con 283,197 t, solo por detrás de la India, Myanmar, Brasil, EE. UU. y China (FAO, 2017). En México, la producción de frijol se distribuye en 23 estados, sin embargo, más del 97% de la producción se concentra en los estados de Sinaloa, Nayarit, Sonora, Chiapas y Veracruz, siendo el estado de Sinaloa el que más produce con 128,144 t, principalmente en los municipios de Guasave y Ahome con el 40 y 16%, de la producción total del estado, de forma respectiva (SIAP, 2019).

El cultivo de frijol es afectado por enfermedades fungosas, entre la que destaca la pudrición de raíz y tallo inducida por *Sclerotium rolfsii* (=*Athelia rolfsii*) (Al-Askar *et al*., 2013; Marcenaro y Valkonen, 2016). Este hongo sobrevive en esclerocios presentes en residuos de tejidos vegetales y en el suelo (Naseri y Mousavi, 2008). En condiciones ambientales favorables infecta la base del tallo, después coloniza e invade la raíz con el típico micelio blanco algodonoso y sedoso (Kwon *et al*., 2016; Mahadevakumar *et al*., 2018; Manu *et al*., 2018). Las lesiones se vuelven café oscuro y enseguida muestran pudrición, lo que conduce a perdidas de rendimiento, y llega a causar una mortalidad de 70−95% en condiciones favorables para el patógeno (Sharma y Ghosh, 2017; Tarafdar *et al*., 2018).

El estado asexual o anamorfo de *S. rolfsii*, se caracteriza por la formación de abundante micelio aéreo blanco, mientras que, el estado sexual o teleomorfo rara vez se ha registrado en condiciones naturales, por lo que es considerado como un hongo de

reproducción asexual (Nalim *et al*., 1995; Almeida *et al*., 2001; Rivera *et al*., 2018). El conocimiento de la variabilidad genética puede ofrecer información útil, sobre la distribución y dispersión del hongo, así como contribuir a la mejora en el diseño de estrategias de manejo integrado en las enfermedades que ocasiona (Leslie, 1993; Xie *et al*., 2014). Una herramienta indirecta utilizada para este propósito, es la caracterización de poblaciones mediante la ocurrencia de grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) (Leslie, 1993; Serra y Silva, 2005; Xie *et al*., 2014). Este método es relevante en hongos en los que la reproducción sexual tiene un mínimo impacto en su ciclo de vida (Kohn *et al*., 1991; Okabe y Matsumoto, 2000; Sarma *et al*., 2002). En este sentido, la importancia de los GCVs radica en preservar la identidad al impedir el intercambio de información genética a otros GCVs o bien de tener recombinación genética dentro de un mismo GCV (Remesal *et al*., 2012; Xie *et al*., 2014).

Diversas investigaciones han estimado la diversidad genética entre poblaciones de *S. rolfsii* (Cilliers *et al*., 2000; Okabe y Matsumoto, 2000; Almeida *et al*., 2001; Punja y Sun, 2001; Sarma *et al*., 2002; Cilliers *et al*., 2003; Adandonon *et al*., 2005; Bagwan, 2011; Remesal *et al*., 2012; Xie *et al*., 2014). Cabe mencionar, que no es clara la relación de los GCVs con respecto a las características morfológicas, fisiológicas, patogénicas e incluso en el nivel de resistencia a fungicidas (Milgroom, 1996; Cilliers *et al*., 2000; Almeida *et al*., 2001; Adandonon *et al*., 2005).

Sclerotium rolfsii es un hongo difícil de manejar, esto se debe a la variabilidad genética de sus poblaciones, amplia distribución en suelos agrícolas, amplio rango de hospedantes y su habilidad de persistir por periodos largos en suelos mediante la formación de esclerocios (Flores-Moctezuma *et al*., 2006; Sennoi *et al*., 2013). Entre las herramientas básicas para el manejo de la pudrición de raíz y tallo del frijol causada por

S. rolfsii en condiciones de campo, se encuentran los fungicidas de acción especifica (Bowen *et al*., 1997; Khatri *et al*., 2017). El modo de acción especifico de los fungicidas pertenecientes a la clase MBC (metil-benzimidazol-carbamatos), se basa en la inhibición de la producción de microtúbulos, mediante su unión a las subunidades heterodiméricas de la molécula tubulina (Peres *et al*., 2004). Sin embargo, estos fungicidas, presentan un riesgo de aparición de resistencia alto por parte del patógeno (Ma y Michailides, 2005). Existen diversos reportes, donde *S. rolfsii*, se ha encontrado como resistente a fungicidas MBC (Kanwal *et al*., 2012; Manu *et al*., 2012; Arshad y Iqra, 2015; Rangarani *et al*., 2017; Divya y Narayanaswamy, 2018; Shirsole *et al*., 2019).

Por otra parte, los fungicidas pertenecientes a la clase DMI (inhibidores de la demetilación), están representados en lo principal por el grupo “triazol” (FRAC, 2012). El modo de acción de estos fungicidas se basa en inhibir la síntesis de ergosterol y la demetilación de los precursores de los esteroles (Mellado *et al*., 2001; Cilliers *et al*., 2003; Yang y Clausen, 2005; Ahemad y Khan, 2010; Dutta *et al*., 2014). El uso continuo de estos fungicidas para controlar enfermedades, puede conducir al desarrollo de resistencia, como se reportó en trabajos previos en Pakistán (Fouzia y Saleem, 2006; Arshad y Iqra, 2015), India (Kumar *et al*., 2014) y en EE. UU. (Khatri *et al*., 2017).

Los tratamientos con fungicidas son un componente clave en el manejo integrado de enfermedades de las plantas, sin embargo, la aparición de resistencia se ha convertido en un factor importante que limita la eficacia y la vida útil de estos, los cuales presentan costos cada vez más altos, incluso llegan a no ser redituables las aplicaciones de los mismos para algunos cultivos de interés agrícola (Ma y Michailides, 2005; De Miccolis *et al*., 2015). El monitoreo de la sensibilidad de poblaciones de aislados de campo mediante rangos de concentraciones y valores de CE_{50} puede ayudar a determinar qué proceso de

selección está ocurriendo y la probabilidad de una pérdida rápida del control de la enfermedad (Brent y Hollomon, 2007).

Por otra parte, la evolución de la resistencia de los patógenos, es una amenaza para el manejo de los cultivos. Las mutaciones que confieren resistencia pueden resultar en penalizaciones de aptitud física, lo que resulta en una compensación evolutiva, estas penalizaciones pueden resultar de las limitaciones funcionales de un sitio en específico de evolución o de los costos de asignación de recursos de sobreexpresión (Hawkins y Fraaije, 2018).

II. ANTECEDENTES

Hernández-Pérez *et al*. (2018) informaron que, en México, las enfermedades producidas por el complejo de hongos del suelo en cultivos de frijol pueden llegar a causar pérdidas en producción hasta de 100%.

En Italia se reportó una incidencia de la pudrición de raíz y tallo inducida por *Sclerotium rolfsii* de 30% (Garibaldi *et al*., 2013) y de 30−35% en la India en campos de frijol (Mahadevakumar *et al*., 2015).

Karthik *et al*. (2017) y Manu *et al*. (2018) informaron rangos de crecimiento micelial de 18.3−46.7 mm dia^{-1} a una incubación de 27 °C. Azhar *et al*. (2003) mencionaron que cuando *S. rolfsii* es cultivado en avena agar, extracto de levadura de malta agar y levadura dextrosa agar, el coeficiente de crecimiento puede variar de manera significativa. Ayed *et al*. (2018) informaron que la variación del crecimiento micelial varía de acuerdo con las temperaturas de incubación. Lin *et al*. (2009) reportaron que *S. rolfsii* presenta el máximo crecimiento micelial a temperaturas de 25−30 °C en medio PDA.

Manu *et al*. (2018) y Sab *et al*. (2014), informaron tonalidades de las colonias: blanco puro, blanco mate, blanco sucio y blanco rosado en medio de cultivo PDA y MEA. Sarma *et al*. (2002) reportaron texturas miceliales esponjosas, compactas y fibrosas. Por su parte Karthik *et al*. (2017) y Venkata *et al*. (2018), informaron esclerocios color marrón claro, marrón rojizo y marrón oscuro.

En Brasil, se identificaron 13 GCVs en 23 aislados de *S. rolfsii* recolectados de diferentes hospedantes y localidades, además, no se encontró relación entre los GCVs y la localidad u hospedantes (Almeida *et al*., 2001). Sarma *et al*. (2002), registraron la variabilidad de 26 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de varios hospedantes, muestras de suelo y localidades

en la India, reportando 13 GCVs. En Sudáfrica a partir de 66 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de frijol, se obtuvieron cuatro GCV (Adandonon *et al*., 2005).

Khatri *et al*. (2017), obtuvieron valores de CE_{50}= 0.0023−0.0312 µg mL^{-1} (media= 0.008 µg mL^{-1}) y 0.0900−0.4501 µg mL^{-1} (media= 0.213 µg mL^{-1}) para tebuconazol y protioconazol, respectivamente, en aislados de *S. rolfsii* recolectados en campos de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) en EE. UU. Ajayi *et al*. (2017) reportaron valores de CE_{50}= 0.349−2.559 µg mL^{-1} (media= 1.338 µg mL^{-1}) y 0.242−3.554 µg mL^{-1} (media= 1.497 µg mL^{-1}) para ipconazol y protioconazol, de forma respectiva, en aislados de *R. solani* recolectados en EE. UU. y Canadá, en campos de soya (*Glycine max* L.).

Rangarani *et al*. (2017), informaron que aislados de *S. rolfsii* recolectados en campos de cacahuate fueron poco sensibles para metil-tiofanato y carbendazim, con crecimiento micelial a 2,000 µg mL^{-1}. Yaqub y Shahzad (2015), en aislados de *S. rolfsii* recolectados en campos de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), presentaron crecimiento micelial a 10,000 µg mL-1 de metil-tiofanato y carbendazim. Asimismo, Baggio *et al*. (2018) informaron valores medios de CE_{50}= 688 µg mL^{-1} de metil-tiofanato.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

3.1.1. Origen y distribución

El frijol pertenece a la familia Fabaceae junto con el chícharo (*Pisum sativum* L.), haba (*Vicia faba* L.), soya (*Glycine max* L.) y 19,400 especies más (CONABIO, 2017). El frijol se conoce con distintos nombres comunes como poroto, caraota, alubia y judía, en náhuatl significa *etl* o *etle* (Gepts, 1998). Este grano constituye uno de los alimentos principales en la dieta de la población mundial (FAO, 2017). La mayoría de las especies que pertenecen al género *Phaseolus*, son consideradas de origen mesoamericano (Delgado-Salinas *et al*., 2006) y este género está constituido por 70 especies, de las cuales, 50 se encuentran en México, con gran variedad de tamaños, colores y requerimientos ecológicos (Lépiz y Ramírez, 2010). Sin embargo, sólo cinco se han domesticado: *P. acutifolius, P. coccineus, P. lunatus, P. dumosus* y *P. vulgaris* (Freytag y Debouck, 2002), esta última, es la de mayor importancia económica a nivel mundial (Gepts, 1999; FAO, 2017). Las formas silvestres de frijol presentan una amplia distribución en el continente americano, y pueden clasificarse en dos acervos genéticos: Mesoamericano (norte de México a Colombia) y Andino (sur de Perú, Bolivia y noroeste de Argentina) (Singh *et al*., 1991; Kwak y Gepts, 2009; Rossi *et al*., 2009). Según los restos arqueológicos, la domesticación y el primer consumo sucedió hace 6,000−8,000 años en Mesoamérica y Sudamérica (Bitocchi *et al*., 2012). Por otra parte, en la actualidad, el cultivo de frijol es de amplia distribución en el mundo, concentrándose en regiones tropicales y subtropicales (Quintana-Blanco *et al*., 2016; SNICS, 2017).

3.1.2. Importancia económica del frijol

El cultivo de frijol es una de las leguminosas más importantes en el mundo en cuanto al consumo directo y producción (FAO, 2017). En México, la producción de frijol se distribuye en 23 estados, sin embargo, más del 97% de ésta se concentra en Sinaloa, Nayarit, Sonora, Chiapas y Veracruz, siendo el estado de Sinaloa el que más produce con 128,144 t, donde destacan los municipios de Guasave y Ahome con el 40 y 16% de la producción total del estado, respectivamente (SIAP, 2019). El rendimiento promedio en México es de 1.243 t ha^{-1}. Es importante señalar que los estados de Guanajuato, Quintana Roo, Chiapas, Veracruz y Oaxaca, presentaron incrementos en su producción, con 2.7, 1.3, 0.7, 0.3 y 0.1 miles de toneladas adicionales con respecto al periodo del ciclo anterior, en el respectivo orden, y la producción por cultivares se distribuye de la siguiente manera: 62.7% frijoles claros (Azufrado, Bayo, Mayocoba, Peruano), 27.5% frijoles negros, 5.9% frijoles pintos y 3.9% otros cultivares (SIAP, 2019).

3.1.3. Principales países productores, exportadores y consumidores

En el mundo se cultivan 36.5 millones ha de frijol y más del 60% de la producción se concentra en seis países, entre ellos, la India (20.3%), Myanmar (17.4%), Brasil (9.7%), EE. UU. (5.2%), China (4.2%) y México (3.8%), con un rendimiento promedio de 861 kg h^{-1} (FAO, 2017). Por otra parte, los rendimientos más altos se obtuvieron en EE. UU. con 1,997 kg ha^{-1} y los más bajos se presentaron en la India, con 414 kg ha^{-1}. México se ubicó en un promedio de 1,243 kg ha^{-1} (FIRA, 2017). Los principales países exportadores son Myanmar (19.8%), China (14.1%), EE. UU. (12.5%), Argentina (9.7%) y Canadá (8.6%), mientras que los tres principales importadores son India, Brasil y EE. UU., los cuales, son

importantes productores que realizan compras al exterior con el fin de complementar su demanda (FIRA, 2017). Los países con más consumo de frijol son India (21.9%), Brasil (18.5%), México (7.3%), EE. UU. (5.2%) y Uganda (4.9%). El consumo per cápita es de alrededor de 16.1 kg en Brasil, 10.1 kg en México y 3.0 kg en EE. UU. (en su mayoría por la población hispana), mientras que, en algunos países desarrollados como Alemania o Francia, el consumo per cápita es inferior a 1.0 kg (FAO, 2017).

3.2. Enfermedades del frijol

3.2.1. Enfermedades causadas por bacterias

Las enfermedades causadas por bacterias que inducen daños importantes en el cultivo de frijol son la bacteriosis común o tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), esta enfermedad transmitida por semilla, es un problema importante y generalizado en este cultivo, aparece donde predominan temperaturas de 20−32 ºC y lluvias frecuentes (Corzo-López *et al*., 2016), los síntomas en hojas son lesiones angulares acuosas, las cuales se expanden y se unen en lesiones más grandes de color marrón grisáceo y de forma irregular, rodeadas por un halo amarillo estrecho (Mkandawire *et al*., 2004; Mengesha y Yetayew, 2018). El tizón del halo, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, es otra enfermedad bacteriana transmitida por semillas y es un problema importante en el frijol, se presenta en condiciones de alta humedad con temperaturas frescas inferiores a 20 °C y se presume que es la bacteriosis más destructiva del género *Phaseolus* (Rico *et al*., 2003). Los síntomas se presentan como lesiones rodeadas por un halo amarillo verdoso y con aspecto grasiento (Audy *et al*., 1994; Félix-Gastélum *et al*., 2016).

3.2.2. Enfermedades causadas por virus

Las enfermedades causadas por virus que inducen daños importantes en el cultivo de frijol son el *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), la cual reduce el número de vainas y el rendimiento hasta en 40%, las hojas infectadas desarrollan pequeñas manchas amarillas, hasta que la planta presenta una clorosis general (Garrido-Ramírez *et al*., 2000; Prophete *et al*., 2014). Por otra parte, el *Bean common mosaic virus* (BCMV), se transmite de forma común atraves de las semillas, con tasas de transmisión que a veces supera el 80% en cultivares susceptibles y el rendimiento puede reducirse más del 50% (Kusolwa *et al*., 2016). Los síntomas en hojas consisten en una clorosis, moteado y reducción en el tamaño (Chiquito-Almanza *et al*., 2017; Wu *et al*., 2018). Por último, en menor grado se presenta el *Bean calico mosaic virus* (BCaMV) (Brown *et al*., 1999; Idris *et al*., 2008). Estas tres enfermedades virales son las más importantes en México y en el mundo en el cultivo de frijol (Prophete *et al*., 2014).

3.2.3. Enfermedades causadas por nematodos

Las infestaciones de cultivos de frijol por nematodos se han reportado en varias regiones del mundo (Hernández-Ochandía *et al*., 2018), en general, ocurren en áreas con temperaturas cálidas y donde predominan suelos arenosos con alta humedad. Los nematodos en el cultivo de frijol ocasionan síntomas de clorosis, enanismo, raquitismo y marchitez (Machado *et al*., 2013). Especies del género *Meloidogyne* son los principales nematodos que se han asociado a muestras de suelo y raíces de frijol, entre los que destacan *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. luci*, *M. phaseoli* y otras especies como *Aphelenchoides besseyi*, *Nacobbus aberrans* y

Pratylenchus spp. (Carneiro *et al*., 2008; Hernández-Ochandía *et al*., 2018). Es importante mencionar que más de 45 genotipos de frijol muestran algún nivel de resistencia a especies de *Meloidogyne*, por otra parte, los nematodos no proliferan en cultivos establecidos en sistema de riego rodado, por lo que, en México, los nematodos en el cultivo de frijol se presentan de forma esporádica y no son un problema importante (Velásquez, 2001; Dutra y Campos, 2013).

3.2.4. Enfermedades causadas por hongos y oomicetes

Existen varias enfermedades en el cultivo de frijol inducidas por hongos y oomicetes que se ha reportado causando síntomas severos y reducción de la calidad y rendimiento del grano (Singleton *et al*., 1992; Alves-Santos *et al*., 2002; Snapp *et al*., 2003). Los hongos con origen en el suelo son el problema más importante en las legumbres, este grupo de patógenos son causantes de la pudrición de semillas y plántulas, así como lesiones hundidas en hipocotilos y raíces principales debajo de la superficie del suelo (Godoy *et al*., 2003). Las lesiones pueden continuar desarrollándose hasta la base del tallo, las raíces se decoloran y arrugan, por lo que, las plantas afectadas pueden ser atrofiadas e improductivas, y en algunos casos, se marchitan y mueren (Hall y Phillips, 1992; France y Abawi, 1994; Biddle y Cattlin, 2007). Algunas de las enfermedades más comunes causadas por hongos y oomicetes con origen en el suelo son el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), marchitez por *Fusarium* spp., ennegrecimiento del tallo (*Thielaviopsis basicola*), mal del tallo (*Rhizotonia solani, Pythium* spp. y *Aphanomyces euteiches*) y pudrición de raíz y tallo causada por *S. rolfsii*. Así mismo, enfermedades foliares como antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*),

roya (*Uromyces appendiculatus*), cenicilla (*Oidium erysiphoides, Erysiphe polygoni, Podosphaera fusca*), pudrición de raíz (*Phytophthora phaseoli*), lesión de la vaina, asociada con pétalo adherido (*Botrytis cinerea*) y mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), pueden ser un problema serio en el cultivo de frijol (Amaro *et al*., 2007; Goncalves *et al*., 2007; Naseri y Mousavi, 2008; Félix-Gastelum *et al*., 2011; Kunjeti *et al*., 2012).

3.3. *Sclerotium rolfsii*

3.3.1. Importancia, distribución y hospedantes

Sclerotium rolfsii es un hongo con origen en el suelo, necrotrófico, facultativo, con alta capacidad de crecimiento saprofítico, agente causal de enfermedades importantes por las pérdidas que ocasiona y la dificultad para controlarlas. Esta enfermedad ocurre en la mayoría de las áreas productoras de frijol en el mundo y se cree ser más agresiva cuando las plantas también se ven afectadas por virosis (Branch y Brenneman, 2009). El valor de las pérdidas económicas y de rendimiento en los cultivos de frijol afectados por *S. rolfsii* no se ha cuantificado con exactitud, aunque se estima que es elevado, este hongo, llega a ocasionar desde daños poco severos hasta la pérdida total de las cosechas, lo que depende del hospedante y las condiciones ambientales (Al-Askar *et al*., 2013). La distribución geográfica de *S. rolfsii* es favorecida en áreas tropicales y subtropicales debido a que su desarrollo y supervivencia coincide con altas temperaturas con elevada humedad (Punja, 1985; Remesal *et al*., 2012). Este hongo fitopatógeno afecta a más de 500 especies de 100 familias de plantas entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (Kwon *et al*., 2016). Los cultivos susceptibles de mayor interés agrícola son el frijol, alfalfa

(*Medicago sativa* L.), algodón (*Gossypium* spp. L.), arroz (*Oryza sativa* L.), banana (*Musa x paradisiaca* L.), cafeto (*Coffea* spp.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), melón (*Cucumis melo* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuun* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), haba, soya, entre otros (Harlton *et al*., 1995; Sarma *et al*., 2002; Remesal *et al*., 2012).

3.3.2. Sintomatología

Los síntomas iniciales de la enfermedad comprenden lesiones pequeñas de color café y acuosas en el tallo inferior o cerca de la superficie del suelo, seguidas de amarillamiento y marchitez de las ramas laterales, el tallo principal y por último toda la planta (Branch y Brenneman, 2009). Los signos de diagnóstico del hongo incluyen característicos abanicos de micelio blanco y esclerocios marrones que se extienden en los tejidos infectados (Kumar *et al*., 2014). Bajo ciertas condiciones favorables, el hongo puede causar pudrición en ramas, peciolos, flores y vainas (Agueda-Cúndom *et al*., 2013; Rivera *et al.*, 2018). Las lesiones se extienden rápido y el tejido xilemático no siempre llega a degradarse por completo, lo que determina que en el proceso infectivo no siempre resulte la muerte de la planta o que plantas muertas permanezcan firmes (Almeida *et al*., 2001). Es característico observar abundante micelio blanco y esclerocios marrones en la superficie del suelo adyacente a la planta infectada (Kwon *et al*., 2016; Khatri *et al*., 2017).

3.3.3. Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad

El intervalo de temperatura en el que los esclerocios de *S. rolfsii* en el suelo pueden causar infección en un hospedante susceptible es muy extenso, el óptimo se encuentra

entre los 25−35 ºC, mientras que a temperaturas inferiores de 20 °C y superiores de 36 ºC se limita el crecimiento del hongo y por tanto la severidad de las plantas, causada por el mismo (Xu *et al*., 2008; Manu *et al*., 2018). La humedad del suelo es determinante para el desarrollo de la enfermedad, el micelio muere a 0 °C, pero los esclerocios pueden sobrevivir a temperaturas tan bajas como -10 °C, se requiere alta humedad para un óptimo crecimiento del hongo, los esclerocios no germinan cuando la humedad relativa es baja (Al-Askar *et al*., 2013). Sin embargo, algunos estudios afirman que los esclerocios germinan mejor en humedad relativa de 25−35% (Khatri *et al*., 2017). Por otra parte, el hongo puede sobrevivir en residuos de cosechas anteriores y en el suelo como esclerocios viables para el siguiente ciclo de cultivo (Truscott y Gilligan, 2001; Al-Askar *et al*., 2013). El pH, es otro factor importante en la inducción de la formación de esclerocios y crecimiento de micelio, con un óptimo de 3.0−5.0. Es importante mencionar que la germinación de esclerocios es inhibida a un pH por encima de 7.0 (Gopalakrishnan *et al*., 2005; Sennoi *et al*., 2013; Manu *et al*., 2018).

3.3.4. Ciclo de vida y patogénesis

Los esclerocios de *S. rolfsii* son las principales estructuras de hibernación y la fuente primaria de inóculo para que ocurra la enfermedad, el patógeno puede persistir en el suelo en forma de micelio sobre materia orgánica muerta, en condiciones favorables los esclerocios germinan y las hifas fúngicas crecen e infectan la parte inferior de la base del tallo y raíz (Mullen, 2001). La dispersión del hongo puede ocurrir mediante el agua de riego, partículas de suelo adheridas a los accesorios agrícolas, animales o semillas, mientras que, la germinación de los esclerocios es determinada por el tipo de suelo,

humedad, temperatura, pH, aireación y la presencia de compuestos volátiles (alcoholes y aldehídos) (Manu *et al*., 2018). Durante el desarrollo de los esclerocios se producen gotas de exudados claros en la superficie, que contienen proteínas, cationes, aminoácidos, carbohidratos, enzimas y ácidos (ácido oxálico y ácido fumárico), componentes esenciales para inducir la infección (Gopalakrishnan *et al*., 2005; Kumar *et al*., 2012; Al-Askar *et al*., 2013). Estas estructuras reproductivas pueden germinar de dos maneras: eruptiva e hifal, lo cual, depende de las condiciones ambientales. La germinación eruptiva se caracteriza por la acumulación de micelio y estalla de forma explosiva a través de la corteza esclerótica, la cual, queda hueca; mientras que la germinación hifal difiere de la eruptiva por el crecimiento de hebras individuales de la superficie del esclerocio que se origina de la médula interna (Punja y Damiani, 1996; Prasad y Naik, 2008) (Figura 1). Al producir ácido oxálico, así como enzimas pectinolíticas y celulolíticas, el hongo causa la muerte y desintegra los tejidos del hospedante antes de penetrar. El ácido oxálico secuestra el calcio de las paredes celulares para formar oxalato cálcico, por lo que, se acidifican los tejidos y se genera un pH ácido, óptimo para la actividad de las enzimas endopoligalacturonasas (Prasad y Naik, 2008). Por otra parte, cabe mencionar que esta enfermedad se desarrolla mejor en suelos arenosos que en suelos de textura fina como limo o arcilla, los esclerocios tienen una alta demanda de oxígeno, casi siempre germinan cuando se encuentran en regiones superiores del suelo, a menos de 5 cm de profundidad, lo que explica por qué la enfermedad es más severa en suelos arenosos (Punja, 1985; Xu *et al*., 2008). El papel de las basidiosporas en el ciclo de la enfermedad, en condiciones de campo, no se ha investigado a detalle y se cree que son estructuras estériles (Almeida *et al*., 2001; Mullen, 2001).

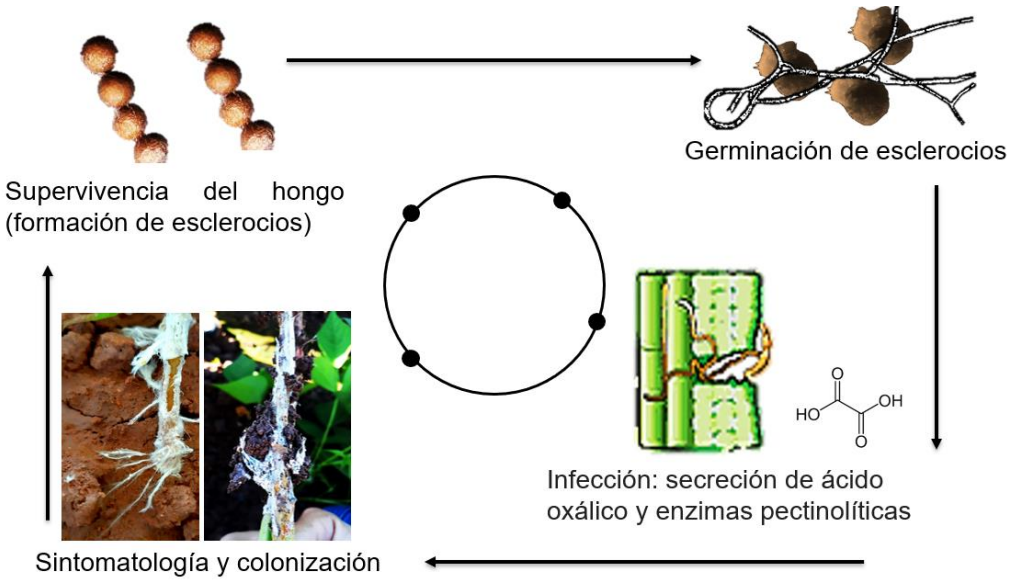

Figura 1. Ciclo de la enfermedad de *Sclerotium rolfsii* en cultivo de frijol (modificado de Mullen, 2001).

3.3.5. Morfología

Sclerotium rolfsii presenta un crecimiento excesivo de micelio blanco algodonoso sedoso (Figura 2a). Conforme madura, las hifas tienden a agregarse en cordones rizomórficos y se producen masas de esclerocios como estructuras de supervivencia, tanto en condiciones naturales, como de laboratorio (Figura 2b), este hongo, es capaz de alcanzar los 9 cm de diámetro en 3−4 días de incubación en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Harlton *et al*., 1995; Ayed *et al*., 2018). Las hifas son septadas, hialinas y con pared celular delgada (Figura 2d,e), lo que permite diferenciar tres tipos de estructuras hifales: las hifas primarias con un diámetro de 4.5−8.0 µm y con conexiones en argolla (Figura 2e), que dan lugar a hifas secundarias y terciarias de menor diámetro (2.4−5.0 µm) y que además tienen la capacidad de anastomosar entre ellas (Figura 2d) (Xu *et al*., 2008). Los esclerocios tienden a ser esféricos (0.5−3.0 mm), formados de manera lateral

en hifas principales, donde se diferencian tres capas al madurar: 1) una corteza exterior melanizada de dos a cuatro células de espesor, 2) un córtex intermedio de seis a ocho células de espesor, y 3) una médula interior compuesta de hifas estrechamente entrelazadas entre sí, son de color blanco en su formación y de color marrón claro a oscuro una vez maduros (Figura 2c) (Punja, 1985; Ayed *et al*., 2018; Manu *et al*., 2018; Venkata *et al*., 2018). El estado sexual de este hongo, produce basidios ovalados y sobre ellos cuatro basidiosporas haploides en los extremos de los esterigmas (Figura 2f), por otra parte, se cree que las basidiosporas de este hongo son estériles (Khatri *et al*., 2017).

3.3.6. Diversidad genética de *Sclerotium rolfsii*

La variabilidad genética entre aislados de *S. rolfsii* se ha estudiado con la finalidad de obtener una mejor comprensión de la estructura de sus poblaciones en condiciones naturales ya que es un patógeno con origen en el suelo importante en distintos hospedantes, este conocimiento puede ofrecer información útil sobre la distribución y dispersión del hongo, así como contribuir a la mejora en el diseño de estrategias de manejo integrado en las enfermedades que ocasiona (Leslie, 1993; Remesal *et al*., 2012). Los caracteres morfológicos como el color y tipo de micelio, y el número, tamaño, forma y color de los esclerocios han sido los más estudiados entre aislados de *S. rolfsii* (Sarma *et al*., 2002; Serra y Silva, 2005), y los fisiológicos basados en la respuesta del crecimiento micelial, germinación de esclerocios y la producción de compuestos químicos esenciales en los procesos infectivos a distintos factores bióticos o abióticos (Punja y Jenkins, 1984; Mullen, 2001; Kumar *et al*., 2012). Sin embargo, ninguno de estos caracteres ha reconocido establecer las discrepancias entre aislados del hongo que

permitan determinar de forma clara la estructura de las poblaciones (Sarma *et al*., 2002; Serra y Silva, 2005). Una de las herramientas indirectas utilizadas para este propósito es la caracterización de poblaciones mediante la ocurrencia de grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) (Leslie, 1993; Serra y Silva, 2005; Xie *et al*., 2014), este método es utilizado para determinar la variabilidad genética entre aislados de hongos fitopatógenos que carecen de fase sexual o que ésta rara vez ha sido descrita (Kohn *et al*., 1991; Okabe y Matsumoto, 2000; Sarma *et al*., 2002). En este sentido, la importancia de los GCVs radica en preservar la identidad al impedir el intercambio de información genética a otros GCVs o bien de tener recombinación genética entre especies dentro de un mismo GCV (Remesal *et al*., 2012; Xie *et al*., 2014). Cabe mencionar que no es clara la relación de los GCVs con respecto a las características morfológicas, fisiológicas, patogénicas e incluso en el nivel de resistencia a fungicidas (Milgroom, 1996; Cilliers *et al*., 2000; Almeida *et al*., 2001; Adandonon *et al*., 2005). Se asume, además, que los aislados que pertenecen a un mismo GCV pueden ser clonales (Kohn *et al*., 1991) o bien exhibir una mayor similitud en su estructura genética con respecto a los aislados que pertenecen a otros GCVs (Okabe y Matsumoto, 2000). Punja y Grogan (1983) establecieron por primera vez GCVs para *S. rolfsii,* en donde, la fusión entre hifas de dos aislados se consideró como una reacción micelial compatible, mientras que, zonas de antagonismo o de aversión se consideró como una reacción micelial incompatible, de allí diversas investigaciones han establecido diversidad genética entre aislados de *S. rolfsii*. En Brasil, se identificaron 13 GCVs en 23 aislados de *S. rolfsii* recolectados de diferentes hospedantes y localidades, además, no encontraron relación entre los GCVs y la localidad u hospedantes (Almeida *et al.,* 2001). Otro estudio similar, registró la variabilidad de 26 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de varios hospedantes, muestras de

suelo y localidades en la India, donde reportaron 13 GCVs (Sarma *et al.,* 2002). Así mismo, en Sudáfrica a partir de 66 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de cultivos de frijol, se obtuvieron cuatro GCVs (Adandonon *et al.,* 2005) y en Turquía con 32 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de césped, no se encontró diversidad genética mediante la ocurrencia de GCVs, por lo que reportaron un solo GCV (Ünal *et al*., 2019).

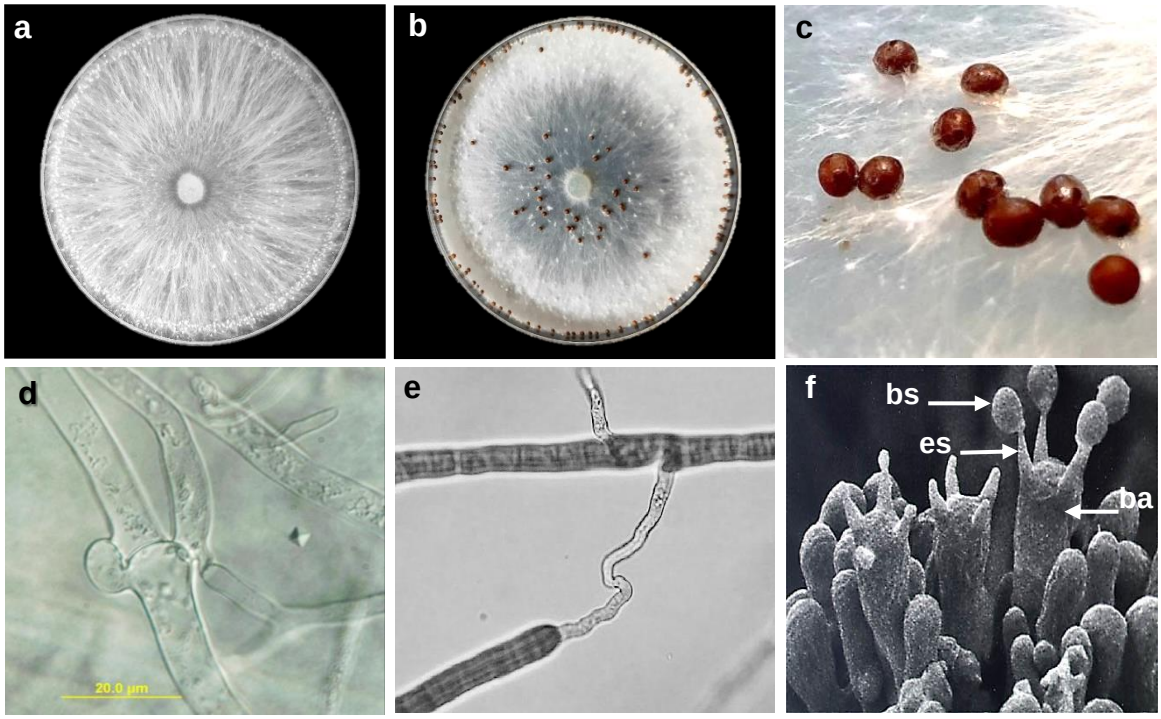

Figura 2. Morfología de *Sclerotium rolfsii*. **a**) Colonia joven de cuatro días de edad con esclerocios en formación de color blanco, en medio de cultivo papa dextrosa agar **b**) Colonia madura de 10 días de edad. **c**) Esclerocios maduros color marrón. **d**) Conexión en argolla en septo de hifa primaria. **e**) Anastomosis hifal. **f**) Estructuras basidiales de la fase sexual: basidio (**ba**); basidiospora (**bs**); esterigma (**es**) (**Fuente**: Remesal *et al*., 2012).

3.4. Estrategias y medidas de control

El complejo de hongos con origen en el suelo son los responsables en gran parte de la reducción de producción de frijol, debido a que no existen cultivares resistentes o tolerantes para dicho complejo de hongos (Le, 2004; Nguyen *et al*., 2004). *Sclerotium*

rolfsii, presenta un amplio rango de hospedantes, rápida tasa de crecimiento y alta capacidad de producir grandes cantidades de esclerocios persistentes, por lo que, la enfermedad causada por este patógeno es una de las más difíciles de controlar (Lakpale *et al*., 2007). En México, los cultivares Azufrado Higuera, Azufrado Pimono 78, Peruano P 80, Azufrado Peruano 87, Azufrado Regional 87, Azufrado Noroeste, Azufrasin y Azufrado Janasa presentan tolerancia moderada para *S. sclerotiorum, Bean common mosaic virus* (BCMV) y algunas royas (SAGARPA, 2012). Sin embargo, ningún cultivar es resistente o tolerante para *S. rolfsii*, por lo que, los cultivares resistentes o tolerantes para otras enfermedades se pueden utilizar como un componente de un esfuerzo dentro de un manejo integrado de enfermedades (Gorbet y Tillman, 2009), dándole más importancia a las medidas de control cultural, físico, químico y biológico (Dos Santos *et al*., 2005; Vargas *et al*., 2008).

3.4.1. Control físico y cultural

La elección de suelos libres de inóculo o con un contenido mínimo, evita el aumento progresivo del inóculo en el suelo, capaz de causar una enfermedad severa, por ello, una de las primeras decisiones en los sistemas agrícolas es la elección del terreno con base en criterios agronómicos de fertilidad y en particular de su estado sanitario (Voorde *et al*., 2012). La elección de suelos libres de infestación por *S. rolfsii* está basada en el conocimiento del historial de la parcela o en la información de un análisis de contenido de patógenos en el suelo (Roberts *et al*., 2004). El barbecho profundo es efectivo para enterrar a los esclerocios, ya que el 80% de éstos, están ubicados en los primeros 15 cm superiores del perfil del suelo y se ha reportado que a 20 cm de profundidad se reduce la

viabilidad de los esclerocios y en ocasiones se inactivan las hifas en campos infestados (Roberts *et al*., 2004). La solarización ha mostrado disminución en el porcentaje de plantas enfermas y vainas podridas en distintos hospedantes, esta medida puede reducir la viabilidad de los esclerocios hasta en un 90% (Singh *et al*., 1991). Además, puede funcionar la eliminación de residuos de cosechas y tratamiento de suelos con yeso agrícola, con el propósito de alcalinizar el pH, ya que *S. rolfsii* se ve favorecido por un pH ácido (Mullen, 2001). Se ha demostrado que los compuestos de amonio y el nitrato de calcio se pueden usar para prevenir la acidificación del suelo y crear condiciones propicias para el desarrollo de enfermedades, estos inhabilitan la germinación de los esclerocios y mejoran la colonización de los mismos por microorganismos benéficos del suelo (Mullen, 2001). Por otra parte, hay que tener en cuenta que, en algunas leguminosas, no se recomienda la aplicación de compuestos de amonio porque esto disminuye la fijación de N_2 en los nódulos de la raíz (Prasad y Naik, 2008). La rotación de cultivos de dos o más años para cultivos no hospedantes como el maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Genus triticum* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L.) ayudan a prevenir la acumulación de inóculo y problemas de enfermedades, además, el control de malezas debe mantenerse durante las rotaciones, para evitar el aumento de inóculo en especies susceptibles (Taylor y Rodríguez, 1999; Roberts *et al*., 2004).

3.4.2. Control biológico

La aplicación de organismos de control biológico no ha conseguido ser tan efectiva frente a las enfermedades causadas por hongos del suelo en condiciones de campo, no obstante, existen numerosos estudios que señalan a diferentes microorganismos como

potenciales agentes de biocontrol de *S. rolfsii*, entre los que destacan *Gliocladium virens* (Ristaino *et al.,* 1996), *Talaromyces flavus* (Madi *et al*., 1997), *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa* (Kishore *et al*., 2005), *Trichoderma harzianum* (Bhagat y Pan, 2007; Ganesan *et al*., 2007), especies de *Streptomyces* (Errakhi *et al*., 2007) y *Bacillus* (Raaijmakers *et al*., 2009; Lorito *et al*., 2010). Otros hongos antagónicos incluyen *Gliocladium roseum, Glomus fascicatum, Penicillium pinophilum, Gigaspora margarita*, entre otros (Abd, 2005; Raaijmakers *et al*., 2009; Daes *et al*., 2010; De Curtis *et al*., 2010; Pastor *et al*., 2010; Tonelli *et al*., 2010). Los agentes de biocontrol fúngicos y bacterianos pueden disminuir esclerocios y micelio de *S. rolfsii*. Las lectinas producidas por este patógeno, sirven como factores de reconocimiento para los organismos benéficos, en una interacción directa, las hifas de *Trichoderma* spp. penetran la corteza de los esclerocios y lisan el tejido medular, en donde, éstos se degradan, se vuelven oscuros, suaves y se desintegran bajo una ligera presión (Prasad y Naik, 2008).

3.4.3. Control químico

La aplicación de fungicidas en cultivos de frijol se enfoca en reducir el daño causado por hongos con origen en el suelo, donde se encuentra *S. rolfsii* (Marcenaro y Valkonen 2016). Los fungicidas sistémicos de las clases MBC y DMI, así como fungicidas de contacto y derivados del cobre, se han utilizado con éxito (Besler *et al*., 1996; Bowen *et al*., 1997; Le *et al*., 2012; Dutta *et al*., 2014; Arshad y Iqra, 2015; Khatri *et al*., 2017; Divya y Narayanaswamy, 2018). Los fungicidas sistémicos pertenecientes a la clase MBC están representados en general por benomil, carbendazim, thiabendazol y metil tiofanato (FRAC, 2012). El modo de acción de estos fungicidas se basa en inhibir la producción de

microtúbulos, mediante su unión a las subunidades heterodiméricas de la molécula tubulina (Peres *et al*., 2004). Metil tiofanato, es un fungicida MBC, con modo de acción especifico y con actividad preventiva, curativa y protector (Narayana y Srivastava, 2003; Divya y Narayanaswamy, 2018). Existen diversos reportes de hongos fitopatógenos que se han encontrado como resistentes a fungicidas MBC. Para el caso particular de aislados de *S. rolfsii*, el control de la enfermedad ha sido irregular en algunos campos comerciales, donde de forma frecuente se han estado aplicando fungicidas MBC, esto debido a la expresión de resistencia por parte del patógeno, como se ha reportado en diversas partes del mundo (Kanwal *et al*., 2012; Manu *et al*., 2012; Rangarani *et al*., 2017; Divya y Narayanaswamy, 2018; Shirsole *et al*., 2019).

Por otra parte, los fungicidas pertenecientes a la clase DMI están representados en lo principal, por el grupo “triazol” (FRAC, 2012). El tebuconazol es un fungicida DMI-triazol, con sitio especifico de acción y con actividad erradicante, preventiva y curativa. El modo de acción de estos fungicidas se basa en inhibir la síntesis de ergosterol y la demetilación de los precursores de los esteroles, sustancias básicas para la función de la membrana celular de los hongos (Mellado *et al*., 2001; Yang y Clausen, 2005; Ahemad y Khan, 2010; Dutta *et al*., 2014). Los fungicidas DMI previenen el crecimiento de hongos y en forma eventual causan la muerte, debido a que se requieren esteroles para formar las membranas celulares. Estos fungicidas se absorben en el tejido de las hojas y evitan el crecimiento del patógeno temprano en el proceso de infección, sin embargo, para ser más efectivos deben aplicarse de forma preventiva (Mueller *et al*., 2013). El tebuconazol ha sido registrado para usarse como cuatro aplicaciones consecutivas entre dos de fungicidas no inhibidores de esteroles para el control de *S. rolfsii*, *R. solani, Phaeoisariopsis personata*, entre otros hongos (Yang y Clausen, 2005). El uso continuo

de estos fungicidas para controlar enfermedades, puede conducir al desarrollo de resistencia, como se reportó en trabajos previos en Pakistán (Fouzia y Saleem, 2006; Arshad y Iqra, 2015), India (Kumar *et al*., 2014) y en EE. UU. (Khatri *et al*., 2017).

Los tratamientos con fungicidas, son un componente clave en el manejo integrado de enfermedades de las plantas, sin embargo, la aparición de resistencia se ha convertido en un factor importante para limitar la eficacia y la vida útil de los fungicidas, los cuales, presentan costos cada vez más altos, incluso llegar a no ser redituable la aplicación de los mismos, para algunos cultivos, por lo tanto, la evaluación de resistencia a fungicidas para el manejo de la pudrición de raíz y tallo causada por *S. rolfsii*, es importante para reducir pérdidas en producción (Ma y Michailides, 2005).

La resistencia se refiere a hongos fitopatógenos que en su forma de tipo silvestre son sensibles y pueden adquirir resistencia después de su exposición a un fungicida, lo cual, se debe a las modificaciones genéticas transmisibles a la progenie, de modo que una sustancia química que alguna vez fue efectiva contra el organismo, ya no es efectiva (De Miccolis *et al*., 2015). El monitoreo de campo mediante rangos de concentraciones y valores de CE_{50} puede ayudar a determinar qué proceso de selección está ocurriendo y la probabilidad de una pérdida rápida del control de la enfermedad (Brent y Hollomon, 2007). En los hongos basidiomicetos heterotálicos, dos núcleos haploides parentales distintos coexisten sin fusión en cada célula, lo que se conoce como un estado dicariótico estable. Los heterocariontes que albergan núcleos resistentes y sensibles a los fungicidas pueden crecer en presencia o ausencia de fungicidas (Santomauro *et al*., 2000; Brent y Hollomon, 2007). Los hongos fitopatógenos se pueden adaptar a las fluctuaciones en la exposición a fungicidas como resultado de cambios en las proporciones y distribución de núcleos sensibles a la resistencia dentro de las células (Santomauro *et al*., 2000). El

dominio o la recesividad se pueden probar al inducir anastomosis hifal entre un aislado que porta el alelo de tipo silvestre y otro con el alelo mutante de un gen de resistencia para formar micelio heterocariótico (Birky, 2001; Ziogas *et al*., 2002).

IV. JUSTIFICACIÓN

El frijol es una de las leguminosas más importantes en el mundo y México ocupa el sexto lugar en su producción. El norte de Sinaloa produce más del 70% de la producción total del estado, sin embargo, una limitante son las enfermedades fungosas, entre las que destaca, la pudrición de raíz y tallo, inducida por *Sclerotium rolfsii*. Poco se sabe, sobre la relación de las variantes genéticas con los niveles de virulencia y el uso excesivo de fungicidas ha generado resistencia por parte del patógeno e inestabilidad al ambiente. Con base en lo anterior, en este trabajo se pretende estudiar dicha relación, mediante grupos de compatibilidad vegetativa, así como contribuir con una estrategia de manejo, mediante pruebas de sensibilidad a fungicidas. Este conocimiento ofrecerá información sobre la distribución y dispersión del hongo, y también contribuirá en el diseño de estrategias de manejo integrado para una mejor fitosanidad del cultivo.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la incidencia, morfología, patogenicidad, compatibilidad vegetativa y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Sclerotium rolfsii*, obtenidos de campos comerciales de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en el norte de Sinaloa, México.

5.2. Objetivos específicos

1) Estimar la incidencia de la pudrición de raíz y tallo causada por *Sclerotium rolfsii* en campos comerciales de frijol en el norte de Sinaloa.
2) Identificar la morfología de aislados de *S. rolfsii* obtenidos del norte de Sinaloa.
3) Comprobar la patogenicidad y virulencia de aislados de *S. rolfsii* en plantas de frijol.
4) Conocer la variabilidad genética de aislados de *S. rolfsii* mediante grupos de compatibilidad vegetativa.
5) Determinar la sensibilidad *in vitro* de aislados de *S. rolfsii* a los fungicidas tebuconazol y metil-tiofanato.

VI. HIPÓTESIS

Existe diversidad genética, fenotípica, patogénica y sensibilidad a fungicidas entre aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol del norte de Sinaloa.

VII. REFERENCIAS

Abd, A. E. 2005. Effect of a *Bacillus subtilis* isolate on southern blight (*Sclerotium rolfsii*) and lipid composition of peanut seeds. Phytoparasitica 33: 460−466.

Adandonon, A., Aveling, T. A., Merwe, N. A., and Sanders, G. 2005. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. Australasian Plant Pathology 34: 19−25. doi: 10.1071/AP04071.

Agueda, C. M., Gutiérrez, S. A., and Cabrera, M. G. 2013. Occurrence of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot to *Peperomia glabella* in Argentina. Summa Phytopathologica 39: 142. doi: 10.1590/S0100-54052013000200013.

Ahemad, M., and Khan, M. S. 2010. Influence of selective herbicides on the growth promoting characteristics of phosphate solubilization plants. *Enterobacter asburiae* cepa PS2. Microbiology 5: 849−857.

Al-Askar, A. A., Rashad, Y. M., and Absulkhair, W. M. 2013. Antagonistic activity on an endemic isolate of *Streptomyces tendae* RDS 16 against phytopathogenic fungi. Mycobiology 6: 509−516.

Almeida, A. M., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessnman, D., and Yorinori, J. T. 2001. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. Journal of Phytopathology 149: 493−502. doi: 10.1046/j.1439-0434.2001.00651.x.

Alves-Santos, F. M, Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J. M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M. C., Díaz-Mínguez, J. M., and Eslava, A. P. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. Plant Pathology 51: 605−611.

Amaro, G. B., Abreu, A. F., Ramalho, M. A., and Silva, F. B. 2007. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. Genetics and Molecular Biology 30: 584−588. doi: 10.1590/S1415-47572007000400014.

Arshad, J., and Iqra, H. K. 2015. Chemical control of collar rot disease of chickpea. Pakistan Journal of Phytopathology 27: 61−68.

Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H. C., and Gilbertson, R. L., 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X*.

c. phaseoli var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. Phytopathology 84: 1185−1192.

Ayed, F., Jabnoun, K. H., Aydi, B., Abdallah, R., and Daami, R. M. 2018. Effect of temperatures and culture media on *Sclerotium rolfsii* mycelial growth, sclerotial formation and germination. Journal of Plant Pathology and Microbiology 9: 1−9. doi: 10.4172/2157-7471.1000446.

Bagwan, N. B. 2011. Morphological variation in *Sclerotium rolfsii* Sacc isolates collected from Maharashtra and Gujarat States causing stem rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). International Journal of Plant Protection 4: 68−73.

Bernal-Cabrera, A., Fleites-Poch, A., y Sosa-Martinez, R. 2016. Actividad antifúngica de extractos acuosos de *Spathodea campanulata* Beauv. sobre la roya del frijol común (*Uromyces phaseoli* Pers. (wint) var. typica Arth.). Revista Centro Agrícola 43: 55−61.

Besler, B. A., Grichar, W. J., and Jaks, A. J. 1996. Southern blight and leaf spot control in peanut using selected fungicides. Texas Journal of Agriculture and Natural Resources 9: 105−114.

Bhagat, S., and Pan, S. 2007. Mass multiplication of *Trichoderma harzianum* on agricultural byproducts and their evaluation against seedling blight (*Rhizoctonia solani*) of mung bean and collar rot (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut. Indian Journal of Agricultural Sciences 77: 583−588.

Biddle, A. J., and Cattlin, N. D. 2007. Pests, Diseases, and Disorders of Peas and Bean. First Edition. Manson Publishing. London, UK. 280p.

Birky, C. W. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. Annual Review of Genetics 35: 125–148.

Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Spagnoletti, P., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., and Papa, R. 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 88−796.

Bowen, K. L., Hagan, A. K., and Weeks, J. R. 1997. Number of tebuconazole applications for maximizing disease control and yield of peanut in growers' fields in Alabama. Plant Disease 81: 927−931.

Branch, W. D., and Brenneman, T. B. 2009. Field evaluation for the combination of white mould and tomato spotted wilt disease resistance among peanut genotypes. Crop Protection 28: 595−598.

Brent, K. J., and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed. Second Edition. Avenue Louise. Brussels, Belgium. 60p.

Brown, J. K., Ostrow, K. M., Idris, A. M., and Stenger, D. C. 1999. Biotic, molecular, and phylogenetic characterization of *Bean calico mosaic virus* (BCMV), a distinct *Begomovirus* species with affiliation in the *Squash leaf curl virus*. Phytopathology 89: 273–280.

Carneiro, R. M., Almeida, M. R., Martins, I., Souza, J. F., Pires, A. Q., and Tigano, M. S. 2008. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. e fungos nematófagos em hortaliças no Distrito Federal, Brasil. Nematologia Brasileira 32: 135−141.

Chiquito-Almanza, E., Acosta-Gallegos, J. A., García-Álvarez, N. C., Garrido-Ramírez, E. R., Montero-Tavera, V., Guevara-Olvera, L., and Anaya-López, J. L. 2017. Simultaneous detection of both RNA and DNA viruses infecting dry bean and occurrence of mixed infections by BGYMV, BCMV and BCMNV in the central-west region of Mexico. Viruses 9: 63. doi:10.3390/v9040063.

Cilliers, A. J., Herselman, L., and Pretorius, Z. A. 2000. Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. Phytopathology 90: 1026–1031. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.9.1026.

Cilliers, A. J., Pretorius, Z. A., and Van Wyk, P. S. 2003. Integrated control of *Sclerotium rolfsii* on groundnut in South Africa. Phytopathology 151: 249−258. doi: 10.1046/j.1439-0434.2003. 00715.x.

CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2017. Origen y distribución geográfica del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm (Consulta, abril 2020).

Corzo-López, M., Plasencia-Márquez, O., Martínez-Coca, B., y Quiñones-Pantoja, M. 2016. Variabilidad molecular de aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* procedentes de la provincia Mayabeque, Cuba. Revista de Protección Vegetal 31: 70−76.

Daes, J., Maeyer, K. D., Pauwelyn, E., and Höfte, M. 2010. Biosurfactants in plant *Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. Environmental Microbiology 2: 539−572.

De Curtis, F., Lima, G., Vitullo, D., and de Cicco, V. 2010. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. Crop Protection 29: 663−670.

De Miccolis, A. R. M., Pollastro, S., and Faretra, F. 2015. Genetics of fungicide resistance. Pp:13–34. *In:* Ishii, H., and Holloman, D. W. (eds.). Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Springer. Tokyo, Japan. 490p. doi: 10.1007/978-4-431- 55642-8_2.

Delgado-Salinas, A., Bibler, R., and Lavin, M. 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae) a recent diversification in an ancient landscape. Systematic Botany 31: 779−791.

Divya, B. A., and Narayanaswamy, H. 2018. *In vitro* efficacy of different fungicides against *Sclerotium rolfsii* sacc. Causing stem rot of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). International Journal of Chemical Studies 6: 1093−1094.

Dixit, R., Agrawal, L., Gupta, S., Kumar, M., Yadav, S., Chauhan, P. S., and Nautiyal, C. S. 2016. Southern blight disease of tomato control by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing *Paenibacillus lentimorbus* B-30488. Plant Signaling and Behavior 11: 1-20. doi: 10.1080/15592324.2015.1113363.

Dos Santos, J. B., Ferreira, E. A., Kasuya, M. C., da Silva, A. A., and Procopio, S. O. 2005. Tolerance of *Bradyrhizobium strains* to glyphosate formulations. Crop Protection 24: 543−547.

Dutra, M. R., and Campos, V. P. 2003. Manejo do solo e da irrigação como nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. Fitopatologia Brasileira 28: 608−614.

Dutta, B. K., Das, N. C., and Ray, D. C. 2014. Potential of some fungicides on the growth and development of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *in vitro*. International Journal of Scientific and Research Publications 4: 12.

Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., and Mustapha, B. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for

damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 1503−1509. doi:10.1007/s11274-007-9394-7.

FAO, Food and Agriculture Organization. 2017. The world and national bean market. http://www.fao.org/faostat/es/#home (Consulta, abril 2020).

Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Herrera-Rodríguez, G., Martínez-Valenzuela, C., Espinosa-Matías, S., Cordero-Ramírez, J. D., and Martínez-Álvarez, J. C. 2011. Powdery mildew on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Northern Sinaloa, Mexico. Sydowia 63: 169-182.

Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Navarrete-Maya, R., Olivas-Peraza, N. G., Brito-Vega, H., and 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: 369–378. doi:10.1007/s12600-016-0530-5.

Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A., and Nava-Juárez, R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. Crop Protection 25: 195-201.

FIRA, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. 2017. Mercado nacional y mundial de frijol. www.eleconomista.com.mx/opinion/El-mercado-mundial-y-nacional-del-frijol-20190328-0088.html (Consulta, abril 2020).

Fouzia, Y., and Saleem, S. 2006. Effect of fungicides on *in vitro* growth of *Sclerotium rolfsii*. Pakistan Journal of Botany 38: 881−883.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. 2012. List of pathogens with field resistance towards Qol fungicides. https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-(updated-2012).pdf?sfvrsn=c8db449a_4 (Consulta mayo 2020).

France, R. A., and Abawi, G. S. 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on selected bean genotypes. Journal of Nematology 26: 467–474.

Freytag, G. F., and Debouck, D. G. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and

Central America. Botanical Research Institute of Texas (BRIT), Forth Worth, TX, USA. 289p.

Ganesan, S., Kuppusamy, R., and Sekar, R. 2007. Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using *Rhizobium* and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). Turkish Journal of Agriculture and Forestry 31: 103−108.

Garrido-Ramírez, E. R., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J., and Gilbertson, R. L. 2000. *Bean dwarf mosaic virus* BV1 protein is a determinant of the hypersensitive response and avirulence in *Phaseolus vulgaris*. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 1184–1194.

Gepts, P. 1998. What can molecular markers tell us about the process of domestication in common bean?. Pp:198−209. *In*: Damania, A. J., Valkoun, G., Willcox, C., and Qualset, O. (eds.). The Origins of Agriculture and the Domestication. Vol. 62. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria. 384p.

Godoy, L. G., Steadman, J. R., Higgins, B., and Powers, K. 2003. Genetic variation among isolates of the web blight pathogen of common bean based on PCR-RFLP of its ITSr DNA region. Plant Disease 87: 766–771.

Goncalves, V. M., Bonett, L. P., Vidigal-Filho, P. S., Gonela, A., and Ribeiro, A. S. 2007. Genetic control on the performance of common bean differential cultivars to *Colletotrichum lindemuthianum* races. Brazilian Archives of Biology and Technology 50: 579−586.

Gopalakrishnan, S., Beale, M. H., Ward, J. L., and Strange, R. N. 2005. Chickpea wilt: identification and toxicity of methyl-fusarubin from *Fusarium acutatum*. Phytochemistry 66: 1536−1539.

Gorbet, D. W., and Tillman, B. L. 2009. Registration of 'Florida-07' peanut. Journal of Plant Registrations 3: 14−18.

Hall, R., and Phillips, L. G. 1992. Effects of crop sequence and rainfall on population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in soil. Canadian Journal of Botany 70: 2005–2008.

Harlton, C. E., Levesque, C. A., and Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium* (*Athelia*) *rolfsii* and related species. Phytopathology 85: 1269–1281.

Hernández-Ochandía, D., Rodríguez-Hernández, M. G., Miranda-Cabrera, I., Moreno-León, E., Castro-Lizazo, I., Delgado-Oramas, B. P., and Holgado, R. 2008. Reproducción y efecto nocivo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en *Phaseolus vulgaris* L. 'Cuba-Cueto-25-9'. Revista de Protección Vegetal 33: 1−7.

Idris, A. M., Mills, L. K., Martin, K., and Brown, J. K. 2008. *Melon chlorotic leaf curl virus*: characterization and differential reassortment with closest relatives reveal adaptive virulence in the *Squash leaf curl virus* clade and host shifting by the host-restricted *Bean calico mosaic virus*. Journal of Virology 82: 1959−1967. doi: 10.1128/JVI.01992-07.

Kanwal, A., Anjum, F., Qudsia, H., Javaid, A., and Mahmood, R. 2012. Evaluation of tebuconazole and thiophanate-methyl against some problematic soil-borne plant pathogens. Mycopath 10: 17−20.

Khatri, K., Kunwar, S., Barocco, R. L., and Dufault, N. S. 2017. Monitoring fungicide sensitivity levels and mycelial compatibility groupings of *Sclerotium rolfsii* isolates from Florida peanut fields. Peanut Science 44: 83−92. doi.org/10.3146/PS17-7.1

Kishore, G. K., Pande, S., Rao, J. N., and Podile, A. R. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the plant cell wall degrading enzymes of *Sclerotium rolfsii* and reduces the severity of groundnut stem rot. European Journal of Plant Pathology 113: 315−320.

Kohn, L. M., Stavoski, E., Carbone, I., Royer, J., and Anderson, J. B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 81: 480–485. doi: 10.1094/Phyto-81-480.

Kumar, M. R., Madhavi, M. V., Santhoshi, K. T., and Raja, K. 2014. Cultural and morphological variability *Sclerotium rolfsii* isolates infecting groundnut and its reaction to some fungicidal. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 10: 553−561.

Kumar, V., Rathanakumar, A. L., and Bagwan, N. B. 2012. Effect of crop residues and root exudates on mycelial growth sclerotial formation, and *Sclerotium rolfsii* induced stem rot disease of groundnut. Indian Phytopathology 65: 238−243.

Kunjeti, S. G., Evans, T. A., Marsh, A. G., Gregory, N. F., Kunjeti, S., Meyers, B. C., Kalavacharla, V. S., and Donofrio, N. M. 2012. RNA-seq reveals infection-related global gene changes in *Phytophthora phaseoli*, the causal agent of lima bean downy mildew: gene expression in *Phytophthora phaseoli*. Molecular Plant Pathology 13: 454−466. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00761.x.

Kusolwa, P. M., Myers, J. R., Porch, T. G., Trukhina, Y., González-Vélez, A., and Beaver, J. S. 2016. Registration of AO-1012-29-3-3A red kidney bean germplasm line with bean weevil, BCMV and BCMNV resistance. Journal of Plant Registrations 10: 149−153. doi: 10.3198/jpr2015.10.0064crg.

Kwak, M., and Gepts, P. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). Theoretical and Applied Genetics 118: 979−992.

Kwon, J. H., Kang, D. W., Choi, O., and Kim, J. 2016. The occurrence of *Sclerotium* rot on *Momordica charantia* caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea. Archives of Phytopathology and Plant Protection 49: 43−47. doi: 10.1080/03235408.2016.1152067

Lakpale, N., Khare, N., and Thrimurty, V. S. 2007. Suppression of *Sclerotium rolfsii* Sacc.: an intergrated approach. Soils and Crops 17: 241−245.

Le, C. N. 2004. Study wilt diseases on groundnut and some methods to control them in Thua Thien Hue province. Vietnam National Journal of Plant Protection 1: 9−15.

Le, C. N., Mendes, R., Kruijt, M., and Raaijmakers, J. M. 2012. Genetic and phenotypic diversity of *Sclerotium rolfsii* in groundnut fields in Central Vietnam. Plant Disease 96: 389–397.

Lépiz, I. R., y Ramírez, R. D. 2010. Los parientes silvestres del frijol común en el Occidente de México. Orgánica Diseño Editorial. México 64p.

Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127−150. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.001015.

Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. Annual Review of Phytopathology 48: 395−417.

Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection 24: 853−863.

Machado, A. C., Dorigo, O. F., and Mattei, D. 2013. First report the root knot nematode *Meloidogyne inornata* parasitizing common bean in Paraná State, Brazil. Plant Disease 97: 431.

Madi, L., Katan, T., Katan, J., and Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. Phytopathology 87: 1054–1060. doi:10.1094/phyto.1997.87.10.1054.

Mahadevakumar, S., Chandana, C., Deepika, Y. S., Sumashri, K. S., Yadav, V., and Janardhana, G. R. 2018. Pathological studies on the southern blight of China aster (*Callistephus chinensis*) caused by *Sclerotium rolfsii.* European Journal of Plant Pathology 15: 1081–1087. doi: 10.1007/s10658-017-1415-2

Manu, T. G., Nagaraja, A. C., Janawad, S., and Vinayaka, H. 2012. Efficacy of fungicides and biocontrol agents against *Sclerotium rolfsii* causing foot rot disease of finger millet, under *in vitro* conditions. Global Institute for Research and Education 1: 46−50.

Manu, T. G., Nagaraja, A., and Manjunatha, S. V. 2018. Morphological and cultural variability among the *Sclerotium rolfsii* isolates. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7: 904−907.

Marcenaro, D., and Valkonen, J. P. 2016. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) in Nicaragua. PLoS ONE 11: 1−18. doi: 101371/journal.pone.0168662.

Mellado, E., Diaz, G. T., Cuenca, E. M., and Rodriguez, T. J. 2001. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* sp. Journal of Clinical Microbiology 39: 2431−2438.

Mengesha, G. G., and Yetayew, H. T. 2018. Distribution and association of factors influencing bean common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) epidemics in southern Ethiopia. Archives of Phytopathology and Plant Protection 51: 1066-1089. doi: 10.1080/03235408.2018.1551043.

Milgroom, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology 34: 457−477. doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.457.

Mkandawire, A. B., Mabagala, R. B., Guzman, P., Gepts, P., and Gilbertson, R. L. 2004. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. Phytopathology 94: 593–603.

Mueller, D. S., Wise, K. A., Dufault, N. S., Bradley, C. A., and Chlvers, M. I. 2013. Fungicides for field crops. APS Press, St Paul, Minnesota, USA. 120p.

Mullen, J. 2001. Southern blight, southern stem blight, white mold. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01.

Nalim, F. A., Starr, J. L., Woodard, K. E., Segner, S., and Keller, N. P. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 85: 1507–1512. doi: 10.1094/Phyto-85-1507

Narayana, B., and Srivastava, L. S. 2003. Evaluation of some fungicides and neem formulations against six soil-borne pathogens and three *Trichoderma* spp. *in vitro*. Plant Disease 18: 56−59.

Naseri, B., and Mousavi, S. S. 2008. Root rot pathogens in field soil, roots and seeds in relation to common bean (*Phaseolus vulgaris*), disease and seed production. Pest Management Science 61: 60–67.

Navarrete-Maya, R., Trejo-Albarrán, E., Navarrete-Maya, J., Prudencio-Sains, J. M., and Acosta-Gallegos, J. A. 2009. Reacción de genotipos de frijol a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. Agricultura Técnica en México 35: 459–470.

Nguyen, T. N., Tran, V. M., Nguyen, T. T., and Le, C. N. 2004. Research on groundnut diseases in Quang Binh province. National Agriculture and Rural Development 17: 337−342.

Okabe, I., and Matsumoto, N. 2000. Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. Mycoscience 41: 145–148. doi: 10.1007/BF02464323.

Pastor, N. A., Reynoso, M. M., Tonelli, M. L., Masciarelli, O., Rosas, S. B., and Rovera, M. 2010. Potential biological control *Pseudomonas* sp. PCI2 against damping-off of tomato caused by *Sclerotium rolfsii*. Journal of Plant Pathology 92: 737−745.

Peres, N. A., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloesporoides* from citrus. Plant Disease 88: 125−130.

Prasad, R. D., and Naik, M. K. 2008. Advances in plant diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and their management. Pp:89−127. *In*: Naik, M. K., and Rani, D. G. (eds.). Advances in Soil Borne Plant Diseases. New India Publishing Agency. Pitam Pura, New Delhi, India. 427p.

Prophete, E., Demosthenes, G., Godoy, L. G., Porch, T. G., and Beaver, J. S. 2014. Registration of PR0633-10 and PR0737-1 red mottled dry bean germplasm lines with resistance to BGYMV, BCMV, BCMNV, and common bacterial blight. Journal of Plant Registrations 8: 49. doi: 10.3198/jpr2013.08.0046crg.

Punja, Z. K., and Damiani, A. 1996. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. Mycologia 88: 694–706. doi: 10.2307/3760963.

Punja, Z. K., and Grogan, R. G. 1983. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia* (*Sclerotium*) *rolfsii*. Phytopathology 73: 1279−1284. doi: 10.1094/Phyto-73-1279.

Punja, Z., and Jenkins, S. 1984. Influence of medium composition on mycelial growth and oxalic acid production in *Sclerotium rolfsii.* Mycologia 76: 947−950.

Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review of Phytopathology 23: 97-127.

Punja, Z. K., and Sun, L. J. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S. delphinii.* Mycological Research 105: 537–546. doi:10.1017/s0953756201004002

Quintana-Blanco, W. A., Pinzón-Sandoval, E. H., y Torres, D. F. 2016. Evaluación del crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Ica Cerinza, bajo estrés salino. Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica 19: 87−95.

Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., and Moonne, L. Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil 321: 341−361.

Rangarani, A., Rajan, C. P., Harathi, P. N., Bhaskar, B., and Sandhya, Y. 2017. Evaluation of fungicides and herbicides on *Sclerotium rolfsii*, incitant of stem rot diseases in groundnut (*Arachis hypogeal* L.). International Journal of Pure and Applied Bioscience 5: 92−97. doi: http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.3040.

Remesal, E., Ramirez, R., Diaz, R., and Cortes, J. 2012. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean type climate regions. Plant Pathology 61: 739–753. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02552.x.

Rico, A., Lopez, R., Asenio, C., Aizpum, M. T., Asensio, S., Manzanera, M. L., and Murillo, J. 2003. Nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo bligth of beans in Spain and escape current detection methods. Phytopathology 93: 1553−1559.

Ristaino, J., Perry, K., and Lumsden, R. 1996. Soil solarization and *Gliocladium virens* reduce the incidence of southern blight *Sclerotium rolfsii* in bell pepper in the field. Biocontrol Science and Technology 6: 583−594. doi: 10.1080/09583159631226.

Rivera, M. C., Wright, E. R., Silvestro, L., Stenglein, S., y Kato, A. 2018. Nuevo hospedante de *Sclerotium rolfsii* que causa podredumbre de la corona y raíz en *Pseudogynoxis benthamii*. Revista Mexicana de Biodiversidad 89: 950−953.

Roberts, P. D., French-Monar, R. D., and McCarter, S. M. 2014. Southern blight. Pp:43−44 *In*: Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, M. T., and Miller, S. A. (eds.). Compendium of Tomato Diseases, 2nd edition. APS Press. St. Paul, MN. 176p.

Rossi, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Nanni, L., Rau, D., Attene, G., and Papa, R. 2009. Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L. Evolutionary Applications 2: 504−522. doi: 10.1111/j.1752-4571.2009.00082.x

SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. Jornada de transferencia de tecnología del cultivo de frijol. https://www.fps.org.mx/portal/index.php/component/phocadownload/category/30-granos-y-flores?download=60:jornada-de-transferencia-de-tecnologia-del-cultivo-del-frijol (Consulta, mayo 2020).

Samaniego-Gaxiola, J. A., and Chew-Madinaveitia, Y. 2007. Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 78: 383−390.

Sánchez-García, B. M., González-Flores, F., Pons-Hernández, J. L., Acosta-Gallegos, J. A., Cabral-Enciso, M., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J., and Rodríguez-Guerra, R. 2006. *Fusarium lateritium*: nuevo patógeno de la raíz del frijol en México. Agricultura Técnica en México 32: 251−257.

Santomauro, A., Pollastro, S., De Guido, M. A., De Miccolis, A. R., Natale, P., and Faretra, F. 2000. A long-term trial on the effectiveness of new fungicides against grey mould on grapevine and on their influence on the pathogen's population. Abstract Book of the XII International *Botrytis* Symposium. Reims, France. 75p.

Sarma, B. K., Singh, U. P., and Singh, K. P. 2002. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. Mycologia 94: 1051−1058. doi: 10.2307/3761870.

Sennoi, R. J., Saksirirak, W., and Kesmala, T. P. 2013. Genotypic variation of resistance to southern stem roto of *Helianthus tuberosus* caused by *Sclerotium rolfsii*. Euphytica 190: 415−424.

Serra, I. M., and Silva, G. S. 2005. Biological and physiological characterization of *Sclerotium rolfsii* isolates obtained from sweet pepper in the State of Maranhão. Brazilian Phytopathology 30: 61−66. doi: 10.1590 / S0100-41582005000100010.

Sharma, M., and Ghosh, R. 2017. Heat and soil moisture stress differentially impact chickpea plant infection with fungal pathogens. Pp:47–57. *In*: Senthil-Kumar, M. (ed.). Plant Tolerance to Individual and Concurrent Stresses. Springer Press. New Delhi, India. 178p. doi: 10.1007/978-81-322-3706-8

Shirsole, S. S., Khare, N., Lakpale, N., and Kotasthane, A. S. 2019. Evaluation of fungicides against *Sclerotium rolfsii* Sacc. incitant of collar rot of chickpea. The Pharma Innovation Journal 8: 310–316.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. Producción mensual agrícola. www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119 (Consulta, marzo 2020).

Singh, A., Mehta, S., Singh, H. B., and Nautiyal, C. S. 2003. Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. Current Microbiology 47: 153–158. doi: 10.1007/s00284-002-3938-8.

Singh, S. P., Gutiérrez, J. A., Molina, A., Urrea, C., and Gepts, P. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean. Crop Science 31: 23–29.

Singleton, L. L., Mihail, J. D., and Rush, C. M. 1992. Methods for research on soil-borne phytopathogenic fungi. APS Press. St Paul, Minnesota, USA. 264p.

Snapp, S., Kirk, W., Roman, A. B., and Kelly, J. 2003. Root traits play a role in integrated management of *Fusarium* root rot in snap beans. HortScience 38: 187–191.

SNICS, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. 2017. Generalidades de la red frijol. www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/frijol-*Phaseolus*-spp (Consulta, marzo 2020).

Tarafdar, A., Rani, T. S., Chandran, U. S., Ghosh, R., Chobe, D. R., and Sharma, M. 2018. Exploring combined effect of abiotic (soil moisture) and biotic (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) stress on collar rot development in chickpea. Frontiers in Plant Science 9: 1−10. doi: 10.3389/fpls.2018.01154.

Taylor, C. R., and Rodriguez, K. R. 1999. Optimal rotation of peanuts and cotton to manage soil borne organisms. Agricultural Systems 61: 57−68.

Tonelli, M. L., Taurian, T., Ibanez, F., Angelini, J., and Fabra, A. 2010. Selection and *in vitro* characterization of biocontrol agents with potential to protect peanut plants against fungal pathogens. Journal of Plant Pathology 92: 73−82.

Truscott, J. E., and Gilligan, C. A. 2001. The effect of cultivation on the size, shape, and persistence of disease patches in fields. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 7128−7133.

Ünal, F., Aşkın, A., Koca, E., Mesut, Y., and Ümit, M. B. 2019. Mycelial compatibility groups, pathogenic diversity and biological control of *Sclerotium rolfsii* on turfgrass.

Egyptian Journal of Biological Pest Control 29: 1−7. doi: 10.1186/s41938-019-0144-6.

Vargas, G., Haro, R., Oddino, C., Kearney, M., Zuza, M., Marinelli, A., and March, G. J. 2008. Crop management practices in the control of peanut diseases caused by soilborne fungi. Crop Protection 27: 1−9.

Velásquez, R. 2001. Nematodos agalladores afectando hortalizas y otros cultivos en el norte centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 107−109.

Venkata, S. P., Mohammad, L. A., Ramana, J., and Ahmmed, S. 2018. Characterization of *Sclerotium rolfsii* Sacc. causing collar rot in chickpea isolates using cultural and morphological traits. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7: 3912−3922. doi: 10.18805/LR-4199.

Voorde, T., Putten, W., and Bezemer, T. 2012. Soil inoculation method determines the strength of plant-soil interactions. Soil Biology and Biochemistry 55: 1−6. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.05.020.

Wu, M., Wu, W. P., Liu, C. C., Liu, Y. N., Wu, X. Y., Ma, F. F., Zhu, A. Q., Yang, J. Y., Wang, B., and Chen, J. Q. 2018. A *Bean common mosaic virus* (BCMV) resistance gene is fine mapped to the same region as Rsv1-h in the soybean cultivar Suweon 97. Theoretical and Applied Genetics 13: 1851–1860. doi: 10.1007/s00122-018-3117-3.

Xie, C., Huang, C. H., and Vallad, G. E. 2014. Mycelial compatibility and pathogenic diversity among *Sclerotium rolfsii* isolate in the southern United States. Plant Disease 98: 1685–1694. doi: 10.1094/PDIS-08-13-0861-RE.

Xu, Z., Gleason, M., Mueller, D., Esker, P., Bradley, C., Buck, J., Benson, D., Dixon, P., and Monteiro, J. E. 2008. Overwintering of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii* in different latitudes of the United States. Plant Disease 92: 719−724. doi: 10.1094/PDIS-92-5-0719.

Yang, V. W., and Clausen, C. A. 2005. Determining the suitability of lactobacilli antifungal metabolites for inhibiting mould growth. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 977−981.

Ziogas, B. N., Markoglou, A. N., and Tzima, A. 2002. A non-Mendelian inheritance of resistance to strobilurin fungicides in *Ustilago maydis*. Pest Management Science 58: 908–916.

CAPÍTULO I.

CARACTERIZACIÓN, VIRULENCIA Y COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* DE CAMPOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA, MÉXICO

RESUMEN

El norte del estado de Sinaloa es la zona con mayor producción de frijol en México y es recurrente la pérdida de producción causada por *Sclerotium rolfsii*, sin embargo, se tiene poca información sobre el patógeno. El objetivo de este estudio fue determinar la morfología, virulencia y grupos de compatibilidad vegetativa de 50 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de 14 campos comerciales de frijol distribuidos en el norte de Sinaloa, México. El análisis morfológico consistió en registrar los caracteres cualitativos y cuantitativos de las colonias y esclerocios. La virulencia de los aislados fúngicos se evaluó en tallos de plantas de frijol cv. Azufrado Higuera mediante inoculación de discos miceliales. Los grupos de compatibilidad vegetativa se determinaron mediante la confrontación del crecimiento micelial de todos los aislados entre sí. Los resultados de la caracterización mostraron diferencias morfológicas como tamaño, color, forma y el número de esclerocios producidos por los diferentes aislados. La prueba de patogenicidad y virulencia indicó que todos los aislados fueron patogénicos y hubo diferencia en la virulencia de los aislados, dado que el 26% se consideraron con virulencia alta, 64% con virulencia moderada y el 10% con virulencia baja. El análisis de compatibilidad vegetativa resultó en la asignación de seis grupos, demostrando que existe gran diversidad genética en poblaciones de este hongo en Sinaloa. Esta información muestra la estructura poblacional de *S. rolfsii* en campos agrícolas en el norte de Sinaloa, México y contribuirá al diseño de estrategias de manejo integrado de la enfermedad.

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris, Athelia rolfsii*, patogenicidad, virulencia, compatibilidad vegetativa.

CHAPTER I.

CHARACTERIZATION, VIRULENCE AND VEGETATIVE COMPATIBILITY OF *Sclerotium rolfsii* ISOLATES OBTAINED FROM BEAN CROPS IN NORTHERN SINALOA, MEXICO

ABSTRACT

Northern Sinaloa state, is the main bean (*Phaseolus vulgaris*) producer in México and the loss of production by *Sclerotium rolfsii* is frequently reported. However, there is little information about this pathogen. The aim of this study was to determine the morphology, virulence and vegetative compatibility groups (VCGs) of 50 *S*. *rolfsii* isolates obtained from 14 commercial bean crops distributed in the north of Sinaloa, Mexico. The morphological analysis was performed by the registration of qualitative and quantitative characters of the colonies and sclerotia. Virulence of the isolates was tested in the stems of bean plants cv. Azufrado Higuera inoculated with mycelial disks. The VCGs were determined by the confrontation of the mycelial growth between all the isolates. Results obtained for the characterization showed morphological differences of size, color, shape and numbers of sclerotia produced by the isolates. Pathogenicity and virulence tests showed that all the isolates were pathogenic and there were differences in the virulence, with 26% of high virulence, 64% of moderate virulence and 10% of low virulence. For the vegetative compatibility six groups were obtained, which means great genetic diversity in the *S. rolfsii* populations. The data obtained showed the population structure of *S*. *rolfsii* in agricultural fields in northern Sinaloa state and will contribute to the design of strategies for the integrated management of the disease.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Athelia rolfsii*, pathogenicity, virulence, vegetative compatibility.

1.1. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de mayor importancia económica a nivel mundial y en Latinoamérica forma parte de la alimentación básica y su consumo satisface los requerimientos necesarios (SIAP, 2019). México ocupa el sexto lugar en producción de frijol con 283,197 t, detrás de la India, Myanmar, Brasil, EE. UU. y China (FAO, 2017). En México, la producción de frijol se distribuye en 23 estados, sin embargo, más del 97% de la producción se concentra en los estados de Sinaloa, Nayarit, Sonora, Chiapas y Veracruz, donde Sinaloa es el que más produce con 128,144 t, resaltando los municipios de Guasave y Ahome con el 40 y 16% de la producción total del estado, respectivamente (SIAP, 2019).

El cultivo de frijol se ve afectado por enfermedades causadas por hongos, entre la que destaca la pudrición de raíz y tallo ocasionada por *Sclerotium rolfsii* (=*Athelia rolfsii*) (Al-Askar *et al*., 2013). Este hongo sobrevive como esclerocios en residuos de tejidos vegetales infectados y en el suelo (Naseri y Mousavi, 2015). En condiciones ambientales favorables infecta la base del tallo, después coloniza e invade la raíz con un típico micelio blanco algodonoso sedoso (Kwon *et al*., 2016). Las lesiones se vuelven café oscuro y se pudren, llegando a causar una mortalidad de plantas de 70−95% en condiciones favorables para el patógeno, lo que conduce a pérdidas de rendimiento del cultivo (Tarafdar *et al*., 2018).

El estado anamórfico de *S. rolfsii*, se caracteriza por la formación de abundante micelio aéreo blanco, su estado teleomórfico rara vez se ha registrado en condiciones naturales, por lo que en general, es considerado como un hongo con reproducción asexual (Almeida *et al*., 2001; Nalim *et al*., 1995). El conocimiento de la diversidad genética entre poblaciones de *S. rolfsii* en áreas infestadas, brinda valiosa información sobre la

estructura del mismo, así como la dispersión para un manejo adecuado de la enfermedad (Cilliers *et al*., 2000). Una de las herramientas indirectas utilizadas para este propósito es la caracterización de poblaciones mediante la ocurrencia de grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) (Leslie, 1993; Xie *et al*., 2014). Este método se ha utilizado en los últimos años y es relevante en hongos en los que la reproducción sexual tiene un mínimo impacto en su ciclo de vida (Kohn *et al*., 1991; Okabe y Matsumoto, 2000). En este sentido, la importancia de los GCVs radica en preservar la identidad al impedir el intercambio de información genética a otros GCVs o bien de tener recombinación genética dentro de un mismo GCV (Xie *et al*., 2014).

Diversas investigaciones han estimado la diversidad genética entre aislados de hongos fitopatógenos mediante GCVs, entre ellos, algunos estudios de variabilidad genética entre poblaciones de *S. rolfsii* (Adandonon *et al*., 2005; Almeida *et al*., 2001; Cilliers *et al*., 2000; Cilliers *et al*., 2003; Okabe y Matsumoto, 2000; Punja y Sun, 2001; Remesal *et al*., 2012; Xie *et al*., 2014).

Cabe mencionar que no es clara la relación de los GCVs con respecto a las características morfológicas, fisiológicas, patogénicas e incluso en el nivel de resistencia a fungicidas (Adandonon *et al*., 2005; Almeida *et al*., 2001). En este contexto, el objetivo de esta investigación fue generar información sobre la diversidad genética, mediante la ocurrencia de GCVs, morfología y virulencia de aislados de *S. rolfsii* obtenidos de campos de frijol distribuidos en el norte de Sinaloa.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Recolección de muestras

Durante muestreos realizados en el ciclo de cultivo 2018–2019, se recolectaron plantas de frijol cv. Azufrado Higuera con síntomas típicos inducidos por *S. rolfsii* (Figura 1) en 14 campos distribuidos en el norte de Sinaloa, México (Cuadro 1). La incidencia de la enfermedad se estimó en todos los campos de frijol en los municipios de Guasave y Ahome, sin importar la edad de la planta, ya que *S. rolfsii* puede causar enfermedad en cada una de las etapas fenológicas del cultivo. Los 14 campos se muestrearon por el método “cinco de oros” y se inspeccionaron 100 plantas por punto de muestreo.

1.2.2. Aislamiento, purificación y preservación de aislados

Los aislados de *S. rolfsii* se obtuvieron de acuerdo con los procedimientos y técnicas descritas por Singleton *et al*. (1992) con algunas modificaciones. Para ello, tallos y raíces de frijol sintomáticos se lavaron con agua corriente para desprender el suelo y tejidos en descomposición. Se cortaron fragmentos de tejido de 5 × 5 mm, abarcando el área de avance de la lesión y tejido con apariencia sana. Los fragmentos se desinfestaron por inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) a 1% por 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Los fragmentos desinfestados se colocaron en placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, Difco, Francia). Las placas Petri se incubaron a 25 °C y oscuridad por 3 días. Para la obtención de cultivos monohifales, se tomó un disco micelial de 6 mm de diámetro del borde del crecimiento activo de la colonia y se transfirió a placas Petri con medio de cultivo agar agua (AA). Después de 24 horas, se localizó una punta de hifa de cada

aislado, se cortó y se transfirió a placas con PDA observando con un microscopio estereoscopio (Leica, Alemania). En total se obtuvieron 50 aislados monohifales los cuales se encuentran depositados en la Colección de Cultivos de Hongos Fitopatógenos de la Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte en la Universidad Autónoma de Sinaloa (Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México) con números de acceso FAVF224−FAVF273. Los cultivos se conservaron como discos miceliales en 15% de glicerol en congelación (-20 °C), agua destilada estéril en refrigeración (4 °C) y en tubos de ensayo con aceite mineral.

1.2.3. Caracterización morfológica

Los caracteres macroscópicos se examinaron para 50 aislados de *S. rolfsii*. Todos los aislados se reactivaron en medio PDA a partir de discos miceliales preservados en glicerol al 15% y a -20 °C. Para determinar la tasa de crecimiento micelial de cada aislado, se tomó un disco micelial de 6 mm de diámetro a partir de la periferia del crecimiento activo de tres días de edad y se transfirió con asepsia a placas con PDA. Las colonias se colocaron en una incubadora (Terlab, México) a 25 °C en oscuridad continua. El diámetro del crecimiento micelial de cada colonia se midió de forma perpendicular en dos direcciones y se registró cada 24 horas durante 3 días. La tasa de crecimiento (k), se calculó con la función de crecimiento lineal $y = k x + c$ (donde y es la distancia, x es el tiempo y c el factor constante) y se expresó en milímetros por día (mm día^{-1}) (Zeravakis *et al*., 2001). Las colonias con 7 días de edad se caracterizaron de forma visual y se registró el color, tipo y grosor del crecimiento micelial, así como la presencia o ausencia de un círculo concéntrico. Para los caracteres de los esclerocios, se evaluó el inicio de formación de éstos, distribución en la placa de Petri, tamaño (n = 50), forma, color y

número total de esclerocios por caja a los 21 días de edad de la colonia. Se analizaron tres réplicas de colonias por cada aislado y el experimento completo se realizó dos veces.

1.2.4. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs)

Para determinar la compatibilidad vegetativa, los 50 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de plantas enfermas de frijol cv. Azufrado Higuera, se confrontaron entre sí de acuerdo con la metodología descrita por Kohn *et al*. (1991), con algunas modificaciones. Para ello, se utilizaron placas de Petri con medio PDA, en donde se colocó un aislado en el centro, mediante un disco micelial de 5 mm de diámetro cortado del borde de una colonia activa de cuatro días de edad y se colocaron cinco aislados a su alrededor a 2.5 cm de distancia del aislado a confrontar por cada placa de Petri. Los discos miceliales del mismo aislado sirvieron como control para determinar las reacciones miceliales compatibles. Después del establecimiento, las placas Petri se incubaron a 25 °C en oscuridad continua por 7 días. La compatibilidad micelial se evaluó mediante reconocimiento visual, para determinar la formación de una colonia combinada para una reacción compatible, o bien, una línea de inhibición oscura o de antagonismo para una reacción incompatible (Leslie, 1993; Xie *et al*., 2014). Cada aislado consistió en tres réplicas y todo el experimento se realizó dos veces. La designación del número de grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) se realizó de forma arbitraria sin hacer referencia al origen geográfico del aislado.

1.2.5. Prueba de patogenicidad y virulencia

Las pruebas de patogenicidad para 50 aislados de *S. rolfsii* se realizaron con semilla certificada de frijol cv. Azufrado Higuera, la cual se desinfestó en NaClO a 1% por 2

min, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente. Después las semillas se sembraron en macetas de poliestireno expandido de 2 kg de capacidad que contenían sustrato Peat-moss (Pro-Moss-Fine, EE. UU.) esterilizado y ahí se mantuvieron por 30 días y se regaron a capacidad de campo. La inoculación de las plantas se realizó con discos miceliales de 5 mm de diámetro, retirados del margen de una colonia de cuatro días de edad en medio PDA, los cuales se colocaron sobre heridas en tallos, con ayuda de un mondadientes estéril y se sellaron con Parafilm® (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Las plantas control se inocularon con discos de PDA no colonizados. Las plantas se cubrieron con bolsas de plástico transparente, luego se mantuvieron en condiciones de luz natural durante 48 horas, después de este periodo las bolsas se retiraron y las plantas se mantuvieron en invernadero a 25 °C, donde se examinaron cada 24 horas para el registro de los síntomas. La virulencia de cada aislado se evaluó 5 días después de la inoculación, mediante el registro de la longitud (mm) de las lesiones en los tallos inoculados, mediante un vernier digital (Truper, México). Se utilizó un diseño completo al azar con 10 réplicas y el experimento se realizó dos veces. Por último, el hongo se reaisló de tejidos sintomáticos para completar los postulados de Koch.

1.2.6. Análisis de datos

La normalidad de los datos de incidencia y virulencia se verificó con la prueba de Shapiro-Wilks. El análisis de varianza fue paramétrico y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el Software estadístico InfoStat (Di-Rienzo *et al*., 2016).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Síntomas e incidencia de la enfermedad

En plantas jóvenes los síntomas consistieron en marchitez y pudrición de raíz, mientras que las plantas en etapas fenológicas avanzadas mostraron pudrición de raíz, tallo, hojas y vainas cubiertas por micelio blanco. En plantas en fructificación con infecciones severas se observó la presencia de esclerocios sobre los tejidos necróticos (Figura 1).

En el ciclo agrícola 2018–2019, la incidencia de la enfermedad (pudrición de raíz y tallo) causada por *S. rolfsii* varió de 6.2 a 18.4% (media= 13.37%) en los 14 campos comerciales de frijol cv. Azufrado Higuera distribuidos en el norte de Sinaloa, México (Cuadro 1). Cabe resaltar, que la incidencia promedio de la enfermedad fue más alta en el municipio de Guasave (15.32%) que en el municipio de Ahome (10.76%).

Figura 1. Síntomas y signos de *Sclerotium rolfsii* en tejidos de frijol cv. Azufrado Higuera. **a**) Planta con síntomas de marchitez. **b**) Plantas muertas en etapa temprana. **c**) Lesión café oscura en tallo. **d**) Lesión café oscura en tallo, con micelio blanco y esclerocios. **e**) Hoja con lesión extendida con crecimiento micelial blanco. **f**) Ramas, peciolos y flores colonizados. **g**) Vaina y granos con lesiones cafés.

Cuadro 1. Incidencia y sitios de recolección de raíces y tallos de frijol cv. Azufrado Higuera con síntomas de pudrición para la obtención de aislados de *Sclerotium rolfsii*, en el norte de Sinaloa, México.

Código de aislado	Municipio	Fecha de recolecta	No. de campo	Incidencia (%)	Coordenadas
FAVF224−FAVF227	Guasave	Noviembre, 2018	1	18.40 **c***	25°43'30.8" N 108°49'35.8" W
FAVF228, FAVF253, FAVF254	Ahome	Diciembre, 2018	2	16.00 **bc**	25°50'57.7" N 108°59'08.5" W
FAVF229−FAVF232	Guasave	Diciembre, 2018	3	16.00 **abc**	25°42'21.5" N 108°50'20.7" W
FAVF233−FAVF235	Guasave	Diciembre, 2018	4	15.60 **abc**	25°44'15.2" N 108°46'19.8" W
FAVF236−FAVF240	Guasave	Diciembre, 2018	5	15.40 **abc**	25°42'54.6" N 108°48'22.3" W
FAVF241−FAVF244	Guasave	Diciembre, 2018	6	15.00 **abc**	25°41'18.3" N 108°48'14.5" W
FAVF245−FAVF252	Ahome	Diciembre, 2018	7	14.40 **abc**	25°49'14.4" N 108°57'20.6" W
FAVF255−FAVF259	Ahome	Enero, 2019	8	13.60 **ab**	25°50'30.9" N 108°56'26.9" W
FAVF260−FAVF263	Guasave	Enero, 2019	9	13.20 **ab**	25°45'22.7" N 108°47'40.4" W
FAVF264−FAVF265	Ahome	Enero, 2019	10	11.40 **ab**	25°46'55.1" N 108°52'19.2" W
FAVF266	Guasave	Enero, 2019	11	11.20 **ab**	25°43'23.5" N 108°46'53.3" W
FAVF267−FAVF269	Ahome	Enero, 2019	12	10.80 **ab**	25°51'11.1" N 109°00'26.4" W
FAVF270	Ahome	Enero, 2019	13	10.00 **ab**	25°49'46.3" N 108°56'58.1" W
FAVF271−FAVF273	Guasave	Enero, 2019	14	6.20 **a**	25°42'37.9" N 108°43'04.9" W

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0.05$) según la prueba de Tukey.

1.3.2. Morfología de la colonia y esclerocios

Las características de las colonias y de los esclerocios de los 50 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de plantas de frijol, con síntomas de pudrición de raíz y tallo, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características morfológicas de la colonia y esclerocios de 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de raíces y tallos de plantas de frijol con síntomas de pudrición, en campos comerciales del norte de Sinaloa, México.

Colonia						Esclerocios				
Aislado	TC[a] (mm dia^{-1})	C[b]	T[c]	CC[d]	TM[e]	DP[f]	F[g]	C[h]	Tamaño (mm) Media (min-max)	N[i]
FAVF224	31.32	Bp	E	A	D	6	Es	Mo	0.98 (0.82-1.85)	90
FAVF225	48.71	Bp	E	A	D	6	Es	Mc	1.29 (1.09-1.48)	193
FAVF226	55.65	Bp	E	P	D	5	Ir	Mc	0.99 (0.72-1.20)	343
FAVF227	55.97	Bm	E	A	D	8	Es	Mc	1.01 (0.85-1.24)	333
FAVF228	48.99	Bs	F	A	G	5	Ir	Mo	1.95 (1.54-2.69)	150
FAVF229	54.98	Bp	E	P	D	5	Es	Mo	1.34 (1.15-1.48)	333
FAVF230	44.85	Bs	E	A	D	5	Es	Mc	1.20 (0.57-1.39)	533
FAVF231	50.94	Bm	F	A	G	8	Es	Mo	1.17 (0.85-1.35)	323
FAVF232	51.54	Bm	F	A	G	8	Es	Mo	1.09 (0.96-1.25)	353
FAVF233	32.19	Bs	E	A	D	5	Es	Mo	1.03 (0.71-1.78)	117
FAVF234	53.59	Bp	F	A	G	7	Es	Mc	1.09 (0.96-1.23)	300
FAVF235	45.95	Bp	C	A	D	9	Ir	Mc	1.13 (1.00-1.88)	260
FAVF236	57.50	Bp	E	P	D	5	Ir	Mc	1.01 (0.81-1.43)	503
FAVF237	57.06	Bm	E	A	D	9	Ir	Mc	1.18 (1.00-1.29)	300
FAVF238	55.71	Bp	E	P	D	5	Ir	Mo	1.07 (0.79-1.31)	607
FAVF239	57.36	Bm	C	A	D	5	Ir	Mc	1.01 (0.88-1.58)	307
FAVF240	55.66	Bp	E	A	D	5	Es	Mc	1.24 (1.07-1.58	413
FAVF241	34.86	Bp	E	A	D	5	Es	Mc	1.02 (0.79-1.71)	110
FAVF242	39.00	Bp	E	A	D	5	Es	Mc	1.06 (0.76-1.25)	140
FAVF243	57.91	Bm	C	A	D	8	Ir	Mc	1.08 (0.80-1.20)	400
FAVF244	47.98	Bs	C	A	D	5	Ir	Mo	1.32 (1.20-1.80)	500
FAVF245	49.38	Bp	C	A	D	6	Es	Mc	1.09 (0.99-1.30)	300
FAVF246	46.57	Bp	E	A	D	5	Es	Mc	1.05 (0.75-1.15)	467
FAVF247	46.82	Bp	E	A	D	9	Es	Mc	1.12 (0.94-1.32)	400
FAVF248	46.65	Bp	E	A	D	9	Es	Mc	1.13 (0.96-1.95)	400
FAVF249	48.81	Bp	E	P	D	8	Es	Mc	1.03 (0.88-1.42)	327

Continuación del cuadro 2

FAVF250	58.80	Bm	C	A	D	9	Ir	Mo	1.01 (0.80-1.22)	733
FAVF251	35.39	Bs	E	P	D	5	Es	Mo	1.04 (0.60-1.76)	123
FAVF252	46.50	Bp	C	P	D	8	Ir	Mc	1.26 (1.11-1.50)	167
FAVF253	50.46	Bm	C	A	D	8	Es	Mo	1.28 (0.95-1.96)	500
FAVF254	58.14	Bm	F	A	G	8	Ir	Mo	1.90 (1.40-2.10)	666
FAVF255	58.14	Bp	E	A	D	8	Ir	Mo	1.35 (1.07-1.67)	717
FAVF256	40.47	Bp	E	P	D	9	Es	Mc	1.20 (1.06-1.52)	200
FAVF257	43.48	Bs	E	P	D	8	Ir	Mc	1.64 (1.25-1.93)	180
FAVF258	58.18	Bp	C	A	D	5	Es	Mc	1.03 (0.80-1.10)	723
FAVF259	54.49	Bp	E	P	D	6	Ir	Mc	1.07 (0.88-1.90)	383
FAVF260	51.16	Bp	E	A	D	9	Es	Mo	1.01 (0.73-1.83)	400
FAVF261	48.96	Bp	C	A	D	8	Es	Mc	1.01 (0.77-1.16)	300
FAVF262	44.38	Bp	E	P	D	8	Es	Mc	1.03 (0.73-1.77)	300
FAVF263	38.34	Bp	C	A	D	8	Es	Mc	1.00 (0.77-1.23)	97
FAVF264	58.67	Bm	F	A	G	6	Ir	Mr	1.65 (1.37-1.80)	633
FAVF265	43.31	Bm	F	A	G	6	Ir	Mr	1.60 (1.20-1.90)	300
FAVF266	45.71	Bp	E	P	D	8	Es	Mc	1.04 (1.60-1.94)	150
FAVF267	51.73	Bp	E	P	D	8	Es	Mo	1.06 (0.87-1.91)	237
FAVF268	48.09	Bs	E	P	D	5	Es	Mc	1.01 (0.77-1.59)	560
FAVF269	51.23	Bp	C	A	D	6	Ir	Mc	0.98 (0.81-1.64)	497
FAVF270	49.37	Bp	E	P	D	9	Es	Mc	1.89 (0.74-1.77)	460
FAVF271	48.45	Bp	E	P	D	9	Es	Mc	1.12 (0.95-1.40)	367
FAVF272	48.67	Bp	F	P	G	5	Ir	Mc	0.97 (0.73-1.09)	553
FAVF273	58.47	Bp	E	P	D	7	Es	Mc	1.00 (0.70-1.12)	700

[a]= Tasa de crecimiento (incubación a 25 °C en oscuridad continua).

[b]= Color de la colonia. **Bp**= Blanco puro. **Bm**= Blanco mate. **Bs**= Blanco sucio.

[c]= Textura de la colonia. **E**= Esponjosa. **F**= Fibrosa. **C**= Compacta.

[d]= Presencia o ausencia de un círculo concéntrico. **P**= Presencia. **A**= Ausencia.

[e]= Tipo de micelio. **D**= Delgado. **G**= Grueso.

[f]= Días en producirse los esclerocios.

[g]= Forma de los esclerocios. **Es**= Esférico. **Ir**= Irregular.

[h]= Color de los esclerocios. **Mo**= Marrón oscuro. **Mc**= Marrón claro. **Mr**= Marrón rojizo.

[i]= Número de esclerocios por placa de Petri (21 días después de la siembra en PDA).

Los 50 aislados de *S. rolfsii* mostraron hifas septadas, hialinas y con paredes delgadas, las cuales exhibieron un gran número de ramificaciones. Las hifas primarias presentaron conexiones en argolla, dando lugar a hifas secundarias y terciarias. Las colonias por lo general presentaron crecimiento aéreo algodonoso, típico de *S. rolfsii* (Sarma *et al*., 2002). La tasa de crecimiento micelial varió de 31.32 a 58.80 mm día^{-1} (media= 49.33 mm día^{-1}) a 25 °C en medio PDA. Se encontraron aislados con tonalidades blanco puro, blanco sucio y blanco mate, así mismo, se observaron aislados con textura micelial esponjosa, fibrosa y compacta (Figura 2). El micelio esponjoso fue más común (60%), seguido del compacto (24%) y fibroso (16%). Además, el 36% de los aislados exhibió un círculo concéntrico característico en la colonia.

Los esclerocios fueron esféricos e irregulares y presentaron coloración marrón claro, marrón oscuro y marrón rojizo (Figura 2). Los esclerocios variaron en tamaño de 0.89 a 1.95 mm (media= 1.17 mm) en medio de cultivo PDA, en tanto que el número de esclerocios por placa Petri varió de 90 a 733 (media= 369 esclerocios). Por otra parte, los días en producirse los esclerocios variaron de 5 a 9 (media= 6.84 días).

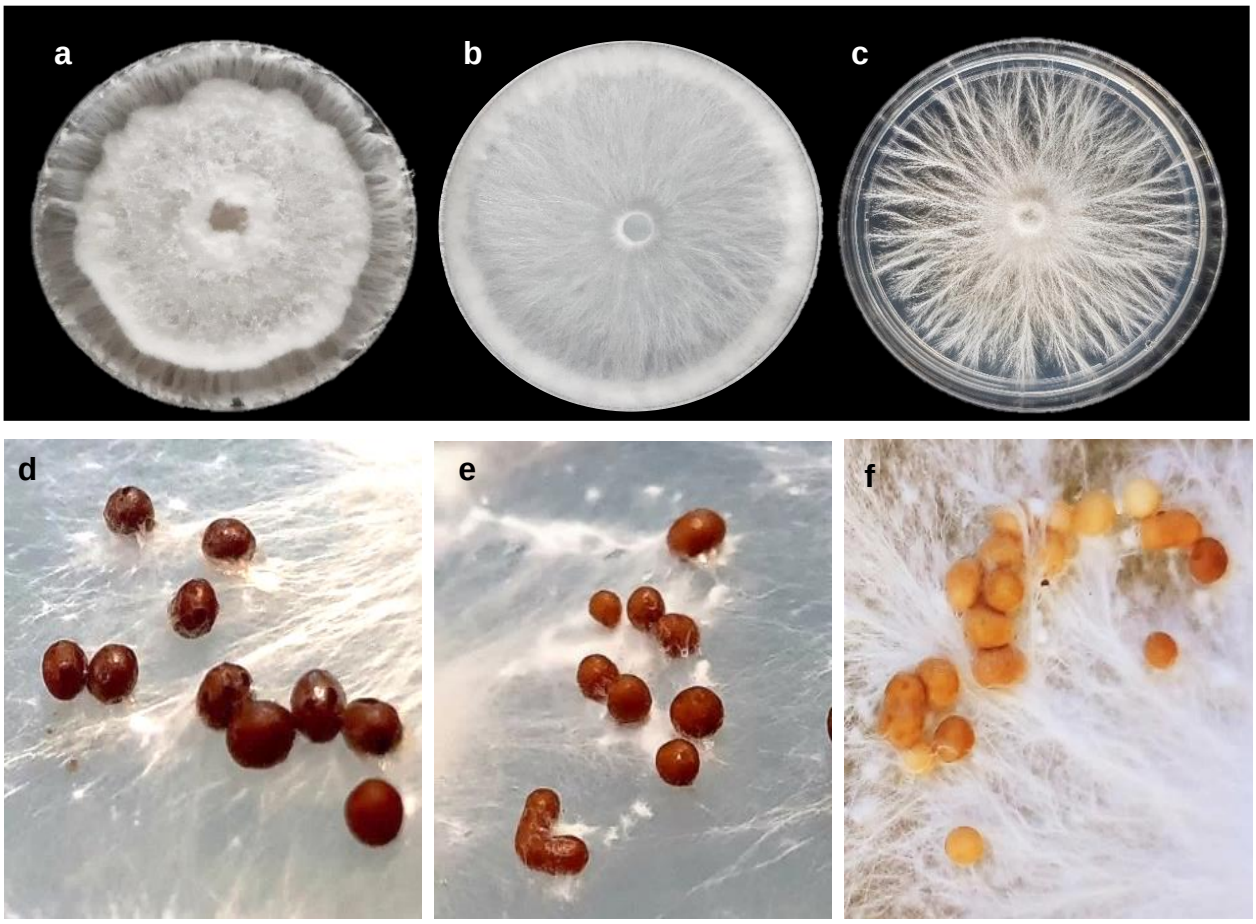

Figura 2. Tipos de crecimiento micelial y coloración de esclerocios de aislados de *Sclerotium rolfsii* en medio de cultivo papa dextrosa agar, incubados a 25 °C. **a**) Crecimiento micelial esponjoso. **b**) Crecimiento micelial compacto. **c**) Crecimiento micelial fibroso. **d**) Esclerocios color marrón oscuro. **e**) Esclerocios color marrón rojizo. **f**) Esclerocios color marrón claro.

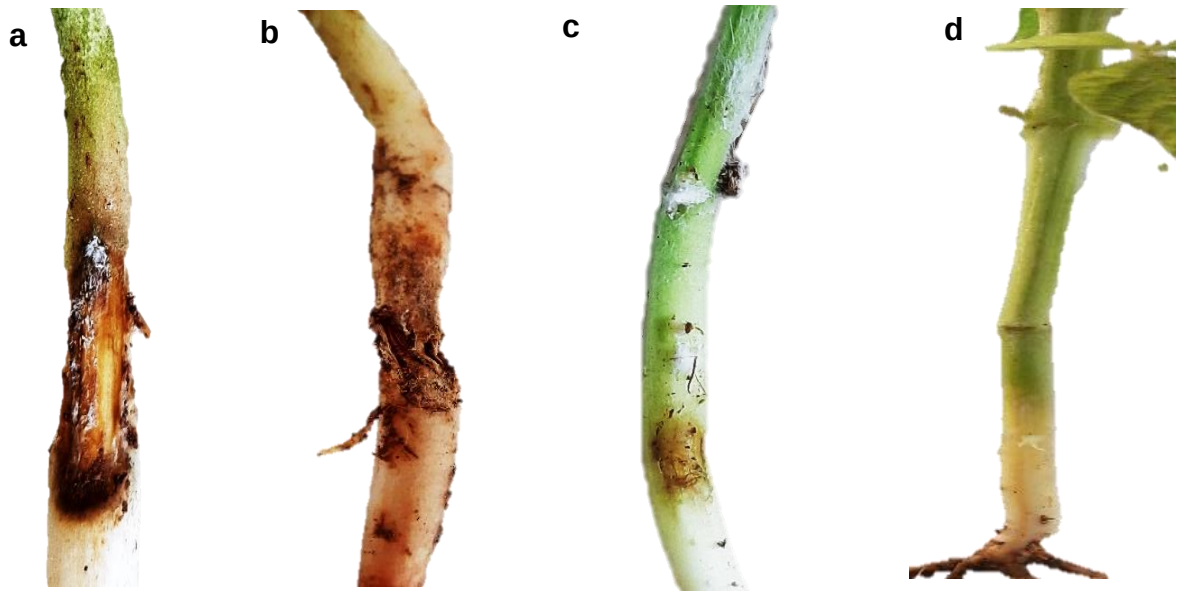

Figura 3. Lesiones desarrolladas cinco días después de la inoculación de los aislados de *Sclerotium rolfsii* en tallos de frijol cv. Azufrado Higuera**. a**) Aislado de virulencia alta. **b**) Aislado de virulencia moderada. **c**) Aislado de virulencia baja. **d**) Tallo sin inoculación.

De los 50 aislados, 26% presentaron virulencia alta, 64% virulencia moderada y el 10% virulencia baja. Por otra parte, los aislados del municipio de Guasave presentaron mayor virulencia (media= 37.28 mm de lesión), en comparación con los aislados de Ahome (media= 30.24 mm) (Figura 4). Todos los hongos se reaislaron a partir de los tejidos de frijol infectados de forma artificial y las colonias fueron de morfología idéntica a las inoculadas originalmente en tallos, cumpliendo así los postulados de Koch. Los resultados de las pruebas de patogenicidad confirmaron que *S. rolfsii* es el agente causal de la pudrición de raíz y tallo del frijol en el norte de Sinaloa, México y que los aislados presentan variación en su grado de virulencia.

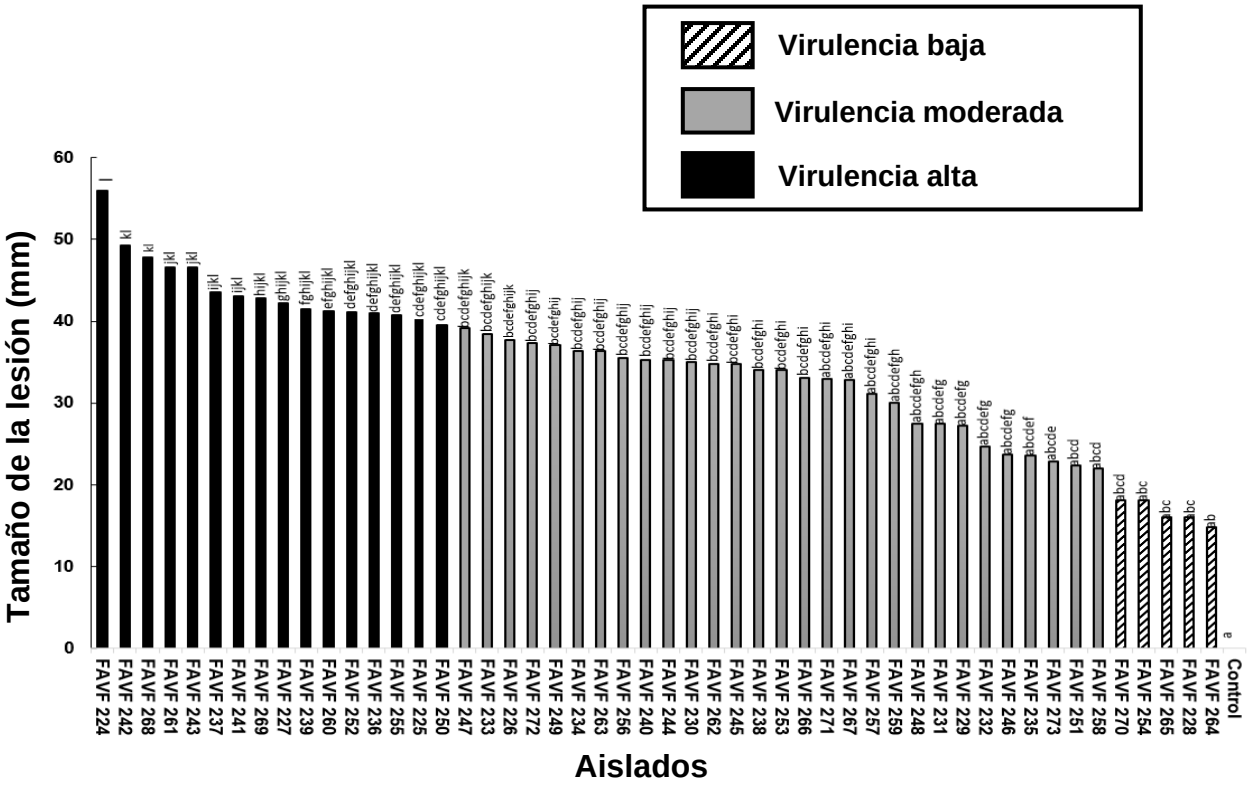

Figura 4. Virulencia de 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* en plantas de frijol cv. Azufrado Higuera infectadas de forma artificial. Para cada barra se muestra la lesión promedio (mm) de 20 plantas inoculadas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), Tukey.

1.3.4. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs)

En el presente estudio se observó una zona de aversión entre aislados incompatibles después de 7 a 10 días de crecimiento, dejando una zona del medio de cultivo sin colonizar (Figura 5a, c) mientras que los límites de las colonias de los aislados compatibles no se pudieron discernir con facilidad durante el mismo período de tiempo (Figura 5b). En las confrontaciones de los controles, no se observó zona de aversión en el área de contacto de las dos colonias, por lo que presentó fusión completa. Los 50 aislados de *S. rolfsii* se asignaron a seis GCVs mediante los emparejamientos miceliales y se determinó la virulencia de cada GCV (Cuadro 3).

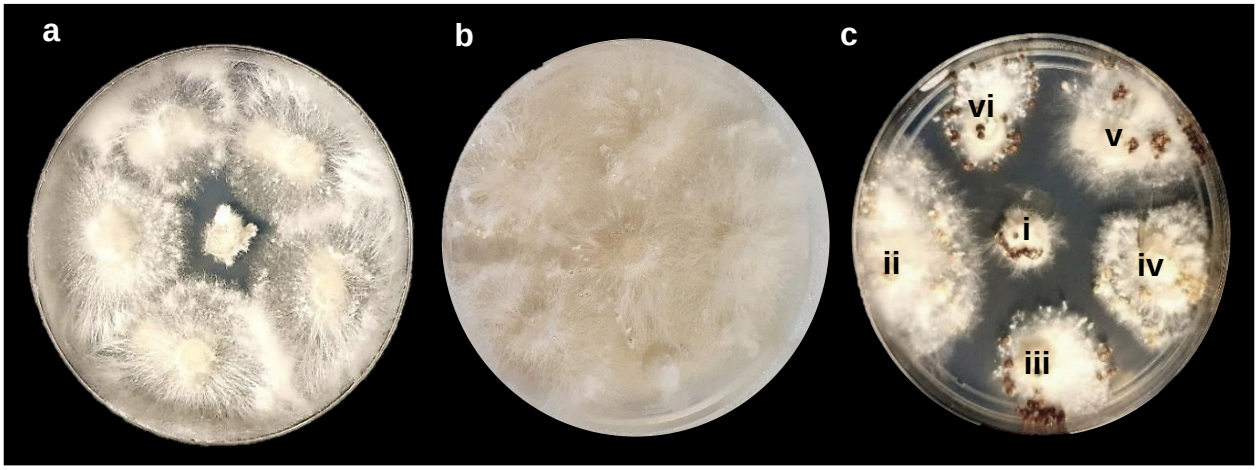

Figura 5. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de tejidos sintomáticos de frijol. **a**) Reacción micelial incompatible. **b**) Reacción micelial compatible. **c**) Reacción micelial incompatible de un aislado representativo de cada uno de los seis GCVs: **i**) GCV I, **ii**) GCV II, **iii**) GCV III, **iv**) GCV IV, **v**) GCV V y **vi**) GCV VI.

Cabe mencionar, que de un mismo campo de frijol se obtuvieron aislados que se agruparon en tres GCVs, lo que confirmó la gran diversidad genética de *S. rolfsii.* En este estudio predominó el GCV VI con un total de 34 aislados provenientes de ambos municipios (Figura 6), lo que indicó que los GCVs no mostraron relación con el área geográfica de origen. Los GCVs I, III y IV pertenecientes al municipio de Ahome, no fueron compatibles con ningún aislado del municipio de Guasave, así mismo el GCV II perteneciente a Guasave, no fue compatible con ningún aislado de los campos de frijol localizados en el municipio de Ahome. Sin embargo, los GCVs V y VI se conformaron por aislados de ambos municipios, por lo que dicha relación no fue clara.

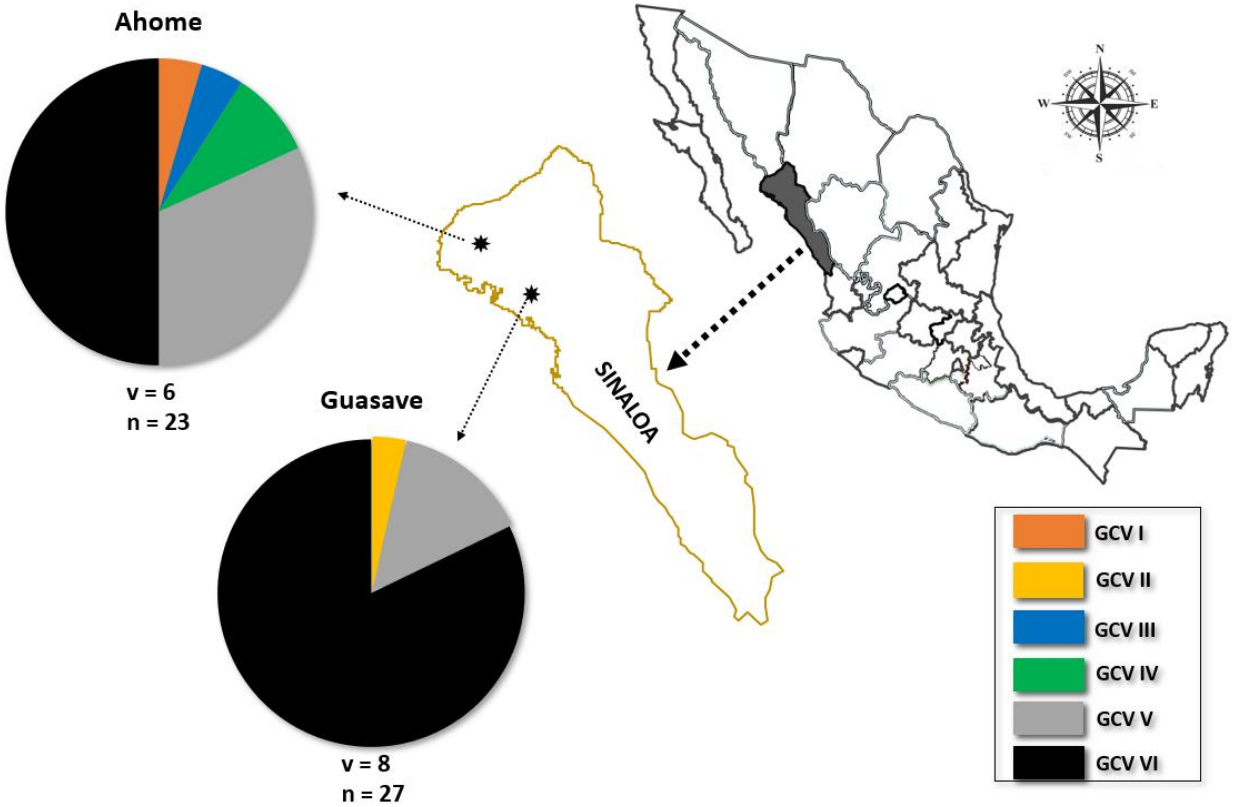

Figura 6. Sitios de recolección de aislados de *Sclerotium rolfsii* asociados a pudrición de raíz y tallo del frijol en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México. Los círculos representan la frecuencia de asociación de cada grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) en cada población muestreada, "***v***" es el número de campos de frijol muestreados en cada población y "***n***" es el número de aislados en cada población.

Por otra parte, los caracteres morfológicos de las colonia y esclerocios no presentaron relación con respecto a los GCVs, debido a que éstos se conformaron por aislados con diferente morfología, tanto en el tipo de crecimiento y color de la colonia, así como color, forma, tamaño y distribución de los esclerocios. Por lo que, en este trabajo, la morfología no presentó relación con la diversidad genética de aislados de *S. rolfsii* mostrada en los seis GCVs. Con respecto a la virulencia se encontró una relación con los GCVs. Los GCVs menos virulentos fueron el IV (media= 15.4 mm), seguido del I (media= 15.9 mm)

y III (media= 18.0 mm), mismos que pertenecen al municipio de Ahome. Los GCVs más virulentos fueron el VI (media= 36.2 mm), seguido del II (media= 35.2 mm) y V (media= 34.13 mm) (Cuadro 3), que en su mayoría se componen de aislados del municipio de Guasave, esto reafirma que la virulencia fue mayor en los aislados de ese municipio.

Cuadro 3. Grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) y virulencia de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos de frijol cv. Azufrado Higuera distribuidos en el norte de Sinaloa.

GCV	N°	Código del aislado	Tamaño de la lesión (mm)*
I	**1**	FAVF228	10.04 **a**
II	**1**	FAVF244	35.26 **b**
III	**1**	FAVF254	14.90 **a**
IV	**2**	FAVF264−FAVF265	8.79 **a**
V	**11**	FAVF255−FAVF257, FAVF266−FAVF273	33.80 **b**
VI	**34**	FAVF224−FAVF227,FAVF229−FAVF243, FAVF245−FAVF253, FAVF258−FAVF263	36.04 **b**

GCV= grupos de compatibilidad vegetativa; **N°**= número de aislados.

*Promedio de la virulencia de los aislados pertenecientes a cada GCV. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), Tukey.

1.4. DISCUSIÓN

Durante el ciclo agrícola 2018-2019 se registró una incidencia de 6.2 a 18.4% de la pudrición de raíz y tallo de frijol causada por *S. rolfsii* en 14 campos distribuidos en los municipios de Guasave y Ahome, con incidencia mayor en el primero. No obstante, se tiene que considerar que el cultivo de frijol también es afectado por otros hongos como

Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium spp., *Rhizoctonia solani, Pythium* spp. y *Macrophomina phaseolina* (Singleton *et al*., 1992; Biddle y Cattlin, 2007), lo cual hace que la incidencia de *S. rolfsii* reportada en el presente estudio sea considerable. En México, las enfermedades producidas por este complejo de hongos del suelo en cultivos de frijol pueden llegar a causar pérdidas en producción hasta de 100% (Hernández-Pérez *et al*., 2018). La importancia de este estudio radica en que el norte de Sinaloa es la principal área productora de frijol en el país (SIAP, 2019) y no existen datos sobre la incidencia de la enfermedad en este cultivo causada por *S. rolfsii.* En Italia se reportó una incidencia de la enfermedad de 30% en campos de frijol (Garibaldi *et al*., 2013) y de 30−35% en la India (Mahadevakumar *et al*., 2015), sin embargo, como ya se mencionó, la incidencia en el norte de Sinaloa fue menor. Es importante mencionar que la incidencia de esta enfermedad puede variar de forma considerable de acuerdo con el cultivar, condiciones de la planta, humedad, temperatura, pH, tipo de suelo, entre otros factores (Browne *et al*., 2002).

Sclerotium rolfsii es un hongo importante del suelo que por lo general expresa distintos rasgos morfológicos en la colonia y esclerocios, esta variabilidad se ha asociado a su extensa gama de hospedantes y condiciones climáticas en las cuales puede proliferar, de forma principal en regiones tropicales y subtropicales del mundo, además de la gran variabilidad genética de sus poblaciones (Xie *et al*., 2014; Mahadevakumar *et al*., 2016). En este estudio, el coeficiente de crecimiento micelial de las colonias en medio PDA fue similar a los rangos reportados por Karthik *et al*. (2017) y Manu *et al*. (2018) con rangos de 18.3−46.7 mm a 27 °C. Sin embargo, Azhar *et al*. (2003) mencionaron que cuando *S. rolfsii* es cultivado en otros medios de cultivos artificiales como avena agar, extracto de levadura de malta agar y levadura dextrosa agar, el coeficiente de crecimiento puede

variar de manera significativa. Asimismo, Ayed *et al*. (2018) informaron que la variación del crecimiento micelial también puede variar de acuerdo con las temperaturas de incubación. Por su parte, Lin *et al*. (2009) encontraron que *S. rolfsii* presenta el máximo crecimiento micelial a temperaturas de 25−30 °C en medio PDA. Por otra parte, las tonalidades de las colonias coincidieron con lo descrito por Sab *et al*. (2014) y Manu *et al*. (2018), quienes reportaron tonos blanco puro, blanco mate, blanco sucio y blanco rosado, sin embargo, ésta última no se observó en los aislados del norte de Sinaloa, México.

Las texturas miceliales de las colonias de *S. rolfsii* fueron esponjosas, compactas y fibrosas, concordando con lo reportado por Sarma *et al*. (2002) y Manu *et al*. (2018), mientras que Ayed *et al*. (2018), solo registraron las dos primeras texturas. En los mismos trabajos de estos autores se menciona que *S. rolfsii* puede formar un círculo concéntrico en el centro de la colonia, mismo que se formó en el 36% de los aislados de Ahome y Guasave.

La caracterización morfológica exhibió esclerocios color marrón claro, marrón rojizo y marrón oscuro, esto coincidió con lo reportado por González *et al*. (2008), Karthik *et al*. (2017) y Venkata *et al*. (2018), aunque no se observaron esclerocios negros como en el estudio de Sarma *et al*. (2002). Entretanto, el tamaño de los esclerocios fue similar a lo registrado por Kokub *et al*. (2007) y Songvilay *et al*. (2012). Con respecto al número de esclerocios producidos en este estudio, el rango osciló entre 90−733 por placa Petri a 25 °C, lo cual fue similar a lo indicado por Ayed *et al*. (2018) pero menor, comparado a lo reportado por Manu *et al*. (2018), quienes registraron de 274−1048 esclerocios por placa Petri a 27 °C. De manera similar, Punja y Damiani (1996) demostraron que *S. rolfsii* produce la mayor cantidad de esclerocios en placas Petri en medio PDA a 35 °C.

La patogenicidad de todos los aislados de *S. rolfsii* se comprobó al observar lesiones en todas las plantas de frijol infectadas de forma artificial. Además, 15 días después de la inoculación se observó muerte de las plantas, tal como se verificó en otros trabajos, en cultivos de frijol, llevados a cabo en Italia (Garibaldi *et al*., 2013) y la India (Mahadevakumar *et al*., 2015). Este hongo fitopatógeno infecta a más de 500 especies de plantas de diferentes familias, donde destacan las leguminosas, solanáceas y cucurbitáceas a nivel mundial (Billah *et al*., 2017). En el presente estudio se demostró que existe diferencia en la virulencia de los aislados de *S. rolfsii* recolectados en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México. Trabajos previos han estudiado la variabilidad patogénica de aislados de *S. rolfsii* en hospedantes susceptibles, donde se evidenció un elevado grado de variación (Adandonon *et al*., 2005; Flores-Moctezuma *et al*., 2006). Esta variación en la virulencia se ha correlacionado con la síntesis de ácido oxálico y producción de enzimas pectinolíticas de *S. rolfsii* (Shukla y Pandey, 2006). De manera similar, otros estudios determinaron que la virulencia de aislados de *S. rolfsii* varió entre distintas localidades de la India en plantas de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) (Shukla y Pandey, 2007); lo mismo ocurrió en EE. UU. en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Xie *et al*., 2014) y Turquía en césped (*Cynodon dactylon* L.) (Ünal *et al*., 2019).

Los 50 aislados de *S. rolfsii* obtenidos a partir de plantas sintomáticas de frijol en el norte de Sinaloa, México, se asignaron a seis GCVs, lo que mostró una amplia diversidad genética. La variabilidad genética entre los aislados de *S. rolfsii* se ha estudiado con la finalidad de obtener una mejor comprensión de la estructura de sus poblaciones en condiciones naturales, ya que es un patógeno con origen en el suelo muy importante en distintos hospedantes de valor económico, además, este conocimiento puede ofrecer información útil sobre la distribución y dispersión del hongo, así como contribuir a la

mejora en el diseño de estrategias de manejo integrado en las enfermedades que ocasiona (Leslie, 1993; Remesal *et al*., 2012).

Los GCVs se han utilizado para obtener una idea de la relación genética o para identificar la variación intraespecífica dentro de una población, ya que los aislados que pertenecen a un mismo GCV pueden ser clónales (Kohn *et al*., 1991) o bien exhibir una mayor similitud en su estructura genética con respecto a los aislados que pertenecen a otros GCVs (Okabe y Matsumoto, 2000). En Brasil, se identificaron 13 GCVs en 23 aislados de *S. rolfsii* recolectados de diferentes hospedantes y localidades, además, no se encontró relación entre los GCVs y la localidad u hospedantes (Almeida *et al*., 2001). Otro estudio similar, registró la variabilidad de 26 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de varios hospedantes, muestras de suelo y localidades en la India, reportando 13 GCVs con alta diversidad genética (Sarma *et al*., 2002). Así mismo, en Sudáfrica a partir de 66 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de frijol, se obtuvieron cuatro GCV (Adandonon *et al*., 2005). Por otra parte, en Turquía con 32 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de césped, no se encontró diversidad genética mediante la ocurrencia de GCV, por lo que reportaron un solo GCV (Ünal *et al*., 2019).

En el presente estudio, de un mismo campo de frijol se obtuvieron tres GCVs, este resultado concuerda con los estudios realizados por Nalim *et al*. (1995) en EE. UU. en cultivos de cacahuate, en donde, informaron una amplia variación genética entre los aislados dentro de un campo agrícola, encontrándose cinco GCVs. De manera similar, Okabe y Matsumoto (2000) reportaron tres GCVs en un campo agrícola de cacahuate en Japón. Por otra parte, en nuestro estudio predominó el GCV VI con un total de 34 aislados provenientes de ambos municipios (Guasave y Ahome) de Sinaloa, lo que sugiere que los GCVs no tienen relación con el área geográfica de origen, tal como lo mencionaron

Almeida *et al*. (2001) y Mahadevakumar *et al*. (2015). Sin embargo, los GCVs I, III y IV pertenecientes al municipio de Ahome no fueron compatibles con ningún aislado del municipio de Guasave, esto coincide, con otros estudios donde se determinó incompatibilidad de distintos GCVs de aislados de *S*. *rolfsii* originarios de dos ubicaciones distintas en Sudáfrica en cultivos de cacahuate (Cilliers *et al*., 2000) y España en cultivos de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Remesal *et al*., 2012).

Los caracteres morfológicos de las colonia y esclerocios de *S. rolfsii* de frijol en el norte de Sinaloa, no presentaron relación con respecto a los GCVs, por lo que la morfología no fue suficiente para evaluar la diversidad genética de aislados de *S. rolfsii*, mediante la ocurrencia de GCVs. Lo anterior concuerda con lo publicado por Okabe y Matsumoto (2000), Sarma *et al*. (2002), quienes mencionaron que los caracteres morfológicos han sido los más estudiados, sin embargo, ninguno de éstos se ha reconocido como un método indirecto para establecer las diferencias genéticas entre aislados de *S. rolfsii.* Por otra parte, sí se observó relación entre la virulencia de los aislados, los GCVs y su origen, dado que los GCVs IV, I y III presentaron a los aislados menos virulentos, de forma respectiva, mismos que pertenecen al municipio de Ahome. Mientras tanto, los GCVs VI, II y V fueron los más virulentos, en este orden y en su mayoría se componen de aislados de Guasave. Esta variación de los GCVs con relación a la virulencia coincide con lo reportado por Remesal *et al*. (2012), quienes encontraron diversidad patogénica entre y dentro de 12 GCVs de aislados de *S. rolfsii* obtenidos de cultivos de remolacha azucarera en España, Italia, Portugal y Chile, así mismo, clasificaron a los GCVs como de virulencia baja, moderada y alta. También, indicaron que la determinación de la variabilidad de la virulencia de aislados de *S. rolfsii* es importante para el manejo de las enfermedades en cultivos que pueden verse afectados.

1.5. CONCLUSIONES

La caracterización morfológica y cultural indicó que los 50 aislados fúngicos obtenidos de raíz y tallo del frijol con síntomas de pudrición en campos del norte de Sinaloa pertenecen a *S. rolfsii* y se encontró diferencia significativa en la virulencia de los aislados.

Las pruebas de compatibilidad vegetativa agruparon a los 50 aislados de *S. rolfsii* en seis GCVs, esto indica una alta variabilidad genética del patógeno en la región agrícola del norte de Sinaloa, México, sin embargo, los caracteres morfológicos de la colonia y esclerocios no tuvieron relación con respecto a los GCVs, aunque si hubo relación entre la virulencia de los aislados y los GCVs.

1.6. REFERENCIAS

Adandonon, A., Aveling, T. A., Merwe, N. A., and Sanders, G. 2005. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. Australasian Plant Pathology 34: 19−25. doi: 10.1071/AP04071

Al-Askar, A. A., Rashad, Y. M., and Absulkhair, W, M. 2013. Antagonistic activity on an endemic isolate of *Streptomyces tendae* RDS 16 against phytopathogenic fungi. Journal Mycobiology 7: 509−516. doi: 10.5897/AJMR12.1792

Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessnman, D., and Yorinori, J. T. 2001. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. Journal of Phytopathology 149: 493−502. doi: 10.1046/j.1439-0434.2001.00651.x

Ayed, F., Jabnoun K. H., Aydi, B., Abdallah, R., and Daami, R. M. 2018. Effect of temperatures and culture media on *Sclerotium rolfsii* mycelial growth, sclerotial formation and germination. Journal of Plant Pathology and Microbiology 9: 446−446. doi: 10.4172/2157-7471.1000446.

Azhar, H. S., Muhammad, I. N., and Abdul, M. H. 2003. Physiological study of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Plant Pathology 2: 102−106. doi: 10.3923/ppj.2003.102.106

Biddle, A. J., and Cattlin, N. D. 2007. Pests, Diseases, and Disorders of Peas and Beans. Washington, USA: Manson Publishing.

Billah, K. M., Hossain, M., Prince, M., Masud, M., and Sumon, P. 2017. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different host, and its over wintering survival. International Journal of Advances in Agriculture Sciences 2: 1−6. Retrieved from https://pdfs.semanticscholar.org/3d02/72363147ec34032ed6d72e15f651a43a1900.pdf

Browne, G. T., De-Tar, W. R., Sanden, B. I., and Phene, C. J. 2002. Comparison of drip and sprinkler irrigation systems for applying metam sodium and managing stem rot on potato. Plant Disease 86: 1211−1218. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.11.1211

Cilliers, A. J., Herselman, L., and Pretorius, Z. A. 2000. Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in south Africa. Phytopathology 90: 1026–1031. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.9.1026

Cilliers, A. J., Pretorius, Z. A., and van Wyk, P. S. 2003. Integrated control of *Sclerotium rolfsii* on groundnut in south Africa. Journal of Phytopathology 151: 249−258. doi: 10.1046/j.1439-0434.2003.00715.x

Di-Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2017. The world and national bean market. Retrieved from http://www.fao.org/faostat/es/#home

Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A., and Nava-Juárez, R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from México, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. Crop Protection 25: 195−201. doi: 10.1016/j.cropro.2005.04.007

Garibaldi, A., Gilardi, G., Ortu, G., Gullino, M. L., and Testa, M. 2013. First report of southern blight caused by *Sclerotium rolfsii* on common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Italy. Plan Disease 97: 1386−1386. doi: 10.1094/PDIS-12-12-1165-PDN

González, A., Labrin, N. B., y Venancio, A. J. 2008. Primer informe de *Sclerotium rolfsii* agente causal de pudrición del tallo y mazorca del maíz en Portuguesa Venezuela. Fitopatología Venezolana 21: 23−26. Retrieved from file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/sclerotium%20(1).pdf

Hernández-Pérez, D., Díaz-Castellanos, M., Quiñones-Ramos, R., Santos-Bermúdez, R., Portal-González, N., y Herrera-Isla, L. 2018. Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales. Centro Agrícola 45: 55−60. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852018000200008

Karthik, P. V., Gopalakrishnan C., and Janahiraman, V. 2017. Cultural and morphological variability in *Sclerotium rolfsii* causing stem rot. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6: 3090−3097. doi: 10.20546/ijcmas.2017.606.366

Kohn, L. M., Stavoski, E., Carbone, I., Royer, J., and Anderson, J. B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum.* Phytopathology 81: 480–485. doi:10.1094/Phyto-81-480

Kokub, D., Azam, F., Hassan, A., Ansar, M., Asad, M., and Khanum, A. 2007. Comparative growth, morphological and molecular characterization of indigenous *Sclerotium rolfsii* strains isolated from different locations of Pakistan. Pakistan Journal of Botany 39: 1849−1866. Retrieved from file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/DarakhshandaKokab-PJB.pdf

Kwon, J. H., Kang, D. W., Choi, O., and Kim, J. 2016. The occurrence of Sclerotium rot on *Momordica charantia* caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea. Archives of Phytopathology and Plant Protection 49: 43−47. doi: 10.1080/03235408.2016.1152067

Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127−150. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.001015

Lin, M. A., Yin, F., Zeng, W., and Huang, Y. 2009. Biological characteristics of *Sclerotium rolfsii* Sacc. in *Coptis chinensis* and screening on its controlling fungicides. Journal of Anhui Agricultural Sciences 34: 240−245. Retrieved from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-AHNY200934073.htm

Mahadevakumar, S., Tejaswini, G. S., Janardhana, G. R. and Vandana, Y. 2015. First report of *Sclerotium rolfsii* causing southern blight and leaf spot on common bean (*Phaseolus vulgaris*) in India. Plant Disease 99: 1280−1280. doi: 10.1094/PDIS-01-15-0125-PDN

Mahadevakumar, S., Yadav, V., Tejaswini, G. S., and Janardhana, G. R. 2016. Morphological and molecular characterization of *Sclerotium rolfsii* associated with

fruit rot of *Cucurbita maxima*. European Journal of Plant Pathology 145: 215–219. Retrieved from https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5182101

Mahadevakumar, S., Chandana, C., Deepika, Y. S., Sumashri, K. S., Yadav, V., and Janardhana, G. R. 2018. Pathological studies on the southern blight of China aster (*Callistephus chinensis*) caused by *Sclerotium rolfsii*. European Journal of Plant Pathology 115: 1081–1087. doi: 10.1007/s10658-017-1415-2

Manu, T. G., Nagaraja, A., and Manjunatha, S. V. 2018. Morphological and cultural variability among the *Sclerotium rolfsii* isolates. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7: 904−907. doi: 10.20546/ijcmas.2018.706.119

Nalim, F. A., Starr, J. L., Woodard, K. E., Segner, S., and Keller, N. P. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 85: 1507–1512. doi: 10.1094/Phyto-85-1507

Naseri, B., and Mousavi, S. S. 2015. Root rot pathogens in field soil, roots and seeds in relation to common bean (*Phaseolus vulgaris*), disease and seed production. International Journal of Pest Management 61: 60–67. doi:10.1080/09670874.2014.993001

Okabe, I., and Matsumoto, N. 2000. Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. Mycoscience 41: 145–148. doi: 10.1007/BF02464323

Punja, Z. K., and Damiani, A. 1996. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. Mycologia 88: 694–706. doi: 10.2307 / 3760963

Punja, Z. K., and Sun, L. J. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S. delphinii*. Mycological Research 105: 537–546. doi:10.1017/s0953756201004002

Remesal, E., Ramirez, R., Diaz, R., and Cortes, J. 2012. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean type climate regions. Plant Pathology 61: 739–753. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02552.x

Sab, J., Nagaraja, A., Harsur, M., and Manu, T. G. 2014. Variability among the *Sclerotium rolfsii* Sacc. isolates from southern Karnataka. International Journal on Agricultural Sciences 5: 229−236. Retrieved from file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Variabilityamong_finalpaper_7.7.14%20(1).pdf

Sarma, B. K., Singh, U. P., and Singh, K. P. 2002. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii.* Mycologia 94: 1051−1058. doi: 10.2307/3761870

Shukla, R., and Pandey, A. K. 2006. Maximization of production of oxalic acid from Sclerotium rolfsii, a mycoherbicidal agent against *Parthenium hysterophorus* L. Annals of Plant Protection Sciences 14: 202−205. Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063109320

Shukla, R., and Pandey, A. K. 2007. Diversity in mycoherbicide agent *Sclerotium rolfsii* isolates from central India. Journal of Mycology and Plant Pathology 37: 514−518. Retrieved from file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/135500-Article%20Text-363257-1-10-20160512%20(4).pdf

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Producción mensual agrícola. Retrieved from https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119

Singleton, L. L., Mihail, J. D., and Rush, C. M. (eds.). 1992. Methods for research on soil-borne phytopathogenic fungi. APS Press. St Paul, Minnesota, USA. 264pp. Retrieved from https://my.apsnet.org/ItemDetail?iProductCode=41272&WebsiteKey=2661527a-8d44-496c-a730-8cfeb6239be7

Songvilay, P., Groenewald, J. Z., Vongphachanh, P., Sayapattha, S., Chittarath, K., Crous, P. W., and Burgess, L. W. 2012. First report of *Sclerotium rolfsii* in the Lao PDR. Australasian Plant Disease Notes 8: 13–15. doi: 10.1007/s13314-012-0085-3

Tarafdar, A., Rani, T. S., Chandran, U. S., Ghosh, R., Chobe, D. R., and Sharma, M. 2018. Exploring combined effect of abiotic (soil moisture) and biotic (*Sclerotium rolfsii*

Sacc.) stress on collar rot development in chickpea. Frontiers in Plant Science 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01154

Ünal, F., Aşkın, A., Koca, E. Mesut, Y., and Ümit, M. B. 2019. Mycelial compatibility groups, pathogenic diversity and biological control of *Sclerotium rolfsii* on turfgrass. Egyptian Journal of Biological Pest Control 29: 44. doi: 10.1186/s41938-019-0144-6

Venkata, S. P., Mohammad, L. A., Ramana, J., and Ahmmed, S. 2018. Characterization of *Sclerotium rolfsii* Sacc. causing collar rot in chickpea isolates using cultural and morphological traits. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7: 3912−3922. doi: 10.18805 / LR-4199

Xie, C., Huang, C. H., and Vallad, G. E. 2014. Mycelial compatibility and pathogenic diversity among *Sclerotium rolfsii* isolates in the southern United States. Plant Disease 98: 1685–1694. doi: 10.1094/PDIS-08-13-0861-RE

Zeravakis, G., Philippoissis, A., Loannidou, S., and Diamantopoulou, P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* 46: 231−234. doi: 10.1007/BF02818539

CAPÍTULO II

SENSIBILIDAD DE AISLADOS DE *Sclerotium rolfsii* OBTENIDOS DE FRIJOL EN EL NORTE DE SINALOA A LOS FUNGICIDAS TEBUCONAZOL Y METIL−TIOFANATO

RESUMEN

La pudrición de raíz y tallo del frijol por *Sclerotium rolfsii*, es una de las enfermedades más importantes de esta leguminosa a nivel mundial y su principal control es con fungicidas con modo de acción especifico, de las clases metil-benzimidazol-carbamatos (MBC) e inhibidores de la demetilación (DMI). En este estudio se determinó la sensibilidad de 50 aislados de *S. rolfsii* a metil-tiofanato y tebuconazol obtenidos de 14 campos comerciales de frijol en el norte de Sinaloa. Los aislados se evaluaron *in vitro* para determinar la concentración efectiva que inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}), para cada combinación de aislado-fungicida. Para tebuconazol, los aislados de *S. rolfsii* presentaron valores de CE_{50}= 0.0299−0.5165 µg mL^{-1} (media= 0.1932 µg mL^{-1}) y para metil-tiofanato fueron de CE_{50}= 152−7,666 µg mL^{-1} (media= 2,291 µg mL^{-1}). Los aislados de *S. rolfsii* del municipio de Ahome fueron más sensibles comparados con los del municipio de Guasave. Para tebuconazol, los valores de CE_{50} fluctuaron de 0.0299–0.3056 µg mL^{-1} y de 0.0995–0.5165 µg mL^{-1} para aislados de Ahome y Guasave, en este orden. Para metil-tiofanato, los valores de CE_{50} exhibieron rangos de 152–5,933 y 743–7,666 µg mL^{-1} para aislados de Ahome y Guasave, respectivamente. La disminución de esclerocios fue significativa cuando la concentración de cada fungicida aumentó. Los aislados menos sensibles a tebuconazol, presentaron costos de adaptabilidad con respecto al crecimiento micelial y número de esclerocios producidos. Estos datos establecen una línea base de sensibilidad a los fungicidas, lo cual permitirá monitorear variación posterior en la sensibilidad de poblaciones de *S. rolfsii* de frijol a metil-tiofanato y tebuconazol.

Palabras clave: *Athelia rolfsii*, *Phaseolus vulgaris*, control químico, resistencia a fungicidas, inhibidores de la demetilación.

CHAPTER II

SENSIBILITY OF *sclerotium rolfsii* ISOLATES OBTAINED FROM BEAN CROPS IN NORTHERN SINALOA, MEXICO TO FUNGICIDES TEBUCONAZOLE AND METHYL-THIOPHANATE

ABSTRACT

The root and stem rot of bean plants caused by *Sclerotium rolfsii* is one of the most important diseases in legumes worldwide and the main control method is the use of specific action fungicides of the methyl-benzimidazole-carbamates (MBC) and demethylation inhibitor (DMI) classes. In this study the sensibility to methyl-thiophanate and tebuconazole was tested for 50 *S. rolfsii* isolates obtained from commercial bean crops in the north of Sinaloa, México. The isolates were tested *in vitro* to determine the effective concentration to inhibit the 50% of the mycelial growth (CE_{50}), for each isolate-fungicide combination. For tebuconazole, *S. rolfsii* isolates showed values of CE_{50}= 0.0299−0.5165 µg mL^{-1} (mean= 0.1932 µg mL^{-1}) and CE_{50}= 152−7,666 µg mL^{-1} (mean= 2,291 µg mL^{-1}) for methyl-thiophanate. Isolates from Ahome municipality were the most sensitive compared to the ones obtained from Guasave municipality. For tebuconazole, values of CE_{50} fluctuated from 0.0299–0.3056 µg mL^{-1} and 0.0995–0.5165 µg mL^{-1} in isolates from Ahome and Guasave respectively. In the case of methyl-thiophanate the values of CE_{50} were between 152–5,933 and 743–7,666 µg mL^{-1} in isolates from Ahome and Guasave respectively. The decrease of sclerotia was significative when the fungicide concentration increased. The isolates less sensitives to tebuconazole, showed costs of adaptability respect to the mycelial growth and the numbers of sclerotia produced. This data stablishes a base line of sensibility to fungicides, which allows to follow the next variation in sensibility of *S. rolfsii* populations in bean plants to methyl-thiophanate and tebuconazole.

Key words: *Athelia rolfsii*, *Phaseolus vulgaris*, chemical control, fungicide resistance, demetilation inhibitors.

2.1. INTRODUCCIÓN

La pudrición de raíz y tallo causada por *Sclerotium rolfsii* (=*Athelia rolfsii*) es una de las enfermedades más importantes del frijol a nivel mundial (Marcenaro y Valkonen, 2016) y puede llegar a causar una mortalidad de 70 a 95% de plantas en condiciones ambientales favorables (Tarafdar *et al*., 2018). Esta enfermedad se manifiesta con síntomas de amarillamiento y marchitez como resultado de la pudrición que se presenta en raíz y tallo, lo que conduce a pérdidas en el rendimiento (Kwon *et al*., 2016; Sharma y Ghosh, 2017). Este hongo sobrevive como esclerocios en residuos de tejidos vegetales y en el suelo (Naseri y Mousavi, 2008), lo que dificulta su manejo, aunado a su alta variabilidad genética entre sus poblaciones, amplia distribución en suelos agrícolas y un amplio rango de especies hospedantes (Adandonon *et al*., 2005; Sennoi *et al*., 2013). Entre las estrategias básicas para el manejo de la enfermedad causada por *S. rolfsii* en condiciones de campo, se encuentra la aplicación de fungicidas con actividad especifica pertenecientes a la clase metil-benzimidazol-carbamatos (MBC) e inhibidores de la demetilación (DMI) (Besler *et al*., 1996; Bowen *et al*., 1997; Cilliers *et al*., 2003; Hawkins y Fraaije, 2018). La sensibilidad a fungicidas es una característica importante que se puede utilizar para comprender mejor las poblaciones de hongos expuestas a las presiones de selección (Milgroom, 1996; Franke *et al*., 1998; Brent y Hollomon, 2007).

Los fungicidas pertenecientes a la clase MBCs están representados en lo principal por benomil, carbendazim, thiabendazol y metil-tiofanato (FRAC, 2012). El modo de acción de estos fungicidas consiste en inhibir el proceso de mitosis y división celular, inhabilitando la producción de microtúbulos, mediante su unión a las subunidades heterodiméricas de la molécula tubulina (Peres *et al*., 2004). Esta clase de fungicidas MBCs, representan un riesgo alto de inducir resistencia en los patógenos, esto se asocia

a cambios en la secuencia de aminoácidos ocasionados por mutaciones en los codones 6, 50, 167, 198, 200 y 240 del gen β−tubulina (Ma y Michailides, 2005). Existen diversos reportes de hongos fitopatógenos que han mostrado poca sensibilidad a fungicidas MBCs. Para el caso particular de aislados de *S. rolfsii*, el control de la enfermedad ha sido irregular en algunos campos comerciales, en donde de forma frecuente se aplicaron fungicidas MBCs, esto debido a la expresión de resistencia, como se reportó en la India (Rangarani *et al*., 2017; Shankar y Ratnoo, 2018), Pakistán (Yaqub y Shahzad, 2015; Kanwal *et al*., 2012), Egipto (Karima *et al*., 2012) y México (Pérez-Moreno *et al*., 2008; Díaz-Nájera *et al*., 2018).

Por otra parte, dentro de los fungicidas pertenecientes a la clase DMIs, se encuentran los triazoles, este grupo es el más importante y numeroso (FRAC, 2012). El tebuconazol es un fungicida DMI−triazol, presenta un sitio especifico de acción con actividad erradicante, preventiva y curativa. El modo de acción se basa en inhibir la síntesis de ergosterol y la demetilación de los precursores de esteroles, sustancias básicas para la función de la membrana celular de los hongos (Mellado *et al*., 2001; Ahemad y Khan, 2010; Dutta *et al*., 2014). Los fungicidas DMIs previenen el crecimiento de hongos, debido a que se requieren esteroles para formar las membranas celulares (Fernández-Ortuño *et al*., 2008; Mueller *et al*., 2013). El tebuconazol está registrado para el control de *S. rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, entre otros hongos (Branch y Brenneman, 1996; Yang y Clausen, 2005). Los tratamientos con fungicidas son un componente clave en el manejo integrado de enfermedades de plantas, sin embargo, la aparición de resistencia por parte de hongos fitopatógenos es un factor importante que limita la eficacia y la vida útil de los fungicidas (Ma y Michailides, 2005). El monitoreo de la sensibilidad usando aislados de campo ayuda a determinar qué proceso de selección está ocurriendo y la probabilidad de una

pérdida rápida del control de la enfermedad (Skylakakis, 1985; Brent y Hollomon, 2007). Los hongos heterocariontes como *S. rolfsii* que albergan núcleos resistentes y sensibles a los fungicidas pueden crecer en presencia o ausencia de éstos, y se pueden adaptar a las fluctuaciones de la exposición a fungicidas como resultado de cambios en las proporciones y distribución de núcleos sensibles o resistentes dentro de las células (Santomauro *et al*., 2000). El dominio o la recesividad se pueden probar al inducir anastomosis hifal entre un aislado que porta el alelo de tipo silvestre y otro con el alelo mutante de un gen de resistencia para formar micelio heterocariótico (Birky, 2001; Ziogas *et al.,* 2002). Las mutaciones que confieren resistencia pueden resultar en penalizaciones de aptitud física, lo que resulta en una compensación evolutiva. Cualquier mutación que confiera resistencia a los fungicidas también puede interrumpir o disminuir la eficiencia de importantes procesos fisiológicos y bioquímicos (Anderson, 2005; Hawkins y Fraaije, 2018). La resistencia a fungicidas puede ser conferida por una sola mutación (Torriani *et al*., 2009), o bien, acumular varias mutaciones en el mismo gen o en diferentes genes para obtener una resistencia considerable (Zhan *et al*., 2006; Cools, 2008).

En el norte del estado de Sinaloa, es necesario conocer la sensibilidad de aislados de *S. rolfsii* asociados a la pudrición de raíz y tallo del frijol, para definir estrategias de aplicación de fungicidas en el manejo de la enfermedad, debido a que, en los últimos años, este patógeno es uno de los factores principales que limitan la producción de frijol en México. El objetivo de este estudio fue determinar la distribución de la sensibilidad a metil-tiofanato y tebuconazol de aislados de *S. rolfsii* obtenidos de 14 campos comerciales de frijol distribuidos en el norte de Sinaloa, México.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Origen y colección de aislados de *Sclerotium rolfsii*

Los 50 aislados de *S. rolfsii* usados en este estudio se caracterizaron de forma previa, mediante morfología, pruebas de patogenicidad y grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs), como causantes de la pudrición de raíz y tallo del frijol en el norte de Sinaloa, México. Estos aislados se obtuvieron a partir de tejidos sintomáticos de plantas de frijol de 14 campos comerciales distribuidos en los municipios de Guasave y Ahome (Cuadro 1), municipios con la mayor producción de frijol en el país.

Los 50 aislados se obtuvieron a partir de muestras de campo con historial de aplicación de fungicidas MBCs y DMIs. Los aislados se preservaron como discos miceliales en glicerol a 20% a temperaturas de -20 °C y en aceite mineral a temperatura ambiente de laboratorio en tubos de ensayo con crecimiento micelial activo para largo almacenamiento. Para preservación a corto tiempo, se almacenaron en agua destilada estéril a 4 °C. Subcultivos frescos se obtuvieron mediante transferencia de discos miceliales a placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Difco®, EE. UU.).

2.2.2. Fungicidas

En el presente estudio se utilizaron formulaciones comerciales de tebuconazol (Folicur®, Bayer Cropscience) y metil-tiofanato (Cercobin®, BASF). Las concentraciones evaluadas de los fungicidas se basaron en el ingrediente activo.

Cuadro 1. Sitios de recolección de raíces y tallos de frijol cv. Azufrado Higuera con síntomas de pudrición para la obtención de aislados de *Sclerotium rolfsii*, en el norte de Sinaloa, México.

Código de aislado	Municipio	Fecha de colecta	No. de campo	Coordenadas
FAVF224−FAVF227	Guasave	Noviembre, 2018	1	25°43'30.8” N 108°49'35.8” W
FAVF228, FAVF253−AVF254	Ahome	Diciembre, 2018	2	25°50'57.7” N 108°59'08.5” W
FAVF229−FAVF232	Guasave	Diciembre, 2018	3	25°42'21.5” N 108°50'20.7” W
FAVF233−FAVF235	Guasave	Diciembre, 2018	4	25°44'15.2” N 108°46'19.8” W
FAVF236−FAVF240	Guasave	Diciembre, 2018	5	25°42'54.6” N 108°48'22.3” W
FAVF241−FAVF244	Guasave	Diciembre, 2018	6	25°41'18.3” N 108°48'14.5” W
FAVF245−FAVF252	Ahome	Diciembre, 2018	7	25°49'14.4” N 108°57'20.6” W
FAVF255−FAVF259	Ahome	Enero, 2019	8	25°50'30.9” N 108°56'26.9” W
FAVF260−FAVF263	Guasave	Enero, 2019	9	25°45'22.7” N 108°47'40.4” W
FAVF264−FAVF265	Ahome	Enero, 2019	10	25°46'55.1” N 108°52'19.2” W
FAVF266	Guasave	Enero, 2019	11	25°43'23.5” N 108°46'53.3” W
FAVF267−FAVF269	Ahome	Enero, 2019	12	25°51'11.1” N 109°00'26.4” W
FAVF270	Ahome	Enero, 2019	13	25°49'46.3” N 108°56'58.1” W
FAVF271−FAVF273	Guasave	Enero, 2019	14	25°42'37.9” N 108°43'04.9” W

2.2.3. Sensibilidad a fungicidas

La sensibilidad a tebuconazol y metil-tiofanato se determinó con base en ensayos de inhibición del crecimiento micelial de 50 aislados de *S. rolfsii*. Para ello, se preparó una solución madre de los fungicidas en agua destilada estéril y se agregó al medio PDA, después de la esterilización, para obtener las siguientes concentraciones: 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 µg mL^{-1} para tebuconazol y 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 y 2000

µg mL^{-1} para metil-tiofanato. Placas Petri con medio PDA sin fungicida sirvieron como testigo. Todas las placas con medio PDA con fungicida se prepararon 24 horas antes de usarlas en la prueba y se mantuvieron en oscuridad continua a 10 °C. Para cada aislado, se tomaron discos miceliales de 6 mm de diámetro del margen con crecimiento activo de una colonia de 4 días de edad y se colocaron en el centro de placas Petri con medio PDA con fungicida a cada una de las concentraciones a evaluar. Las placas se incubaron durante 4 días a 25 °C en oscuridad continua. Para cada aislado, se usaron tres replicas por concentración. El diámetro de la colonia en cada placa Petri se midió de forma perpendicular en dos direcciones y se promedió. El diámetro del disco de agar de 6 mm de diámetro se restó del diámetro de la colonia, antes de realizar el análisis de datos. El número de esclerocios se calculó a los 21 días después del establecimiento del ensayo para todas las concentraciones evaluadas. El experimento completo se realizó dos veces.

2.2.4. Análisis de datos

La concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para cada aislado se calculó con una curva de dosis-respuesta ajustada a los datos con una regresión logística-log con el paquete R *ezec* (Kamvar, 2016) usando el modelo LL.3 en el paquete R *drc* (Ritz *et al*., 2015). La normalidad de los datos de ambos experimentos para cada fungicida se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk. Los análisis preliminares mostraron que las distribuciones de frecuencia de los valores de CE_{50} no fueron normales, por lo que se ajustaron con la prueba de Kruskal-Wallis.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Distribución de la sensibilidad a tebuconazol

Los 50 aislados de *S. rolfsii* presentaron valores de CE_{50} de tebuconazol que variaron de 0.0299−0.5165 µg mL^{-1} (media= 0.1932 µg mL^{-1}). Es importante resaltar que el 76% de los aislados mostraron valores de CE_{50} que fluctuaron de 0.101−0.300 µg mL^{-1} (Figura 1). Por otra parte, el número de esclerocios disminuyó de forma significativa cuando cada concentración de tebuconazol aumentó (Cuadro 2 y Figura 2).

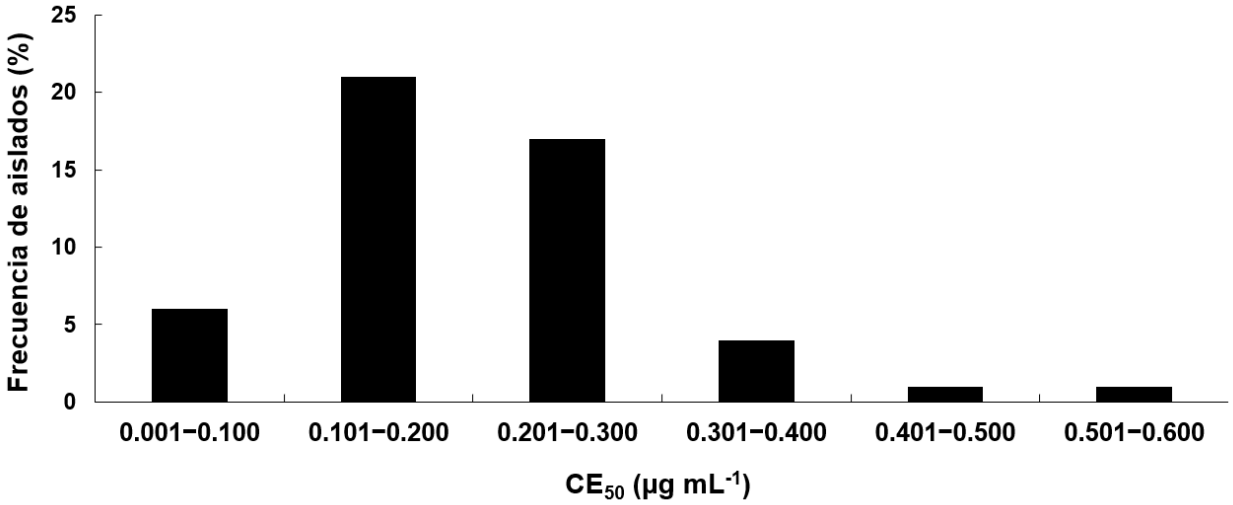

Figura 1. Distribución de frecuencia, de valores de concentración efectiva de tebuconazol a la cual se inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos de frijol en el norte de Sinaloa, México.

El promedio de los valores de CE_{50} de tebuconazol, difirió entre los aislados obtenidos de los campos comerciales de frijol, distribuidos en los municipios de Guasave y Ahome (Figura 3).

Cuadro 2. Medias de números de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* en colonias de 21 días de edad, de aislados pertenecientes a cada rango de concentración efectiva de tebuconazol que inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}), obtenidos de la distribución de frecuencia.

	Rangos de concentración efectiva para tebuconazol (CE_{50}) µg mL^{-1}					
µg mL^{-1}	**0.001−0.100**	**0.101−0.200**	**0.201−0.300**	**0.301−0.400**	**0.401−0.500**	**0.501−0.600**
Control	689 **f**	400 **f**	300 **f**	110 **d**	100 **b**	122 **d**
0.001	475 **e**	315 **f**	250 **ef**	95 **cd**	100 **b**	120 **cd**
0.005	350 **de**	280 **e**	200 **e**	95 **cd**	100 **b**	110 **cd**
0.01	225 **cd**	200 **d**	150 **d**	95 **cd**	100 **b**	110 **cd**
0.05	150 **c**	105 **c**	80 **c**	95 **c**	100 **b**	100 **bc**
0.1	55 **b**	60 **b**	30 **b**	55 **b**	75 **ab**	40 **ab**
0.5	5 **a**	5 **a**	5 **a**	12 **ab**	25 **a**	5 **ab**
1	0 **a***	0 **a**	0 **a**	0 **a**	0 **a**	0 **a**

Aislados pertenecientes a cada rango de concentración efectiva que inhibe el 50% de crecimiento micelial.

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), Kruskal-Wallis.

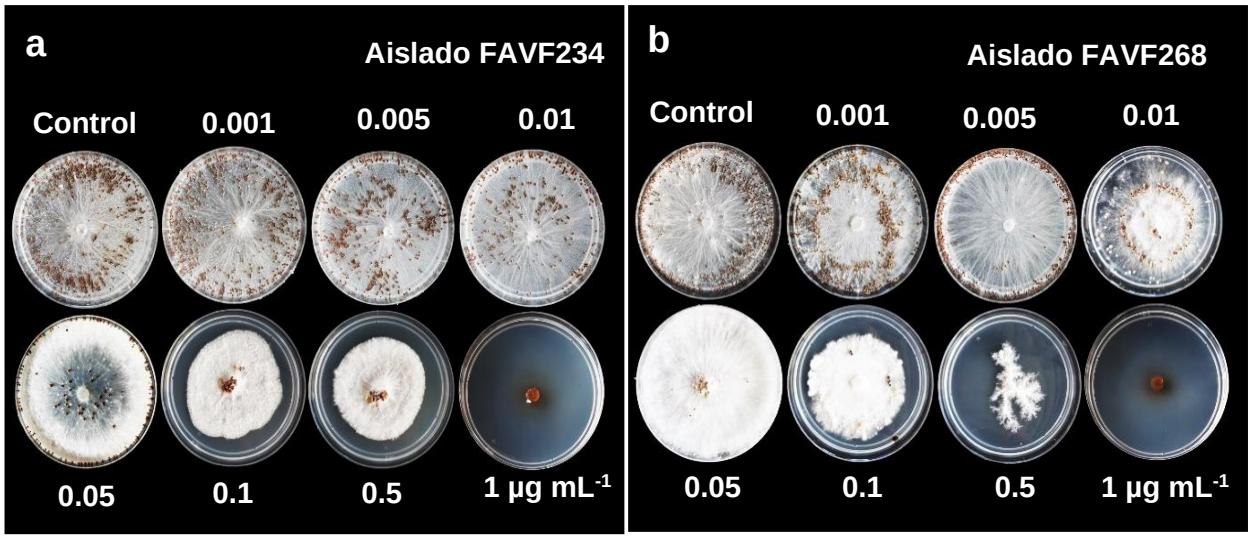

Figura 2. Efecto de tebuconazol sobre la producción de esclerocios *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. **a**) Aislado FAVF234 del municipio de Guasave. **b**) Aislado FAVF268 del municipio de Ahome.

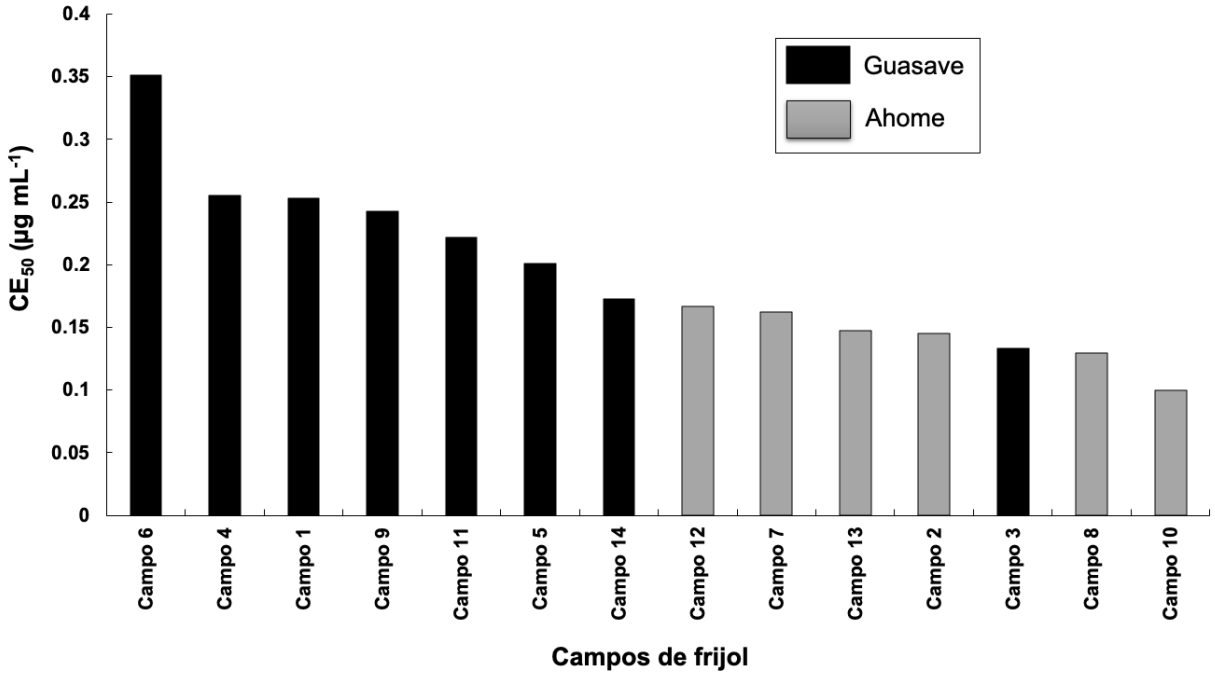

Figura 3. Valores de concentración efectiva de tebuconazol a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii*, distribuidos en 14 campos comerciales de frijol, en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México.

Los valores de sensibilidad mostrados en la Figura 3, indicaron que los aislados de *S. rolfsii* de los campos comerciales de Ahome fueron más sensibles a tebuconazol, con valores de CE_{50}= 0.0299−0.3056 µg mL^{-1} (media= 0.146 µg mL^{-1}), mientras que los aislados obtenidos de Guasave mostraron valores de 0.0995−0.5165 µg mL^{-1} (media= 0.229 µg mL^{-1}). Es importante mencionar que el 73% de los aislados de Ahome mostraron valores de CE_{50}= 0.001−0.200 µg mL^{-1} (media= 0.143 µg mL^{-1}), mientras que el 61% de los aislados de Guasave mostraron valores de CE_{50} > 0.200 µg mL^{-1} (media= 0.285 µg mL^{-1}), tal como se muestra en la Figura 4.

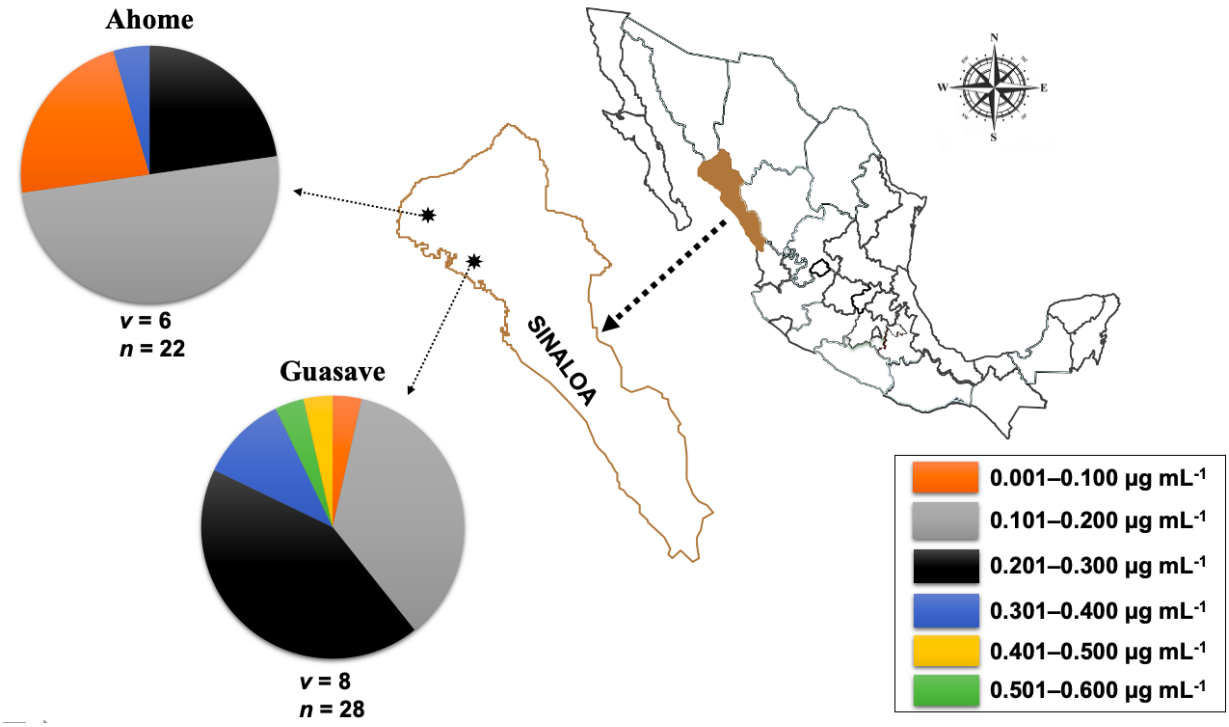

Figura 4. Sitios de recolección de aislados de *Sclerotium rolfsii* asociados a pudrición de raíz y tallo del frijol en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México. Los círculos representan la frecuencia de cada rango de inhibición (CE_{50}) a tebuconazol en cada población muestreada, "***v***" es el número de campos comerciales de frijol muestreados en cada población y "***n***" es el número de aislados en cada población.

Los 50 aislados de *S. rolfsii* fueron inhibidos cuando se usó la máxima concentración de tebuconazol (1 µg mL^{-1}), para los aislados de ambos municipios (Guasave y Ahome), lo cual indicó una alta sensibilidad a fungicidas DMI (Figura 5).

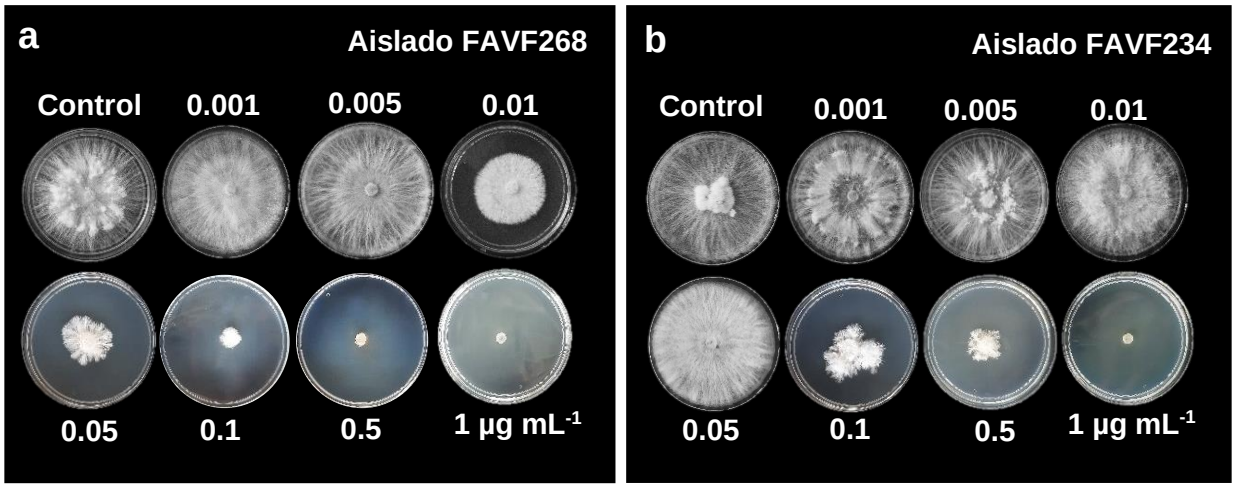

Figura 5. Efecto de tebuconazol sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. **a**) Aislado FAVF268 del municipio de Ahome. **b**) Aislado FAVF234 del municipio de Guasave.

Cabe mencionar que los aislados menos sensibles a tebuconazol, mostraron menor tasa de crecimiento micelial (mm dia^{-1}) y producción de esclerocios, por el contrario, los aislados con mayor sensibilidad presentaron mayor crecimiento micelial y producción de esclerocios en medio PDA sin fungicida, lo cual indicó un costo de adaptabilidad para resistencia a tebuconazol (Cuadro 3).

Cuadro 3. Costo de adaptabilidad en la producción de esclerocios y crecimiento micelial, de aislados de *Sclerotium rolfsii* con respecto a la sensibilidad a tebuconazol.

Código de aislado	CE_{50} para tebuconazol	No. de esclerocios*	Tasa de crecimiento micelial (mm dia^{-1})*
FAVF224	0.329	90	31.32
FAVF225	0.240	193	48.71
FAVF226	0.204	343	55.65
FAVF227	0.239	333	55.97
FAVF228	0.232	150	48.99
FAVF229	0.134	333	54.98
FAVF230	0.134	533	44.85
FAVF231	0.128	323	50.94
FAVF232	0.139	353	51.54
FAVF233	0.489	117	32.19
FAVF234	0.139	300	53.59
FAVF235	0.136	260	45.95
FAVF236	0.222	503	57.50
FAVF237	0.230	300	57.06
FAVF238	0.196	640	55.71
FAVF239	0.220	307	57.36
FAVF240	0.139	413	55.66
FAVF241	0.394	110	34.86
FAVF242	0.517	140	39.00
FAVF243	0.258	400	57.91
FAVF244	0.236	500	47.98
FAVF245	0.253	300	49.38
FAVF246	0.128	467	46.57
FAVF247	0.107	400	46.82
FAVF248	0.114	400	46.65
FAVF249	0.175	327	48.81
FAVF250	0.051	733	58.80
FAVF251	0.306	123	35.39
FAVF252	0.166	167	46.50
FAVF253	0.136	500	50.46
FAVF254	0.068	666	58.14
FAVF255	0.030	717	58.14
FAVF256	0.203	200	40.47
FAVF257	0.109	180	43.48
FAVF258	0.065	723	58.18
FAVF259	0.240	383	54.49
FAVF260	0.155	400	51.16
FAVF261	0.255	300	48.96
FAVF262	0.216	300	44.38
FAVF263	0.344	97	38.34
FAVF264	0.072	633	58.67
FAVF265	0.129	300	43.31
FAVF266	0.222	150	45.71
FAVF267	0.143	237	51.73

Continuación del cuadro 3

FAVF268	0.150	560	48.09
FAVF269	0.209	497	51.23
FAVF270	0.148	460	49.37
FAVF271	0.245	367	48.45
FAVF272	0.174	553	48.67
FAVF273	0.100	700	58.47

*****El número de esclerocios producidos y tasa de crecimiento micelial se obtuvieron de la caracterización morfológica en el capítulo I.

2.3.2. Distribución de la sensibilidad a metil-tiofanato

Los 50 aislados de *S. rolfsii* presentaron valores de CE_{50} que fluctuaron de 152−7,666 µg mL^{-1} (media= 2,291 µg mL^{-1}) a metil-tiofanato. Es importante resaltar que el 74% de los aislados mostraron valores de CE_{50}= 1−3,000 µg mL^{-1} (Figura 6). Por otra parte, el número de esclerocios disminuyó de forma significativa cuando cada concentración de metil-tiofanato aumentó (Cuadro 4 y Figura 7).

El promedio de los valores de CE_{50} para metil-tiofanato, difirió entre los aislados pertenecientes a los campos comerciales de frijol, distribuidos en los municipios de Guasave y Ahome (Figura 8).

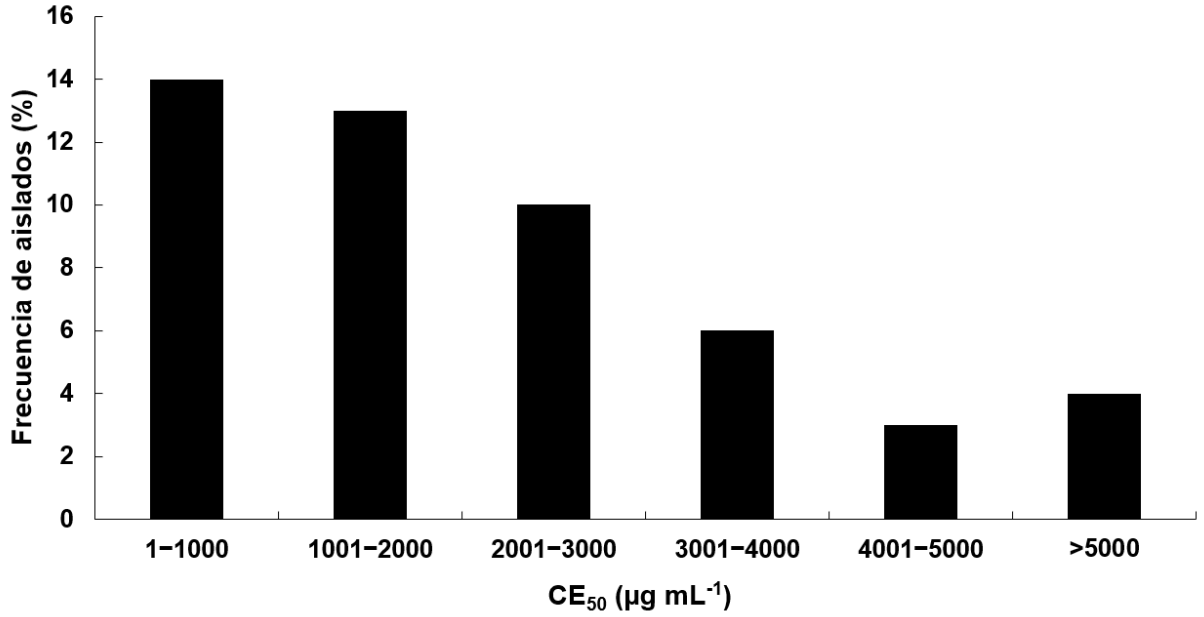

Figura 6. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva para metil-tiofanato a la cual se inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos de frijol en el norte de Sinaloa, México.

Cuadro 4. Medias de número de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* a los 21 días de edad de la colonia, de aislados pertenecientes a cada rango de concentración efectiva de metil-tiofanato que inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}), obtenidos de la distribución de frecuencia.

	Rangos de concentración efectiva para metil-tiofanato (CE_{50}) µg mL^{-1}					
µg mL^{-1}	**1−1000**	**1001−2000**	**2001−3000**	**3001−4000**	**4001−5000**	**> 5000**
Control	201 **f**	200 **f**	164 **e**	224 **e**	178 **d**	320 **f**
1	130 **e**	142 **e**	117 **d**	143 **d**	144 **cd**	233 **ef**
5	114 **e**	128 **de**	107 **d**	110 **cd**	113 **bc**	148 **de**
10	90 **d**	100 **d**	69 **c**	98 **c**	101 **bc**	125 **cd**
50	42 **c**	69 **c**	57 **b**	63 **b**	83 **ab**	107 **bc**
100	15 **b**	60 **b**	41 **a**	36 **ab**	60 **a**	79 **ab**
500	9 **a**	29 **a**	34 **a**	19 **a**	56 **a**	72 **a**

Aislados pertenecientes a cada rango de concentración efectiva que inhibe el 50% de crecimiento micelial

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), Kruskal-Wallis.

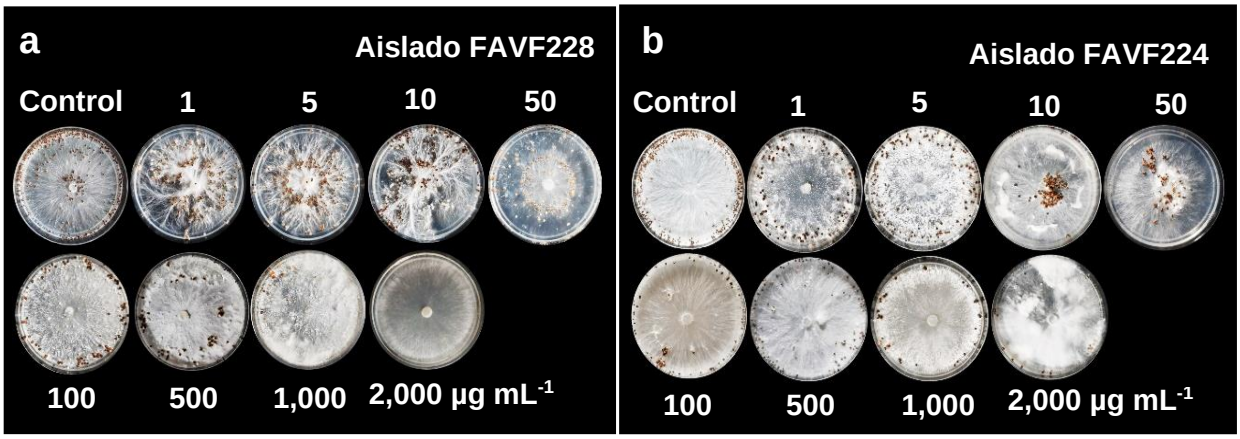

Figura 7. Efecto de metil-tiofanato sobre la producción de esclerocios *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. **a**) Aislado FAVF228 del municipio de Guasave. **b**) Aislado FAVF224 del municipio de Ahome.

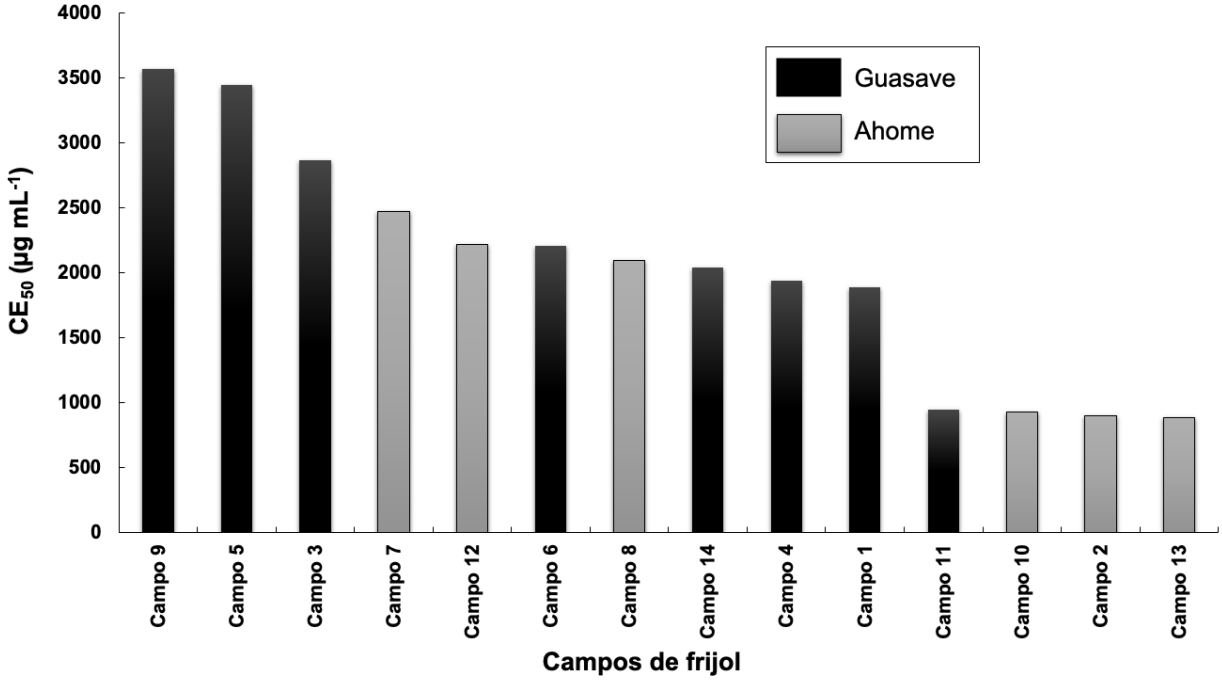

Figura 8. Valores de concentración efectiva para metil-tiofanato a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 50 aislados de *Sclerotium rolfsii*, distribuidos en 14 campos comerciales de frijol, en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México.

Los valores de CE_{50} mostrados en la Figura 8, indicaron que los aislados obtenidos de los campos de Ahome, mostraron mayor sensibilidad a metil-tiofanato, con valores de CE_{50}= 152−5,933 µg mL^{-1} (media= 1,923 µg mL^{-1}), por el contrario, los aislados obtenidos de Guasave, fueron menos sensibles con valores de CE_{50}= 743−7,666 µg mL^{-1} (media= 2,580 µg mL^{-1}). Cabe resaltar que el 59 y 82% de los aislados de Ahome y Guasave mostraron valores de CE_{50} > 1,000 µg mL^{-1}, de forma respectiva (Figura 9).

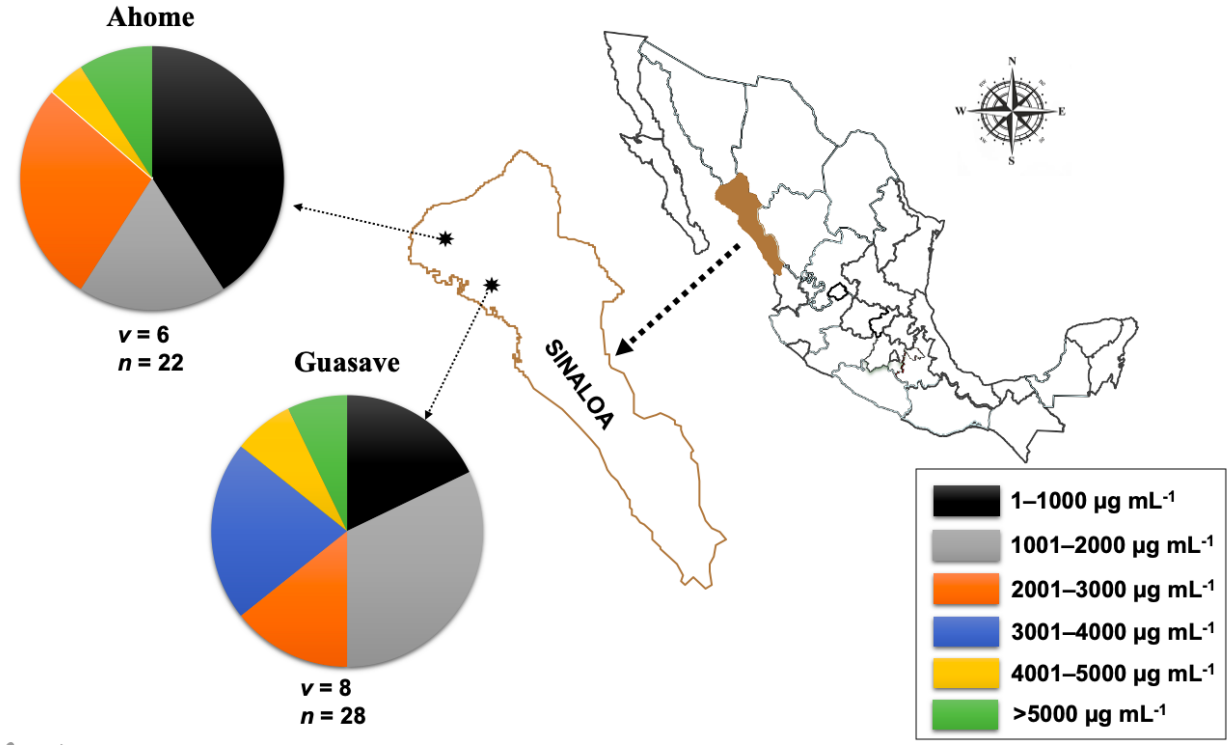

Figura 9. Sitios de recolección de aislados de *Sclerotium rolfsii* asociados a pudrición de raíz y tallo del frijol en los municipios de Guasave y Ahome, Sinaloa, México. Los círculos representan la frecuencia de cada rango de inhibición (CE_{50}) en cada población muestreada, "***v***" es el número de campos de frijol muestreados en cada población y "***n***" es el número de aislados en cada población.

El crecimiento micelial de los 50 aislados de *S. rolfsii*, no se inhibió por completo cuando se usó la máxima concentración evaluada de metil-tiofanato (2,000 µg mL^{-1}), para los aislados de ambos municipios (Guasave y Ahome), lo cual indicó poca sensibilidad a este fungicida MBC (Figura 10).

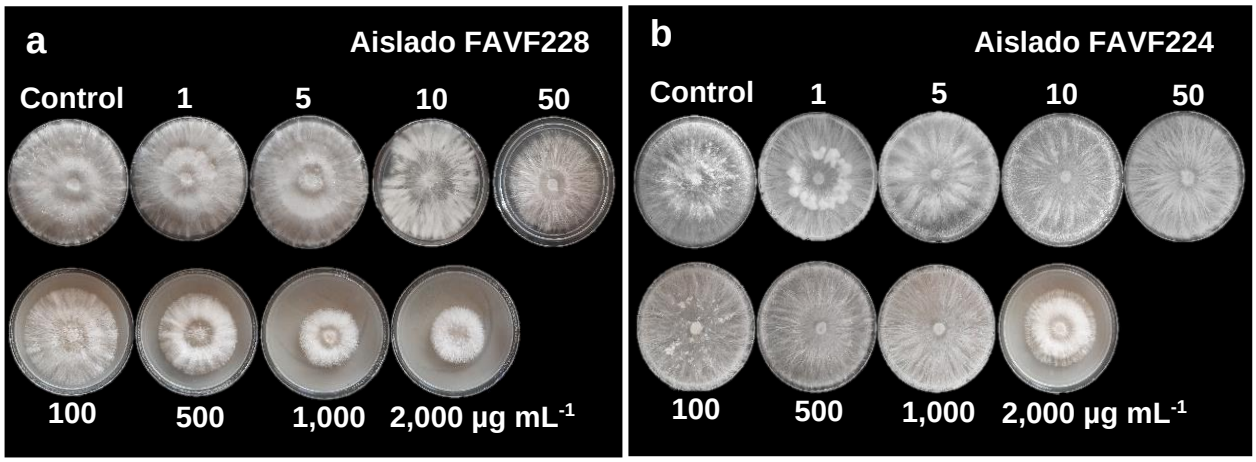

Figura 10. Efecto de metil-tiofanato sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Sclerotium rolfsii* obtenidos de campos comerciales de frijol, en el norte de Sinaloa, México. **a**) Aislado FAVF228 del municipio de Ahome. **b**) Aislado FAVF224 del municipio de Guasave.

Por otra parte, los aislados de *S. rolfsii* no presentaron correlación entre el crecimiento micelial y producción de esclerocios con la sensibilidad a metil-tiofanato, lo que sugiere la ausencia de un costo de adaptabilidad.

2.4. DISCUSIÓN

La resistencia a fungicidas ocurre cuando surgen poblaciones de hongos objetivo que ya no presentan suficiente sensibilidad a un fungicida y que ya no pueden ser controladas de forma adecuada en campo (Brent y Hollomon, 2007). El monitoreo de la sensibilidad con aislados de campo y usando un amplio rango de concentraciones para establecer

valores de CE_{50}, contribuye a decretar el proceso de selección que está ocurriendo y la probabilidad de una pérdida rápida del control de la enfermedad (Skylakakis, 1985; Brent y Hollomon, 2007). La sensibilidad a fungicidas es una característica importante que se puede utilizar para comprender mejor las poblaciones de hongos expuestas a las presiones de selección (Milgroom, 1996; Brent y Hollomon, 2007). Los valores de CE_{50} mostrados en el presente estudio para tebuconazol, concuerdan con los reportados por Khatri *et al*. (2017), donde obtuvieron valores de CE_{50}= 0.0023−0.0312 µg mL^{-1} (media= 0.008 µg mL^{-1}) y 0.0900−0.4501 µg mL^{-1} (media= 0.213 µg mL^{-1}) para tebuconazol y protioconazol, respectivamente, en aislados de *S. rolfsii* recolectados en campos de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) en EE. UU. También, Ajayi *et al*. (2017) reportaron valores de CE_{50}= 0.349−2.559 µg mL^{-1} (media= 1.338 µg mL^{-1}) y 0.242−3.554 µg mL^{-1} (media= 1.497 µg mL^{-1}) para ipconazol y protioconazol, en este orden, en aislados de *R. solani* recolectados en EE. UU. y Canadá, en campos de soya (*Glycine max* L.). De manera similar, en Georgia se registraron valores medios de CE_{50}= 0.080 y 0.170 µg mL^{-1} para tebuconazol en aislados de *S. rolfsii* y *R. solani,* de forma respetiva, recolectados en campos de cacahuate (Brenneman *et al*., 1991), en este mismo hospedante Franke *et al*. (1998) informaron valores de CE_{50}= 0.0008−0.140 µg mL^{-1} (media= 0.013 µg mL^{-1}) para tebuconazol en aislados de *S. rolfsii*. Por su parte Chen *et al.* (2014) informaron valores de CE_{50}= 0.079−0.573 µg mL^{-1} en aislados de *S. rolfsii* recolectados en diferentes hospedantes en China. Además, Kataria *et al*. (1991) informaron valores de CE_{90}= 0.003−0.083 µg mL^{-1}, en diferentes especies de *Rhizoctonia*, recolectadas en diferentes hospedantes en Suiza. Otros estudios han reportado valores de CE_{50} más bajos, tal es el caso de Bimal *et al*. (2014) con valores de CE_{50}= 0.0005−0.00233 µg mL^{-1} para triticonazol en aislados de *R. solani* recolectados en EE. UU. en campos de césped

(*Cynodon dactylon* L.), y similar a lo informado por Meyer *et al*. (2016) con valores de CE_{50}= 0.000049, 0.000097 y 0.000023 µg mL^{-1} para tebuconazol, bromuconazol y difenoconazol, en el mismo orden, en aislados de *R. solani*, recolectados en campos de soya en Brasil. En contraste, Shankar y Ratnoo (2018) informaron que el crecimiento micelial de aislados de *S. rolfsii* recolectados en campos de cacahuate no se inhibió cuando evaluaron 750 µg mL^{-1} para tebuconazol y hexaconazol, lo cual indicó aislados con poca sensibilidad a fungicidas DMIs. En otros estudios, se logró inhibir el total del crecimiento micelial de aislados de *S*. *rolfsii*, a concentraciones ≥ 35 µg mL^{-1} utilizando diferentes fungicidas DMIs (Madhavi y Bhattiprolu, 2011; Kanwal *et al*., 2012). La diferencia en los valores de CE_{50} entre los diferentes estudios puede fluctuar debido que, en el trabajo de Shankar y Ratnoo (2018), las placas Petri se incubaron bajo luz fluorescente continua durante el ensayo de inhibición del crecimiento micelial, lo cual pudo haber ocasionado una rápida degradación del ingrediente activo en el medio de cultivo para el caso de diferentes fungicidas benzimidazoles sensibles a la fotodegradación en condiciones *in vitro* (Escalada *et al*., 2006; Stoytcheva y Zlatev, 2011). Esta variación, también puede deberse al número de aislados evaluados o tamaño representativo de la muestra, tal como lo mencionaron Csinos (1987) y Khatri *et al*. (2017). En este estudio, los valores de sensibilidad indicaron que ninguno de los 50 aislados fue resistente para tebuconazol, de acuerdo a lo reportado por Madhavi y Bhattiprolu (2011), Kanwal *et al*. (2012) y Shankar y Ratnoo (2018) donde informaron valores de CE_{50} ≥ 35 µg mL^{-1} para aislados de *S. rolfsii*. La presencia en México de aislados de *S. rolfsii* sensibles a tebuconazol puede deberse a que, en la mayoría de los campos comerciales de frijol, el número de aplicaciones de fungicidas DMIs por año varía de una a tres, lo cual es bajo comparado con otros países como EE. UU. (Gianessi y

Reigner, 2006), India (Banyal *et al*., 2008), Pakistán (Kanwal *et al*., 2012) y Brasil (Silvânia *et al*., 2018).

En cuanto a metil-tiofanato, el presente estudio concuerda con lo reportado por Rangarani *et al*. (2017), en donde aislados de *S. rolfsii* recolectados en campos de cacahuate, fueron poco sensibles para metil-tiofanato y carbendazim, con crecimiento micelial a 2,000 µg mL^{-1}, similar a lo reportado por Yaqub y Shahzad (2015), donde aislados de *S. rolfsii* recolectados en campos de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), presentaron crecimiento micelial a 10,000 µg mL-1 de metil-tiofanato y carbendazim. Asimismo, Baggio *et al*. (2018) informaron valores medios de CE_{50}= 688 µg mL-1 de metil-tiofanato. Resultados similares se han reportado en Egipto (Karima *et al*., 2012) y Grecia (Chatzidimopoulos *et al*., 2013). En México también se han presentado poblaciones de *S. rolfsii* poco sensibles para metil-tiofanato y carbendazim, tal como lo reportaron Pérez-Moreno *et al*. (2008) en aislados recolectados de ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.), y Díaz-Nájera *et al*. (2018) en aislados recolectados de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* H.). Sin embargo, estos resultados discrepan con lo reportado en Brasil por Meyer *et al*. (2006), en donde informaron valores medios de CE_{50}= 0.01084, 0.000352, 0.00022 y 0.00017 µg mL^{-1}, para metil-tiofanato, benomyl, thiabendazol y carbendazim, en el orden repectivo, en aislados de *R. solani* recolectados en campos de soya. Por otra parte, Sabet *et al*. (2000) y Arshad e Iqra (2015), reportaron que metil-tiofanato inhibió por completo el crecimiento micelial de los aislados de *S. rolfsii* a 50 y 150 µg mL^{-1}, respectivamente. Los valores de CE_{50} mostrados para metil-tiofanato en el presente estudio, indicaron que los 50 aislados de *S. rolfsii* fueron poco sensibles, de acuerdo a lo informado por Sabet *et al*. (2000), Meyer *et al*. (2006) y Arshad e Iqra (2015), donde consideraron como poblaciones sensibles a los aislados de *S. rolfsii* y *R. solani*

que presentaron valores de CE_{50} ≤ 150 µg mL^{-1} de metil-tiofanato. Es importante mencionar que, en el norte de Sinaloa, el cultivo de frijol se suele rotar con otros cultivos hospedantes (solanáceas y cucurbitáceas) de *S. rolfsii,* aunado a la variabilidad genética de las poblaciones del hongo, lo cual favorece el desarrollo de resistencia por parte del patógeno (Leslie, 1993; Adandonon *et al*., 2005).

La diferencia de los valores de CE_{50} obtenida entre los municipios de Guasave y Ahome, para tebuconazol y metil-tiofanato, fue similar a lo reportado en otros trabajos, donde evaluaron fungicidas DMIs y MCBs, en los cuales, encontraron diferencias significativas en los valores de CE_{50} de aislados de *S. rolfsii* originarios de dos ubicaciones distintas, tal como ocurrió en EE. UU. (Ajayi *et al*., 2017; Khatri *et al*., 2017), Brasil (Zancan *et al*., 2012), Georgia (Brenneman *et al*., 1991; Franke *et al*., 1998), Bangladesh (Naima *et al*., 2001), India (Rangarani *et al*., 2017; Shankar y Ratnoo, 2018), Pakistán (Arshad e Iqra, 2015; Yaqub y Shahzad, 2015) y México (Pérez-Moreno *et al*., 2008). Esta diferencia, puede corresponder a la alta diversidad genética entre poblaciones de este patógeno (Leslie, 1993; Cilliers *et al*., 2000) y a costos de adaptabilidad de aislados resistentes a fungicidas (Genet *et al*., 2006; Hawkins y Fraaije, 2018). Las mutaciones que confieren resistencia pueden resultar en costos de adaptabilidad, lo que resulta en una compensación evolutiva (Corio *et al*., 2010). Estos costos de adaptabilidad pueden resultar de las limitaciones funcionales de un sitio en específico de evolución o de los costos de asignación de recursos de sobreexpresión (Hawkins y Fraaije, 2018). La aptitud de los hongos fitopatógenos se puede manifestar en diferentes etapas de su ciclo de vida, estos incluyen, entre otros, la producción y dispersión de esporas, la eficacia de la infección, el crecimiento micelial y la capacidad de competir con otros patógenos en un entorno de campo caracterizado por condiciones ambientales fluctuantes e interacciones

con una amplia variedad de genotipos del hospedante y microbiota competidora (Anderson, 2005; Cools, 2008).

En el presente estudio, los aislados con menor sensibilidad para tebuconazol exhibieron menor tasa de crecimiento micelial (mm dia^{-1}) y producción de esclerocios, lo que sugiere un costo de adaptabilidad, similar a lo reportado por Lichtemberg *et al*. (2018), en aislados de *Monilinia fructicola* resistentes a tebuconazol, los cuales, mostraron una desventaja de adaptabilidad en relación con los aislados sensibles, ya que estos últimos obtuvieron mayor tasa de germinación y capacidad de crecimiento micelial, así como mayor producción de esporas. Por su parte, Karaoglanidis *et al*. (2001) informaron aislados de *Cercospora beticola* resistentes a fungicidas DMIs, los cuales produjeron menos conidios en comparación con aislados sensibles, del mismo modo, Billard *et al*. (2012), obtuvieron aislados resistentes de *Botrytis cinerea* con menor tasa de crecimiento micelial, conidios y esclerocios, en comparación con aislados sensibles.

Para el caso de metil-tiofanato, no se encontró costos de adaptabilidad para aislados poco sensibles de *S. rolfsii*, al igual que lo reportado por Molaei *et al*. (2020), en donde aislados de *Sclerotinia sclerotiorum*, recolectados de campos de girasol (*Helianthus annuus* L.), no presentaron correlación entre el crecimiento micelial, producción de esclerocios y la agresividad con la sensibilidad a carbendazim, lo que sugiere la ausencia de un costo de adaptabilidad asociado con la resistencia a los fungicidas. Asimismo, en China, en aislados de *S. sclerotiorum*, no se encontró diferencias significativas en los parámetros de aptitud como el crecimiento micelial, la virulencia y la producción de ácido oxálico entre aislados de *S. sclerotiorum* resistentes y sensibles a carbendazim (Zhu *et al*., 2016). Cabe mencionar, que las mediciones de costos de adaptabilidad de los mutantes resistentes obtenidos en condiciones de laboratorio, no reflejan necesariamente

los costos de adaptabilidad relacionados con los mutantes resistentes seleccionados en el campo (Billard *et al*., 2012). Esto se debe a que los mutantes de campo tienen más probabilidades de poseer mutaciones compensatorias que mejoran la aptitud o adaptabilidad del patógeno en el campo ambiental y condiciones del hospedante (Prever y Milgroom, 1995; Ishii y Hollomon, 2015).

En relación con el número de esclerocios producidos por *S. rolfsii*, estos presentaron disminución de forma significativa cuando cada concentración de metil-tiofanato y tebuconazol aumentó, lo cual coincide con otros estudios, donde se observó una disminución en el número de esclerocios de *S. rolfsii* cuando se aplicó tebuconazol, pentacloronitrobenceno (Brenneman *et al*., 1991), azoxystrobin, carbendazim, metalaxyl (Siddique *et al*., 2016), hymexazol, benomyl (Naima *et al*., 2001), metil-tiofanato, fluazinam, piraclostrobina, fluquinconazol y procimidone (Zancan *et al*., 2012). En México, se reportó este efecto con los fungicidas tebuconazol, thiabendazol, TCMTB, procimidona e iprodiona (Pérez-Moreno *et al*., 2008).

En general, los tratamientos con fungicidas son un componente clave en el manejo integrado de enfermedades. En México, la aparición de resistencia por parte de hongos fitopatógenos se ha convertido en un factor importante para limitar la eficacia y la vida útil de los fungicidas. El establecimiento de valores de CE_{50} proporciona la línea base para evaluar la efectividad de los fungicidas y monitorear la detección de cambios en la sensibilidad a los fungicidas en *S. rolfsii*.

2.5. CONCLUSIONES

La prueba *in vitro* de sensibilidad para tebuconazol, mostró que los 50 aislados de *Sclerotium rolfsii,* agente causal de la pudrición de raíz y tallo del frijol presentan alta sensibilidad a este fungicida del grupo de los DMIs. En cuanto a metil-tiofanato (del grupo de los MBCs) los 50 aislados de *S. rolfsii* fueron poco sensibles

Los resultados obtenidos de este estudio, permitirán monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *S. rolfsii* en campos comerciales de frijol a fungicidas tebuconazol y metil-tiofanato.

2.6. REFERENCIAS

Adandonon, A., Aveling, T. A., Merwe, N. A., and Sanders, G. 2005. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. Australasian Plant Pathology 34: 19−25. doi:10.1071/AP04071.

Ahemad, M., and Khan, M. S. 2010. Influence of selective herbicides on the growth promoting characteristics of phosphate solubilization plants. *Enterobacter asburiae* cepa PS2. Microbiology 5: 849−857.

Ajayi, O. O., Butts, W. C., and Bradley, C. A. 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia solani* to succinate dehydrogenase inhibitor and demethylation inhibitor fungicides. Plant Disease 101: 487–495. doi:10.1094/pdis-07-16-1015-re

Anderson, J. B. 2005. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. Nature Reviews Microbiology 3: 547−556.

Arshad, J., and Iqra, H. K. 2015. Chemical control of collar rot disease of chickpea. Pakistan Journal of Phytopathology 27: 61−68.

Baggio, J. S., Peres, N. A., and Amorim, L. 2018. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, and thiophanate-methyl. Plant Disease 102: 1803–1810. doi:10.1094/pdis-08-17-1221-re

Banyal, D. K., Mankotia, V., and Sugha, S. K. 2008. Integrated management of tomato collar rot caused by *Sclerotium rolfsii*. Journal of Mycology and Plant Pathology 38: 2.

Besler, B. A., Grichar, W. J., and Jaks, A. J. 1996. Southern blight and leaf spot control in peanut using selected fungicides. Texas Journal of Agriculture and Natural Resources 9: 105−114.

Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., and Debieu, D. 2012. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. Pest Management Science 68: 684−691.

Bimal, S. A., Dilip, L., David, S. M., and Brandon, J. H. 2014. *In vitro* fungicide sensitivity of *Rhizoctonia* and waitea isolates collected from turfgrasses. Horticultural Research Institute 32: 126–132.

Birky, C. W. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. Annual Review of Genetics 35: 125–148.

Bowen, K. L., Hagan, A. K., and Weeks, J. R. 1997. Number of tebuconazole applications for maximizing disease control and yield of peanut in growers' fields in Alabama. Plant Disease 81: 927−931.

Branch, W. D., and Brenneman, T. B. 1996. Pod yield and stem rot evaluation of peanut cultivars treated with tebuconazole. Agronomy Journal 88: 933. doi:10.2134/agronj1996.00021962003600060014x

Brenneman, T. B., Murphy, A. P., and Csinos, A. S. 1991. Activity of tebuconazole on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, two soilborns of peanut. Plant Disease 75: 744−747.

Brent, K. J., and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed. Second Edition. Avenue Louise. Brussels, Belgium. 60p.

Chatzidimopoulos, M., Papaevaggelou, D., and Pappas, A. C. 2013. Detection and characterization of fungicide resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* in lettuce crops in Greece. European Journal of Plant Pathology 137: 363–376. doi:10.1007/s10658-013-0248-x

Chen, F., Han, P., Liu, P., Liu, J., Si, N., and Liu, X. 2014. Activity of the novel fungicide SYP-Z048 against plant pathogens. Scientific Reports 4: 6473. doi:10.1038/srep06473.

Cilliers, A. J., Herselman, L., and Pretorius, Z. A. 2000. Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. Phytopathology 90: 1026−1031. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.9.1026.

Cilliers, A. J., Pretorius, Z. A., and Van Wyk, P. S. 2003. Integrated control of *Sclerotium rolfsii* on groundnut in South Africa. Phytopathology 151: 249−258. doi:10.1046/j.1439-0434.2003.00715.x

Cools, H. J. 2008. Are azole fungicides losing ground against Septoria wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science 64: 681−684.

Corio, C. M., Dufour, M. C., Cigna, J., Abadie, P., and Chen, W. J. 2010. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. European Journal of Plant Pathology 129: 315−329. doi:10.1007/s10658-010-9711-0.

Csinos, A. S. 1987. Control of southern stem rot and *Rhizoctonia* limb rot of peanut with flutolanil. Peanut Science 14: 55–58.

Díaz-Nájera, J. F., Sahagún-Castellanos, J., Vargas-Hernandez, M., Ayvar-Serna, S., Alvarado-Gómez, O. G., Villanueva-Verduzco, C., and Acosta-Ramos, M. 2018. Diagnosis and integrated management of fruit rot in *Cucurbita argyrosperma*, caused by *Sclerotium rolfsii*. The Plant Pathology Journal 34: 171–181. doi:10.5423/PPJ.OA.08.2017.0185

Dutta, B. K., Das, N. C., and Ray, D. C. 2014. Potential of some fungicides on the growth and development of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *in vitro*. International Journal of Scientific and Research Publications 4: 12.

Escalada, J. P., Pajares, A., Gianotti, J., Massad, W. A., Berolotti, S., Amat, G. F., and García, A. N. 2006. Dye-sensitized photodegradation of the fungicide carbendazim and relatrd benzimidazoles. Chemosphere 65: 237−244.

Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., Vicente, A., and Pérez-García, A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. International Microbiology 11: 1–9.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. 2012. List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides. https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-(updated-2012).pdf?sfvrsn=c8db449a_4 (Consulta mayo 2020).

Franke, M. D., Brenneman, T. B., Stevenson, K. L., and Padgett, G. B. 1998. Sensitivity of isolates of *Sclerotium rolfsii* from peanut in Georgia to selected fungicides. Plant Disease 82: 578−583.

Genet, J. L., Jaworska, G., and Deparis, F. 2006. Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. Pest Management Science 62: 188−194. doi:10.1002/ps.1146.

Gianessi, L., and Reigner, N. 2006. The importance of fungicides in U.S. crop production. Outlooks on Pest Management 10: 209–213.

Hawkins, N. J., and Fraaije, B. A. 2018. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. Annual Review of Phytopathology 56: 339−360. doi:10.1146/annurev-phyto-080417-050012

Ishii, H., and Hollomon, D. W. 2015. Fitness cost of resistance: impact on management. Pp:77−89. *In*: Mikaberidze, A., and McDonald, B. A. (eds.). Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Springer, Japan. 490p. doi:10.1007/978-4-431-55642-8

Kamvar, Z. N. 2016. ezec: Easy Interface to Effective Concentration Calculations. R package version 1.0.1. https://CRAN.R-project.org/package=ezec

Kanwal, A., Anjum, F., Qudsia, H., Javaid, A., and Mahmood, R. 2012. Evaluation of tebuconazole and thiophanate-methyl against some problematic soil-borne plant pathogens. Mycopath 10: 17−20.

Karaoglanidis, G., Thanassoulopoulos, C. C., and Ioannidis, P. M. 2001. Fitness of *Cercospora beticola* field isolates-resistant and-sensitive to demethylation inhibitor fungicides. European Journal of Plant Pathology 107: 337−347.

Karima, H. E. H., and Nadia, G. E. G. 2012. *In vitro* study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* isolates causing the damping off and root rot diseases in tomatoes. Nature and Science 10: 16–20.

Kataria, H. R., Hugelshofer, U., and Gisi, U. 1991. Sensitivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. Plant Pathology 40: 203–211. doi:10.1111/j.1365-3059.1991.tb02368.x

Khatri, K., Kunwar, S., Barocco, R. L., and Dufault, N. S. 2017. Monitoring fungicide sensitivity levels and mycelial compatibility groupings of *Sclerotium rolfsii* isolates from Florida peanut fields. Peanut Science 44: 83−92. doi:10.3146/PS17-7.1

Kwon, J. H., Kang, D. W., Choi, O., and Kim, J. 2016. The occurrence of *Sclerotium* rot on *Momordica charantia* caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea. Archives of

Phytopathology and Plant Protection 49: 43−47. doi:10.1080/03235408.2016.1152067

Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127−150. doi:10.1146/annurev.py.31.090193.001015.

Lichtemberg, P. S., Michailides, T. J., Puckett, R. D., Zeviani, W. M., and May, L. L. 2018. Fitness costs associated with G461S mutants of *Monilinia fructicola* could favor the management of tebuconazole resistance in Brazil. Tropical Plant Pathology 44: 140−150. doi:10.1007/s40858-018-0254-9

Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection 24: 853−863.

Madhavi, G. B., and Bhattiprolu, S. L. 2011. Integrated disease management of dry root rot of chilli incited by *Sclerotium rolfsii* (Sacc.). International Journal of Plant, Animal and Evironmental Scienses 1: 31−37

Marcenaro, D., and Valkonen, J. P. 2016. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) in Nicaragua. PLoS ONE 11: 1−18. doi:101371/journal.pone.0168662.

Mellado, E., Diaz, G. T., Cuenca, E. M., and Rodriguez, T. J. 2001. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* sp. Journal of Clinical Microbiology 39: 2431−2438.

Meyer, M. C., Bueno, C. J., de Souza, N. L., and Yorinori, J. T. 2006. Effect of doses of fungicides and plant resistance activators on the control of *Rhizoctonia* foliar blight of soybean, and on *Rhizoctonia solani* AG1–IA *in vitro* development. Crop Protection 25: 848–854. doi:10.1016/j.cropro.2005.11.008

Milgroom, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology 34: 457−477. doi:10.1146/annurev.phyto.34.1.457.

Molaei, H., Abrinbana, M., and Ghosta, Y. 2020. Baseline sensitivities to azoxystrobin and tebuconazole in *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from sunflower in Iran related to

sensitivities to carbendazim and iprodione. Journal of Phytopathology 6: 353−362. doi:10.1111/jph.12899

Mueller, D. S., Wise, K. A., Dufault, N. S., Bradley, C. A., and Chlvers, M. I. 2013. Fungicides for field crops. APS Press, St Paul, Minnesota, USA. 120p.

Naima, K., Brahim, E., Latifa, L., and Abdellah, O. 2001. Effect of fungicides and *Trichoderma harzianum* on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathologia Mediterranea 40: 143–148.

Naseri, B., and Mousavi, S. S. 2008. Root rot pathogens in field soil, roots and seeds in relation to common bean (*Phaseolus vulgaris*), disease and seed production. Pest Management Science 61: 60–67.

Peres, N. A., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloesporoides* from citrus. Plant Disease 88: 125−130.

Pérez-Moreno, L., Villalpando-Mendiola, J. L., Castañeda-Cabrera, C., y Ramírez-Malagón, R. 2008. Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. Revista Mexicana de Fitopatología 27: 11−17.

Prever, T., and Milgroom, M. 1995. Fungicide resistance-lessons for herbicide resistance management?. Weed Technology 9: 840.

Rangarani, A., Rajan, C. P., Harathi, P. N., Bhaskar, B., and Sandhya, Y. 2017. Evaluation of fungicides and herbicides on *Sclerotium rolfsii*, incitant of stem rot diseases in groundnut (*Arachis hypogeal* L.). International Journal of Pure and Applied Bioscience 5: 92−97. doi:http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.3040.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., and Gerhard, D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. PLoS ONE 10(12): e0146021.

Sabet, K., Mostafa, A., Said, S., and Gomal, A. 2000. Biological and chemical control of root diseases of tomato plants. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 3: 1043−1048.

Santomauro, A., Pollastro, S., De Guido, M. A., De Miccolis, A. R., Natale, P., and Faretra, F. 2000. A long-term trial on the effectiveness of new fungicides against grey mould

on grapevine and on their influence on the pathogen's population. Abstract Book of the XII international *Botrytis* symposium. Reims, France. 75p.

Sennoi, R. J., Saksirirak, W., and Kesmala, T. P. 2013. Genotypic variation of resistance to southern stem roto of *Helianthus tuberosus* caused by *Sclerotium rolfsii*. Euphytica 190: 415−424.

Shankar, S. S., and Ratnoo, R. S. 2018. Bio-efficacy and management of stem rot (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut with different fungicides and bioagent. International Journal of Chemical Studies 6: 492−495

Sharma, M., and Ghosh, R. 2017. Heat and soil moisture stress differentially impact chickpea plant infection with fungal pathogens. Pp:47–57. *In*: Senthil-Kumar, M. (ed.). Plant Tolerance to Individual and Concurrent Stresses. Springer Press. New Delhi, India. 178p. doi:10.1007/978-81-322-3706-8

Siddique, A. M., Ahmmed, F. N., Mazumder, H. G., Khaiyam, O. M., and Islam, R. M. 2016. Evaluation of some fungicides and bio-agents against *Sclerotium rolfsii* and foot and root rot disease of eggplant (*Solanum melongena* L.). Scientific Journal of Krishi Foundation 14: 92−97.

Silvânia, H. F., Fernando, K. C., and Ulisses, R. A. 2018. Strategies for the control of asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil: fungicide resistance and application efficacy. Outlooks on Pest Management 29: 120−123. doi:10.1564/v29_jun_05

Skylakakis, C. 1985. Two different processes for the selection of fungicide-resistant subpopulations. EPPO Bulletin 15: 519−525.

Stoytcheva, M., and Zlatev, R. 2011. Photolysis of some benzimidazole base pesticides. Pp43−54. *In*: Yousef, Y. A., and Akasheh, T. S. (eds.). Pesticides in the Modern World: Trends in Pesticides Analysis. InTech. Rijeka, Croatia. 514p.

Tarafdar, A., Rani, T. S., Chandran, U. S., Ghosh, R., Chobe, D. R., and Sharma, M. 2018. Exploring combined effect of abiotic (soil moisture) and biotic (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) stress on collar rot development in chickpea. Frontiers in Plant Science 9: 1−10. doi:10.3389/fpls.2018.01154.

Torriani, S. F., Brunner, P. C., McDonald, B. A., and Sierotzki, H. 2009. Qol resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science 65: 155−162.

Yang, V. W., and Clausen, C. A. 2005. Determining the suitability of lactobacilli antifungal metabolites for inhibiting mould growth. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 977−981.

Yaqub, F., and Shahzad, S. 2015. Effect of fungicides on *in vitro* growth of *Sclerotium rolfsii*. Pakistan Journal of Botany 38: 881−883.

Zancan, W. L., Machado, J. C., Sousa, B. F., and De Matos, M. 2012. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum.* Bioscience Journal Uberlândia 28: 782−789.

Zhan, J., Stefanato, F., and McDonald, B. A. 2006. Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host. Molecular Plant Pathology 7: 259−268.

Zhu, Z. Q., Zhou, F., Li, J. L., Zhu, F. X., and Ma, H. J. 2016. Carbendazim resistance in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* in China and its management. Crop Protection 81: 115–121. doi:10.1016/j.cropro.2015.12.011

Ziogas, B. N., Markoglou, A. N., and Tzima, A. 2002. A non-Mendelian inheritance of resistance to strobilurin fungicides in *Ustilago maydis*. Pest Management Science 58: 908–916.

CONCLUSIONES GENERALES

- La caracterización morfológica y cultural indicó que los 50 aislados fúngicos obtenidos de raíz y tallo del frijol con síntomas de pudrición en campos del norte de Sinaloa pertenecen a *Sclerotium rolfsii* y se encontró diferencia significativa en la virulencia de los aislados.
- Las pruebas de compatibilidad vegetativa agruparon a los 50 aislados de *S. rolfsii* en seis GCVs, esto indica una alta variabilidad genética del patógeno en la región agrícola del norte de Sinaloa, México, sin embargo, los caracteres morfológicos de la colonia y esclerocios no tuvieron relación con respecto a los GCVs, aunque si hubo relación entre la virulencia de los aislados y los GCVs.
- La prueba *in vitro* de sensibilidad para tebuconazol, mostró que los 50 aislados de *Sclerotium rolfsii,* agente causal de la pudrición de raíz y tallo del frijol presentan alta sensibilidad a este fungicida del grupo de los DMIs. En cuanto a metil-tiofanato (del grupo de los MBCs) los 50 aislados de *S. rolfsii* fueron poco sensibles
- Los resultados obtenidos de este estudio, permitirán monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *S. rolfsii* en campos comerciales de frijol a fungicidas tebuconazol y metil-tiofanato.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Se propone evaluar la respuesta a la infección por *S. rolfsii* en los principales cultivares de frijol que se producen en México, con la finalidad de determinar cuáles son los cultivares que presentan tolerancia a esta enfermedad, bajo los diferentes ambientes en los que se desarrolla este cultivo.
- Se sugiere evaluar el grado de variabilidad genética de poblaciones de *S. rolfsii* mediante análisis de secuencias parciales de las regiones de los genes del factor de elongación 1α (EF1-α) y la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (RPB2) y verificar si existe una correlación entre los GCVs y las secuencias de las regiones del gen EF1α y RPB2 que se encuentran en las poblaciones en estudio, ya que el análisis combinado de las secuencias de los genes EF1-α y RPB2 hace posible separar los diferentes GCVs.
- Se recomienda utilizar el fungicida tebuconazol para el control de la pudrición de raíz y tallo del frijol en condiciones de campo, ya que este fungicida presenta excelente actividad en la planta, mediante la eliminación de infecciones. Además de que el riesgo de generar resistencia a tebuconazol, en aislados de *S. rolfsii*, es bajo, en comparación con los fungicidas MBC.
- Se recomienda realizar programas de monitoreo de la resistencia a fungicidas en campos comerciales de frijol, con la finalidad de generar datos que ayuden a establecer estrategias para el uso racional y adecuado del control químico.