

Fungi associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) wilt in Costa Rica

Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica

María del Milagro Granados-Montero* Centro de Investigación en Protección de Cultivos y Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas, Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica; **Néstor Chaves-Barrantes**, Programa de Leguminosas, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica. 183-4050 Alajuela, Costa Rica; **Priscila Chaverri**, ¹Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 11501-2060, San José, Costa Rica y Department of Plant Sciences and Landscape Architecture, University of Maryland, College Park, Maryland, 20742, U.S.A.; **Juan Carlos Hernández-Fonseca**, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), 382-1007 Centro Colón, Costa Rica; **Efraín Escudero-Leyva**.

*Autor para correspondencia: maria.granadosmontero@ucr.ac.cr.

Recibido: 11 de Noviembre, 2020.

Aceptado: 17 de Febrero, 2021.

Granados-Montero MM, Chaves-Barrantes N, Chaverri P, Hernández-Fonseca JC and Escudero-Leyva E. 2021. Fungi associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) wilt in Costa Rica. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 289-301.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2011-1>

Primera publicación DOI: 05 de Marzo, 2021.

First DOI publication: March 05, 2021.

Resumen. Las pudriciones radicales limitan el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris*), y aunque en Costa Rica son frecuentes, la identidad de los hongos asociados a ellas es incierta. El objetivo de esta investigación fue identificar molecularmente los hongos asociados a las pudriciones radicales y marchitez del frijol en las dos principales zonas productoras del país. Entre 2017 y 2020,

Abstract. Root rot limits the performance of beans (*Phaseolus vulgaris*), and although they are frequent in Costa Rica, the identity of the fungi associated with them is uncertain. The objective of this research was to molecularly identify the fungi associated with root rot and wilt of beans in the two main producing areas of the country. Between 2017 and 2020, 120 plants were collected in 20 farms in the Huetar Norte and Brunca regions. Experimental lines (IBC 302-29 and ALS 0536-6) and commercial varieties (Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí and Tayní) were sampled. The symptoms observed in the field were described and isolates were made on chloramphenicol bengal rose water agar, then pure hypha-tip cultures on water agar, which were transferred to potato dextrose agar to determine morphotypes with the use of taxonomic keys. Isolated fungi were also identified by

se recolectaron 120 plantas en 20 fincas de las regiones Huetar Norte y Brunca. Se muestrearon líneas experimentales (IBC 302-29 y ALS 0536-6) y variedades comerciales (Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí y Tayní). Se describieron los síntomas observados en campo y se efectuaron aislamientos en agar agua rosa de bengala cloranfenicol, luego cultivos puros de punta de hifa en agar agua, que se transfirieron a papa dextrosa agar para determinar morfotipos con el uso de claves taxonómicas. Los hongos aislados también se identificaron mediante secuenciación de la región ITS del ADN nuclear ribosomal. Se calculó el porcentaje de frecuencia relativa de morfotipos. Los más frecuentes fueron *Macrophomina phaseolina* (26.7%), *Fusarium oxysporum* (13.6%) y *Athelia rolfsii* (5.6%). A partir de los síntomas de marchitez observados en campo se aislaron los hongos comúnmente descritos en frijol para esas patologías. Es necesario realizar pruebas de patogenicidad para confirmar que son los agentes causales.

Palabras clave: Patógenos de la raíz, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Athelia rolfsii*.

El frijol es consumido por el 97 % de la población costarricense, es un grano fundamental para la seguridad alimentaria y nutricional del país, y su producción está principalmente en manos de pequeños productores (<5 ha) (Hernández-Fonseca, 2009; Rodríguez-González y Fernández-Rojas, 2015). El cultivo enfrenta una serie de limitantes, como las enfermedades, que pueden reducir significativamente la productividad (Schoonhoven y Voysest, 1994). Entre ellas, los patógenos de la raíz como *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. y *Pythium* sp. tienen el potencial de causar pérdidas entre un 80 y 100%

sequencing the ITS region of ribosomal nuclear DNA. The percentage of relative frequency of morphotypes was calculated. The most frequent were *Macrophomina phaseolina* (26.7%), *Fusarium oxysporum* (13.6%) and *Athelia rolfsii* (5.6%). From the wilt symptoms observed in the field, the fungi commonly described in beans for these pathologies were isolated. It is necessary to perform pathogenicity tests to confirm that they are the cause of the infections.

Key words: Soil-borne pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Athelia rolfsii*.

Beans are consumed by 97% of the Costa Rican population, and are a crucial grain for food and nutritional security, and its production is mainly in the hands of small-scale farmers (<5 ha) (Hernández-Fonseca, 2009; Rodríguez-González and Fernández-Rojas, 2015). The crop faces a series of limitations, such as diseases, which may reduce its productivity significantly (Schoonhoven and Voysest, 1994). Among these diseases, root pathogens such as *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. and *Pythium* sp. have the potential to produce losses of 80 to 100% of the yield (Singh and Schwartz, 2010; Méndez-Aguilar *et al.*, 2013).

The most efficient way to manage pathological problems, and particularly soil diseases, is through the use of resistant cultivars (Mendes *et al.*, 2019). Since 1995, in Costa Rica the methodology of participative plant breeding has been used, helping generate varieties with a greater resistance to biotic and abiotic problems, higher productivity and better adapted to conditions of small-scale farming (Hernández *et al.*, 2018).

en rendimiento (Singh y Schwartz, 2010; Méndez-Aguilar *et al.*, 2013).

La manera más eficiente de combatir los problemas patológicos, y en especial las enfermedades del suelo, es a través de la generación de cultivares resistentes (Mendes *et al.*, 2019). Desde 1995, en Costa Rica se trabaja bajo la metodología de fitomejoramiento participativo, lo que ha permitido generar variedades con mayor resistencia a problemas bióticos y abióticos, alta productividad y mejor adaptadas a las condiciones de pequeño productor (Hernández *et al.*, 2018).

El cambio en el uso de variedades comerciales, las alteraciones en el clima y la incorporación de nuevas áreas de cultivo, han favorecido el progreso de epidemias de pudrición radicular en Costa Rica, asociadas principalmente a *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Athelia rolfsii* (sin. *Sclerotium rolfsii*) y *Macrophomina phaseolina* (Araya y Hernández, 2003; Araya y Hernández, 2006). Sin embargo, la presencia de dichos agentes causales no se ha demostrado, y las publicaciones existentes se basan únicamente en la comparación de síntomas de campo con los reportados en la literatura; no hay referencias de aislamientos ni de identificación a nivel molecular. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue identificar morfológica y molecularmente los hongos asociados a las pudriciones radicales y marchitez del frijol común en las principales zonas productoras de Costa Rica.

Para este trabajo, se recolectaron 120 plantas en diferentes estados fenológicos (desde plántulas a plantas en llenado de vainas), distribuidas en ocho fincas de la región Brunca (2017 y 2018) al sureste de Costa Rica, y 12 de la región Huetar Norte (2019 y 2020), al norte del país. Se muestreó en parcelas de las líneas experimentales ALS 0536-6 e IBC 302-29, así como de las variedades comerciales Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí y Taynín (Hernández-Fonseca y Araya-Villalobos,

The change in the use of commercial varieties, climate change and the incorporation of new production areas have benefitted the progress of root rot epidemics in Costa Rica related mainly to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Athelia rolfsii* (sin. *Sclerotium rolfsii*) and *Macrophomina phaseolina* (Araya and Hernández, 2003; Araya and Hernández, 2006). However, the presence of such causal agents has not been proven and existing publications are based only on the comparison of field symptoms with those reported in literature; there are no references of isolations or identification at a molecular level. Due to this, the aim of the present investigation was to identify, both morphologically and molecularly, the fungi associated with root rot and wilting of common bean plants in the main production areas of Costa Rica.

For this investigation, 120 plants in different phenological stages were sampled (from seedlings to plants in filling of pods), distributed into eight farms of the region of Brunca (2017 and 2018) in southeastern Costa Rica, and 12 from the region of Norte (2019 and 2020), in the north of the country. Samples were taken in fields of the experimental lines ALS 0536-6 and IBC 302-29, as well as of the commercial varieties Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí and Taynín (Hernández-Fonseca and Araya-Villalobos, 2009; Hernández-Fonseca and Chaves-Barrantes, 2016).

Three plants with symptoms and three asymptomatic plants were taken from each farm. Asymptomatic plants were collected to isolate endophytic fungi with possible antagonistic abilities. Sections of tissue were taken and washed with soap and water, and were later disinfected with alcohol at 70% for 1 min and isolations were performed with chloramphenicol bengal rose water agar culture medium, and incubated for seven days in the dark, between 23 and 25 °C. This was followed by pure hypha-tip cultures on

2009; Hernández-Fonseca y Chaves-Barrantes, 2016).

Se recolectaron tres plantas con síntomas y tres asintomáticas de cada finca. Las plantas asintomáticas se colectaron para aislar hongos endófitos con posible capacidad antagonista. Se tomaron secciones de tejido y se lavaron con agua y jabón, luego se desinfectaron con alcohol al 70% por 1 min y se realizaron aislamientos en medio de cultivo agar-agua-rosa de bengala-cloranfenicol, se incubaron por siete días en oscuridad, entre 23 y 25 °C. Se realizaron cultivos de punta de hifa en agar-agua 30 g L⁻¹ (3%) y la identificación de morfotipos en papa dextrosa agar (PDA), de acuerdo con las descripciones de Leslie y Summerell (2006) y Seifert *et al.* (2011). Con estos datos se calculó el porcentaje de frecuencia relativa (% FR) de acuerdo con Mueller *et al.* (2004), mediante la fórmula: % FR = (número de aislamientos de cada especie/número total de aislamientos) x 100. Se seleccionaron los más frecuentes para realizar la identificación molecular.

El ADN se extrajo con el kit Prepman Ultra y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores ITS-5 (GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de la región del espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (nrDNA ITS por sus siglas en inglés) (Schoch *et al.*, 2012). Se preparó una reacción de PCR (25 µL) según White *et al.* (1990), los productos se enviaron a Macrogen (USA) para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el uso de Geneious, versión 10.2.3, y se compararon con las disponibles en GenBank por medio del algoritmo BLASTn. Se consideró como identificación positiva de especie si las secuencias obtuvieron similitudes de 100%, como posible especie si obtuvieron 99% (se anotó el sufijo cf.) y si obtuvieron entre 96-98% como especie relacionada (se anotó el sufijo aff.) (Hofstetter *et*

water agar 30 g L⁻¹ (3%), and the identification of morphotypes in potato-dextrose-agar (PDA), following descriptions by Leslie and Summerell (2006) and Seifert *et al.* (2011). Using these data, the percentage of relative frequency (%FR) was calculated following Mueller *et al.* (2004), using the formula: %FR = (number of isolations of each species/total number of species) x 100. The most frequent were selected to carry out molecular identification.

The DNA was extracted using the Prepman Ultra kit and the polymerase chain reaction (PCR) was carried out using primers ITS-5 (GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) and ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) of the region of the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA ITS) (Schoch *et al.*, 2012). A PCR reaction (25 µL) was prepared following White *et al.* (1990), and the products were sent to Macrogen (USA) for purification and sequencing. The sequences obtained were edited and aligned with the use of Geneious, version 10.2.3 and compared with those available in the GenBank using the algorithm BLASTn. A species identification was considered as positive when the sequences had a similarity of 100 %, as a possible species if it obtained 99% (suffix cf. was written), and as a related species if it obtained 96 to 98% (suffix aff. was written) (Hofstetter *et al.*, 2019). For the range of the genus, a similarity of 97% was considered (López *et al.*, 2017).

The 155 isolations recovered from symptomatic and asymptomatic plants were classified into nine morphotypes (Figure 1). The fungi with the highest percentage of relative frequency were *M. phaseolina* (26.7), *F. oxysporum* (13.6) and *A. rolfsii* (5.6).

The recovered fungi varied according to the year and region of sampling. For example, *A. rolfsii* was recovered on all four years of sampling in both

al., 2019). Para el rango de género se consideró una similitud del 97% (López *et al.*, 2017).

Los 155 aislamientos recuperados, tanto de plantas con síntomas como asintomáticos, se clasificaron en nueve morfotipos (Figura 1). Los hongos con mayor porcentaje de frecuencia relativa fueron *M. phaseolina* (26.7), *F. oxysporum* (13.6) y *A. rolfsii* (5.6).

Los hongos recuperados variaron de acuerdo al año y a la región de muestreo. Por ejemplo, *A. rolfsii* fue posible recuperarlo los cuatro años de muestreo en ambas regiones, mientras que *M. phaseolina* solo se aisló en el 2019 en la región Huetar Norte (Cuadro 1).

En plantas con síntomas de marchitez, *M. phaseolina* y *F. oxysporum* fueron aislados con mayor frecuencia en la variedad Cabécar, mientras que, *A. rolfsii* se encontró con mayor frecuencia en las variedades Nambí, Brunca y Chánguena (Cuadro 2). En general, se encontró *F. oxysporum*, *F. solani* y *A. rolfsii* como hongos asociados a plantas con problemas de marchitez, en casi todas las variedades comerciales y líneas experimentales muestreadas.

regions, whereas *M. phaseolina* was only isolated in 2019 in the region of Huetar Norte (Table 1).

In plants with symptoms of wilting, *M. phaseolina* and *F. oxysporum* were isolated more frequently in the variety Cabécar, while *A. rolfsii* was found most often in the varieties Nambí, Brunca and Chánguena (Table 2). In general, *F. oxysporum*, *F. solani* and *A. rolfsii* were found as fungi related to plants with problems of wilting in almost all commercial varieties and experimental lines sampled.

The sequencing of the ITS region showed that the *Fusarium* morphotypes were located in the operative taxonomic units *F. fujikuroi*, *F. solani* and *F. oxysporum*. The fungus classified preliminarily as *M. phaseolina* had a percentage of similarity of 100%. The isolations tentatively defined as *Penicillium* spp. were classified as *P. crustosum*, *P. simplicissimum*, *Penicillium* sp. and *Talaromyces pinophilus* (Table 3). No DNA from *A. rolfsii* was sequenced, since its morphological characteristics were enough to identify it, and they coincided with those described by Kamil *et al.* (2020): cottonlike white mycelium with clamp connections in both

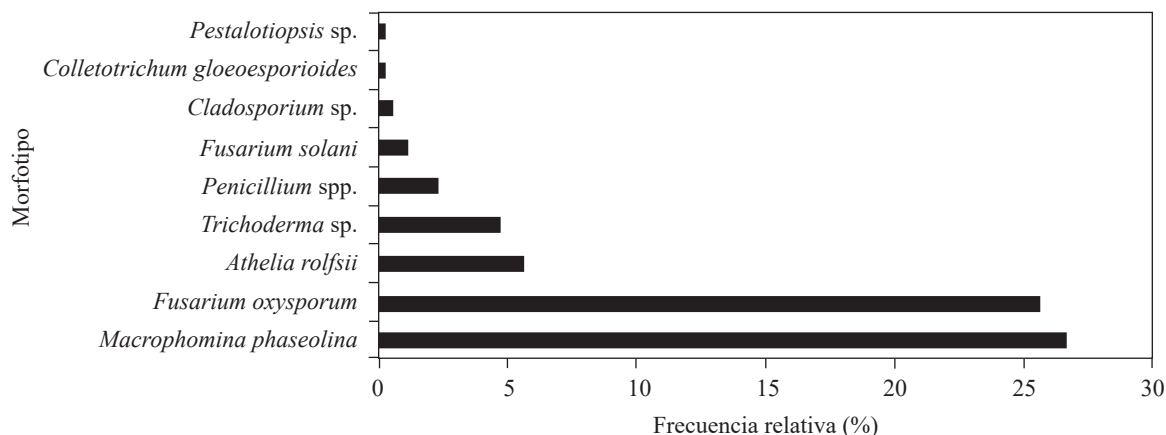


Figura 1. Frecuencia relativa (%) de morfotipos de hongos aislados de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en las regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica durante el año 2017-2020.

Figure 1. Relative frequency (%) of morphotypes of fungi isolated from common bean plants (*Phaseolus vulgaris*) in the regions of Huetar Norte and Brunca, Costa Rica during the years 2017-2020.

Cuadro 1. Frecuencia relativa (%) de morfotipos por región productora, año de recolecta y estado de la planta (con síntoma/sin síntoma) de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Costa Rica. Año 2017-2020.
Table 1. Relative frequency (%) of morphotypes by region of production, year collected and state (with symptoms/asymptomatic) of the common bean plant (*Phaseolus vulgaris*). Costa Rica. Year 2017-2020.

Morfotipo	Brunca ^x (21.3)				Huetar Norte (78.7)			
	2017 ^y		2018		2019		2020	
	16.77		4.51		40.64		38.06	
	€ ^z	₤ ^z	€	₤	€	₤	€	₤
	7.74	9.03	2.58	1.93	21.29	19.35	37.42	0.64
<i>Athelia rolfsii</i>	0.64	0.00	1.29	0.00	0.64	0.00	9.68	0.00
<i>Cladosporium</i> spp.	0.00	0.00	0.00	1.29	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.58	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	23.87	0.64
<i>Fusarium solani</i>	0.64	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	1.29	0.00
<i>Macrophomina phaseolina</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	20.65	19.35	0.00	0.00
<i>Penicillium</i> spp.	0.64	4.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Trichoderma</i> sp.	3.23	3.23	0.64	0.00	0.00	0.00	2.58	0.00

^x Región productora; ^y Año; ^z€: plantas con síntomas, ₤: plantas asintomáticas. / ^x Region of production; ^y Year; ^z€: plants with symptoms, ₤: symptomatic plants

Cuadro 2. Frecuencia relativa (%) de morfotipos por variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), recuperados a partir de plantas con y sin síntomas de marchitez. Regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica. Año 2017-2020.

Table 2. Relative frequency (%) of morphotypes by variety of common bean (*Phaseolus vulgaris*), recovered from plants with and without symptoms of wilting. Regions of Huetar Norte and Brunca, Costa Rica. Years 2017-2020.

Morfotipo	Variedad												
	Brunca	Cabécar	Chánguena	Guaymí	IBC 302-29	ALS 0536-6	Nambí	Nd ^y	Tayní				
	€ ^z	€	₤ ^z	€	€	₤	€	€	₤	€	₤	€	€
<i>Athelia rolfsii</i>	3.23	0.00	0.00	3.23	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	4.52	0.00	0.64	0.00
<i>Cladosporium</i> sp.	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.58	13.55	1.29	0.00	0.00	0.00	1.29	1.29	0.00	4.52	0.00	0.00	3.23
<i>Fusarium solani</i>	1.29	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00
<i>Macrophomina phaseolina</i>	0.00	20.65	9.68	0.00	0.00	9.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Penicillium</i> spp.	0.00	0.00	4.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Trichoderma</i> sp.	0.00	2.58	2.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.93	0.64	0.64	0.00

^z€: plantas con síntomas, ₤: plantas asintomáticas, Nd: no dato, no se conoce la variedad. / ^z€: plants with symptoms, ₤: asymptomatic plants, Nd: no data, the variety is not know.

La secuenciación de la región ITS mostró que los morfotipos de *Fusarium* se ubicaron en las unidades taxonómicas operativas *F. fujikuroi*, *F. solani* y *F. oxysporum*. El hongo clasificado preliminarmente como *M. phaseolina*, obtuvo un porcentaje de similitud del 100%. Los aislamientos tentativamente definidos como *Penicillium* spp. se clasificaron como *P. crustosum*, *P. simplicissimum*, *Penicillium* sp. y *Talaromyces pinophilus* (Cuadro 3). No se realizó secuenciación del ADN proveniente de *A. rolfsii*, porque las características morfológicas se consideraron suficientes para su identificación, y coincidieron con las descritas por Kamil *et al.* (2020), micelio blanco algodonoso con presencia de fibulas, tanto en planta como en medio de cultivo PDA y, el desarrollo de esclerocios esféricos de

plant and PDA culture medium and the development of spherical sclerotia, approximately 1 mm in size, colored white at the beginning and light brown at maturity.

The species with the highest frequency of isolation, *M. phaseolina*, *F. oxysporum* and *A. rolfsii* (Figure 1), are related to root rot and vascular wilting in common bean plants worldwide (Xue *et al.*, 2015; Yesil and Bastas, 2016; Al-Jaradi *et al.*, 2018; Sendi *et al.*, 2019). In Costa Rica they were reported previously (Echandi, 1967; Araya and Hernández, 2003; Villalobos *et al.*, 2009); however, in no previous investigation was there a morphological identification or any molecular analysis to confirm the identity of the pathogenic agent related to the damage described.

Cuadro 3. Identificación molecular, porcentaje de similitud, accesión y longitud de la secuencia de ITS de morfotipos recuperados a partir de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con y sin síntomas de marchitez, según región productora y variedad. Regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica. 2017-2020.

Table 3. Molecular identification, percentage of similarity, accession and length of the ITS sequence of morphotypes recovered from common bean plants (*Phaseolus vulgaris*) with and without symptoms of wilting, depending on the region of production and the variety. Regions of Huetar Norte and Brunca, Costa Rica. 2017-2020.

Identificación	% de similitud	Secuencias de referencia disponibles en GenBank	# accesión en GenBank	Longitud de la secuencia (pares de bases)	Región productora	Variedad	Estado de la planta
<i>Fusarium</i> cf. <i>fujikuroi</i>	99.8	KT192406	MW449097	514	Brunca	IBC302-29	Con síntoma
<i>Fusarium</i> cf. <i>oxysporum</i>	99.5	MK156682	MW449096	503	Brunca	ALS 0536-6	Con síntoma
<i>Fusarium</i> cf. <i>solani</i>	99.9	MK817031	MW449094	503	Brunca	Cabécar	Con síntoma
<i>Macrophomina phaseolina</i>	100.0	MK968305	MW449091	536	Huetar Norte	Guaymí	Con síntoma
<i>Colletotrichum</i> sp.	99.6	KX721643	MW449095	515	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Penicillium</i> aff. <i>crustosum</i>	98.3	KF938410	MW449099	489	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Penicillium</i> cf. <i>simplicissimum</i>	99.7	KM104597	MW449100	490	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Penicillium</i> sp.	100.0	KY552262	MW449093	537	Brunca	Nambí	Sin síntoma
<i>Talaromyces</i> cf. <i>pinophilus</i>	99.5	CP017345	MW449092	527	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>	99.7	MK387946	MW449098	550	Brunca	Nambí	Sin síntoma

aproximadamente de 1 mm, de coloración blanca al inicio y café claro cuando maduran.

Las especies con mayor frecuencia de aislamiento, *M. phaseolina*, *F. oxysporum* y *A. rolfsii* (Figura 1) están asociadas a pudriciones radicales y marchitez vascular en frijol común alrededor del mundo (Xue *et al.*, 2015; Yesil y Bastas, 2016; Al-Jaradi *et al.*, 2018; Sendi *et al.*, 2019). En Costa Rica fueron reportadas con anterioridad (Echandi, 1967; Araya y Hernández, 2003; Villalobos *et al.*, 2009); sin embargo, en ninguno de los trabajos previos se realizó una identificación morfológica o algún análisis molecular para confirmar la identidad del agente patógeno asociado al daño descrito.

Los síntomas observados en campo para la pudrición carbonosa provocada por *M. phaseolina*, coincidieron con los reportados por Sun *et al.* (2019) para esta patología e incluyeron clorosis, marchitez y muerte de plantas adultas con hojas completamente deshidratadas unidas al tallo (Figura 2 A y D), así como decoloración y pudrición en la base del tallo. De acuerdo con Araya y Hernández (2003), esta especie se presenta con frecuencia en la región Huetar Norte, no así en la región Brunca, comportamiento que se repitió en este estudio (Cuadro 1).

Durante el ciclo productivo del 2019 en la región Huetar Norte se presentaron condiciones de sequía y altas temperaturas, propias de un año bajo influencia del fenómeno del Niño (Fernández y Ramírez, 1991; Alvarado, 2019), que favorecieron o predispusieron la infección por *M. phaseolina* (Dhingra y Chagas, 1981), debido a las alteraciones fisiológicas que sufre el hospedante, como reducción de la tasa de transpiración y la conductancia estomática (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). Estas condiciones explicarían porque solo en ese año fue posible recuperar dicho patógeno de plantas marchitas en esa región; mientras que, en los demás años de muestreo no fue aislado. Al respecto, en 2018 se

The symptoms observed on the field for symptoms of carbon rot caused by *M. phaseolina* coincided with those reported for Sun *et al.* (2019) for this pathology and included chlorosis, wilting and the death of adult plants with completely dehydrated leaves attached to the stem (Figure 2 A and D), as well as discoloration and rotting on the base of the stem. According to Araya and Hernández (2003), this species is commonly found in the region of Huetar Norte, but not in the region of Brunca, a behavior which was also displayed in this study (Table 1).

During the 2019 productive cycle, the region of Huetar had drought conditions and high temperatures, typical of a year under the influence of *El Niño* (Fernández and Ramírez, 1991; Alvarado, 2019), which favored or predisposed infection with *M. phaseolina* (Dhingra and Chagas, 1981), due to the physiological alterations undergone by the host, such as a reduction in the transpiration rate and stomatal conductance (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). These conditions would explain why, in that year alone, it was possible to recover this pathogen from wilted plants in the region and in the other sampling years it was not isolated. In this regard, 2018 had rain conditions, typical of a year under the influence of the *La Niña* phenomenon (Fernández and Ramírez, 1991; Alvarado, 2018) and 2017 and 2020 were neutral years, according to the National Weather Institute of Costa Rica (Alvarado, 2017; Alvarado, 2020).

On the other hand, *F. oxysporum* was isolated from seedlings and adult plants with long and sunken lesions and reddish in color (Figure 2 B and E). The symptoms on the field were distributed in patches, although they were occasionally found at random. The damages observed agreed with those indicated for wilting by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) in several investigations: plants with delayed growth, gradual yellowing, defoliation and

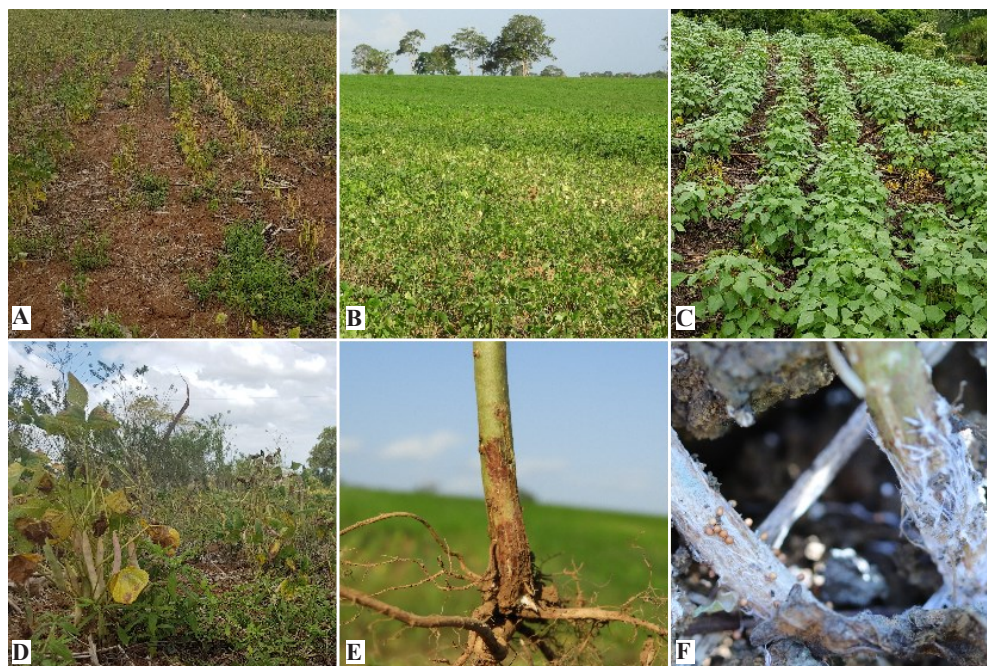


Figura 2. Plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con síntomas de marchitez de las que se aislaron A) y D) *Macrophomina phaseolina*; B) y E) *Fusarium oxysporum*; C) y F) *Athelia rolfsii*. Regiones Brunca y Huetar Norte, Costa Rica. 2018-2020.

Figure 2. Common bean plants (*Phaseolus vulgaris*) with signs of wilting, from which A) and D) *Macrophomina phaseolina*; B) and E) *Fusarium oxysporum*; C) and F) *Athelia rolfsii* were isolated. Regions of Brunca and Huetar Norte, Costa Rica. 2018-2020.

tuvieron condiciones lluviosas propias de un año bajo el fenómeno de la Niña (Fernández y Ramírez, 1991; Alvarado, 2018), y 2017 y 2020 fueron años neutros, según el Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (Alvarado, 2017; Alvarado, 2020).

Por otro lado, *F. oxysporum* se aisló a partir de plántulas y plantas adultas, de lesiones longitudinales y hundidas, de coloración rojiza (Figura 2 B y E). Los síntomas en campo se distribuyeron en parches, aunque en ocasiones se encontraron de forma aleatoria. Los daños observados concordaron con los indicados para marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) en varias investigaciones: plantas con retardo de crecimiento, amarillamiento gradual, defoliación y decoloración de tejidos vasculares de raíces y tallos (Kendrick y Snyder,

discoloration of vascular tissues in roots and stems (Kendrick and Snyder, 1942; Schwartz, 1989; Saremi *et al.*, 2011; Edel-Hermann and Lecomte, 2019). Wilting by Fop is considered one of the main diseases in common bean plants worldwide (Xue *et al.*, 2015).

Both *Macrophomina* and *Fusarium* can be transmitted by seeds. The latter can be found on the surface and underneath it, particularly in the cotyledons (Kendrick, 1934; Singh and Schwartz, 2010; Marcenaro and Valkonen, 2016). In this study, these pathogens were isolated from asymptomatic plants, which may indicate that they are latent in the seeds, as in findings by Parsa *et al.* (2016), who found both fungi in an endophytic form in healthy and disinfected seeds.

1942; Schwartz, 1989; Saremi *et al.*, 2011; Edel-Hermann y Lecomte, 2019). La marchitez por Fop se considera una de las principales enfermedades del frijol común a nivel mundial (Xue *et al.*, 2015).

Tanto *Macrophomina* como *Fusarium* pueden ser transmitidos por semilla. El último, puede localizarse en la superficie y en el interior, especialmente en los cotiledones (Kendrick, 1934; Singh y Schwartz, 2010; Marcenaro y Valkonen, 2016). En esta investigación se aislaron estos patógenos de plantas asintomáticas, lo que podría indicar que se encuentran latentes en la semilla, al igual que lo encontrado por Parsa *et al.* (2016), quienes encontraron estos dos hongos de forma endófito en semillas sanas y desinfectadas.

La enfermedad que provoca *Athelia rolfsii* en frijol es conocida mundialmente como añublo suroño, los síntomas incluyen marchitez y lesiones en la base de la planta, que gradualmente la desecan. Además, frecuentemente, se presenta el desarrollo de micelio grueso, blanco y algodonoso en la lesión, con presencia de esclerocios esféricos de coloración café (Abawi y Pastor-Corrales, 1990; Mahadevakumar *et al.*, 2015), síntomas y signos observados en esta investigación (Figura 2 C y F). *Athelia rolfsii* se obtuvo solo de plantas adultas con colapso completo y al igual que *Fusarium*, presentó distribución agregada.

A partir de los síntomas observados en campo se aislaron los hongos comúnmente descritos en frijol para esas patologías. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de patogenicidad para corroborar que son los causantes de las infecciones. Adicionalmente, se debe realizar una identificación molecular más precisa, de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Talaromyces*, con marcadores como EF-1 α , rpb2 y el gen de la β -tubulina, especialmente, para resolver con mayor exactitud cuáles especies o formas especiales están presentes. Sobre todo, si se toma en cuenta lo hallado por Marcenaro y

The disease caused by *Athelia rolfsii* in the bean plant is known worldwide as southern blight, and its symptoms include wilting and lesions on the base of the plant, which gradually dry it out. Additionally, a development of thick, white, cottonlike mycelia frequently appears in the lesion, along with brown, spherical sclerotia (Abawi and Pastor-Corrales, 1990; Mahadevakumar *et al.*, 2015), all of which are symptoms and signs observed in this investigation (Figure 2 C and F). *Athelia rolfsii* was only obtained from adult plants with a complete collapse and, as in the case of *Fusarium*, it displayed aggregated distribution.

From the symptoms observed on the field, we isolated the fungi described in beans for those pathologies. However, pathogenicity tests must be performed to confirm that they are the cause of the infections. In addition, a more accurate molecular identification is necessary, with markers such as EF-1 α , rpb2 and the gene of β -tubulin, especially in the genera *Fusarium*, *Trichoderma* and *Talaromyces*, to find exactly what species or special forms are present. This is particularly true when considering the findings by Marcenaro and Valkonen (2016), Edel-Hermann and Lecomte (2019) and Guido-Monge (2020), who reported the presence of other species of *Fusarium* related to the common bean; as well as reports by Otadoh (2011), Carvalho *et al.* (2014) and Abdel-Rahim and Abo-Elyousr (2018), who point out that *Trichoderma* and *Talaromyces* may be biocontrol agents.

The advanced commercial varieties and experimental lines sampled were susceptible to these pathogens. Due to their potential to cause losses in yields (Singh and Schwartz, 2010), the genetic breeding program for bean in Costa Rica must pay more attention to these pathologies.

This investigation corroborated, through isolation and molecular identification based on ITS, the identity of the fungi related to the wilting

Valkonen (2016), Edel-Hermann y Lecomte (2019) y Guido-Monge (2020), que reportan la presencia de otras especies de *Fusarium* relacionadas con el frijol común. Así como, lo documentado por Ota-doh (2011), Carvalho *et al.* (2014) y Abdel-Rahim y Abo-Elyousr (2018), que indican que *Trichoderma* y *Talaromyces* podrían ser agentes de biocontrol.

Las variedades comerciales y líneas experimentales avanzadas muestreadas fueron susceptibles a estos patógenos. Por el potencial de causar pérdidas en rendimiento que éstos tienen (Singh y Schwartz, 2010), el programa de mejoramiento genético de frijol en Costa Rica debe poner mayor atención a estas patologías.

Esta investigación corroboró mediante el aislamiento e identificación molecular basada en ITS, la identidad de los hongos asociados a la marchitez del frijol en las principales zonas productoras de Costa Rica, lo que permite desarrollar mejores estrategias de combate de estos patógenos. Se sugiere realizar trabajos de pruebas de patogenidad e identificación molecular con marcadores como EF-1 α , rpb2 y el gen de la β -tubulina.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI), proyecto F14-17, y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR), proyecto B7514, por el financiamiento parcial de esta investigación; al Centro de Investigación en Protección de Cultivos (UCR) por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología, y al Ing. Álvaro Ulate Hernández de la Oficina Nacional de Semillas, por su apoyo en la recolección de muestras.

LITERATURA CITADA

Abawi GS and Pastor-Corrales MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies. CIAT. Cali, Colombia.

of bean plants in the main areas of production in Costa Rica, which helps develop better strategies to manage these pathogens. We suggest performing pathogenicity tests and molecular identification with markers such as EF-1 α , rpb2 and the β -tubulin gene.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Foundation for the Promotion of Research and Transfer of Agricultural Technology of Costa Rica (FITTACORI), project F14-17, and the Vice-rectory of Research of the University of Costa Rica (UCR), project B7514, for the partial funding of this investigation; to the Research Center in Crops Protection (UCR) for allowing the use of the Phytopathology Laboratory facilities, and to Ing. Álvaro Ulate Hernández of the National Seed Office, for his help in the recollection of samples.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- 114 p. [https://books.google.ca/books?id=YxGqzLSYtcMC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&hl=es#v=onepage&q&f=false](https://books.google.ca/books?id=YxGqzLSYtcMC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&hl=es#v=onepage&q&f=false)
- Abdel-Rahim IR and Abo-Elyousr KAM. 2018. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. Microbiological Research 212-213:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.004>
- Al-Jaradi A, Al-Mahmooli I, Janke R, Maharachchikumbura S, Al-Saady N and Al-Sadi AM. 2018. Isolation and identification of pathogenic fungi and oomycetes associated with beans and cowpea root diseases in Oman. PeerJ-Life and Environment 6: e6064. <https://doi.org/10.7717/peerj.6064>
- Alvarado, LF. 2017. Informe 10. Boletín del ENOS No. 101. Fase actual: Neutra. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 2p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/431236/%23%20101>
- Alvarado, LF. 2018. Informe 3. Boletín del ENOS No. 112. Fase actual: La Niña. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 4p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/450551/%23%20112>
- Alvarado, LF. 2019. Informe 10. Boletín del ENOS No. 119. Fase actual: El Niño. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 5p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/470467/%23119>
- Alvarado, LF. 2020. Informe marzo 2020. Boletín del ENOS No. 129. Fase actual: Neutra. Instituto Meteorológico

- Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 2p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/486374/%23129>
- Araya CM y Hernández JC. 2003. Distribución agroecológica de enfermedades del frijol en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 68: 26-33. <http://hdl.handle.net/11554/6067>
- Araya CM y Hernández JC. 2006. Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). San José, Costa Rica. 44p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H20-5247.pdf>
- Carvalho DC, Lobo-Junior M, Martins I, Inglis PW and Mello SCM. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology* 39(5): 384-391. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762014000500005>
- Dhingra OD and Chagas D. 1981. Effect of soil temperature, moisture, and nitrogen on competitive saprophytic ability of *Macrophomina phaseolina*. *Transactions of the British Mycological Society* 77(1): 15-20. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(81\)80173-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(81)80173-8)
- Echandi E. 1967. Amarillamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli*. *Turrialba* 17(4): 409-411.
- Edel-Hermann V and Lecomte C. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* 109(4): 512-530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
- Fernández W y Ramírez P. 1991. El Niño, la Oscilación del Sur y sus efectos en Costa Rica: una revisión. *Tecnología en Marcha* 11(1): 3-10. [https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/2631](https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/2631)
- Guido-Monge, AZ. 2020. Prevalencia de especies micotoxigénicas de *Fusarium* en frijol negro producido en Costa Rica y determinación de su capacidad toxigénica. [Tesis de Licenciatura sin publicar]. Universidad de Costa Rica.
- Hernández-Fonseca JC. 2009. Zonas de cultivo y épocas de siembra. Pp:18. In: Hernández JC y Ramírez L (eds.). *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris)*. Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). San José, Costa Rica. 80p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9533.pdf>
- Hernández-Fonseca JC y Araya-Villalobos R. 2009. Cultivo. Pp:19-26. In: Hernández JC y Ramírez L (eds.). *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris)*. Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). San José, Costa Rica. 80p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9533.pdf>
- Hernández-Fonseca JC y Chaves-Barrantes N. 2016. Nambí. Variedad de frijol resistente a la sequía terminal. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) y Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa. Alajuela, Costa Rica. Plegable. 6p.
- Hernández JC, Chaves NF, Araya R y Beebe S. 2018. "Diquís", variedad de frijol común rojo brillante. *Agronomía Costarricense* 42(1): 127-136. [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v42n01\\_127.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v42n01_127.pdf)
- Hofstetter V, Buyck B, Eyssartier G, Schnee S and Gindro K. 2019. The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Diversity* 96: 243-284. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00428-3>
- Kamil D, Bahadur A, Debnath P, Kumari A, Choudhary SP and Prameeladevi T. 2020. First report of *Athelia rolfsii* causing stem rot disease on Vasaka (*Justicia adhatoda*). *Australasian Plant Disease Notes* 15(1): 33. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00402-y>
- Kendrick JB. 1934. Seed transmission of fusarium yellows of beans. *Phytopathology* 24(10): 1139.
- Kendrick JB and Snyder WC. 1942. *Fusarium* yellows of beans. *Phytopathology* 32(11): 1010-1014.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. Morphological characters. Pp:111-119. In: Leslie JF and Summerell BA. (eds.). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.
- López R, Gómez S, De la Rosa S and Garrido E. 2017. The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology* 26: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.11.004>
- Mahadevakumar S, Tejaswini GS, Janardhana GR and Yadav V. 2015. First report of *Sclerotium rolfsii* causing southern blight and leaf spot on common bean (*Phaseolus vulgaris*) in India. *Plant Disease* 99(9): 1280-1280. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-15-0125-pdn>
- Marcenaro D and Valkonen JPT. 2016. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) in Nicaragua. *PLOS ONE* 11(12): e0168662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168662>
- Mayek-Pérez N, García-Espinosa R, López-Castañeda C, Acosta-Gallegos JA and Simpson J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60(4): 185-195. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0388>
- Mendes LW, de Chaves MG, Fonseca MC, Mendes R, Raaijmakers JM and Tsai SM. 2019. Resistance breeding of common bean shapes the physiology of the rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology* 10: 2252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02252>
- Méndez-Aguilar R, Reyes-Valdés MH y Mayek-Pérez N. 2013. Avances y perspectivas sobre el mapeo genético de la resistencia a las pudriciones de la raíz en frijol común. *Phyton* 82:215-226. [http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/MENDEZ\\_AGUILAR.pdf](http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/MENDEZ_AGUILAR.pdf)
- Mueller G, Bills G and Foster M. 2004. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. London, UK. 777p.
- Otadoh JA, Okoth SA, Ochanda J and Kahindi JP. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Tropical and subtropical agroecosystems* 13(1): 99-107. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v13n1/v13n1a15.pdf>
- Parsa S, García-Lemos AM, Castillo K, Ortiz V, López-Lavalle LAB, Braun J and Vega FE. 2016. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Fungal Biology* 120(5): 783-790. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.017>

- Rodríguez-González S y Fernández-Rojas SE. 2015. Prácticas culinarias asociadas al consumo de frijoles en familias costarricenses. *Agronomía Mesoamericana* 26(1): 145-151. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16937>
- Saremi H, Amiri ME and Ashrafi J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. *African Journal of Biotechnology* 10(66): 14954-14961. <https://doi.org/10.5897/AJB11.258>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoonhoven A y Voyses O. 1994. El frijol común en América Latina y sus limitaciones. Pp:39-66. *In: Pastor-Corrales M y Schwartz HF (eds.). Problemas de producción del frijol en los trópicos*. 2 ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 805p. <https://core.ac.uk/download/pdf/132664941.pdf>
- Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W and Kendrick B. 2011. The genera of Hyphomycetes. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 997 p.
- Sendi Y, Romdhane SB, Mhamdi R and Mrabet M. 2019. Diversity and geographic distribution of fungal strains infecting field-grown common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 153(3):947-955. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01612-y>
- Singh SP and Schwartz HF. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science* 50:2199-2223. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.03.0163>
- Sun SL, Zhu ZD, Duan CX, Zhao P, Sun F, Deng D and He YH. 2019. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on faba bean in China. *Plant Disease* 103(6): 1415. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1660-PDN>
- Schwartz HF. 1989. Occurrence of fusarium wilt of beans in Colorado. *Plant Disease* 73(6): 518. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0518D>
- Villalobos JL, Cárdenas FA y Cordero JM. 2009. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Servicio Fitosanitario del Estado. Diagnóstico Fitosanitario. San José, Costa Rica. 118 p.
- White T, Bruns S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. *In: Innis M, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York. 482p.
- Xue R, Wu J, Zhu Z, Wang L, Wang X, Wang S and Blair MW. 2015. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *PLOS ONE* 10(6): e0127698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127698>
- Yesil S and Bastas KK. 2016. Genetic variability of *Macrophomina phaseolina* isolates from dry beans in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 4(4):305. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i4.305-312.572>