

# Epidemiology of *Bean common mosaic virus* and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes

## Epidemiología de *Bean common mosaic virus* y *Alternaria alternata* en 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*

Agustín Gonzalez-Cruces<sup>1</sup>, Esly Arista-Carmona<sup>1</sup>, Karen Vianey Díaz-Arias<sup>1</sup>, Karina Ramírez-Razo<sup>1</sup>, Adrián Hernández-Livera<sup>1</sup>, Gerardo Acevedo-Sánchez<sup>2</sup>, Coral Mendoza-Ramos<sup>2</sup>, Gustavo Mora-Aguilera<sup>1,2\*</sup>, <sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México, Campus Montecillo. <sup>2</sup>Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF).

\*Corresponding author: morag@colpos.mx

Received: February 28, 2022.

Accepted: April 24, 2022.

Gonzalez-Cruces A, Arista-Carmona E, Díaz-Arias KV, Ramírez-Razo K, Hernández-Livera A, Acevedo-Sánchez G, Mendoza-Ramos C and Mora-Aguilera G. 2022. Epidemiology of *Bean common mosaic virus* and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 188-220.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-8>

Primera publicación DOI: 30 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 30, 2022.

**Abstract.** Research objective was to assess phytosanitary response and epidemiological behavior in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes and develop etiologic-epidemiological methodologies applicable to plant breeding studies. In 2020 spring-summer season, assessments were conducted at flowering (June) and fructification stages (August). Severity was evaluated with a 6-class logarithmic-diagrammatic scale setup in App-

**Resumen.** El objetivo de la investigación fue evaluar la respuesta fitosanitaria y comportamiento epidemiológico en 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris* y desarrollar metodologías etiológico-epidemiológicas aplicables a estudios de mejoramiento genético. En ciclo primavera-verano 2020 se realizaron evaluaciones en fases de floración (junio) y fructificación (agosto). La severidad porcentual se evaluó con escala logarítmica-diagramática de 6-clases configurada en App-Monitor<sup>®</sup> v1.1. La sanidad por genotipo se determinó mediante un Índice de Daño Integrado (IDI), ponderando por intensidad de severidad y corregido por vigor de cobertura-planta (IV), calculado con imágenes (RGB, 14mpx) de dron-Phantom-3 a 5 m altura del centroide de genotipo. Se realizaron pruebas de *t*-Student ( $p = 0.05$ ) y ANOVAs, seguido de Tukey ( $p = 0.05$ ), con SAS v9.4 para las distintas variables experimentales. Se analizó la dependencia espacial de contagio con kriging y variogramas omnidireccionales en SURFER v10. Un total de 43

Monitor<sup>®</sup> v1.1. Genotype health was determined using an Integrated Damage Index (IDI), weighted and adjusted for disease severity and coverage-plant vigor (IV), which was estimated with images (RGB, 14mpx) captured with dron-Phantom-3 at 5 m height from genotype centroid. In SAS v9.4, t-test and ANOVAs, followed by Tukey ( $p = 0.05$ ), were performed for different experimental settings. Disease spatial patterns were analyzed with kriging and omnidirectional variograms in SURFER v10. Forty-three total samples were used for isolation, pathogenicity testing, and molecular identification with universal primers ITS1/ITS4, Nib2F/Nib3R, PBL1v2040/PCR1c for eukaryotes, Potyvirus and Begomovirus, respectively. Final data matrix included 22 variables, 859 observations and 18,898 metadata. *Alternaria alternata* and *Bean common mosaic virus* (BCMV) were identified in 100% of samples analyzed with 99% homology. *Vaquita Negro*, *Garrapato* and *Canario* were statistically the most susceptible genotypes (37.3 - 58% severity) for BCMV, while *Canario* and *Tipo Flor de Mayo* (41.4-42.7%) were for *A. alternata* ( $p = 0.05$ ). *Oti* and *Negro Perla* had higher climatic adaptability and tolerance to both pathogens with  $IV > 0.7$  and  $IDI < 0.43$ . Spatially, BCMV presented random dispersion of foci and a block-edge effect with continuous contagion of up to 5.6 meters. *Vaquita Negro* and *Bayo Mecentral* showed uniform virus spread, presumptively due to high viral transmissibility by seed. In contrast, except for *Tipo Flor de Mayo* and *Canario*, which exhibited significant coalescence of foci, *A. alternata* had spatial dependence of less than 8 plants. Wind and hail damage significantly favored *A. alternata* infection ( $p = 0.05$ ) suggesting its opportunistic condition.

**Key words:** Virus, Fungi, Bean, Geostatistics, Scales, Android application, Severity

muestras se emplearon para aislamiento, pruebas de patogenicidad e identificación genómica con iniciadores universales ITS1/ITS4, Nib2F/Nib3R, PBL1v2040/PCR1c para eucariotes, Potyvirus y Begomovirus, respectivamente. La matriz final incluyó 22 variables, 859 observaciones y 18,898 metadatos. En 100% de muestras analizadas se identificó *Alternaria alternata* y *Bean common mosaic virus* (BCMV) con 99% de homología. *Vaquita Negro*, *Garrapato* y *Canario* fueron estadísticamente los genotipos más susceptibles (37.3 - 58% severidad) a BCMV, mientras *Canario* y *Tipo Flor de Mayo* (41.4 - 42.7%) a *A. alternata* ( $p < 0.05$ ). *Oti* y *Negro Perla* presentaron mayor adaptabilidad climática y tolerancia a ambos patógenos con  $IV > 0.7$  e  $IDI < 0.43$ . Espacialmente, BCMV presentó dispersión aleatoria de focos y efecto de bordo-bloque con contagios continuos de hasta 5.6 metros. *Vaquita Negro* y *Bayo Mecentral* tuvieron dispersión viral uniforme, presuntivamente por alta transmisibilidad viral por semilla. En contraste, con excepción en *Tipo Flor de Mayo* y *Canario*, que exhibieron coalescencia significativa de focos, *A. alternata* tuvo dependencia espacial menor a 8 plantas. El daño por viento y granizo significativamente favoreció la infección de *A. alternata* ( $p = 0.05$ ) sugiriendo su naturaleza oportunista.

**Palabras clave:** Virus, Hongo, Frijol, Geoestadística, Escalas, Aplicación Android, Severidad

Mesoamérica y Sudamérica, con poblaciones genéticamente diferenciables, pero con un ancestro compartido, son el centro de origen y diversificación del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), con al menos 8000 años de domesticación (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Se estiman aproximadamente 400 especies silvestres de *Phaseolus* spp. con gran variabilidad morfológica y

Mesoamerica and South America, with genetically differentiable populations, but with a shared ancestor, are the center of origin and diversification of the common bean (*Phaseolus vulgaris*), with at least 8000 years of domestication (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Approximately 400 wild species of *Phaseolus* spp. with great morphological and physiological variability are estimated, of which five have been domesticated: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* and *P. polyanthus* (De Ron and Santalla, 2013). Taxonomic and phylogenetic studies estimate 52 species in Mexico, of which 55% are endemic, with Jalisco, Durango and Oaxaca being the regions with the greatest diversity (Delgado and Gama, 2015). In Mexico, the crop has great historical agricultural, sociocultural, economic and nutritional relevance. Its diversity and productive adaptability are evidenced by more than 100 registered varieties (SADER and SNICS, 2022), highlighting *Oti* and black testa materials such as *Negro Perla*, *Negro Jamapa*, and others, for yield, grain quality, or resistance/tolerance to plant pathogens. Worldwide, Mexico is the sixth largest producer (FAOSTAT, 2022), and one of the main per capita consumers with an annual average of 10.4 kg. At the end of 2020, 1 086 733 t were reported, of which, 71% are concentrated in Zacatecas (41%), Sinaloa (13%), Nayarit (9%), Chiapas (6%), and Durango (4%) (SIAP, 2020). This production satisfies 90% of domestic demand, and 10% is imported from the USA, Canada and China.

The prolonged process of domestication and adaptation to diverse environments has detonated parasitic processes of co-evolution between *Phaseolus* spp. and different organisms, highlighting 36 species of phytopathogenic fungi e.g., *Alternaria alternata*, *Pseudocercospora griseola*, and *Colletotrichum lindemuthianum*

fisiológica, de las cuales cinco han sido domesticadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* y *P. polyanthus* (De Ron y Santalla, 2013). Estudios taxonómicos y filogenéticos estiman 52 especies en México, de las cuales 55% son endémicas, siendo Jalisco, Durango y Oaxaca las regiones con mayor diversidad (Delgado y Gama, 2015). En México, el cultivo tiene gran relevancia agrícola, sociocultural, económica y nutricional histórica. Su diversidad y adaptabilidad productiva se evidencia con más de 100 variedades registradas e inscritas (SADER y SNICS, 2022), destacando *Oti* y materiales de testa negra como *Negro Perla*, *Negro Jamapa* y otros, por rendimiento, calidad de grano o resistencia/tolerancia a fitopatógenos. A nivel mundial, México representa el sexto productor (FAOSTAT, 2022), y uno de los principales consumidores *per cápita* con 10.4 kg promedio anual. Al cierre agrícola 2020 se reportaron 1 086 733 t, de las cuales 71% se concentra en Zacatecas (41%), Sinaloa (13%), Nayarit (9%), Chiapas (6%) y Durango (4%) (SIAP, 2020). Esta producción satisface 90% de la demanda nacional y 10% se importa de EUA, Canadá y China.

El prolongado proceso de domesticación y adaptación a diversos ambientes ha detonado procesos coevolutivos parasíticos entre *Phaseolus* spp. y diferentes organismos, destacando 36 especies de hongos fitopatógenos p.e., *Alternaria alternata*, *Pseudocercospora griseola* y *Colletotrichum lindemuthianum* (Berrouet-Vanegas *et al.*, 2014); 26 organismos virales p.e., *Bean common mosaic virus*, *Bean golden yellow mosaic virus* y *Bean common mosaic necrotic virus* (Flores-Estévez *et al.*, 2003); 22 especies de nematodos p.e., *Dolichodoros heterocephalus* y *Aphelenchoides ritzemabosi* (Bird y Warner, 2018); nueve oomycetos p.e., *Phytophthora nicotianae* y *Pythium irregulare* (Watanabe *et al.*, 2007); y seis especies bacterianas (p.e., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Curtobacterium*

(Berrouet-Vanegas *et al.*, 2014); 26 viral organisms, e.g., *Bean common mosaic virus*, *Bean golden yellow mosaic virus*, and *Bean common necrotic mosaic virus* (Flores-Estévez *et al.*, 2003); 22 nematode species, e.g., *Dolichodorus heterocephalus*, and *Aphelenchoides ritzemabosi* (Bird and Warner, 2018); nine oomycetes, e.g., *Phytophthora nicotianae*, and *Pythium irregulare* (Watanabe *et al.*, 2007); and six bacterial species (e.g., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Curvobacterium flaccumfaciens*, and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) (Torres *et al.*, 2009; Gent *et al.*, 2005). Some of these organisms can be endemic, cause syndromes, or occur in mixed infections compromising yield and varietal stability (Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012; Mena and Velázquez, 2010; Estrada-Gómez *et al.*, 2004; Flores-Estévez *et al.*, 2003).

Seed, as the main sowing practice for *P. vulgaris*, represents one of the main risks for the dissemination of Potyvirus, Begomovirus and fungi such as *Alternaria* spp. (Subramanya, 2013). These organisms are widely distributed in Mexico, although with limited epidemiological studies. Systemic viral infections in beans, from infected seed, may cause greater productive detriment and loss of plant vigor due to chronic physiological alterations. Symptomatically, these can be expressed as poor plant development, dwarf, flower, and fruit abortion, and mosaics of yellow to golden tones, chlorosis, epinasty, distortion, and greening of the nervures on leaves (Rojas *et al.*, 2018). In addition, 75% of bean pathogenic viruses are associated with insect vectors (aphids and whiteflies) increasing transmission and dispersal between plants and crop fields (Gilbertson *et al.*, 2015). Among fungal problems, *Alternaria* spp. is not considered of high productive impact on beans despite its endemic status and to cause a typical blight with concentric necrotic spots affecting leaf tissue, pods and seeds

*flaccumfaciens* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) (Torres *et al.*, 2009; Gent *et al.*, 2005). Algunos de éstos organismos pueden ser endémicos, presentar síndromes u ocurrir en infecciones mezcladas comprometiendo la producción y estabilidad de variedades (Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012; Mena y Velázquez, 2010; Estrada-Gómez *et al.*, 2004; Flores-Estévez *et al.*, 2003).

La semilla, como principal medio de siembra de *P. vulgaris*, representa uno de los principales riesgos de diseminación de Potyvirus, Begomovirus y hongos como *Alternaria* spp. (Subramanya, 2013). Estos organismos tienen amplia distribución en México, aunque con limitados estudios epidemiológicos. Infecciones virales sistémicas en frijol, a partir de semilla infectada, causan mayor detrimento productivo y pérdida de vigor de planta debido a las alteraciones fisiológicas crónicas, las cuales se expresan sintomatológicamente por disminución en desarrollo vegetativo, enanismo, aborto de flores y frutos, y en hojas con mosaicos de tonalidades amarillas a dorado, clorosis, epinastia, distorsión y enverdecimiento de nervaduras (Rojas *et al.*, 2018). Adicionalmente, 75% de virus fitopatógenos en frijol están asociados a insectos-vectores (áfidos y moscas blancas) en transmisión y dispersión entre plantas y sembradíos del cultivo (Gilbertson *et al.*, 2015). Entre los problemas fungosos, *Alternaria* spp., no es considerado de alto impacto productivo en frijol a pesar de su condición endémica y causar un tizón típico con manchas necróticas concéntricas que afectan tejido foliar, vainas y semillas con defoliación en fases avanzadas (Mena y Velázquez, 2010). La transmisión de *Alternaria* spp. por semilla representa un riesgo fitosanitario adicional que debe investigarse (Prasad y Ahir, 2013; Moraes y Menten, 2006).

En el cultivo de frijol, estratégico en la seguridad alimentaria de México, estudios sistemáticos

with defoliation in advanced stages (Mena and Velázquez, 2010). The transmission of *Alternaria* spp. by seed represents an additional phytosanitary risk that should be investigated (Prasad and Ahir, 2013; Moraes and Menten, 2006).

In the bean crop, strategic in Mexico's food security, systematic and comprehensive studies that articulate health, genetic, and production are limited. This approach would represent a paradigm shift that implies a regional, multidimensional and multi-pest vision to analyze the parasitic and epidemiological processes associated with production risks (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). The objective of this research was to develop etiologically-epidemiological methodologies applicable to breeding programs in bean (*P. vulgaris*) with an integral productive and phytosanitary aim. For this purpose, 12 genotypes of *P. vulgaris*, exposed to natural infections of plant pathogens, were studied in two contrasting phenological events during the spring-summer 2020 season in a region of Mexican central highlands.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental unit.** In May 2020, spring-summer season, a 5 000 m<sup>2</sup> plot was selected at the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Mexico State. Twelve *Phaseolus vulgaris* genotypes were sown in randomized blocks: *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Tipo Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco*, *Canario*, *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro*, *Negro Perla*, *Vaquita Negro*, *Garrapato*, *OTI*, and *Segregante OTI* (Figure 1A). Each genotype was established in 25 rows 13 m long with 80 cm, and 2 m spacing between furrows and blocks, respectively. A barrier of five maize (*Zea mays*) rows delimited the experimental area. A semi-technological agronomic management

e integrales que articulen sanidad, genotecnia y producción son limitados. Este enfoque representaría un cambio de paradigma que implica una visión regional, multidimensional y multiplaga para analizar procesos parasíticos y epidemiológicos asociados a riesgos productivos (Mora-Aguilera *et al.*, 2021). El objetivo de esta investigación fue desarrollar metodologías etiológico-epidemiológicas aplicables a estudios de mejoramiento genético del frijol (*P. vulgaris*) con un propósito integral productivo y fitosanitario. Para este fin se estudiaron 12 genotipos de *P. vulgaris*, expuestos a procesos naturales de infección microbiológica, en dos eventos fenológicos contrastantes durante el ciclo primavera-verano 2020 en una región del altiplano mexicano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Unidad experimental.** En mayo 2020, ciclo primavera-verano, se seleccionó una parcela de 5 000 m<sup>2</sup> en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. Se sembraron en bloques aleatorios 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*: *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Tipo Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco*, *Canario*, *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro*, *Negro Perla*, *Vaquita Negro*, *Garrapato*, *OTI* y *Segregante OTI* (Figura 1A). Cada genotipo se estableció en 25 surcos de 13 m de largo con 80 cm y 2 m de separación entre surco y bloques, respectivamente. Una barrera de cinco surcos de maíz (*Zea mays*) delimitó el área experimental. Se aplicó un manejo agronómico semitecnificado con actividades convencionales de fertilización, aporque, control de malezas y riego rodado complementario. En el centroide de la unidad experimental se instaló un sensor climático *HOBO u23 Pro v2* para medición de humedad relativa (HR) y temperatura (°C) a intervalos de 30 min entre



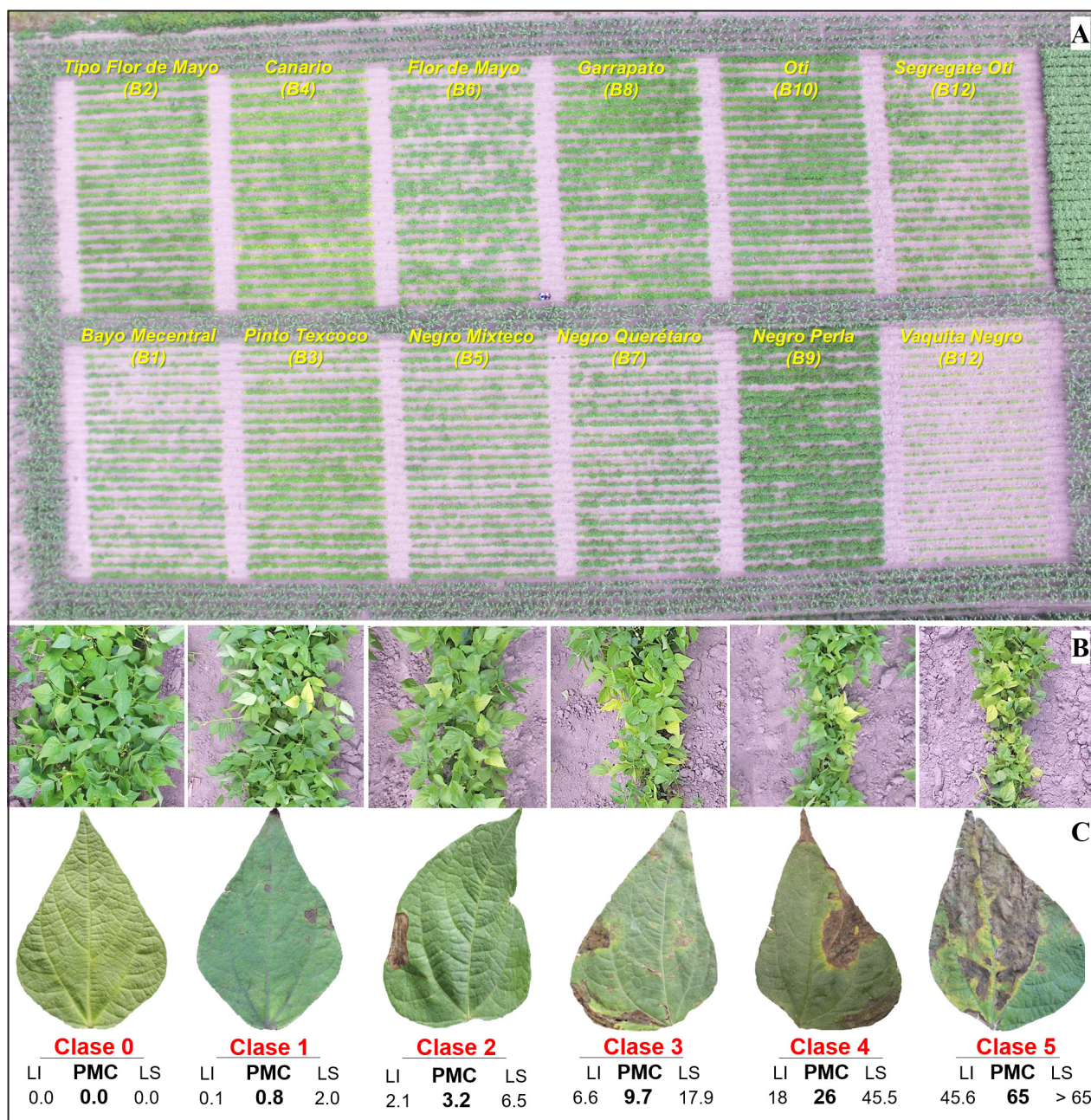


Figure 1. A) Experimental design of 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes randomly distributed under field conditions. Aerial image captured on June 2, 2020, at 50 m from the centroid of the experimental unit using a Phantom 3 DJI® drone. Six-class logarithmic-diagrammatic scale to evaluate virus disease severity, estimated with percentage of mosaic-chlorosis-deformation leaf tissue in a 70 cm row-section (B), and to evaluate blight severity estimated with percentage of necrotic leaf area (C). The scale values apply to both diseases. LI, LS and PMC correspond to the lower, upper and midpoint of class in percentage units, respectively. Spring-Summer 2020 cycle.

Figura 1. A) Diseño experimental de 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris* distribuidos al azar en condiciones de campo. Imagen aérea captada el 2 de junio 2020 a 50 m del centroide del bloque experimental mediante un dron Phantom 3 DJI®. Escala logarítmica-diagramática de seis clases para evaluar severidad viral, estimado con porcentaje de tejido foliar clorótico en una sección de 70 cm de surco (B), y para evaluar severidad de tizón estimado con porcentaje de área foliar necrótico (C). Los valores de la escala aplican para ambas enfermedades. LI, LS y PMC corresponden a los límites inferior, superior y punto medio de clase en unidades porcentuales, respectivamente. Ciclo Primavera-Verano 2020.

was implemented with conventional fertilization, hilling, weed control, and complementary irrigation. A *HOBO u23 Pro v2* climate sensor was installed at the centroid of the experimental unit to measure relative humidity (RH) and temperature (°C), at 30 min intervals, between 1-June and 15-August 2020. Complementarily climatic data were obtained from the meteorological station of the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

**Experimental variables and severity.** Using App-Monitor® v1.1 Android®, available at PlayStore® (CP-LANREF, 2021), the coordinates, spatial location (state, municipality, and locality), crop name, plot extension, crop phenology, technification, irrigation, plantation density, and owner's name were recorded in the *characterization digital module*. Epidemiological variables were evaluated in 13 plants/row in 5-6 rows/genotype by means of a 1 x 2 discontinuous systematic sampling. Two evaluations were made, one on flowering (6-June), and other on the fruit setting stage (10-August). Per plant, the virus symptoms severity, and leaf blight, the two infectious problems with the highest occurrence among genotypes, were evaluated. In addition, the presence or absence of *Bemisia* sp. and *Aphis* spp., as potential virus vectors, was reported. Percentage of severity was evaluated using a 6-class logarithmic-diagramatic scale (González-Cruces *et al.*, 2020). Class midpoint (CMP), lower limit (LL) and upper limit (UL) were calculated in 2-Log v2.0 employing the parameters of *Number of classes* = 6 and  $Y_{max} = 65\%$  (CP-LANREF, 2018. Unpublished). With virus symptoms, severity represented the percentage of mosaic-chlorosis-deformation tissue in a 70 cm row-section (Figure 1B); in blight, severity indicated the necrotic percentage of leaf area of the most infected leaflet/plant (Figure 1C). The severity scales were configured in App-Monitor®. A total of 12 assessors performed the

1-junio y 15-agosto 2020. Complementariamente se obtuvieron datos climáticos de la estación meteorológica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

**Variables experimentales y severidad.** Mediante App-Monitor® v1.1 Android®, disponible en PlayStore® (CP-LANREF, 2021), se registró en el *módulo digital de caracterización* las coordenadas, ubicación espacial (estado, municipio y localidad), nombre del cultivo, superficie, fenología, tecnificación, riego, densidad de plantación y nombre de propietario. Las variables epidemiológicas se evaluaron en 13 plantas/surco en 5-6 surcos/genotipo mediante un muestreo sistemático discontinuo 1 x 2. Se realizó una evaluación en el evento fenológico de floración (6-junio) y otra en fructificación (10-agosto). Por planta, se evaluó la severidad de síntomas virales y de un tizón foliar, los dos problemas infecciosos con mayor ocurrencia entre genotipos. Adicionalmente, se reportó presencia o ausencia de *Bemisia* sp. y *Aphis* spp., como potenciales vectores de virus.

El porcentaje de severidad se evaluó mediante una escala logarítmica-diagramática de 6-clases (González-Cruces *et al.*, 2020). El punto medio de clase (PMC), límite inferior (LI) y superior (LS) se calcularon en 2-Log v2.0 empleando los parámetros de *Número de clases* = 6 y  $Y_{max} = 65\%$  (CP-LANREF, 2018. No publicado). En virosis, la severidad representó el porcentaje de tejido con mosaico-clorosis-deformación en una sección de 70 cm de surco (Figura 1B); en tizón, la severidad indicó el porcentaje necrótico de área foliar del foliolo más infectado/planta (Figura 1C). Las escalas de severidad se configuraron en App-Monitor®. Un total de 12 evaluadores realizaron las mediciones en cada fecha. Los datos se almacenaron en la App y posteriormente se exportaron en MS Excel para integración de la matriz epidemiológica y análisis



measurements on each date. Data were stored in the App and subsequently exported in MS Excel for integration of the epidemiological data matrix and further system approach analysis (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

**Vigor Index.** A coverage-plant vigor analysis was carried out during the flowering stage, assisted by 14 mpx RGB digital aerial images captured by a DJI® Phantom 3 drone between 15:00 and 17:00 h. The flights were performed in vertical trajectory from the centroid of the experimental unit (50 m height) and of each plot per genotype (3 and 5 m). The images were processed with Gimp® v2.10.20. By genotype, a *Coverage Vigor Index (IV)* =  $[(CF_{Gi})/(AT_{Gi})]*100$  was obtained, where *Gi* is genotype-*i*, *CF* is coverage-plant area, and *AT* is total area (soil + coverage-plant).

**Integrated Damage Index.** In order to evaluate integrated health, with virus and blight severity data, and the *Vigor Index* as a correction factor, an *Integrated Damage Index* was calculated by genotype:  $(IDI) = [(3(\bar{x}CV_{Gi}) + 1 (\bar{x}AL_{Gi}))/260] + (1-IV_{Gi})$ , where *Gi* is genotype-*i*, *CV* percentage of virus disease severity, *AL* percentage of blight severity, and *IV* *Coverage Vigor Index*.

**Sampling of plant material.** In order to identify the agent(s) associated with blight, five samples were collected from the three genotypes with the highest incidence: *Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco*, and *Canario*. Samples were collected targeting leaflets with concentric necrotic spots and leaf with 1 - 3 severity classes (0.01 - 20%) of the severity scale (Figure 1C). For virus symptoms, 20 and 18 trifoliolate samples were collected with mosaic-epinasty and severe chlorosis-wrinkling symptoms, putatively associated with Potyvirus and Begomovirus, respectively. Sampling was representatively performed on the 12 genotypes.

bajo un enfoque de sistemas (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

**Índice de Vigor.** Se realizó un análisis de cobertura foliar en fase de floración, asistido por imágenes aéreas digitales RGB de 14 mpx capturadas mediante dron Phantom 3 DJI® entre las 15:00 y 17:00 h. Los vuelos se realizaron en trayectoria vertical desde el centroide de la unidad experimental (50 m de altura) y de cada parcela por genotipo (3 y 5 m). Las imágenes se procesaron con Gimp® v2.10.20. Por genotipo, se obtuvo un *Índice de Vigor de Cobertura (IV)* =  $[(CF_{Gi})/(AT_{Gi})]*100$ , donde *Gi* es el genotipo-*i*, *CF* área de cobertura foliar y *AT* es área de cobertura total (suelo + cobertura foliar).

**Índice de Daño Integrado.** Con el objetivo de evaluar la sanidad integral, con datos de severidad de virus y tizón, y el *Índice de Vigor* como factor de corrección, se calculó un *Índice de Daño Integrado* por genotipo  $(IDI) = [(3(\bar{x}CV_{Gi}) + 1 (\bar{x}AL_{Gi}))/260] + (1-IV_{Gi})$ , donde *Gi* es el genotipo-*i*, *CV* porcentaje de severidad viral, *AL* porcentaje de severidad de tizón e *IV* *Índice de Vigor de Cobertura*.

**Colecta de material vegetal.** Con el fin de identificar el agente(s) asociado al tizón se colectaron cinco muestras en los tres genotipos con mayor incidencia: *Tipo Flor de Mayo*, *Pinto Texcoco* y *Canario*. Las muestras se colectaron de forma dirigida a foliolos con manchas necróticas concéntricas y severidad de hoja con clases 1 - 3 (0.01 - 20%) de la escala de severidad (Figura 1C). Para síntomas virales, se colectaron 20 y 18 muestras trifoliadas con síntomas de mosaico-epinastia y clorosis-arrugamiento severo, putativamente asociados a Potyvirus y Begomovirus, respectivamente. El muestreo se realizó representativamente en los 12 genotipos.

**Aislamiento y caracterización del organismo asociado al tizón.** Un total de cinco hojas sintomáticas del genotipo *Tipo Flor de Mayo* se cortaron



**Isolation and characterization of the blight-associated organism.** A total of five symptomatic leaves of the genotype *Flor de Mayo* were cut into 10 5-mm squares from the marginal lesion zone and disinfested for 2 min with 1% sodium hypochlorite (NaClO), followed by three washes with sterile distilled water. Five mycelial growths were re-isolated and incubated in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium (Difco®). After seven days, the sporulation pattern, conidiophores and conidia were reviewed using a stereo microscope (IROSCOPE YZ-6). With the hyphal tip technique, the isolates were purified on PDA and a mycelial growth characterization was performed. Mycelial color, morphology, and conidial morphometry were determined on 64 conidia/isolate. Fixed slides were made for compound microscopy (Velab VE-B2 of 10x and 40x) integrated to the Motic Images Plus v2.0 program. Identification was performed with taxonomic keys (Simmons, 2007; Barnet and Hunter, 1998). The characterization of isolates was documented photographically using a Canon EOS REBEL T6, 24.1 MP®.

**Koch's postulates.** Twelve apparently healthy *Flor de Mayo* leaflets (4-5 cm wide and 5-6 cm long) were selected. They were disinfested with the previously described technique and dried in a laminar flow hood for 30 min. The 12 leaflets were placed individually in the center of Petri dishes, used as humid chambers, with an upper mesh and sterile absorbent paper below. Three treatments were carried out with three replicates and an absolute control. The treatments were inoculum of pure FPTA2h, FPTA3h, and FPTA4h isolates obtained from leaf blight and selected at random. Four discs with full mycelial growth (0.5 cm diameter)/isolate were distributed on the upper leaf blade. The absolute control consisted of leaflets without inoculation. The Petri dishes

en 10 cuadros de 5 mm a partir de la zona marginal de lesión y desinfectaron por 2 min con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Se reaisló e incubó en cajas Petri con medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Difco®) five crecimientos miceliales. Después de siete días se revisó el patrón de esporulación, conidióforos y conidias mediante un microscopio estereoscópico (IROSCOPE YZ-6). Con la técnica de punta de hifa se purificaron los aislados en PDA y se realizó la caracterización del crecimiento micelial. Se determinó coloración micelial, morfología y morfometría conidial en 64 conidios/cepa. Se realizaron preparaciones fijas para microscopio compuesto (Velab VE-B2 de 10x y 40x) integrado al Programa Motic Images Plus v2.0. La identificación se efectuó con claves taxonómicas (Simmons, 2007; Barnet y Hunter, 1998). La caracterización de aislados se documentó fotográficamente mediante una cámara Canon EOS REBEL T6, 24.1 MP®.

**Postulados de Koch.** Se seleccionaron 12 folíolos de *Flor de Mayo* (de 4-5 cm de ancho y 5-6 cm de largo) aparentemente sanos. Se desinfectaron con la técnica previamente descrita y se secaron en campana de flujo laminar durante 30 min. Los 12 folíolos se colocaron individualmente al centro de cajas de Petri, acondicionadas como cámaras húmedas, con una malla superior y papel absorbente estéril al fondo. Se realizaron tres tratamientos con tres repeticiones y un testigo absoluto. Los tratamientos fueron inóculo de las cepas puras FPTA2h, FPTA3h y FPTA4h aisladas del tizón foliar y seleccionadas al azar. En el haz de cada folíolo se distribuyeron cuatro discos con crecimiento micelial (0.5 cm diámetro) / cepa. El testigo absoluto consistió en folíolos sin inoculación. Las cajas Petri se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 °C y 90% de humedad relativa (HR) con fotoperiodo 12:12 h durante 7 d.

were incubated in a growth chamber at 25 °C and 90% relative humidity (RH) with a 12:12 h photoperiod for 7 d. Seven days after inoculation, the pathogenicity of each strain was evaluated by recording the presence or absence of typical blight symptoms. Six symptomatic leaves were selected, and the infective organism was re-isolated in Petri dishes with PDA. One colony per leaf was taken at random for morphological characterization.

**Extraction of total nucleic acids.** Extraction of total DNA from five, and total DNA and RNA from 5 and 37 samples was performed by the modified AP (SDS1%) method (Green and Sambrook, 2012). A total of 0.1 g of pure culture mycelium and leaf tissue was used for identification by partial genomic sequence of the fungus and putative viral agent(s), respectively. Optimal thresholds of nucleic acid concentration and purity were quantified with a NanoDrop spectrophotometer 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, USA).

**Selection and in silico primers validation for genomic identification.** Based on viral-like symptomatology in the field, infection of a member(s) of Potyvirus and/or Begomovirus genus was assumed. For genomic identification, three universal primer pairs were selected based on amplification on: **1)** the nuclear inclusion coding region of protein B (NIb) in Potyvirus genomes; **2)** the ORF BL1 of DNA-B in Begomovirus; and **3)** the ITS region of the rDNA for eukaryotes (Table 1). The primers specificity associated with criteria 1 and 2 was assessed by local alignment using Blast® with genomic sequences registered at the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). For pathogens putatively associated with viral symptoms, a set of 22 nucleotide sequences specific for *Bean golden yellow mosaic virus* and *Bean dwarf mosaic virus* (Begomovirus), and

Siete días después de la inoculación se evaluó la patogenicidad de cada cepa registrando presencia o ausencia de síntomas típicos de tizón. Se seleccionaron seis hojas sintomáticas y se reisoló al organismo infectivo en cajas Petri con PDA. Se tomó al azar una colonia por hoja para la caracterización morfológica.

**Extracción de ácidos nucleicos totales.** La extracción de ADN de cinco, y ADN y ARN total de un total de 37 muestras se realizó por el método AP (SDS1%) modificado (Green y Sambrook, 2012) a partir de 0.1 g de micelio de cultivo puro y tejido foliar para identificación por secuencia genómica parcial del hongo y del putativo agente(s) viral, respectivamente. Umbrales óptimos de concentración y pureza de ácidos nucleicos se cuantificaron en espectrofotometría con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA).

**Selección y validación in silico de iniciadores para identificación genómica.** Con base en la sintomatología de tipo viral en campo se asumió la infección de un miembro(s) del género Potyvirus y/o Begomovirus. Para la identificación genómica, se seleccionaron tres pares de iniciadores universales con base en criterios de amplificación sobre: **1)** La región codificadora de la inclusión nuclear en la proteína B (NIb) en genomas de Potyvirus; **2)** el ORF BL1 del ADN-B en Begomovirus; y **3)** la región ITS del rADN para eucariontes (Cuadro 1). La especificidad de iniciadores asociados a los criterios 1 y 2 se evaluó mediante alineamiento local empleando Blast® con secuencias genómicas registradas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para patógenos putativamente asociados a los síntomas virales, se generó un grupo de 22 secuencias de nucleótidos específicas para *Bean golden yellow mosaic virus* y *Bean dwarf mosaic virus* (Begomovirus), y *Bean common mosaic virus*

**Table 1. Name of the selected universal primer, sequence, and amplicon size for genomic identification of Potyvirus and Begomovirus species, and for eukaryotic microorganisms.**

**Cuadro 1. Nombre del iniciador universal seleccionado, secuencia, y tamaño del amplicon para identificación genómica de especies pertenecientes a Potyvirus y Begomovirus, y para microorganismos eucariotes.**

Organismo	Iniciador	Secuencia	Tamaño de Amplicon (pb)	Cita
Potyvirus	NIb2F NIb3R	5' GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA 3' TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC	350	Zheng <i>et al.</i> , 2008
Begomovirus	PBL1v2040 PCR1c	5' CARTGRTCKATCTTCATACA 3' CATATTTACRARWATGCCA	500~650	Rojas <i>et al.</i> , 1993
Hongo	ITS1 ITS4	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' TCCTCCGCTTATTGATATGC	~500	White <i>et al.</i> , 1990

*Bean common mosaic virus* (Potyvirus) reported in America for *P. vulgaris* were selected. The sequences were aligned with the respective primers using the Clustal W algorithm in MEGA 7.0.26 software.

**Fungus molecular identification.** Genomic identification of five fungal isolates was performed by amplifying the ITS region of the ribosomal DNA in a 25 µL final sample composed of: 1X PCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs mix, 400 nM of primers ITS1 and ITS4 (Table 1), 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 40 ng of total DNA and nuclease-free water. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed on the T-100 thermal cycler (BioRad). A processing program was run consisting of initial denaturation at 95 °C for 5 min and 31 cycles with denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 55 °C for 1 min, extension at 72 °C for 90 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplified fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide and visualized with UV light in an imaging system (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).

(Potyvirus) reportados en América para *P. vulgaris*. Las secuencias se alinearon con los iniciadores respectivos empleando el algoritmo Clustal W en el software MEGA 7.0.26.

**Identificación molecular del hongo.** La identificación genómica de cinco cepas fungosas se realizó amplificando la región ITS del ADN ribosomal en una muestra final de 25 µL integrada por: 1X de Buffer PCR, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM del mix dNTPs, 400 nM de los iniciadores ITS1 e ITS4 (Cuadro 1), 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 40 ng de ADN total y agua libre de nucleasas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en el termociclador T-100 (BioRad). Se ejecutó un programa de procesamiento que consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min y 31 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 90 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV en fotodocumentador (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).



**Virus complex molecular identification.** In 20 samples presumptively associated with Potyvirus symptoms, the synthesis of complementary DNA (cDNA) from total RNA was performed in two steps. In the first step, the reaction mixture with: 9.75 µL nuclease-free water, 500 nM per primer (N1b2F - N1b3R) and 2.5 µL total RNA, incubated at 85 °C for 3 min in a T100 thermocycler (Bio-Rad). In the second step, a mixture with: 2 mM mix dNTP's, 1X buffer-RT, 100 U of reverse transcriptase enzyme (M-MLV-RT) and 10 U of ribonuclease inhibitor (RNAsin), all from Promega Corp. USA. The total reaction volume was 20 µL incubated at 44 °C for 60 min, followed by inactivation of the enzyme at 92 °C for 10 min. RT-PCR was performed in a final volume of 25 µL consisting of: 12.5 µL of Gotaq® G2 Hot star mix, 500 nM of N1b2F - N1b3R primers (Table 1) and 2.5 µL of cDNA. The final volume was completed with nuclease-free water. Using the T-100 thermal cycler (BioRad), a program was run consisting of: initial denaturation at 95 °C for 2 min, 35 cycles with denaturation at 95 °C for 45 s, alignment at 45 °C for 45 s, extension at 72 °C for 45 s and a final extension at 72 °C for 5 min.

For 18 putative Begomovirus samples, the PCR reaction mixture had a final volume of 25 µL containing: 1X GoTaq® buffer, 0.2 mM dNTP's mix, 300 nM of the primers PBL1v2040 - PCR1c (Table 1), 0.5 U of GoTaq® G2 and 2 µL of DNA. The final volume was volumetrically gauged with nuclease-free water. The thermocycling program executed was initial denaturation at 95 °C for 3 min, 30 cycles with denaturation at 94 °C for 30 s, alignment at 50 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplified fragments of samples presumptive to Potyvirus and Begomovirus were analyzed by electrophoresis with the methodology analogous to the identification of the fungus.

**Identificación molecular del complejo viral.** En 20 muestras presuntamente asociadas a síntomas de Potyvirus, se realizó en dos pasos la síntesis de ADN complementario (cADN) a partir del ARN total. En el primer paso, la mezcla de reacción con: 9.75 µL de agua libre de nucleasas, 500 nM por primer (N1b2F - N1b3R) y 2.5 µL de ARN total, incubado a 85 °C durante 3 min en un termociclador T100 (Bio-Rad). En el segundo paso, se añadió a la reacción una mezcla con: 2 mM de mix dNTP's, 1X buffer-RT, 100 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV-RT) y 10 U del inhibidor de la ribonucleasa (RNAsin), todos de Promega Corp. EUA. El volumen total de reacción fue de 20 µL incubada a 44 °C durante 60 min, seguido de inactivación de la enzima a 92 °C durante 10 min. La PCR se realizó en un volumen final de 25 µL integrado por: 12.5 µL de mix Gotaq® G2 Hot star, 500 nM de los iniciadores N1b2F - N1b3R (Cuadro 1) y 2.5 µL de cADN. El volumen final se completó con agua libre de nucleasas. Con el termociclador T-100 (BioRad) se ejecutó un programa que consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 45 s, alineamiento a 45 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 45 s y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Para 18 muestras putativas a Begomovirus, la mezcla de la reacción de PCR tuvo un volumen final de 25 µL que contenía: 1X de buffer GoTaq®, 0.2 mM de mix dNTP's, 300 nM de los iniciadores PBL1v2040 - PCR1c (Cuadro 1), 0.5 U de GoTaq® G2 y 2 µL de ADN. El volumen final se aforó con agua libre de nucleasas. El programa de termociclaje ejecutado fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 50 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 45 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados de muestras presuntivas a Potyvirus y Begomovirus se analizaron por

**Sequencing and bioinformatics analysis.** A total of 23 samples that amplified by PCR were sent for nucleotide sequencing (Macrogen® Seoul, Korea). With the sequences and reference sequences for each organism group, bioinformatic analyses were performed including: **1)** Generation of the consensus sequence with the SeqAssem v07 program; **2)** Local alignment with Blast-n® at NCBI; **3)** Evaluation of the percentage of homology and coverage with the amplified genomic region; and **4)** Phylogenetic reconstruction in MEGA v7.0.26 using maximum likelihood and/or maximum parsimony as clustering methods.

**Spatial analysis.** The *intra-* and *inter-*plot geospatial analysis was performed with Golden Surfer® v10. The data matrix by phenological event and genotype was structured with  $x$  = row,  $y$  = plant spacing (fungus) or 70 cm row-section (virus), and  $z$  = percentage of severity of virus symptoms or blight. Geostatistical analysis was performed with the kriging method represented in two-dimensional maps and contours. Spatial dependence and autocorrelation were calculated with omnidirectional variograms fitted to a spherical model. By genotype, the graphic indicators *nugget* ( $n$ ),  $\sigma^2$ -*partial* ( $\sigma^2$ - $p$ ), and sill of  $\sigma^2$  ( $\sigma^2$ - $s$ ) were obtained to determine the level of continuous spatial dependence.

**Abiotic damage associated with fungal infection.** Due to the distribution of blight in the field, predominantly basal on the plant, and record of a hail event at the early crop stage, a simulated hail ( $G$ ), wind ( $V$ ) and soil friction ( $S$ ) damage trial was conducted on leaf tissue of *P. vulgaris* to evaluate its implication in the infection process and blight development under greenhouse conditions. The trial was established with a total of nine asymptomatic *Flor de Mayo* leaflets, distributed

electroforesis con metodología análoga a la identificación del hongo.

**Secuenciación y análisis bioinformáticos.** Un total de 23 muestras que amplificaron por PCR fueron enviadas a secuenciación de nucleótidos (Macrogen® Seúl, Corea). Con las secuencias obtenidas y secuencias de referencia para cada grupo de organismo, se realizaron análisis bioinformáticos que incluyeron: **1)** Generación de la secuencia consenso con el programa SeqAssem v07; **2)** Alineamiento local con Blast-n® en el NCBI; **3)** Evaluación del porcentaje de homología y cobertura con la región genómica amplificada; y **4)** Reconstrucción filogenética en MEGA v7.0.26 usando máxima probabilidad y/o máxima parsimonia como métodos de agrupamiento.

**Análisis espacial.** El análisis geoespacial *intra-* e *inter-*parcelario se realizó con Golden Surfer® v10. La matriz por evento fenológico y genotipo se estructuró con  $x$  = surco,  $y$  = distanciamiento de planta (hongo) o sección de 70 cm de surco (virus), y  $z$  = porcentaje de severidad de síntomas virales o de tizón. El análisis geoestadístico se realizó con el método kriging representado en mapas bidimensionales y contornos. La dependencia y autocorrelación espacial se calculó con variogramas omnidireccionales ajustados a un modelo esférico. Por genotipo, se obtuvieron los indicadores variográficos *nugget* ( $n$ ),  $\sigma^2$ -*parcial* ( $\sigma^2$ - $p$ ), y *sill* o meseta de  $\sigma^2$  ( $\sigma^2$ - $s$ ) para determinar el nivel de dependencia espacial continua.

**Daño abiótico asociados a la infección del hongo.** Debido a la distribución del tizón en campo, predominantemente basal en planta y registro de un evento de granizo en fases tempranas del cultivo, se realizó un ensayo de daños simulados por Granizo ( $G$ ), Viento ( $V$ ) y fricción por Suelo ( $S$ ) en tejido

in three replicates per treatment. The hail effect was simulated by impacting five frozen hydrogel spheres of 0.5 cm diameter at 10 cm from each leaflet. Wind simulation was performed by friction between leaflets by means of air generated with a fan (Taurus rush® 20 inches) at 1300 rpm, during 5 min. For the Soil effect, a total of 2 kg of soil was gradually dispersed over the leaf tissue. Absolute controls were asymptomatic leaflets, without exposure to damage and sprayed with sterile distilled water.

Immediately after the simulation, the upper blade of each leaflet was inoculated by spraying 20000 (C1), 39000 (C2) and 49000 (C3) conidia per mL<sup>-1</sup> of the FPTA2h isolate. Each leaflet was placed in 2 mL tubes immersing the peduncle in sterile distilled water to maintain turgor during the experiment. This material was placed inside polypropylene bags to avoid contamination. From symptomatic leaves, the organism was re-isolated in Petri dishes with PDA eight days after inoculation. Six preparations of direct lesion structures were made for identification under compound microscopy (10x and 40x Velab VE-B2) using the previously cited taxonomic keys. Additionally, a digital collection of 12 images of damaged leaf tissue was generated to quantify the percentage of severity by processing with GIMP 2.10®. The results were analyzed in SAS v9.4 software using ANOVA in a BCA design and the PROC GLM procedure with the combination of simulated damage type (*G*, *V*, *S*, *T*) and concentration (*C<sub>i</sub>*) as treatments.

**Statistical analysis.** An epidemiological matrix with 859 observations, 22 variables, and 18898 total metadata was integrated with MS Excel for statistical analysis in *Statistical Analysis Software* (SAS®) v9.4. Viral symptom severity, blight, *Integrated Damage Index*, and *Vigor Index* were used as response variables, whereas genotype and phenological event were experimental factors.

foliar de *P. vulgaris* para evaluar su implicación en el proceso de infección y desarrollo del tizón en condiciones de invernadero. Se utilizó un total de nueve foliolos asintomáticos del genotipo *Flor de Mayo* distribuidos en tres repeticiones por tratamiento. El efecto Granizo se simuló impactando a 10 cm de cada foliolo cinco esferas de hidrogel congelado de 0.5 cm de diámetro. La simulación de Viento se realizó mediante fricción entre foliolos por medio del aire generado con un ventilador (Taurus rush® 20 pulgadas) a 1300 rpm, durante 5 min. Para el efecto Suelo se utilizó un total de 2 kg de suelo gradualmente dispersado sobre el tejido foliar. Los Testigos absolutos fueron foliolos asintomáticos, sin exposición a daños y asperjado con agua destilada estéril.

Inmediatamente después de la simulación, el haz de cada foliolo se inoculó por aspersión las concentraciones 20000 (C1), 39000 (C2) y 49000 (C3) conidios por mL<sup>-1</sup> cepa FPTA2h. Cada foliolo se colocó en tubos de 2 mL sumergiendo el pedúnculo en agua destilada estéril para mantener la turgencia durante el desarrollo del experimento. Este material se colocó dentro de bolsas de polipapel para evitar contaminación. A partir de hojas sintomáticas se reaisló el organismo en cajas Petri con PDA ocho días después de la inoculación. Se realizaron seis preparaciones de estructuras directas de la lesión para identificación en microscopio compuesto (Velab VE-B2 de 10x y 40x) mediante las claves taxonómicas referidas. Adicionalmente, se generó un acervo digital con 12 imágenes de tejido foliar dañado para cuantificar el porcentaje de severidad mediante procesamiento con GIMP 2.10®. Los resultados se analizaron en software SAS v9.4 mediante ANOVA en un diseño BCA y el procedimiento PROC GLM con la combinación tipo de daño simulado (*G*, *V*, *S*, *T*) y concentración (*C<sub>i</sub>*) como tratamientos.

**Análisis estadístico.** Una matriz epidemiológica con 859 observaciones, 22 variables y 18898



Descriptive analyses were performed by variable and phenological events with PROC UNIVARIATE for normality tests through Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ). Analysis of variance (ANOVA) for a completely randomized design (CRD) with nested replications was performed with PROC GLM and Tukey mean comparison ( $\alpha = 0.05$ ). Comparison between phenological events was performed with *t*-Student ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Morphological and molecular fungus identification.** The FTFMA1h, FPTA2h, FPTA3h, FPTA4h, and FPTA5h fungus isolates were characterized by black mycelial growth with 5 to 8 conidia-chain per conidiophore (Figure 2A). A total of 64 mature conidia of FPTA2h isolate were morphometrically measured, showing an average length and width of 7.53  $\mu\text{m}$  (range 3.8 - 12.3  $\mu\text{m}$ ) and 3.23  $\mu\text{m}$  (range 2 - 4.6  $\mu\text{m}$ ), respectively. Conidium had 3 - 5 transversal, and 1-2 longitudinal septa (Figure 2A). Based on these characteristics, the fungus was identified as *Alternaria alternata* (Berrouet *et al.*, 2014; Simmons, 2007; Barnet and Hunter, 1998).

*A. alternata* was confirmed by molecular amplification of optimal fragments 500-600 bp ITS region. Threshold concentrations of 127.7 - 482.3  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  and purity 1.88 - 2.18 nm were obtained. Five sequences were aligned at NCBI and confirmed the taxonomic identification of *A. alternata* with 99 - 100% homology regarding the *A. alternata* accession AF347031.1. The sequences were registered in GenBank with accession numbers OL229866, OL229867, OL229868, OL229869, and OL229870. The phylogenetic analysis, using the maximum likelihood method ( $i=1000$ ) for ITS region and 100% node support, clustered all five

metadatos totales se integró en MS Excel para análisis estadístico en *Statistical Analysis Software* (SAS®) v9.4. La severidad de síntomas virales, tizón, *Índice de Daño Integrado* e *Índice de Vigor* se emplearon como variables respuesta, mientras que genotipo y evento fenológico fueron factores experimentales. Se realizaron análisis descriptivos por variable y evento fenológico mediante PROC UNIVARIATE para pruebas de normalidad mediante Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ). El análisis de varianza (ANOVA) para un diseño completamente al azar (DCA) con repeticiones anidadas se realizó con PROC GLM y comparación de medias con Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La comparación entre eventos fenológicos se realizó con *t*-Student ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación morfológica y molecular del hongo.** Las cepas fungosas FTFMA1h, FPTA2h, FPTA3h, FPTA4h y FPTA5h se caracterizaron por exhibir crecimiento micelial negro con presencia de 5 a 8 conidios en cadena (Figura 2A). La determinación morfométrica de 64 conidios maduros de la cepa FPTA2h mostró longitud y ancho promedio de 7.53  $\mu\text{m}$  (rango 3.8 - 12.3  $\mu\text{m}$ ) y 3.23  $\mu\text{m}$  (rango 2 - 4.6  $\mu\text{m}$ ), respectivamente. Se identificaron conidios con 3-5 septos y 1-2 longiseptos (Figura 2A). Con base en estas características se identificó al hongo como *Alternaria alternata* (Berrouet *et al.*, 2014; Simmons, 2007; Barnet y Hunter, 1998). La confirmación molecular de *A. alternata* se realizó mediante amplificación de fragmentos óptimos de 500-600 pb ITS. Se obtuvieron umbrales concentración de 127.7 - 482.3  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  y pureza 1.88 - 2.18 nm. El alineamiento de las cinco secuencias en NCBI confirmó la identificación taxonómica de *Alternaria alternata* con rango 99 - 100% homología con la accesión AF347031.1

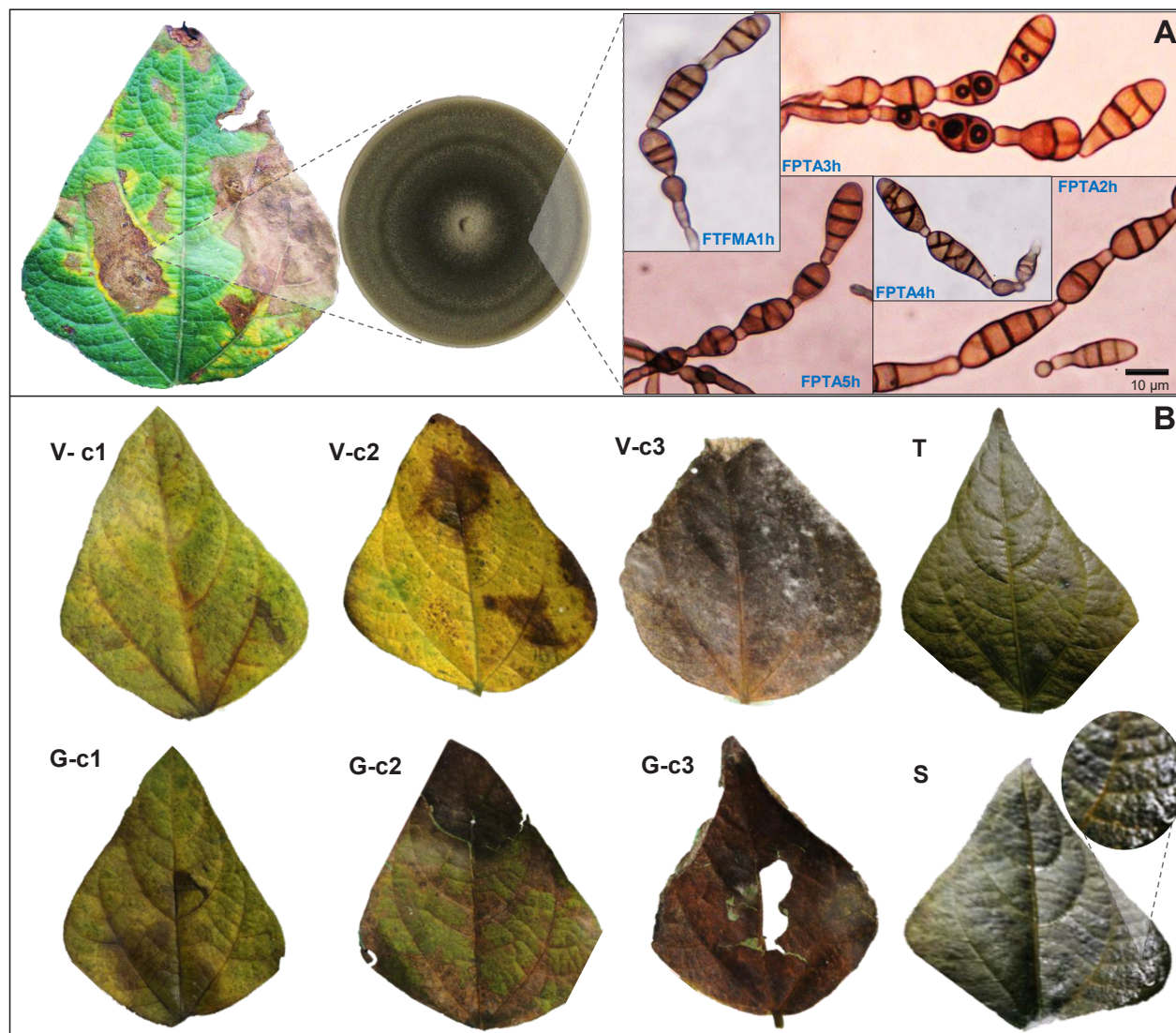


Figure 2. A. *Alternaria alternata* identification by symptom Association - Culturing - Identification based on morphometry of dyciospores in chain, short pedicels, conidiophores (see description in text). B. Simulation of wind (V), hail (G), and soil friction (S) effect damage on *Alternaria alternata* infection under controlled conditions. c1 = 20000, c2 = 39000, c3 = 49000 conidia mL<sup>-1</sup> FPTA2h isolate; T = Control. Except for S, which exhibited a bacterial-type biofilm, mechanical damage was favorable for fungus infection.

Figura 2. A. Identificación de *Alternaria alternata* por Asociación del síntoma – Aislamiento – Identificación por morfometría de dyciosporas en cadena, pedicelos cortos, conidióforos (ver descripción en texto). B. Simulación del efecto de daños por viento (V), granizo (G) y fricción de suelo (S) en la infección de *Alternaria alternata* en condiciones controladas. c1 = 20000, c2 = 39000, c3 = 49000 conidios mL<sup>-1</sup> cepa FPTA2h; T = Testigo. Con excepción de S, el cual exhibió un biofilm de tipo bacteriano, el daño mecánico favoreció la infección del hongo.

sequences with the accession AF347031.1. The reference sequences of *Alternaria alternantherae* (KC584179.1) and *Stemphylium amaranthi* (KU850503.1) were clearly separated from the *A. alternata* node (Figure 3A). However, since *A. alternata* (*Alternaria* sect. *alternaria*) is an evolutionary diverse group, with morphological and molecular ITS attributes potentially overlapping

de *A. alternata*. Las secuencias se registraron en GenBank con los números de accesión OL229866, OL229867, OL229868, OL229869 y OL229870. El análisis filogenético con el método de máxima verosimilitud ( $i=1000$ ) para la región ITS y 100% de soporte de nodo, confirmó la agrupación de las cinco secuencias con la accesión AF347031.1. Las secuencias de referencia para *Alternaria alternan-*

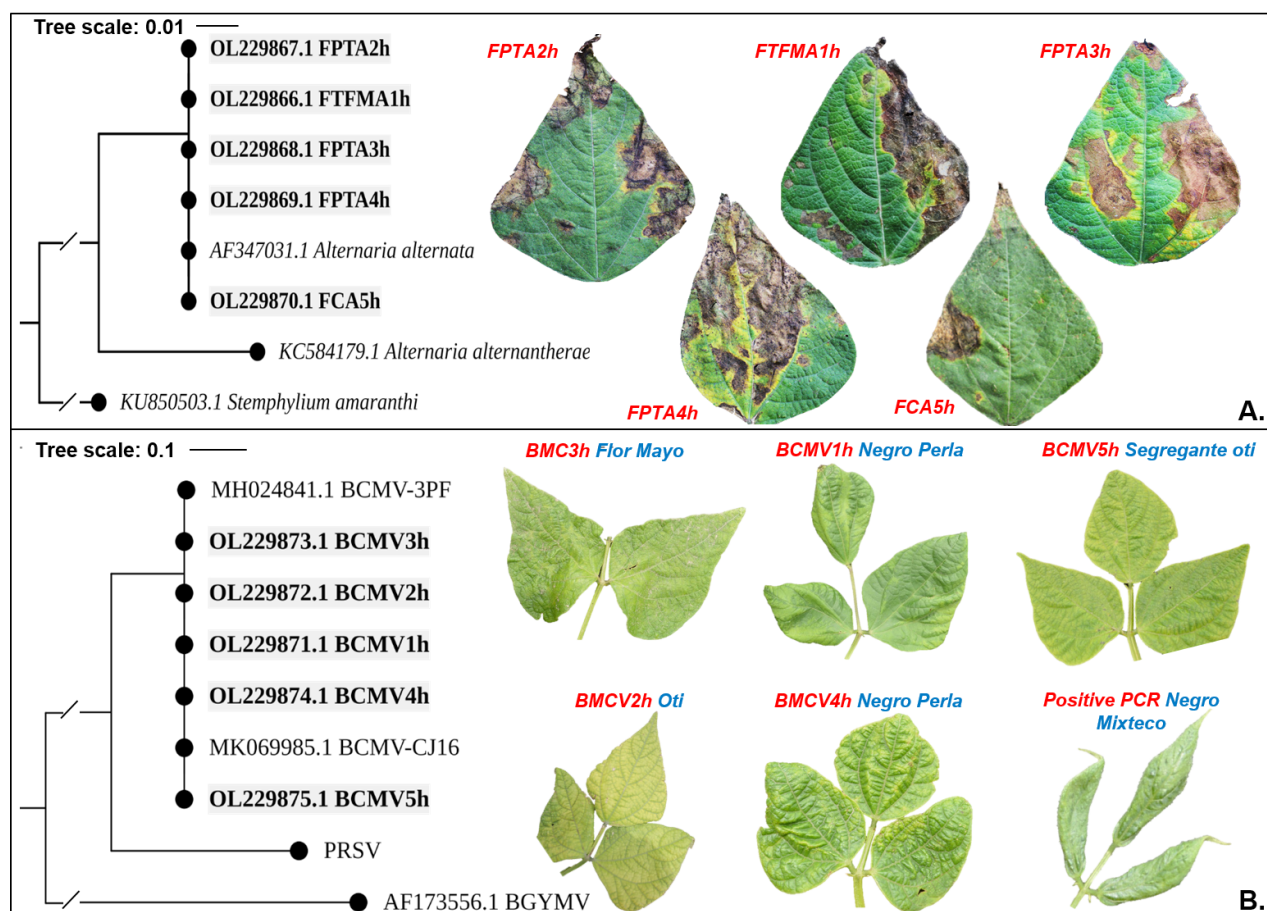


Figure 3. Bioinformatic analysis through amplified sequences of universal genomic regions and maximum likelihood with 1000 Bootstrap repeats. A) *A. alternata* identification through ITS1 and ITS4, HKY+G model with 99% homology with respect to GenBank isolate AF347031.1. B) *Bean common mosaic virus* identification through Nib2F and Nib3R, Tamura-Nei model with 99% homology with two accessions of this virus from GenBank. Bold sequences correspond to samples obtained in this work.

Figura 3. Análisis bioinformático mediante secuencias amplificadas de regiones genómicas universales, máxima verosimilitud y 1000 repeticiones Bootstrap. A) Identificación de *A. alternata* mediante ITS1 y ITS4, modelo HKY+G con 99% de homología respecto del aislado AF347031.1 del GenBank. B) Identificación de *Bean common mosaic virus* con Nib2F y Nib3R, modelo Tamura-Nei con 99% de homología a dos accesiones de este virus del GenBank. Secuencias en negritas corresponden a muestras obtenidas en este trabajo.



among species, complementary studies may be necessary (Armitage *et al.*, 2020).

#### ***Alternaria alternata* pathogenicity tests.**

Pathogenicity of FPTA2h, FPTA3h, and FPTA4h *A. alternata* isolates was confirmed on leaf tissue of *P. vulgaris* genotype *Tipo Flor de Mayo*. The control leaflets did not reproduced symptoms. On average, seven days after inoculation, 100% of leaflets showed symptoms as dark-brown or black necrotic lesions accompanied by chlorotic extending halos. Colonial and conidial morphometry adheres to the taxonomic characteristics of *Alternaria alternata* in all leaflets infected (Simmons, 2007; Barnet and Hunter, 1998), confirming Koch's postulates.

#### **Molecular diagnosis and prevalence of Potyvirus and Begomovirus.**

RT-PCR detected a 100% prevalence of one member of the Potyvirus genus in the samples analyzed (20/20). The 350-bp amplicon for universal primers Nib2F and Nib3R was amplified in all 12 genotypes of *P. vulgaris* samples. The concentration and purity thresholds ranged from 127.7 - 482.3 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  and 1.88 - 2.18 nm, respectively. Sequencing of five representative samples identified *Bean common mosaic virus* (BCMV) specie at 99 - 100% homology with the NCBI accessions MH024841.1 BCMV-3PF and MK069985.1 BCMV-CJ16 of this virus. The phylogenetic construction using Maximum Likelihood, reached 100% node support (Figure 3B). Reference sequences of *Papaya ringspot virus* (PRSV), specie of the Potyvirus genus, and *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), belonging to Begomovirus genus, were separated of the main clade. BCMV confirmatory sequences in this paper were recorded in GenBank with accession numbers OL229871.1, OL229872.1, OL229873.1, OL229874.1, and OL229875.1.

The high incidence of this virus agreed with the 90.2 - 100% reports for Africa (Mwaipopo *et al.*,

*therae* (KC584179.1) y *Stemphylium amaranthi* (KU850503.1) estuvieron distantes del nodo principal de *A. alternata* (Figura 3A). Sin embargo, es necesario remarcar que *A. alternata* conforma un grupo evolutivo diverso (*Alternaria* sect. *alternaria*) con atributos morfológicos y moleculares con ITS que pueden traslaparse entre especies, por lo que podrían requerirse estudios complementarios (Armitage *et al.*, 2020).

#### **Pruebas de patogenicidad de *Alternaria alternata*.**

La patogenicidad de *A. alternata* se comprobó en tejido foliar de *P. vulgaris* genotipo *Tipo Flor de Mayo* con las cepas FPTA2h, FPTA3h y FPTA4h. Los foliolos testigo no reprodujeron síntomas. En promedio, siete días después de la inoculación, el 100% de foliolos mostraron síntomas de lesiones necróticas café-oscuro o negras con halos amarillos. La validación por criterios de morfometría colonial, conidial y corroboración con claves taxonómicas (Simmons, 2007; Barnet y Hunter, 1998), fueron coincidentes con *Alternaria alternata* en el total de foliolos analizados confirmando los postulados de Koch.

#### **Diagnóstico molecular y prevalencia de Potyvirus y Begomovirus.**

Se detectó por RT-PCR una prevalencia del 100% de un miembro del género Potyvirus en las muestras analizadas (20/20). El amplicon de 350 pb para los iniciadores universales Nib2F y Nib3R amplificó en las muestras de los 12 genotipos de *P. vulgaris*. Los umbrales concentración y pureza estuvieron en rango de 127.7 - 482.3 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y 1.88 - 2.18 nm, respectivamente. La secuenciación de cinco muestras representativas determinó la identificación de la especie *Bean common mosaic virus* (BCMV) con 99 - 100% de homología con las accesiones MH024841.1 BCMV-3PF y MK069985.1 BCMV-CJ16 de NCBI para este virus. La reconstrucción filogenética por Maximum Likelihood, tuvo 100% soporte de nodo

2018), although it exceeded that reported previously by Lepe-Soltero *et al.* (2012) in Sonora and Nayarit (6 - 78%). In this study, BCMV symptoms were mosaic (100%), epinasty (60%), and leaf distortion (39%), which were apparently influenced by the genotype (Figure 3B). The BCMNV was not detected, a Potyvirus closely related to BCMV, previously reported with higher prevalence in five Mexican states, State of Mexico not included, occurring in single infection or mixed with BCMV (Lepe-Soltero *et al.*, 2012). Even though necrosis symptoms on secondary veins, typical of BCMNV, were not detected in this research, future studies may require specific primers, in addition to a universal sequence, to ensure the diagnosis.

The 18 samples with severe leaf yellowing suspected of some member of Begomovirus genus were not amplified with PBL1v2040 and PCR1c universal primers, despite the presence, although in low density of *B. tabaci* in over 80% of 12 genotypes. This insect represents a potential vector of this virus group. However, this finding was unexpected considering that *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) and *Bean golden mosaic virus* (BGMV) have been widely reported for Central America and the Caribbean (Rojas *et al.*, 2018; 1993), although strongly associated with regional outbreaks of *Bemisia tabaci* in the 1990s (Gilbertson *et al.*, 2005). In Brazil, BGMV was reported infecting seven bean cultivars, though at different viral concentrations (De Freitas-Vanzo *et al.*, 2021).

***Bean common mosaic virus severity in 12 bean genotypes.*** The epidemiological matrix for comparative analysis among genotypes regarding *A. alternata* and BCMV severity, and spatial spread, included 22 variables, 859 observations, and 18898 metadata. In flowering phase, BCMV plant severity varied between 9 and 50% (classes

(Figura 3B). Secuencias de referencia asociadas a *Papaya ringspot virus* (PRSV) especie del género Potyvirus y principalmente el *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) perteneciente a los Begomovirus se ubicaron distantes del clado principal. Las secuencias confirmatorias de BCMV en este trabajo se registraron en GenBank con los números de accesión OL229871.1, OL229872.1, OL229873.1, OL229874.1 y OL229875.1.

La alta incidencia de este virus fue coincidente con reportes de 90.2 - 100% para África (Mwai-popo *et al.*, 2018), pero superó los reportados previamente por Lepe-Soltero y colaboradores (2012) para Sonora y Nayarit con un rango de 6 - 78%. En este estudio, la prevalencia de síntomas asociados a BCMV fueron mosaico (100%), epinastia (60%) y distorsión foliar (39%), posiblemente dependiente del genotipo (Figura 3B). No se detectó la presencia del BCMNV, un Potyvirus muy relacionado con BCMV, previamente reportado en cinco estados mexicanos, Estado de México no incluido, con mayor prevalencia en infecciones simples, o mezclado con BCMV (Lepe-Soltero *et al.*, 2012). Aunque en campo no se detectó síntomas de necrosis en nervaduras secundarias, típico del BCMNV, futuros trabajos podrían requerir iniciadores específicos, en adición al universal, para asegurar el diagnóstico.

Las 18 muestras con fuerte amarillamiento foliar presuntivas a algún miembro del género Begomovirus no amplificaron con los iniciadores universales PBL1v2040 y PCR1c, a pesar de presencia, aunque con muy baja densidad, de *B. tabaci* en más de 80% de los 12 genotipos. Este insecto es un potencial vector de este grupo de virus. Este resultado fue inesperado ya que el *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) y *Bean golden mosaic virus* (BGMV) se han reportado ampliamente para Centroamérica y el Caribe (Rojas *et al.*, 2018; 1993), aunque fuertemente asociado con los brotes regionales de *Bemisia tabaci* en los 90's (Gilbert-

3 - 5) with high genotype-dependent variability. *Vaquita Negro* ( $50.06 \pm 13.6$ ), *Canario* ( $48.7 \pm 15.4$ ), and *Segregante Oti* ( $40.14 \pm 21.9$ ) exhibited higher symptom expressions severity classes 4 - 5 compared to other genotypes (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Table 2). On the contrary, *Bayo Mecentral* ( $21.2 \pm 8.1$ ), *Tipo Flor de Mayo* ( $18.2 \pm 14.8$ ) and *Negro Perla* ( $9.6 \pm 6.9$ ) exhibited relatively lower severity (classes 3 - 4) (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Table 2). At fruit stage, severity range increased to 6.7 - 58.1% (classes 3 - 6). *Vaquita Negro* ( $58.1 \pm 4.8$ ) and *Canario* ( $37.3 \pm 20.3$ ) were statistically the most susceptible genotypes with severity classes 4 - 5 (Tukey,  $p = 0.05$ ), whereas *Garrapato* ( $38.5 \pm 18.5$ ) which increased in severity by 14%, was statistically different ( $t$ -test,  $p < 0.0001$ ) respect to the flowering stage.

son *et al.*, 2005). En Brasil, el BGMV fue infectivo en siete cultivares de frijol, aunque con diferentes concentraciones virales (De Freitas-Vanzo *et al.*, 2021).

**Severidad de *Bean common mosaic virus* en 12 genotipos de frijol.** La matriz epidemiológica para el análisis comparativo entre genotipos respecto a la severidad de *Alternaria alternata* y BCMV, y la dispersión espacial, incluyó 22 variables, 859 observaciones y 18898 metadatos. En fase de floración de *P. vulgaris*, la severidad de BCMV en planta osciló entre 9 y 50% (clases 3 - 5), con alta variabilidad en función del genotipo. *Vaquita Negro* ( $50.06 \pm 13.6$ ), *Canario* ( $48.7 \pm 15.4$ ) y *Segregante Oti* ( $40.14 \pm 21.9$ ) mostraron mayor expresión de síntomas con clases de severidad 4 - 5 estadísticamente

**Table 2. BCMV and *A. alternata* average severity percentage in 12 bean genotypes (*P. vulgaris*) on flowering and fruit stage under field conditions. Spring-Summer 2020 season.**

**Cuadro 2. Porcentaje de severidad promedio de BCMV y *A. alternata* en 12 genotipos de frijol (*P. vulgaris*) en la fase fenológica de floración y fructificación en condiciones de campo. Ciclo Primavera-Verano, 2020.**

Genotipo <sup>y</sup>	<i>Bean common mosaic virus</i>			<i>Alternaria alternata</i>		
	Floración	Fructificación	$t$ -test <sup>x</sup>	Floración	Fructificación	$t$ -test <sup>x</sup>
<i>Vaquita Negro</i>	<b>50.0 ± 13.6 a</b>	<b>58.1 ± 4.8 a</b>	0.021	10.6 ± 10.6 b	11.9 ± 6.0 b	0.581
<i>Canario</i>	48.7 ± 15.4 a	37.3 ± 20.3 abc	0.000	7.0 ± 7.5 b	<b>42.7 ± 18.2 a</b>	0.000
<i>Segregante Oti</i>	40.1 ± 21.9 ab	31.0 ± 16.4 abc	0.039	6.8 ± 9.4 b	8.6 ± 6.6 b	0.424
<i>Flor de Mayo</i>	36.0 ± 15.4 abc	29.8 ± 18.8 abc	0.123	11.4 ± 10.1 b	11.9 ± 9.2 b	0.870
<i>Negro Mixteco</i>	31.5 ± 15.8 abc	12.1 ± 12.3 bc	0.000	16.7 ± 10.3 ab	7.5 ± 4.2 b	0.001
<i>Negro Querétaro</i>	29.9 ± 8.1 abc	15.2 ± 12.4 bc	0.000	15.3 ± 11.9 ab	10.0 ± 10.8 b	0.119
<i>Garrapato</i>	24.5 ± 19.1 abc	38.5 ± 18.5 ab	0.000	<b>5.3 ± 4.3 b</b>	20.2 ± 8.6 b	0.000
<i>Pinto Texcoco</i>	23.4 ± 10.5 abc	16.0 ± 10.0 bc	0.051	<b>33.6 ± 8.1 a</b>	9.5 ± 4.8 b	0.000
<i>Oti</i>	23.3 ± 21.0 abc	29.7 ± 17.8 abc	0.102	5.6 ± 7.4 b	15.2 ± 7.4 b	0.000
<i>Bayo Mecentral</i>	21.2 ± 8.1 abc	9.5 ± 4.2 bc	0.000	11.8 ± 7.4 b	12.3 ± 3.4 b	0.865
<i>Tipo Flor de Mayo</i>	18.2 ± 14.8 bc	27.0 ± 22 bc	0.042	9.9 ± 11.8 b	<b>41.4 ± 13 a</b>	0.000
<i>Negro Perla</i>	<b>9.6 ± 6.9 c</b>	<b>6.7 ± 8.8 c</b>	0.121	10.0 ± 10.6 b	<b>6.2 ± 5.8 b</b>	0.111

<sup>x</sup> Student's  $t$ -test ( $\alpha = 0.05$ ) comparing mean percent BCMV severity in plant canopy and *A. alternata* foliar severity between flowering and fruiting. Treatments with at least a common letter are statistically equal ANOVA/Tukey  $p = 0.05$ . Bold numbers represent the genotypes with the maximum and minimum severity values of BCMV and *A. alternata*. Signs ± followed by a number represents the *intra*-genotype standard deviation (SD) of mean percent severity. / <sup>x</sup> Prueba  $t$ -Student ( $\alpha = 0.05$ ) comparando el promedio del porcentaje de severidad de BCMV en dosel de planta y severidad foliar de *A. alternata* entre floración y fructificación. Tratamientos con al menos una letra en común son estadísticamente iguales ANOVA/Tukey  $p = 0.05$ . Números en negrita representan genotipos con los valores de severidad máximos y mínimos de BCMV y *A. alternata*. Signos ± seguido de un número representa la desviación estándar (SD) *intra*-genotipo de la media porcentual de severidad.

<sup>y</sup> Bold genotypes belong to the same lineage. / <sup>y</sup> Genotipos en negrita pertenecen al mismo linaje.



*Negro Perla* ( $6.7 \pm 8.8$ ) was the lowest susceptible genotype at flowering and fruit stage without statistical differences ( $t$ -test,  $p = 0.12$ ) (Table 2). However, the trend was a reduction between 2.9 - 19.9% severity, attributed to vegetative growth, previously documented in Kenya for *pre*- and *post*-rainfall experiments, where severity decreased up to 12.6% in ten *P. vulgaris* cultivars (Mangeni *et al.*, 2020). In this research, eight genotypes showed the decreasing condition, of which six were statistically different ( $t$ -test,  $p = 0.0001$ ). Severity for *Flor de Mayo* (- 6.4%) and *Negro Perla* (- 2.9%) was no statistical different in flowering and fruit stage ( $t$ -test,  $p = 0.12$ ) (Table 2). Among the most susceptible genotypes, those with statistically significant increases (6.4 - 8.8%) ( $t$ -test,  $p = 0.021 - 0.042$ ) were *Vaquita Negro* ( $58.1 \pm 4.8$ ) and *Tipo Flor de Mayo* ( $27 \pm 22$ ) (Table 2).

Overall, varietal studies of bean virus severity (Potyvirus, Begomovirus, or another genus) use qualitative leaf-level scales (e.g., 0 = no symptoms, 1 = mild symptoms, 2 = moderate symptoms, and 3 = severe distortion, leaf or stem malformation, and stunting). Using this scale, Mangeni and coworkers (2020) reported a 2.3 average severity of BCMV, which could be comparative to classes 4 - 5 of the severity scale developed for this study, found in *Vaquita Negro*, *Canario*, *Garrapato*, or *Segregate Oti* (Table 2). Murere and coworkers (2018) studying 16 bean genotypes reported BCMV prevalence in 29.4 - 42.78% cultivars with a regional average severity of 1.1 - 1.67. Susceptible genotypes exhibited moderate and severe symptoms (classes 2 - 3).

Regarding disease intensity caused by Begomoviruses (i.e., CuLCrV and SiGMFV) in *Phaseolus* sp., severity has been reported between 5 - 50% in 20 genotypes considered of moderate resistance, and over 60% for 21 varieties typified as susceptible (Agarwal *et al.*, 2021). These findings

diferentes (Tukey,  $p = 0.05$ ) al resto de genotipos (Cuadro 2). Por el contrario, *Bayo Mecentral* ( $21.2 \pm 8.1$ ), *Tipo Flor de Mayo* ( $18.2 \pm 14.8$ ) y *Negro Perla* ( $9.6 \pm 6.9$ ) tuvieron severidad relativamente más baja (clases 3 - 4), entre las cuales *Negro Perla* fue estadísticamente menor (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Cuadro 2). En fase de fructificación, se amplió el rango de severidad a 6.7 - 58.1% (clases 3 - 6). *Vaquita Negro* ( $58.1 \pm 4.8$ ) y *Canario* ( $37.3 \pm 20.3$ ) se mantuvieron estadísticamente como genotipos más susceptibles con clases de severidad 4 - 5 (Tukey,  $p = 0.05$ ), mientras que *Garrapato* ( $38.5 \pm 18.5$ ) tuvo un incremento de severidad en 14%, estadísticamente diferente ( $t$ -test,  $p < 0.0001$ ) respecto a la expresión sintomática en floración.

*Negro Perla* ( $6.7 \pm 8.8$ ) fue el genotipo menos susceptible en floración y fructificación sin diferencias estadísticas entre estos eventos fenológicos ( $t$ -test,  $p = 0.121$ ) (Cuadro 2). Sin embargo, la tendencia fue una reducción entre 2.9 - 19.9% de severidad, atribuida al desarrollo vegetativo, ya documentado en otro trabajo en Kenia en experimentos *pre*- y *post*-lluvias, con decrementos hasta de 12.6% en 10 cultivares de *P. vulgaris* (Mangeni *et al.*, 2020). En esta investigación, un total de ocho genotipos presentaron esta condición decreciente, de los cuales seis fueron estadísticamente diferentes ( $t$ -test,  $p = 0.0001$ ). *Flor de Mayo* (-6.4%) y *Negro Perla* (-2.9%) no presentaron diferencias de severidad entre floración y fructificación ( $t$ -test,  $p = 0.12$ ) (Cuadro 2). Entre los genotipos más susceptibles, los que tuvieron incrementos (6.4 - 8.8%) estadísticamente significativos ( $t$ -test,  $p = 0.021 - 0.042$ ) fueron *Vaquita negro* ( $58.1 \pm 4.8$ ) y *Tipo Flor de Mayo* ( $27 \pm 22$ ) (Cuadro 2).

En general, los estudios varietales de frijol respecto a la severidad de virus (Potyvirus, Begomovirus u otros géneros) emplean escalas cualitativas a nivel foliar (p.e., 0 = sin síntomas, 1 = síntomas leves, 2 = síntomas moderados y 3 = distorsión

show the high prevalence and severity of BCMV and other virus species on beans, suggesting the need of updating the viruses status in Mexican germplasm stocks and the productive implications (Flores-Estévez *et al.*, 2003; Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012). The use of a 70 cm row-section plant-coverage as scale proposed in this work allowed discriminating the viral infectious effect and therefore constitutes a methodological alternative for intensive field studies with respect to plant-level scales under the rationale of confounding canopy in high density plantings.

#### ***Alternaria alternata* severity in 12 bean genotypes.**

Among the 12 bean genotypes studied, *A. alternata* severity was highly variable. In the flowering stage, leaf severity ranged from 7 - 33.6% (classes 3 - 4). *Pinto Texcoco* was the most susceptible genotype ( $33.6 \pm 8.1$ ), followed by *Negro Mixteco* ( $16.7 \pm 10.3$ ) and *Negro Querétaro* ( $15.3 \pm 11.9$ ). However, these genotypes were no statistically different (Tukey,  $p = 0.05$ ) due to *intra*- and *inter*-genotype variability (Table 2). *Garrapato* ( $5.3 \pm 4.3$ ), *Oti* ( $5.6 \pm 7.4$ ), and *Segregante Oti* ( $6.8 \pm 9.4$ ), belonging to the same lineage (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), exhibited tolerance to the fungus. These materials were equal statistically (Tukey,  $p = 0.05$ ) respect to the other genotypes except for *Pinto Texcoco* (Table 2). This lineage was reported as highly or moderately resistant to foliar and root fungal infections such as *Colleotrichum lindemuthianum*, *Sclerotinia* sp., *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* and *Rhizoctonia solani* (Estrada-Gómez *et al.*, 2004).

At the fruit stage, severity maintained its variability. Nevertheless, *Canario* ( $42.7 \pm 18.2$ ) and *Tipo Flor de Mayo* ( $41.4 \pm 13$ ) were the most susceptible genotypes showing significant increases compared to the flowering stage with

severa, malformación de las hojas o del tallo y retraso en el crecimiento). Con esta escala, Mangeni y colaboradores (2020), reportaron 2.3 severidad promedio de BCMV, el cual puede considerarse equivalente a las clases 4 - 5 de la escala de severidad desarrollada en este estudio y encontradas en *Vaquita Negro*, *Canario*, *Garrapato* o *Segregante Oti* (Cuadro 2). Murere y colaboradores (2018) en un estudio de 16 genotipos de frijol reportaron prevalencia de BCMV en 29.4 - 42.78% de las muestras analizadas con rango de severidad promedio regional de 1.1 - 1.67 (escala 0 - 3). Los genotipos susceptibles exhibieron síntomas moderados y severos (clases 2 - 3).

Respecto a la intensidad de enfermedad causada por Begomovirus (i.e., CuLCrV y SiGMFV) en *Phaseolus* sp., la severidad se ha reportado entre 5 - 50% en 20 genotipos considerados con moderada resistencia, y más de 60% en 21 variedades tipificadas como susceptibles (Agarwal *et al.*, 2021). Estos resultados muestran la alta prevalencia e intensidad de daño de BCMV y otras especies de virus en frijol y sugieren la importancia de actualizar su estatus en los acervos genéticos mexicanos y su implicación productiva (Flores-Estévez *et al.*, 2003; Pedroza-Sandoval *et al.*, 2013; Lepe-Soltero *et al.*, 2012). El empleo de la escala de cobertura vegetal propuesta en este trabajo permitió discriminar el efecto infeccioso viral por lo que constituye una alternativa metodológica para estudios intensivos de campo respecto a escalas a nivel planta bajo la racionalidad de dosel confundido entre plantas de siembras compacta.

#### **Severidad de *Alternaria alternata* en 12 genotipos de frijol.**

La severidad de *A. alternata* fue contrastante entre los 12 genotipos de frijol estudiados. En fase de floración, la severidad foliar osciló entre 7 - 33.6% (clases 3 - 4). *Pinto Texcoco* fue el genotipo más susceptible ( $33.6 \pm 8.1$ ), seguido

35.7% and 31.5% ( $t$ -test,  $p < 0.0001$ ), respectively (Table 2). This increase is explained by greater plant longevity, favoring leaf growth and prolongation of infection cycles. The genotypes *Negro Perla* ( $6.2 \pm 5.8$ ), *Negro Mixteco* ( $7.5 \pm 4.2$ ), *Segregante Oti* ( $8.6 \pm 6.6$ ), *Pinto Texcoco* ( $9.5 \pm 4.8$ ), and *Negro Querétaro* ( $10 \pm 10.8$ ) exhibited lower severity than 10% (Classes 1 - 3), and a significant decrease severity, from 3.8 - 24.1%, respect to the flowering stage ( $t$ -test,  $p < 0.01$ ) (Table 2). *Pinto Texcoco* exhibited the highest severity reduction from 33.6% to 9.5%, followed by *Negro Mixteco* decreased by 16.7%. Analogous to BCMV, the severity decrease in these genotypes was associated with tissue senescence and consequently inoculum loss. *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Vaquita Negro*, and *Segregante Oti* were the most stable genotypes, with moderate severity of 6.8 - 11.8% in the flowering stage, and not significant increases, between 0.4 - 1.8%, in the fruit stage ( $t$ -test,  $p = 0.42 - 0.87$ ) (Table 2).

Several *Alternaria* spp. species has been reported associated with beans and other crops. i.e., *A. solani* in some species of the Solanaceae family can be highly restrictive for production (Thomma, 2003). *Alternaria alternata* (= *A. tenuis*) was reported as a pathogenic agent on *Phaseolus* spp. at least since the early 19th century (Thomma, 2003; O'Donnell and Dickinson, 1980). Nevertheless, epidemiological studies of *A. alternata* applied to *P. vulgaris* germplasm assessment were not found. This report is the first in Mexico with this approach.

**Integrated Damage Index (IDI) and Vigor Index (IV).** Comprehensive health of *P. vulgaris* genotypes regarding BCMV and *A. alternata*, estimated by IDI, ranged from 0 - 1.54. The IDI was higher at flowering stage between 0.37 - 1.51, being *Oti* (0.37) and *Negro Perla* (0.43) significantly more tolerant genotypes, whereas *Vaquita Negro*

contrastantemente de *Negro Mixteco* ( $16.7 \pm 10.3$ ) y *Negro Querétaro* ( $15.3 \pm 11.9$ ). Sin embargo, estos genotipos fueron estadísticamente iguales (Tukey,  $p = 0.05$ ) debido a la variabilidad *intra-* e *inter-*genotipos (Cuadro 2). *Garrapato* ( $5.3 \pm 4.3$ ), *Oti* ( $5.6 \pm 7.4$ ) y *Segregante Oti* ( $6.8 \pm 9.4$ ), pertenecientes al mismo linaje (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), fueron relativamente más tolerantes al hongo. Estadísticamente (Tukey,  $p = 0.05$ ), estos materiales no fueron diferentes del resto de genotipos con excepción de *Pinto Texcoco* (Cuadro 2). Este linaje se ha reportado con alta o moderada resistencia a infecciones de hongos foliares y de raíz como *Colleotrichum lindemuthianum*, *Sclerotinia* sp., *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* y *Rhizoctonia solani* (Estrada-Gómez *et al.*, 2004).

En fructificación, la severidad se mantuvo con alta variabilidad. No obstante, *Canario* ( $42.7 \pm 18.2$ ) y *Tipo Flor de Mayo* ( $41.4 \pm 13$ ) fueron genotipos altamente susceptibles con incrementos significativos respecto a la fase de floración ( $t$ -test,  $p < 0.0001$ ) con 35.7% y 31.5%, respectivamente (Cuadro 2). Este incremento se puede explicar por mayor longevidad del genotipo propiciando renovación foliar y extensión del proceso infeccioso. Los genotipos *Negro Perla* ( $6.2 \pm 5.8$ ), *Negro Mixteco* ( $7.5 \pm 4.2$ ), *Segregante Oti* ( $8.6 \pm 6.6$ ), *Pinto Texcoco* ( $9.5 \pm 4.8$ ) y *Negro Querétaro* ( $10 \pm 10.8$ ) tuvieron severidad menor al 10% (Clases 1 - 3), con una reducción significativa ( $t$ -test,  $p < 0.01$ ) de 3.8 - 24.1% respecto al daño expresado en floración (Cuadro 2). *Pinto Texcoco* exhibió la mayor reducción de severidad pasando de 33.6% a 9.5%, seguido de *Negro Mixteco* con un decremento de 16.7%. Análogo a BCMV, en estos genotipos la disminución de severidad se asoció a senescencia de tejidos y consecuentemente pérdida de inóculo. Los genotipos más estables fueron *Bayo Mecentral*, *Flor de Mayo*, *Vaquita Negro* y *Segregante Oti*, los cuales tuvieron severidad moderada 6.8 - 11.8% en

(1.51) and *Segregante Oti* (1.05) were the most susceptible to BCMV and *A. alternata* combined effect (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Table 3). In fruit phase, the IDI decreased considerably to ranges of 0.03 - 0.63. Once again, *Negro Perla* (0.03) and *Oti* (0.03) were statistically the most tolerant, and *Vaquita Negro* (0.63) was the most susceptible (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Table 3).

The *Vigor Index* (IV) by genotype ranged from 0.1 - 0.91. This index was inversely proportional to IDI, evidencing a strongly detrimental physiological effect of the BCMV and *A. alternata* combination. Overall, IV showed statistical differences at least in 8/12 genotypes (Tukey,  $p = 0.05$ ). *Oti* (0.91) had significantly higher coverage-plant vigor (Tukey,  $p = 0.05$ ). Interestingly, *Garrapato*, from whom *Oti* was derived, and was selected for Mexico State Valley due to high productivity and resistance to plant pathogenic fungi (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), exhibited moderate IV = 0.64 (Table 3), and moderate susceptibility with 38% maximum damage by BCMV and 20.2% *A. alternata* (Table 2). By contrast, *Vaquita Negro* (0.1) showed the lowest vigor, indicating high susceptibility, particularly to BCMV. *Negro Querétaro*, *Bayo Mecentral*, *Negro Mixteco* and *Segregante Oti* were similar genotypes in IV, ranged from 0.43 - 0.48 (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Table 3).

This research supports *Oti* and *Negro Perla* as the genotypes with the highest tolerance to BCMV and *A. alternata*, attributed to intrinsic genotype-environment characteristics. However, it is necessary to analyze lineages and parental lines to optimize this type of studies in comprehensive breeding programs that incorporate phytosanitary factors in addition to the phenotypic approach associated with yield components.

**Spatial analysis of severity at genotype level.** Geostatistical kriging analysis and omnidirectional

**Table 3. *Vigor Index* (IV) in flowering phase and *Integrated Damage Index* (IDI) in flowering and fruit stages assessed in 12 varieties of bean (*P. vulgaris*) under field conditions. Spring-Summer 2020 season.**

**Cuadro 3. *Índice de Vigor* (IV) en estado de floración e *Índice de Daño Integrado* (IDI) en floración y fructificación evaluados en 12 variedades de frijol (*P. vulgaris*) en condiciones de campo. Ciclo Primavera-Verano 2020.**

Variedad <sup>y</sup>	IV <sup>x</sup>	IDI <sup>y</sup> Floración	IDI <sup>z</sup> Fructificación
<b><i>Oti</i></b>	<b>0.91 a</b>	<b>0.37 f</b>	<b>0.03 c</b>
<b><i>Negro Perla</i></b>	<b>0.71 b</b>	<b>0.43 ef</b>	<b>0.03 c</b>
<i>Canario</i>	0.68 c	0.90 bcd	0.18 b
<i>Flor de Mayo</i>	0.66 d	0.79 bcd	0.13 bc
<i>Garrapato</i>	0.64 e	0.66 def	0.18 b
<i>Pinto Texcoco</i>	0.61 f	0.78 bcd	0.08 bc
<i>Tipo Flor de Mayo</i>	0.53 g	0.71 cde	0.21 b
<i>Negro Querétaro</i>	0.48 h	0.91 bcd	0.10 bc
<i>Bayo Mecentral</i>	0.47 hi	0.81 bcd	0.08 bc
<i>Negro Mixteco</i>	0.45 ij	0.97 bc	0.09 bc
<i>Segregante Oti</i>	0.43 j	1.05 b	0.22 b
<b><i>Vaquita Negro</i></b>	<b>0.10 k</b>	<b>1.51 a</b>	<b>0.63 a</b>

<sup>x</sup> Treatments with at least one common letter are statistically equal by Tukey  $p = 0.05$ . <sup>y</sup> Tratamientos con al menos una letra en común son estadísticamente iguales por Tukey  $p = 0.05$ .

<sup>y</sup> Genotypes and IV and IDI values in bold represent maximum and minimum contrasts. High IV and low IDI values indicate higher tolerance to BCMV and *A. alternata*. / <sup>z</sup> Genotipos y valores IV e IDI en negritas representan contrastes máximo y mínimo. Alto valor IV y bajo IDI indican mayor tolerancia a BCMV y *A. alternata*.

floración, con incrementos no significativos entre 0.4 - 1.8% en fructificación ( $t$ -test,  $p = 0.42 - 0.87$ ) (Cuadro 2).

Diversas especies de *Alternaria* spp. se han reportado asociados al frijol y otros cultivos. En algunos casos, como *A. solani* en solanáceas puede ser altamente restrictivo para la producción (Thomma, 2003). *Alternaria alternata* (= *A. tenuis*) se ha reportado como agente patogénico en *Phaseolus* spp. al menos desde principios del siglo XIX (Thomma, 2003; O'Donnell y Dickinson, 1980). Sin embargo, no se encontraron estudios epidemiológicos aplicados a la evaluación de germoplasma respecto a *A.*



variograms of *Bean common mosaic virus* and *A. alternata* exhibited random *intra*-genotype dispersal patterns of random *foci*, aggregates, and uniformity depending on susceptibility / tolerance and phenological phase. Aggregation intensity agreed with severity intensity / genotype, IDI, and IV results discussed in previous sections (Table 2, 3; Figure 1, 4).

The *Vaquita Negro* block, the most susceptible genotype to BCMV, was characterized by high-intensity dispersion (class 5, 58.2%) at fruit stage (Figure 4A), without spatial dependence of severity indicating uniform virus infection distribution through the parameters'  $nugget[n] = 209$ ,  $\sigma^2\text{-parcial}[\sigma^2\text{-}p] \approx 0$ ,  $\sigma^2\text{-sill}[\sigma^2\text{-}s] = 233.7$  (Figure 4B-**BII**). On the contrary, *Bayo Mecentral*, although had a *uniform* distribution ( $n = 40.9$ ,  $\sigma^2\text{-}p \approx 0$ ,  $\sigma^2\text{-}s = 70.5$ ) was associated with low severity (class 3, 9.6%) (Figure 4A, 4B-**BI**).

*Segregante Oti* represented genotypes with spatial dependence in *discontinuous aggregate foci* of 4-8 distances of 70 cm row-sections ( $n = 207.4$ ,  $\sigma^2\text{-}p = 338.6$ ,  $\sigma^2\text{-}s = 546$ ) (Figure 4A, 4B-**B12**), analogous to *Tipo Flor de Mayo* and *Negro Mixteco*, or block-edge effect, as *Canario*, *Flor de Mayo*, *Garrapato*, and *Oti* genotype (Figure 4A, 4B). Other group included *Negro Querétaro* with *random foci* ( $n = 136$ ,  $\sigma^2\text{-}p > 207.8$ ,  $\sigma^2\text{-}s = 343.8$ ) (Figure 4A, 4B-**B7**), similar to *Bayo Mecentral*, *Pinto Texcoco* and *Negro Perla*, this last one significantly tolerant for both phenological stages (Figure 4A, 4B). Uniform dispersal pattern associated with BCMV, without statistical differences between phenological events (data not shown), suggests a seed-borne transmission effect, which is well established for this virus (Worrall *et al.*, 2015; Subramanya, 2013). However, a vector(s) may also be involved due to random foci and edge-block effect. *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*, among other aphids, have been reported as vectors (Worrall *et al.*, 2015).

*alternata* en *P. vulgaris*. Este es el primer reporte con ese enfoque en México.

**Índice de Daño Integrado (IDI) e Índice de Vigor (IV).** La sanidad integral de *Phaseolus vulgaris* respecto a BCMV y *A. alternata*, estimada con IDI, estuvo en el rango de 0 – 1.54. IDI fue mayor en floración con valores entre 0.37 – 1.51, siendo *Oti* (0.37) y *Negro Perla* (0.43) los genotipos significativamente más tolerantes, mientras que *Vaquita Negro* (1.51) y *Segregante Oti* (1.05) los más susceptibles considerando al efecto combinado de BCMV y *A. alternata* (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Cuadro 3). En fructificación, el IDI disminuyó considerablemente a rangos de 0.03 – 0.63. Nuevamente, *Negro Perla* (0.03) y *Oti* (0.03) fueron estadísticamente los más tolerantes, y *Vaquita Negro* (0.63) se mantuvo como el más susceptible (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Cuadro 3).

El *Índice de Vigor* de planta (IV) por genotipo osciló entre 0.1 – 0.91. Este índice fue inversamente proporcional a IDI, evidenciando fuerte efecto fisiológico detrimental de la combinación de BCMV y *A. alternata*. En general, el IV mostró diferencias estadísticas al menos en 8/12 genotipos (Tukey,  $p = 0.05$ ). *Oti* (0.91) tuvo el vigor de planta significativamente más alto (Tukey,  $p = 0.05$ ). Interesantemente, *Garrapato*, del cual se derivó *Oti*, y que fue seleccionado para el Valle de México por su alta productividad y resistencia a hongos fitopatógenos (Estrada-Gómez *et al.*, 2004), tuvo moderado IV = 0.64 (Cuadro 3), y moderada susceptibilidad con daños máximos de 38% por BCMV y 20.2% por *A. alternata* (Cuadro 2). En contraste, *Vaquita Negro* (0.1) obtuvo el menor vigor, evidenciando su alta susceptibilidad principalmente a BCMV. *Negro Querétaro*, *Bayo Mecentral*, *Negro Mixteco* y *Segregante Oti* fueron genotipos similares en IV con rangos entre 0.43 – 0.48 (Tukey,  $p = 0.05$ ) (Cuadro 3).

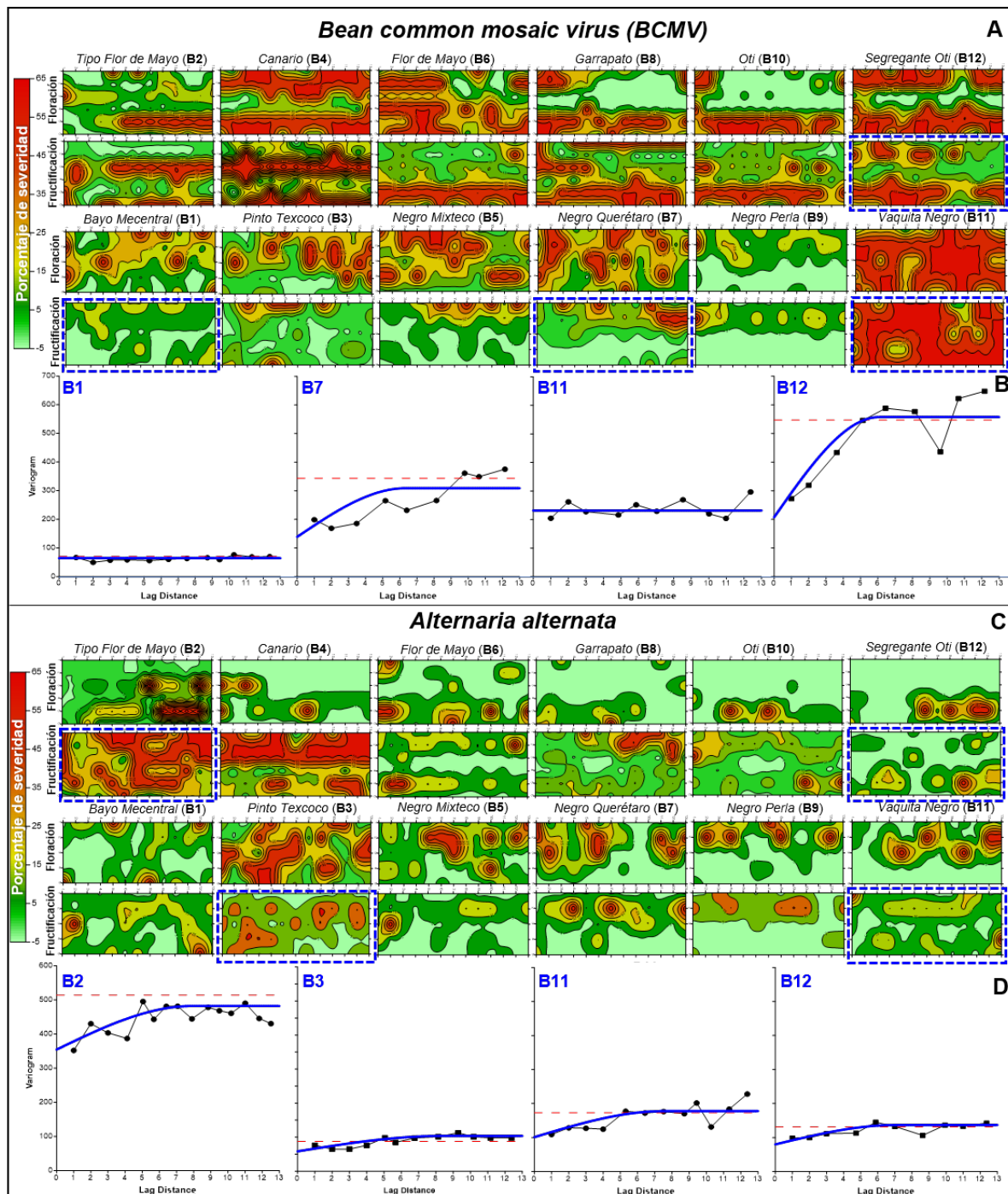


Figure 4. Geostatistical kriging analysis of average severity of A) *Bean common mosaic virus* and C) *Alternaria alternata* assessed in flowering (6 June, 2020) and fruiting (10 August, 2020) phase for 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes. Percentage severity is represented in green-red colorimetry according to assessment scale classes (Figure 1). Omnidirectional semivariograms by spherical method for contrasting genotype block, highlighted with blue dashes boxes, for B) BCMV (B1, B7, B11, and B12) and D) *A. alternata* (B2, B3, B11, and B12) in fruiting phase. The X-axis represents lag -distance of 70 cm row-sections (BCMV), -plant (*A. alternata*), and Y severity variance ( $\sigma^2$ ).

**Figura 4.** Análisis geoestadístico kriging del promedio de severidad de: A) *Bean common mosaic virus* y C) *Alternaria alternata* evaluada en floración (6 junio, 2020) y fructificación (10 agosto, 2020) para 12 genotipos de *Phaseolus vulgaris*. El porcentaje de severidad se representa en colorimetría verde-rojo en concordancia con clases de escala de evaluación (Figura 1). Semivariogramas omnidireccionales por método esférico para bloque de genotipos contrastantes, remarcados con recuadros azules, para B) BCMV (B1, B7, B11 y B12) y D) *A. alternata* (B2, B3, B11 y B12) en fase de fructificación. Eje-X se representa *lag*-distancia de 70 cm sección de surco (BCMV), -planta (*A. alternata*), y Y la varianza ( $\sigma^2$ ) de severidad.

Even though aphid colonization or exuviae were not detected in the flowering and fruit stages, a transient occurrence at early crop stages cannot be rule out. The primary inoculum may originate from diseased plants due to infected seeds, subsequently dispersed by vectors generating foci and aggregates with higher spatial dependence. The severity and incidence levels, contrasted with the phenological events studied, suggest that viral load and infection proportion in seeds is variable among genotypes. Viral transmission may have implications for breeding programs and BCMV resistance studies; therefore, should be investigated.

*A. alternata* spatial behavior also exhibited contagion progress, although less intense among genotypes, except for *Flor de Mayo* and *Canario* genotypes, which, due to higher susceptibility, showed spatial dependence in *discontinuous aggregates* of 3-8 plants ( $n= 354.3$ ,  $\sigma^2-p = 159.8$ ,  $\sigma^2-s = 514.1$ ). These genotypes had high severity (class 4, 41.5%) at the fruit stage, coinciding with a significant increase and foci coalescence (Figure 4C-B2, B4, 4D-**B2**). *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro*, and *Segregante Oti* showed spatial dependence in small random foci of 2-3 plants ( $n= 103$ ,  $\sigma^2-p = 28.8$ ,  $\sigma^2-s = 87.1$ ), with severity reduction at fruit stage associated with senescence and leaf tissue loss (Figure 4C, 4D-**B12**). *Pinto Texcoco*, *Flor de Mayo*, or *Garrapato* represented genotypes with discontinuous aggregate dispersal pattern of 4-5 plants ( $n= 58.3$ ,  $\sigma^2-p > 72.9$ ,  $\sigma^2-s = 131.2$ ) and moderate severity (Figure 4C, 4D-**B3**). *Vaquita Negro* had low severity with *uniform* dependence ( $n= 102$ ,  $\sigma^2-p \approx 0$ ,  $\sigma^2-s = 172.8$ ),

Esta investigación sustenta a *Oti* y *Negro Perla* como los genotipos de frijol de mayor tolerancia a BCMV y *A. alternata*, atribuida a características intrínsecas al genotipo-ambiente. Sin embargo, es necesario analizar los linajes y líneas parentales para optimizar este tipo de estudios en programas de mejoramiento integrales que incorporen factores fitosanitarios en adición al enfoque fenotípico asociado a componentes de rendimiento.

**Análisis espacial-parcelario de severidad a nivel genotipo.** El análisis geoestadístico kriging y variogramas omnidireccionales del *Bean common mosaic virus* y *A. alternata* exhibieron patrones de dispersión *intra*-genotipo aleatorios de *focos*, agregados y uniformes en función de la susceptibilidad/tolerancia y evento fenológico. La intensidad de agregación fue concordante con los resultados de severidad/genotipo, IDI e IV analizados en secciones previas (Cuadro 2, 3; Figura 1, 4).

El bloque de *Vaquita Negro*, el genotipo más susceptible a BCMV, se caracterizó por dispersión de alta intensidad (clase 5, 58.2%) en fase de fructificación (Figura 4A), sin dependencia espacial de severidad indicando distribución *uniforme* de la infección del virus con parámetros variográficos  $nugget[n]= 209$ ,  $\sigma^2\text{-parcial}[\sigma^2-p] \approx 0$ ,  $\sigma^2\text{-sill}[\sigma^2-s] = 233.7$  (Figura 4B-**B11**). Contrariamente, *Bayo Mecertral*, aunque tuvo una distribución *uniforme* ( $n= 40.9$ ,  $\sigma^2-p \approx 0$ ,  $\sigma^2-s = 70.5$ ) pero asociado a baja intensidad de daño (clase 3, 9.6%) (Figura 4A, 4B-**B1**).

*Segregante Oti* fue representativo de genotipos con dependencia espacial en *focos agregados*

however, associated with low covered-plant vigor (0.1) as well as high susceptibility to BCMV (58.1%), therefore, it could be a competition effect rather than tolerance (Figure 4C, 4D-**B11**).

The microclimatic data recorded during the experiment showed *minimum* relative humidity (RH) between 22 - 51% and *RH-maximum* >77%; *minimum* temperature (T) of 11.6 - 15.8 °C and *T-maximum* of 21.6 - 28.9 °C, and discontinuous *post-flowering* and fruit rainfall frequency. These conditions are considered optimal for *A. alternata* mycelial growth and sporulation (Prasad and Ahir, 2013); thus, the dispersal patterns exhibited could represent the real fungus parasitic fitness conditioned by genotype. Consequently, the fungal epidemic potential will be strongly influenced by genetic factors and other contributing abiotic components (Table 4).

**Abiotic effects associated with *A. alternata* infection on bean.** Wind (*V*) and hail (*G*) damage simulation was associated with symptoms in 100% of the experimental leaflets, except for Soil (*S*) and the absolute control (Table 4). Necrotic lesions caused by inoculation of *A. alternata* isolate FPTA2h were reproduced (Figure 2B). Foliar disease severity was directly proportional to conidia concentration applied for each simulated factor. Overall, the *G* effect induced a higher severity, which ranged in 75.3 - 94.7%, in comparison to *V* with 66 - 95.7% (Tukey,  $p = 0.05$ ). Treatments *V* and *G* at a 49000 conidia mL<sup>-1</sup> concentration (C3) induced 95.3% and 94.7% severity, respectively (Table 4; Figure 2B). Concentrations of 39000 (C2) and 20000 mL<sup>-1</sup> (C1) in *G* induced 80.3% and 75.3% severity, respectively, with not statistical differences (Tukey,  $p = 0.05$ ). Treatments *V*-C1 and *V*-C2 induced a similar severity of 66% and 64.3%, respectively (Table 4; Figure 2B).

A biofilm of colonies, putatively associated with soil-borne pathogenic bacteria was found in *S*-Ci

*discontinuos* de 4-8 segmentos de 70 cm surco ( $n=207.4$ ,  $\sigma^2-p = 338.6$ ,  $\sigma^2-s = 546$ ) (Figura 4A, 4B-**B12**), análogo a *Tipo Flor de Mayo* y *Negro Mixteco*, o con efecto de bordo, como en *Canario*, *Flor de Mayo*, *Garrapato* u *Oti* (Figura 4A, 4B). Por su parte, *Negro Querétaro* evidenció *focos aleatorios* ( $n=136$ ,  $\sigma^2-p > 207.8$ ,  $\sigma^2-s = 343.8$ ) (Figura 4A, 4B-**B7**), cuyo patrón fue similar en *Bayo Mecentral*, *Pinto Texcoco* y *Negro Perla*, este último significativamente más tolerante en ambos eventos fenológicos (Figura 4A, 4B). El patrón de dispersión uniforme asociado a BCMV, sin diferencias estadísticas entre eventos fenológicos (datos no mostrados), sugiere efecto de transmisión por semilla, lo cual se tiene consignando para este virus (Worrall *et al.*, 2015; Subramanya, 2013). Sin embargo, un vector(es) también puede estar implicado por la presencia de focos aleatorios y de orilla-bloque. *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*, entre otros áfidos, se han reportado como vectores (Worrall *et al.*, 2015). Aunque colonización o exuvias de áfidos no fue detectada en las fases de floración y fructificación, no se descarta su ocurrencia transitoria en etapas tempranas del cultivo. El inóculo primario puede provenir de plantas enfermas a partir de semilla infectada, con posterior dispersión por el vector generando focos y agregados con mayor dependencia espacial. Los niveles de severidad e incidencia, contrastante en los eventos fenológicos estudiados, sugiere que la carga viral y proporción de infección en semilla es variable entre genotipos. La transmisión viral puede tener implicaciones en programas de mejoramiento genético y estudios de resistencia al BCMV por lo que debe ser investigado.

El comportamiento espacial de *A. alternata* también mostró una progresión de contagio aunque con claramente con menor intensidad entre genotipos, con excepción de *Tipo Flor de Mayo* y *Canario*, los cuales debido a su mayor susceptibilidad, evidenciaron dependencia espacial en *agregados discontinuos* de 3-8 plantas ( $n=354.3$ ,  $\sigma^2-p = 159.8$ ,



**Table 4. Percentage of severity in detached bean leaflets of *Flor de Mayo* genotype (*P. vulgaris*), inoculated with three conidia concentrations (C) of *Alternaria alternata* isolate FPTA2h, previously damaged with simulated wind, hail and soil in controlled conditions.**

**Cuadro 4. Porcentaje de severidad en folíolos desprendidos de frijol variedad *Flor de Mayo* (*P. vulgaris*), inoculados con tres concentraciones de conidios (C) de *Alternaria alternata* cepa FPTA2h, previa simulación de daños por Viento, Granizo y Suelo en condiciones controladas.**

Tipo de Daño Simulado	Concentración (conidios mL <sup>-1</sup> )	Porcentaje <sup>x</sup> de Severidad (± Std. Dev)
Viento ( <i>V</i> )	C1 (20,000)	66.0 ± 4 d
	C2 (39,000)	64.3 ± 8.5 d
	C3 (49,000)	<b>95.3 ± 3.5 a</b>
Granizo ( <i>G</i> )	C1 (20,000)	75.3 ± 4 c
	C2 (39,000)	80.3 ± 4 b
	C3 (49,000)	<b>94.7 ± 6.1 a</b>
Suelo ( <i>S</i> )	C1 (20,000)	0.0
	C2 (39,000)	(Presencia de biofilm bacteriano)
	C3 (49,000)	
Testigo ( <i>T</i> )	Agua destilada Estéril	0.0

<sup>x</sup> Tratamientos con al menos una letra en común son estadísticamente iguales (Tukey,  $p = 0.05$ ). / <sup>\*</sup> Treatments with at least one common letter are statistically equal (Tukey,  $p = 0.05$ ).

treatment leaflets (Figure 2S). Despite the bacteria(s) were not identified, the survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* has been reported on bean-fields soil surface, with dispersal capacity due to impact or particle splashing (Torres *et al.*, 2019; Gent *et al.*, 2005). These results confirm that abiotic factors' effect on infection, contagion, and dispersal of *Alternaria* and other organisms (Kumar *et al.*, 2021; Lione *et al.*, 2020). Likewise, it suggests that effectiveness of *A. alternata* inoculum load on beans may depend on secondary factors for infective success,

$\sigma^2-s = 514.1$ ). Estos materiales tuvieron alta intensidad de daño (clase 4, 41.5%) en fructificación, correspondiendo con un incremento y coalescencia significativa de focos (Figura 4C-B2, B4, 4D-B2). *Negro Mixteco*, *Negro Querétaro* y *Segregante Oti* presentaron dependencia espacial en pequeños focos aleatorios 2-3 plantas ( $n = 103$ ,  $\sigma^2-p = 28.8$ ,  $\sigma^2-s = 87.1$ ), con reducción de severidad en fructificación asociada a senescencia y pérdida de tejido foliar (Figura 4C, 4D-B12). *Pinto Texcoco*, *Flor de Mayo* o *Garrapato* representaron materiales con patrón de dispersión en agregados discontinuos de 4-5 plantas ( $n = 58.3$ ,  $\sigma^2-p > 72.9$ ,  $\sigma^2-s = 131.2$ ) y severidad moderada (Figura 4C, 4D-B3). *Vaquita Negro* reportó dependencia uniforme de baja intensidad ( $n = 102$ ,  $\sigma^2-p \approx 0$ ,  $\sigma^2-s = 172.8$ ), aunque asociada a vigor de planta muy bajo (0.1) y alta susceptibilidad a BCMV (58.1%), por lo que podría ser efecto de competencia más que tolerancia (Figura 4C, 4D-B11).

Los datos microclimáticos registrados durante el experimento mostraron humedad relativa (HR) mínimas entre 22 - 51% y HR-máximas >77%; temperatura (T) mínimas de 11.6 - 15.8 °C y T-máxima de 21.6 - 28.9 °C, y frecuencia discontinua de precipitaciones post-floración y fructificación. Considerando que estas condiciones son óptimas para crecimiento micelial y esporulación de *A. alternata* (Prasad y Ahir, 2013), los patrones de dispersión exhibidos podrían representar la aptitud parasítica real del hongo condicionada por el genotipo. En consecuencia, el potencial epidémico del hongo dependerá de fuertemente del factor genético y de otros componentes abióticos que contribuyan a la infección (Cuadro 4).

**Efectos abióticos asociados a la infección de *A. alternata* en frijol.** La simulación de daño por Viento (*V*) y Granizo (*G*) propició síntomas en 100% de los folíolos experimentales, no así para

thus could be considered an opportunistic fungus (Armitage *et al.*, 2020). Bean may have evolved efficient structural defense mechanisms during the long plant-pathogen coevolutionary process in America, area of bean domestication (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Even though a hail event is erratic, the tissue damage by wind in high density crops, such as in *P. vulgaris*, can be intermittent and determinant for disease (de Langre, 2008).

## CONCLUSIONS

Applying classical cultural-morphology, genomic, and pathogenic criteria, *Alternaria alternata* was identified as the causal agent of leaf blight in 12 genotypes of bean (*P. vulgaris*). Accessions OL229866, OL229867, OL229868, OL229869, and OL229870 were registered in the GenBank. Similarly, through universal primers for Potyvirus and Begomovirus, the association of Potyvirus *Bean common mosaic virus* with all genotypes was only found. Accessions OL229871, OL229872, OL229873, OL229874, and OL229875 were also registered. In flowering and fruit phenological stages, *Negro Perla* genotype was the most tolerant with 6.7 - 9.6% and 6.2 - 10% severity associated with BCMV and *A. alternata*, respectively. *Canario* was the most susceptible genotype with maximum values of 48.7% and 42.7%. Vigor integration with severity caused by both organisms (IDI) confirmed *Negro Perla* as the most tolerant variety. Geospatial studies demonstrated differential damage intensity among genotypes and higher BCMV epidemic capacity. *A. alternata* could be an opportunistic pathogen. A canopy coverage *Vigor Index* (IV) assisted with single exposure aerial-drone imagery; *Integrated Damage Index* (IDI) with vigor values and multi-pathogen severity levels; logarithmic-diagrammatic

Suelo (*S*) y Testigo absoluto (Cuadro 4). Se reprodujeron lesiones necróticas causadas por la inoculación de la cepa FPTA2h de *A. alternata* (Figura 2B). La severidad foliar de *A. alternata* fue directamente proporcional a la concentración de conidios de *A. alternata* aplicada por cada factor de simulación. En general, el efecto de *G* indujo mayor rango de severidad con 75.3 - 94.7% con respecto a *V* que osciló entre 66 - 95.7% (Tukey,  $p = 0.05$ ). Los tratamientos *V* y *G* con una concentración de 49000 conidios mL<sup>-1</sup> (C3) tuvieron 95.3% y 94.7% de severidad, respectivamente (Cuadro 4; Figura 2B). Las concentraciones 39000 (C2) y 20000 mL<sup>-1</sup> (C1) en *G*, indujeron severidad de 80.3% y 75.3%, respectivamente, los cuales fueron iguales estadísticamente entre sí (Tukey,  $p = 0.05$ ). En los tratamientos *V*-C1 y *V*-C2 se tuvo severidad similar de 66% y 64.3% (Cuadro 4; Figura 2B).

En foliolos de los tratamientos *S*-C<sub>i</sub> se encontró un biofilm de colonias putativamente asociadas a bacterias fitopatógenas presentes en suelo (Figura 2S). Aunque no se identificó a la bacteria(s), se reporta sobrevivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* y *X. axonopodis* pv. *phaseoli* en superficie del suelo cultivado con frijol, con capacidad de dispersión por impacto o salpique de partículas (Torres *et al.*, 2019; Gent *et al.*, 2005). Estos resultados ratifican el efecto de factores abióticos en procesos de infección, contagio y dispersión de *Alternaria* y otros organismos (Kumar *et al.*, 2021; Lione *et al.*, 2020). Asimismo, sugiere que la efectividad de la carga de inóculo de *A. alternata* en frijol puede depender de factores secundarios para el éxito infeccioso, por lo que podría considerarse hongo oportunista (Armitage *et al.*, 2020). El frijol pudo haber desarrollado eficientes mecanismos de defensa estructurales durante el largo proceso coevolutivo planta-patógenos en América, su centro de origen (Rendón-Anaya *et al.*, 2017; Bitocchi *et al.*, 2017). Si bien un evento de granizo es errático, el daño de tejido por viento en cultivos de alta densidad de

scale at leaf and row-canopy levels; and the App-Monitor® v1.1 Android®, available in PlayStore®, are proposed as novel methodologies to optimize comprehensive breeding programs incorporating phytosanitary factors to complement the phenotypic approach to assess yield components.

#### ACKNOWLEDGMENTS

To CONACYT for scholarships granted to graduate students involved in this research as part of the FIT612 Epidemiology class at the Postgraduate College (CP). To the CP-Seed Production Program for funding. To CP-LANREF team, especially to Verónica Martínez Bustamante and Juan José Coria Contreras for logistical support. To CP authorities and students to trust and conduct this project during the most critical period of the COVID-19 pandemic, overcoming responsibly, the confinement and social distancing restrictions.

#### LITERATURE CITED

- Agarwal G, Kavalappara SR, Gautam S, Silva Ad, Simmons A, Srinivasan R and Dutta B. 2021. Field screen and genotyping of *Phaseolus vulgaris* against two Begomoviruses in Georgia, USA. *Insects* 12:49. <https://doi.org/10.3390/insects12010049>
- Armitage AD, Cockerton HM, Sreenivasaprasad S, Woodhall J, Lane CR, Harrison RJ and Clarkson JP. 2020. Genomics evolutionary history and diagnostics of the *Alternaria alternata* species group including apple and asian pear pathotypes. *Frontiers Microbiology* 10:3124. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03124>
- Barnet HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. American Phytopathological Society. USA. 240p.
- Berrouet-Vanegas KM, Gutiérrez-Sánchez A y Marín-Montoya A. 2014. Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis. *Acta Biológica Colombiana* 19: 143-153. <https://doi.org/10.15446/abc.v19n2.39154>
- Bird GW and Warner F. 2018. Nematodes and Nematologists of Michigan. In: Subbotin, S., Chitambar, J. (eds) *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America*. Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-99588-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-99588-5_3)
- Bitocchi E, Rau D, Bellucci E, Rodriguez M, Murgia ML, Gioia T, Santo D, Nanni L, Attene G and Papa R. 2017. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a model for understanding crop

siembra, como en *P. vulgaris*, puede ser continuado y determinante para la enfermedad (de Langre, 2008).

#### CONCLUSIONES

Aplicando criterios morfológicos, genómicos y patogénicos se identificó *Alternaria alternata* como el agente causal de un tizón foliar en 12 genotipos de frijol (*P. vulgaris*). Las accesiones OL229866, OL229867, OL229868, OL229869 y OL229870 se registraron en GenBank. Análogamente, mediante iniciadores universales para Potyvirus y Begomovirus, se demostró únicamente la asociación del potyvirus *Bean common mosaic virus* con todos los genotipos. Se registraron las accesiones OL229871, OL229872, OL229873, OL229874 y OL229875. En etapas fenológicas de floración y fructificación, se determinó que el genotipo *Negro Perla* fue el más tolerante con 6.7 - 9.6% y 6.2 - 10% de severidad asociada a BCMV y *A. alternata*, respectivamente. *Canario* fue el genotipo más susceptible con valores máximos de 48.7% y 42.7%. La integración del vigor con la severidad causada por ambos organismos (IDI) confirmó a *Negro Perla* como la variedad más tolerante. Estudios geoespaciales demostraron intensidad de daño diferencial entre genotipos y la mayor aptitud epidémica del BCMV. *A. alternata* podría ser un patógeno oportunista. Se propone el *Índice de Vigor* de cobertura de dosel (IV) asistido con imágenes áreas-drone de exposición simple; *Índice de Daño Integrado* (IDI) con valores de vigor y niveles de severidad multipatógeno; escalas logarítmicas diagramáticas a nivel de hoja y cobertura foliar; y la App-Monitor® v1.1 Android®, disponible en PlayStore®, como no-veles propuestas para optimizar programas de mejoramiento integrales que incorporen factores fitosanitarios que complementen el enfoque fenotípico de componentes de rendimiento.

- evolution. *Frontiers in Plant Science* 8:722. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00722>
- De Freitas-Vanzo AT, Da Silva CC, De Novaes TG, Walz DM, Guimarães FCM, Kuwahara MK, Molina RO and Leite RPJ. 2021. Evaluation of disease severity caused by *Bean golden mosaic virus* in different bean cultivars. *Canadian Journal of Plant Pathology* 43(1): 172-178. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1771618>
- de Langre E. 2008. Effects of wind on plants. *Annual Review of Fluid Mechanics* 40:141-168. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.40.111406.102135>
- De Ron AM and Santalla M. 2013. *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition). Academic Press. Pages 290-292. ISBN 9780080961569. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01145-1>.
- Delgado SA y Gama LS. 2015. Diversidad y distribución de los frijoles silvestres en México. *Revista Digital Universitaria [en línea]* 16(2). <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art10/index.html>. ISSN: 1607-6079.
- Estrada-Gómez JA, Estrada-Trejo V, Hernández-Livera A, Molina-Moreno JC y Campos-Escudero A. 2004. Oti, una nueva variedad de frijol para el valle de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 115-116. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/27-1/15a.pdf>
- Flores-Estévez N, Acosta-Gallegos JA and Silva-Rosales L. 2003. *Bean common mosaic virus* and *Bean common necrosis virus* in Mexico. *Plant Disease* 87: 21-25. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.1.21>
- Gent DH, Lang JM and Schwartz HF. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease* 89: 558-564. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0558>
- Gilbertson RL, Batuman O, Webster CG and Adkins S. 2015. Role of the supervectors insect *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis*, in the emergence and global spread of plant viruses. *Annual Review of Virology* 2: 67-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085410>
- González-Cruces JA, Ramírez-Razo K, Díaz-Arias KV, Buendía-Ayala BL, Cristóbal-Martínez AL, Consuelo-Isidoro A, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras JJ and Mora-Aguilera G. 2020. Diagrammatic logarithmic scales for bean-leaf spot severity by *Alternaria* sp. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(Suplemento): 71-72. [https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/suplemento382020/Resumenes\\_Posters.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/suplemento382020/Resumenes_Posters.pdf)
- Green M and Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Four Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1936 p.
- Kumar S, Kansal S, Bhardwaj C, Kaushal S, Dangi R, Thakur A and Karn M. 2021. Effect of abiotic factors on progression of *Alternaria* blight of brinjal. *The Pharma Innovation Journal* 10(6): 95-100. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2021/vol10issue6/PartB/10-6-189-452.pdf>
- Lepe-Soltero D, Sánchez-García B, Jiménez-Hernández Y, Salinas-Perez, R, García-Neria M, González de León D, Becerra-Leor E, Acosta-Gallegos J, Silva Rosales L, Silva Rosales L and Silva Rosales L. 2012. Presence of BCMV and BCMNV in five dry bean-producing States in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15(2): 313-321.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por las becas de postgrado otorgadas a los estudiantes que participaron en esta investigación en el contexto del curso Epidemiología FIT612 en el Colegio de Postgraduados (CP). A CP-Producción de Semillas por el financiamiento de la investigación. Al equipo CP-LANREF, en particular a Verónica Martínez Bustamante y Juan José Coria Contreras por apoyo logístico. Al CP y estudiantes por su confianza en la ejecución de este proyecto durante la etapa más álgida de la pandemia COVID-19 superando, responsablemente, las restricciones de confinamiento y distanciamiento social.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

<https://www.revista.criba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1243/747>

- Lione G, Giordano L, Turina M and Gonthier P. Hail-induced Infections of the chestnut blight pathogen *Cryphonectria parasitica* depend on wound size and may lead to severe diebacks. *Phytopathology* 110:1280-1293. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0006-R>
- Mangani BC, Were HK, Ndong'a M and Mukoye B. 2020. Incidence and severity of bean common mosaic disease and resistance of popular bean cultivars to the disease in western Kenya. *Journal of Phytopathology* 168: 501– 515. <https://doi.org/10.1111/jph.12928>
- Mena CJ y Velázquez RV. 2010. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades de Frijol en Zacatecas. Folleto Técnico No. 24. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 83 p. <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/PlagasFrijol.pdf>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado O, Coria-Contreras J, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante V, López-Buenfil A, González-Gómez R y Javier-López M. 2021. Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease. *Mexican Journal Phytopathology* 39(3): 452-492. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-6>
- Moraes MHD and Menten JOM. 2006. Transmission of *Alternaria* spp. by common bean seeds and its effects on physiological quality. *Summa Phytopathologica* 32(4): 381-383. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000400012>



- Murere LW, Were HK, Mukoye B and Kollenberg M. 2018. Distribution of BCMV and response of common bean varieties to Bean common mosaic virus in western Kenya. *International Journal of Academic and Applied Research* 2(9):1-7. ISSN: 2000-005X. <https://philarchive.org/archive/MURDOB>
- Mwaiopopo B, Nchimbi-Msolla S, Njau PJR, Mark D and Mbanziwira DR. 2018. Comprehensive surveys of *Bean common mosaic virus* and *Bean common necrosis virus* and molecular evidence for occurrence of other *Phaseolus vulgaris* viruses in Tanzania. *Plant Disease* 102: 2361-2370. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0198-RE>
- O'Donnell J and Dickinson CH. 1980. Pathogenicity of *Alternaria* and *Cladosporium* isolates on *Phaseolus*. *Transactions of the British Mycological Society* 74(2): 335-342. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80164-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80164-1)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, División de Estadística (FAOSTAT). 2022. <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Pedroza-Sandoval A, Trejo-Calzada R, Chávez-Rivero JA y Samaniego-Gaxiola JA. 2013. Tolerancia al estrés hídrico y fitosanitario mediante indicadores agronómicos y fisiológicos en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 91-104. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509001>
- Prasad LB and Ahir RR. 2013. Role of temperature and relative humidity on mycelial growth of *Alternaria alternata* infecting brinjal. *Trends in Biosciences* 6(3): 307-308. <https://www.researchgate.net/publication/351481659>
- Rendón-Anaya M, Montero-Vargas JM, Saburido-Álvarez S, Vlasova A, Capella-Gutiérrez S, Ordaz-Ortiz JJ, Aguilar OM, Vianello-Brondani RP, Santalla M, Delaye L, Gabaldón T, Gepts P, Winkler R, Guigó R, Delgado-Salinas A and Herrera-Estrella A. 2017. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biology* 18(1): 60. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1190-6>
- Rojas MR, Macedo MA, Maliano MR, Soto-Aguilar M, Souza JO, Bridson RW, Kenyon L, Rivera-Bustamante RF, Zerbini FM, Adkins S, Legg JP, Kvarneden A, Wintermantel WM, Sudarshana MR, Peterschmitt M, Lapidot M, Martin DP, Moriones E, Inoue-Nagata AK and Gilbertson RL. 2018. World management of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 56(1): 637-677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100327>
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russel DR and Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0340>
- SADER y SNICS. 2022. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Catálogo nacional de variedades vegetales en línea. <https://datastudio.google.com/u/0/reporting/5b7206ba-e190-48fe-9696-73523bfccf58/page/itBWB>.
- SIAP. 2020. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap>.
- Simmons EG. 2007. *Alternaria*, An Identification Manual, Fully Illustrated and with Catalograisonné 1796-2007. CBS Fungal Biodiversity Centre. 775 p.
- Subramanya KS. 2013. *Virus Transmission, Seed-Borne. Plant Virus Diseases*. Springer. India. 343p. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6_4)
- Thomma, BPHJ. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225-236. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- Torres JP, Maringoni AC and Silva TAF. 2009. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. *Journal of Plant Pathology* 91: 195-198. <http://doi.org/10.4454/jpp.v91i1.642>
- Watanabe H, Taguchi Y, Hyakumachi M and Kageyama K. 2007. *Pythium* and *Phytophthora* species associated with root and stem rots of kalanchoe. *Journal Genetic Plant Pathology* 73: 81-88. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0338-0>
- White TJ, Bruns TD, Lee SB and Taylor JW. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Pp. 315-322. *In* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. California, USA. 460 p. [https://www.researchgate.net/publication/262687766\\_Amplification\\_and\\_Direct\\_Sequencing\\_of\\_Fungal\\_Ribosomal\\_RNA\\_Genes\\_for\\_Phylogenetics](https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics)
- Worral EA, Wamonje FO, Mukeshimana G, Harvey JJW, Carr JP and Mitter N. 2015. *Bean common mosaic virus* and *Bean common mosaic necrosis virus*: Relationships, Biology and Prospects for Control Pp. 1-46. *In*: *Advances in Virus Research* 93: 319. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.04.002>
- Zheng L, Wayper PJ, Gibbs AJ, Fourment M, Rodoni BC and Gibbs MJ. 2008. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. *PLoS ONE* 3(2): 1586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001586>