

Pathogenic and genetic characterization of Mexican isolates of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder. & Hans

Caracterización patogénica y genética de aislamientos Mexicanos de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder. & Hans

M. Martínez-Garnica¹, F. Nieto-Muñoz¹,
S. Hernández-Delgado² y N. Mayek-Pérez²

¹Instituto Tecnológico El Llano. Carretera Aguascalientes-San Luis Potosí km. 18.5, 20660, El Llano, Aguascalientes.

²Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Blvd. Del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, México CP 88710. Tel/Fax (+52899) 9243727. Corresponding author.

Abstract

Throughout Mexico, fungi from genus *Fusarium* causes root rot in common beans which results in substantial yield losses. Disease epidemiology and fungal/plant population genetics are poorly understood. Common beans growing in four states of Mexico (Aguascalientes, Veracruz, Guanajuato, Mexico) were sampled. Forty-eight *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (FSP) isolates were obtained and identified and then analyzed for conidia size, *in vitro* growth rate, pathogenicity in twelve common bean cultivars, and Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) genotype in order to characterize genetic diversity patterns and to identify relationships among them. Significant differences were found in morphology, pathogenicity and AFLP genotype amongst the various isolates. Isolates from Veracruz, Guanajuato, and Aguascalientes grew faster *in vitro* than those from México and showed the largest conidia. The most pathogenic FSP isolates were from Aguascalientes and Mexico. Bean cultivars with black seed coat (from Mesoamerica and Durango races) and cv. Pinto Villa (from Durango race) showed the highest frequencies of resistance reactions to most of FSP isolates. Isolates from the state of Mexico were genetically different from the other isolates with genetic dissimilarity >9%.

Key words: Common bean, Molecular markers, Pathogenic diversity, *Phaseolus vulgaris* L., Root rots.

Resumen

A través de México los hongos del género *Fusarium* causan las pudriciones de raíz en frijol común lo que resulta en pérdidas sustantivas del rendimiento de grano. La epidemiología de las enfermedades y la genética de poblaciones de la interacción hongo/planta son poco entendidas. Plantas de frijol común creciendo en campos de cuatro estados de México (Aguascalientes, Veracruz, Guanajuato, México) se colectaron y a partir de ellas se obtuvieron 48 aislamientos de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (FSP), mismos que se analizaron con base en el tamaño de conidias, tasa de crecimiento *in vitro*, patogenicidad en doce variedades de frijol común y el genotipo AFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) para caracterizar los patrones de diversidad genética e identificar las relaciones entre morfología, patogenicidad y genotipo AFLP y el origen de los aislamientos. Diferencias significativas en características morfológicas, patogenicidad y genotipo AFLP se observaron entre aislamientos. Los aislamientos de Veracruz, Guanajuato y Aguascalientes crecieron más rápido *in vitro* que los de México y mostraron los conidios más grandes. Los aislamientos de FSP más patogénicos fueron de Aguascalientes y México. Las variedades de frijol con testa de la semilla color negro (de las razas genéticas Mesoamérica y Durango) y la variedad Pinto Villa (de la raza Durango) mostraron las frecuencias más altas de reacciones de resistencia a la mayoría de los aislamientos de FSP. Los aislamientos de Estado de México fueron genéticamente distintas a los otros aislamientos con una disimilaridad genética >9%. Nuestros resultados mostraron que no hay relación entre la morfología, la patogenicidad y/o el genotipo AFLP con el origen de cada aislamiento de FSP.

Palabras clave: Frijol común, marcadores moleculares, diversidad patogénica, *Phaseolus vulgaris* L., pudriciones de raíz.

Introduction

Root rots of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by fungi from genus *Fusarium* are economically important in semi-arid regions of Mexico (Navarrete and Acosta, 1999) due to increases grain yield losses in susceptible cultivars. *Fusarium* produces red or dark lesions on seedling hypocotyls and epicotyls near cotyledon node. Lesions cover the stem and then can produce wilting and death of plants (Abawi and Pastor-Corrales, 1990). Fungal attacks occur during periods

Introducción

La pudrición de la raíz del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocados por hongos del género *Fusarium* tienen importancia económica en las regiones semiáridas de México (Navarrete y Acosta, 1999) debido al aumento de pérdidas en el rendimiento del grano en cultivares susceptibles. *Fusarium* produce lesiones rojas u oscuras en los hipocotíleos de las plántulas cerca del nudo del cotiledón. Las lesiones cubren el tallo y luego pueden producir el marchitamiento y la muerte de las

of high temperature and drought. The fungus produces pink, yellow or purple mycelium as well as monocellular or bicellular microconidia which are frequently produced in the infected host's vascular system. Macroconidia are the typical vegetative propagules. They contain three to five curve-shaped cells. Macroconidia are used for taxonomic identification of *Fusarium* species. Chlamydospores are mono or bicellular and have thick cell walls (Armstrong and Armstrong, 1981; Abawi and Pastor-Corrales, 1990).

The genus *Fusarium* consists of different species and formae specialis classified based on host range. For example *F. oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *phaseoli* (Kendrick & Snyder) and *F. solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder & Hans (FSP) attack commonly common beans (Armstrong and Armstrong 1981) although new species attacking common beans (*F. lateritium*) have been found in Mexico (Sanchez-Garcia *et al.*, 2006). Differentiating formae specialis is difficult using morphologic characteristics alone. Additional pathogenicity tests must be conducted using differential cultivar sets or vegetative compatibility group (VCGs) tests. These tests are quite laborious and time-consuming and the results are affected by environmental conditions (Woo *et al.*, 1998). Molecular marker methodologies avoid the limitations and provide precise identification of fungal genetic diversity (Khalil *et al.*, 2003). Moreover, genetic analyses are particularly useful when correlated with race or VCGs identification, the epidemic demographics, analysis of

plantas (Abawi y Pastor-Corrales, 1990).

Los ataques fúngicos ocurren durante períodos de sequía y de altas temperaturas. El hongo produce micelio de color de rosa, amarillo o púrpura, así como microconidios monocelulares o bicelulares que con frecuencia se producen en el sistema vascular del huésped infectado. Los macroconidios son los típicos propágulos vegetativos. Estos contienen de tres a cinco células en forma de curva. Los macroconidios se utilizan para la identificación taxonómica de las especies de *Fusarium*. Clamidosporas son mono o bicelular y tienen membranas celulares gruesas (Armstrong y Armstrong, 1981; Abawi y Pastor-Corrales, 1990).

El género *Fusarium* consta de diferentes especies y formas especiales clasificadas basadas en el rango de los hospederos. Por ejemplo, *F. oxysporum* (Schlecht.) f. SP. *phaseoli* (Kendrick & Snyder) y *F. solani* f. SP. *phaseoli* (Burk). Snyder & Hans (FSP) atacan comúnmente el frijol (Armstrong y Armstrong 1981) aunque se han encontrado nuevas especies atacando al frijol (*F. lateritium*) en México (Sánchez-García *et al.*, 2006).

Es difícil diferenciar las formas especiales basándose solamente en las características morfológicas. Se deben realizar pruebas de patogenicidad adicionales utilizando conjuntos de diferencial cultivar o pruebas de grupo (VCGs) de compatibilidad vegetativa. Estas pruebas son bastante laboriosas y requieren mucho tiempo, donde los resultados se ven afectados por las condiciones ambientales (Woo *et al.*, 1998).

population genetic diversity, and fungal isolate evolution relationships (Elias *et al.*, 1993).

Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), sequencing of the DR region of the large-subunit (28S) ribosomal DNA and Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) have been used to characterize *Fusarium* genetic diversity (Kelly *et al.*, 1994; Manicom *et al.*, 1987; Jana *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2003; Brasileiro *et al.*, 2004) and to determine the relationship between genotype and pathogenicity (Elias *et al.*, 1993; Assigbetse *et al.*, 1994; Cramer *et al.*, 2003; Zanotti *et al.*, 2006). Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) were used by Abdel-Satar *et al.* (2003); Khalil *et al.* (2003) and Martínez-Garnica *et al.* (2004) to analyze *Fusarium* genetic relationships amongst isolates of different geographic origins. FSP have been studied infecting soybeans and common beans as well as molecular fingerprinting have been obtained (Mwang'ombe *et al.*, 2008).

The objective of this work was to characterize the morphologic, pathogenic and genetic variation and relationships amongst 48 FSP isolates from four regions of Mexico.

Materials and methods

FSP isolates

Common bean plants which showed root rot symptoms were collected in four locations of Mexico: Sandoval and Pabellón de Arteaga, Aguascalientes; Irapuato, Guanajuato; Texcoco, México; and Cotaxtla and Isla, Veracruz. Roots were disinfested using 2% NaOCl and

Las metodologías de los marcadores moleculares evitan las limitaciones y proporcionan la identificación precisa de la diversidad genética fúngica (Khalil *et al.*, 2003). Además, los análisis genéticos son especialmente útiles cuando se correlacionó con la raza o la identificación VCGs, la demografía epidémica, análisis de diversidad genética de la población y la evolución de las relaciones de aislados fúngicos (Elias *et al.*, 1993).

Se utilizaron la restricción de la longitud de los fragmentos de los polimorfismos (RFLPs), la secuencia de la región DR de la sub-unidad (28S) ribosomal DNA, y un diseño polimórfico aleatorizado DNA (RAPDs), para caracterizar la diversidad genética de *Fusarium* (Kelly *et al.*, 1994; Manicom *et al.*, 1987; Jana *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2003; Brasileiro *et al.*, 2004) y para determinar la relación existente entre el genotipo y la patogenicidad (Elias *et al.*, 1993; Assigbetse *et al.*, 1994; Cramer *et al.*, 2003; Zanotti *et al.*, 2006).

La longitud de los polimorfismos de fragmentos amplificadas (AFLPs) fueron utilizados por Abdel-Satar *et al.*, (2003); Khalil *et al.* (2003) y Martínez-Garnica *et al.* (2004) para analizar las relaciones genéticas de *Fusarium* entre aislados de diferentes orígenes geográficos. Se han estudiado FSP infectando soya y frijol, obteniendo la toma de huellas dactilares moleculares (Mwang'ombe *et al.*, 2008).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la variación morfológica, patógena y genética y las relaciones entre 48 FSP aislados procedentes de cuatro regiones de México.

cultured in Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) medium acidified with lactic acid. Petri dishes were incubated for seven days to 25°C in darkness. Previous to this work, identity of fungi associated to root rots was confirmed based on morphologic traits and we found *Fusarium*, *Rhizoctonia* and *Macrophomina*, mainly. After, isolates were analyzed and identified as FSP using the criteria described by Armstrong and Armstrong (1981) and O'Donnell (2000). Finally, we selected the 48 FSP isolates used in this work, 12 per each state. Monosporic cultures of each selected isolate were obtained from 10⁻⁴ dilutions in sterilized water. The fungus was cultured on PDA for seven days at 25°C in darkness (table 1).

Morphology and *in vitro* growth

One 1 cm diameter PDA disk with seven day fungal growth was placed in the center of a Petri dish containing PDA media. Each isolate was replicated three times and then incubated at 25°C for four days in darkness. Colony diameter was measured daily and the growth rate calculated (Mayek-Pérez *et al.*, 1997). At the fourth day, colony shape, aerial mycelium production, and color were recorded for each isolate. Finally, the plate was scrapped. Mycelium and spores were harvested, placed on glass slides, and stained with lacto-phenol dye. Length, width and the length/width ratio of 50 spores per isolate were measured using a calibrated micrometer in an optical microscope at 40X magnification.

Pathogenic analysis

Pathogenicity of FSP isolates was measured using 12 bean cultivars:

Materiales y métodos

Aislados de FSP

Se recolectaron plantas de frijol común que mostraron síntomas de pudrición en la raíz en cuatro localidades de México: Sandoval y Pabellón de Arteaga, Aguascalientes; Irapuato, Guanajuato; Texcoco, México y Cotaxtla e Isla, Veracruz. Las raíces fueron desinfectadas usando 2% NaOCl y cultivadas en placas de Petri con un medio papa-dextrosa (PDA) acidificado con ácido láctico.

Las placas de Petri se incubaron durante siete días a 25°C en la oscuridad. Previo a este trabajo, fue confirmada la identidad de hongos asociados a pudriciones de raíz basada en características morfológicas y se encontraron *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Macrophomina*. Después, los aislamientos fueron analizados e identificaron como FSP utilizando los criterios descritos por Armstrong y Armstrong (1981) y O'Donnell (2000).

Por último, se seleccionaron los 48 aislamientos de FSP utilizados en este trabajo, 12 por cada estado. Se obtuvieron cultivos monospóricos de cada cepa seleccionada de 10⁻⁴ diluciones en agua esterilizada. El hongo fue cultivado en PDA durante siete días a 25°C en la oscuridad (tabla 1).

Morfología y crecimiento *in vitro*

Un disco de PDA de 1 cm de diámetro con crecimiento fúngico de siete días se colocó en el centro de un plato de Petri conteniendo medio PDA. Cada cepa fue replicada tres veces y luego se incubaron a 25°C durante cuatro días en la oscuridad. El diámetro de la colonia se midió diariamente y se cal-

Table 1. *In vitro* characteristics of *F. solani* f.sp. *phaseoli* isolates from four states of Mexico and resistance/susceptibility ratios for 12 common bean cultivars.

Cuadro 1. Características *in vitro* de aislados de *F. solani* f.sp. *phaseoli* de cuatro estados de México y la tasa de resistencia/sensibilidad de 12 cultivares de frijol común.

State	Aspect of colony		Growth rate (mm d ⁻¹)		Conidia size		Reactions in 12 common bean genotypes	
	Growth pattern ^z	Color	24 h	48 h	Length (µm)	Width (µm)	Length/width	R ^y S
Aguascalientes	Radial (12)	White (1),						
		Beige (7),						
		Purple (4)	2.7	2.3	2.1	0.6	3.5	3
Guanajuato	Radial (12)	Beige (8),						
		Pink (4)	2.0	2.3	6.3	1.2	5.3	4
México	Radial (6),	Purple (4),						
		Beige (4),	2.7	1.8	1.8	0.6	3.0	3
Veracruz	Radial (11),	Pink (4)						
		Beige (8),	2.7	2.3	2.2	0.7	3.2	9
DMSH (P<0.05)	Irregular (1)	Pink (4)	0.5	0.4	1.5	0.4	1.0	

^z = Number in brackets indicate the number of isolates per class.

^y = R = Resistance, S = Susceptibility.

three with 'flor de mayo' seeds (Flor de Mayo Sol, Flor de Mayo Bajío, Flor de Mayo M38); three 'pinto' beans (Pinto Villa, Pinto Mestizo, Pinto Zapata.); three 'bayo' beans (Bayo Zacatecas, Bayo Madero, Bayo Criollo del Llano); two 'black-seed' cultivars (Negro Altiplano, Negro Vizcaya); and one 'yellow'-seed landrace (Tlaxcala 62). All bean genotypes show growth habit type III and all of them with the exception of Tlaxcala 62 (landrace) are breed cultivars (table 2). Isolates and common bean cultivars were treated according to a randomized block design pattern with two replicates and using *in vitro* growth conditions (Martínez-Garnica *et al.*, 2004). Each experiment consisted of 10 seeds placed on a Petri dish. The seeds were completely colonized by the respective FSP isolate. The seeds had been previously disinfested with 2% NaOCl for 5 min and after then were rinsed with sterile distilled water and dried with sterilized paper. Petri dishes with seeds were incubated for four days at 25±1°C in darkness. Disease severity for each isolate was estimated using a visual scale from 1 to 5: 1 = < 20%; 2 = 21-40%; 3 = 41-60%; 4 = 61-80% and 5 = > 80% of seed coat or roots infected by the fungus (Martínez-Garnica *et al.*, 2004)

AFLP analysis

The DNA of each FSP isolate was obtained by using the protocol of Reader and Broda (1985). DNA concentrations were visually estimated on 0.8% agarose gels using a standard molecular marker (phage λ /HindIII). The 48 FSP isolates were analyzed using the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) method (Vos

culó la tasa de crecimiento (Mayek-Pérez *et al.*, 1997). En el cuarto día, se registraron la forma de la colonia, la producción de micelio aéreo y el color para cada aislamiento. Finalmente, la placa fue desechada. El micelio y las esporas fueron cosechados, colocados sobre un portaobjetos de vidrio y teñidos con tintes de lacto-fenol. La longitud, anchura y la relación longitud/anchura de 50 esporas por aislar fueron medidas usando un micrómetro calibrado en un microscopio óptico con 40X de aumento.

Análisis patogenético

La patogenicidad de los aislamientos de FSP se midió usando 12 cultivares de frijol: tres con semillas 'flor de mayo' (Flor de Mayo Sol, Flor de Mayo Bajío, Flor de Mayo M38); tres frijoles "pinto" (Pinto Villa, Pinto Mestizo, Pinto Zapata.); tres frijoles 'bayo' (Bayo Zacatecas, Bayo Madero, Bayo Criollo del Llano); dos cultivares 'semilla negra' (Altiplano Negro, Negro Vizcaya); y una semilla 'amarilla' (Tlaxcala 62). Todos los genotipos de frijol presentaron un hábito de crecimiento III, y todos, exceptuando Tlaxcala 62 (landrace) son cultivares de géneros (cuadro 2).

Los aislamientos y cultivares de frijol fueron tratados según un patrón de diseño de bloques al azar con dos repeticiones y el uso de condiciones de crecimiento *in vitro* (Garnica-Martínez *et al.*, 2004). Cada experimento consistió en 10 semillas colocadas en una placa de Petri. Las semillas fueron completamente colonizadas por el respectivo aislante FSP. Las semillas habían sido previamente desinfestadas con 2% NaOCl durante 5 minutos y luego enjuagadas con agua destilada

Table 2. Agronomic characteristics of 12 common bean cultivars and resistance/susceptibility ratios to 48 *F. solani* f.sp. *phaseoli* isolates.

Cuadro 2. Características agronómicas de 12 cultivares de frijol común y la tasa de resistencia/sensibilidad a 48 aislados de *F. solani* f.sp. *phaseoli*.

Cultivar	Race ^z	Seed color	Reaction to FSP isolates	
			Resistance	Susceptibility
Flor de Mayo Sol	J	Beige with pink spots	30	18
Flor de Mayo Bajío	J	"	22	26
Flor de Mayo M38	J	"	16	32
Pinto Villa	D	Beige with brown spots	35	13
Pinto Mestizo	D	"	12	36
Pinto Zapata	D	"	20	28
Bayo Zacatecas	D	Beige	10	38
Bayo Madero	D	"	7	41
Bayo Criollo del Llano	D	"	25	23
Negro Altiplano	D/M	Black	34	14
Negro Vizcaya	J	"	33	15
Tlaxcala 62	M	Yellow	31	17

^zRace: M = Mesoamerica, D = Durango, J = Jalisco

et al., 1995) in which genomic DNA was digested with two endonucleases (EcoRI and Tru9I). A pre-selective PCR amplification was performed using a single nucleotide (A); while the selective amplification was carried out using two selective nucleotides (A plus A, T, G or C). The amplified products were separated by electrophoresis on 6% acrylamide gels and visualized by silver staining (Promega®; Madison, WI, USA).

Data analysis

Morphological and *in vitro* growth data (mean±SE) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software; San Diego, CA, USA). Pathogenicity results were subjected to variance analysis where sources of variation were isolates, common bean cultivars, and their interaction. Mean comparisons were determined by calculating LSD values ($P \leq 0.05$). Euclidean distances amongst isolates were calculated using pathogenicity means and then used to perform a cluster analysis using the UPGMA (Unweighted Paired Grouping Method with Arithmetic Averages) method. A binary matrix reflecting the presence (1) or absence (0) of each AFLP band was generated for each isolate. The number of bands (total, monomorphic, polymorphic) was counted and genetic distances amongst the isolates were estimated using the simple matching coefficient method (Skroch *et al.*, 1992). Cluster analysis based on the similarity matrix was performed with Statistica version 5 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) using the UPGMA method. Diversity values based on phenotype frequency were calculated

estéril y secadas con papel esterilizado. Las semillas se incubaron durante cuatro días en platos de Petri a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en la oscuridad. La severidad de la enfermedad para cada cepa se estimó mediante una escala visual del 1 al 5: 1 = 80% de la capa de semilla o raíces infectadas por el hongo (Garnica-Martínez *et al.*, 2004)

Análisis AFLP

El ADN de cada aislamiento de FSP se obtuvo mediante el protocolo de Reader y Broda (1985). Las concentraciones de ADN se estimaron visualmente en geles de agarosa al 0.8% usando un marcador molecular estándar (fago λ /HindIII). Los 48 aislamientos de FSP fueron analizados utilizando el método AFLP (polimorfismos de longitud de fragmento amplificado) (Vos *et al.*, 1995) en la cual el ADN genómico fue digerido con dos endo-núcleos (EcoRI y Tru9I).

Una amplificación pre-selectiva de PCR fue realizada usando un solo nucleótido (A); mientras que la amplificación selectiva se realizó mediante dos nucleótidos selectivos (A más A, T, G o C). Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de acrilamida 6% y visualizados por tinción de plata (Promega®; Madison, WI, Estados Unidos).

Análisis de la información

Los datos de crecimiento morfológicas e *in vitro* (media±SE) se calcularon utilizando el software de GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA). Los resultados de patogenicidad fueron sometidos a análisis de varianza, donde fuentes de variación fueron aislados, cultivares de frijol y su interacción. Se determinaron las

for isolates grouped based on origins using Nei's unbiased distances (Nei, 1978). Diversity values for group of isolates (H) were calculated as the mean value over all markers.

Results and discussion

Seven isolates (MEX01, MEX02, MEX03, MEX07, MEX08, MEX09 Y VER05) showed an irregular colony growth pattern and all other isolates showed a radial growth pattern. Four colony colors were found: white (one isolate), beige (26), pink (13) and purple (8). The isolates from Veracruz, Guanajuato and Aguascalientes showed the highest relative colony growth rate while isolates from Guanajuato had the largest spores. Most bean cultivars showed susceptibility to most FSP isolates. Isolates from Aguascalientes and Mexico were the most aggressive while isolates from Guanajuato and Veracruz were less pathogenic (table 1). Genotypes Tlaxcala 62, Negro Altiplano, Flor de Mayo Sol, Bayo Criollo del Llano and Pinto Villa were resistant to 25 or more isolates, while genotypes Flor de Mayo M38, Bayo Zacatecas, Bayo Madero and Pinto Mestizo were resistant to 16 or less isolates (table 2). Pathogenicity cluster analysis data showed two groups, one group (A) included the most aggressive isolates from Aguascalientes and Mexico, while the other group (B) included the less aggressive isolates from Guanajuato and Veracruz (figure 1a).

All isolates in this study were pathogenic to at least one common bean seed cultivar as found by Mwang'ombe *et al.* (2008) too in one bean cultivar

comparaciones de las medias mediante el cálculo de los valores de LSD ($P \leq 0,05$).

Distancias euclidianas entre los aislamientos fueron calculadas usando las medias de patogenicidad, y luego usadas para llevar a cabo un análisis de conglomerados utilizando el método UPGMA (un método de agrupación no ponderado con promedios aritméticos). Se generó una matriz binaria que refleja la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda de AFLP para cada aislamiento

Se contó el número de bandas (total, monomórficas, polimórficas), de igual forma, las distancias genéticas entre los aislamientos se estimaron mediante el método simple de coeficiente (Skroch *et al.*, 1992). Se realizó el análisis de agrupamiento basado en la matriz de similitud con Statistica versión 5 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) usando el método UPGMA

La diversidad de valores basada en la frecuencia de fenotipo se calculó para aislamientos agrupados en base a orígenes, utilizando distancias imparciales de Nei (Nei, 1978). Se calcularon los valores de diversidad para el grupo de aislamientos (H) como el valor medio sobre todos los marcadores.

Resultados y discusión

Siete aislamientos (MEX01, MEX02, MEX03, MEX07, MEX08, VER05 Y MEX09) demostraron un patrón de crecimiento irregular en las colonias y las otras cepas mostraron un patrón de crecimiento radial. Se observaron cuatro colores de colonia: blanco (un aislante), beige (26), rosa (13) y morado (8). Los aislamientos de

(Rosecoco) commonly grown in Kenya. Most cultivars were susceptible to a majority of the isolates. Variable occurrence (5 to 48%) of non-pathogenic *F. oxysporum* strains have been found in cucumber (*Cucumis sativus* L.) (Vakalounakis and Fragkiadakis 1999), melon (*Cucumis melo* L.) (Appel and Gordon 1994) and beans (Woo *et al.* 1996). Cultivars Tlaxcala 62, Negro Altiplano, Flor de Mayo Sol, Bayo Criollo del Llano and Pinto Villa were resistant to $\geq 50\%$ of the isolates. Cultivars Flor de Mayo M38, Bayo Zacatecas, Bayo Madero, and Pinto Mestizo were resistant to $\leq 33\%$ of the isolates. Resistant cultivars belong to genetic races Mesoamerica and Durango with black seed-coat. Susceptible cultivars belong to Durango and Jalisco races with 'bayo' and 'flor de mayo' seed-coat, respectively. Cultivar Pinto Villa belongs to Durango race but is the 'pinto' bean. Similar resistance/susceptibility relationships among bean races have been found in common bean-*M. phaseolina* (Tassi) Goidanich. No clear association between genotype and host/isolate geographic origin was found (Mayek-Pérez *et al.* 2002). Biotrophic common bean pathogens such as *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc. y Magnus) Lams.-Scrib.] causal agent of anthracnose show genetic lineages clearly related to geographic origin of the isolate (González *et al.* 1998).

Álves-Santos *et al.* (1999) suggested that pathogenic forms of FOP could be derived from non-pathogenic parents. Mutations that induce parasitic phenotype are rare events and therefore pathotypes from

Veracruz, Guanajuato y Aguascalientes demostraron la mayor tasa de crecimiento de la Colonia mientras que aislantes de Guanajuato tenían las esporas más grandes. La mayoría de los cultivares de frijol mostraron susceptibilidad a la mayoría de los aislamientos de FSP.

Los aislados de Aguascalientes y México fueron los menos agresivos, mientras que los aislados de Guanajuato y Veracruz fueron los que tuvieron menos patogenicidad (cuadro 1). Los genotipos Tlaxcala 62, Negro Altiplano, Flor de Mayo Sol, Bayo Criollo del Llano y Pinto Villa fueron resistentes a 25 o más aislados, mientras que los genotipos Flor de Mayo M38, Bayo Zacatecas, Bayo Madero y Pinto Mestizo fueron resistentes a 16 o menos aislados (cuadro 2). El análisis de grupos de datos patogenicidad reveló la existencia de dos grupos, uno de los grupos (A) incluía los aislamientos más agresivos de Aguascalientes y de México, mientras que el otro grupo (B) incluye los aislamientos menos agresivos de Guanajuato y Veracruz (figura 1A).

Todos los aislados en este estudio fueron patogénicos en al menos una variedad de frijol común, como ha sido reportado por Mwang'ombe *et al.* (2008) en una variedad de frijol (Rosecoco) comúnmente cultivadas en Kenia. La mayoría de los cultivares fueron sensibles a la mayor parte de los aislados. Se ha evidenciado la variable incidencia de cepas no patogénicas de *F. oxysporum* en pepino (*Cucumis sativus* L.) (Vakalounakis y Fragkiadakis 1999), melón (*Cucumis melo* L.) (Appel y Gordon 1994) y frijoles (Woo *et al.* 1996). Los cultivares

the same formae specialis can be derived from a single parent (monophyletic origin). In addition, frequently new pathotypes from the same formae specialis result from changes in lineages (polyphyletic origin). If pathogenic FOP isolates originate from a common parent, then members from the same VCG group should be more closely related than other non-pathogenic isolates. Thus, pathogenicity of FOP appears to be polyphyletic (Álves-Santos *et al.* 1999). The use of common bean cultivars that are resistant to *Fusarium* provides an effective tool for management of root rot. These cultivars contain monogenic and dominant genes (Salgado *et al.*, 1995). Even though resistance genes can be readily transferred to susceptible cultivars, the effectiveness of this approach depends upon fungal physiology and the relative genetic diversity of the pathogen population in the pathosystem. Since *Fusarium* shows broad diversity, we must assume that transfer of resistance genes will show limited effectiveness. Thus, to increase the probability of developing common bean cultivars resistant to genetically diverse *Fusarium* populations, bean cultivars must contain new polygenes showing resistance to the broadest range of genetically-diverse pathogens.

The AFLP analysis which was performed using four oligonucleotide primer combinations produced 535 amplified products of which 4.3% were monomorphic (data not shown). Cluster analysis based on AFLP data produced three groups of isolates: group A included isolates from Veracruz (12),

Tlaxcala 62, Negro Altiplano, Flor de Mayo Sol, Bayo Criollo del Llano y Pinto Villa eran resistentes a $\geq 50\%$ de los aislamientos. Los cultivares Flor de Mayo M38, Bayo Zacatecas, Bayo Madero y Pinto Mestizo eran resistentes a $\leq 33\%$ de los aislamientos. Los cultivares resistentes pertenecen a razas genéticas Mesoamérica y Durango con testa negra. Los cultivares susceptibles pertenecen a las razas Durango y Jalisco con 'bayo' y 'flor de mayo' Testa, respectivamente. El cultivar Pinto Villa pertenece al género Durango pero es el frijól 'pintón'. Se han encontrado relaciones similares entre la resistencia/sensibilidad de géneros de frijol encontrados en frijol-M. *phaseolina* (Tassi) Goidanich. No se encontró ninguna asociación clara entre el genotipo y el anfitrión/aislado con origen geográfico (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). Los patógenos de frijol comúnmente foliares como *Colletotrichum lindemuthianum* ((Sacc. y Magnus) Lams.-Scrub.), agente causal de la antracnosis, muestra linajes genéticos claramente relacionado con los orígenes geográficos de la cepa (González *et al.*, 1998).

Álves-Santos *et al.* (1999) sugiere que las formas patógenas de FOP pudieran derivarse de los padres no patógenos. Las mutaciones que inducen el fenotipo parasitario son acontecimientos raros y por lo tanto se pueden derivar de una madre soltera (origen monofilético). Además, frecuentemente pueden resultar cambios en linajes (origen polifilético) de las mismas formas especiales. Si los patógenos aislados de FOP originan un padre común, entonces los miembros del mis-

Aguascalientes (3) and Guanajuato (1); group B contained nine isolates from Aguascalientes and 11 from Guanajuato and group C included isolates from the state of Mexico. Pathogenic and genetic analyses showed no clear association between isolate groupings; however, we found high genetic variability among isolates grouped based on geographic origin. Isolates of Mexico were clearly different based on AFLP data from isolates from all other regions (figure 1b). Less than 5% of AFLP amplified products were monomorphic which shows the high genetic variability in Mexican FOP isolates. In addition, based on genetic data no identical isolates were found. Our results contrasting with those reported by Achenbach *et al.* (1997) where after ITS region and RAPD analyses of 19 isolates of FSP from soybeans grown in USA found very low levels of genetic variation within the form species and suggest the analyzed isolates comprise an almost clonal population. Our analysis reported genetic dissimilarities among isolates ranged from 1 to 8% similar to the report of Abdel-Satar *et al.* (2003). We suggest that FSP shows high levels of genetic diversity as other *Fusarium* formae specialis as FOP since the fungus uses both heterocaryosis and parasexualism as genetic exchange mechanisms between vegetative compatible strains. Members of one vegetative compatibility group (VCG) are both genetically and clonally related (Woo *et al.*, 1996). In this sense, we suggest that further identification of VCGs of FSP isolates would help to elucidate the association between FSP genetic lineages.

mo grupo de VCG deben estar más estrechamente relacionados que otras cepas no patógenas. Por lo tanto, la patogenicidad de FOP parece ser polifilética (Álves-Santos *et al.* 1999).

El uso de cultivares de frijol resistente a *Fusarium* proporciona una herramienta eficaz para la gestión de la putrefacción de la raíz. Estos cultivares contienen genes monogenéticos y dominantes (Salgado *et al.*, 1995). Aunque los genes de resistencia se pueden transferir fácilmente a cultivares susceptibles, la eficacia de este enfoque depende de la fisiología fúngica y la relativa diversidad genética de la población del patógeno en el pato-sistema. Debido a que *Fusarium* muestra amplia diversidad, se debe asumir que la transferencia de genes de resistencia mostrará una eficacia limitada. Por lo tanto, para aumentar la probabilidad de desarrollar cultivares de frijol común resistentes a poblaciones genéticamente diversas de *Fusarium*, los cultivares de frijol deben contener nuevas poli-genes mostrando resistencia a la más amplia gama de patógenos genéticamente diversos.

El análisis AFLP, que se realizó con cuatro combinaciones de oligonucleótidos, produjo 535 productos amplificados de los cuales 4,3% eran monomórficas (datos no mostrados). El análisis de agrupamiento en base a datos AFLP produjo tres grupos de aislamientos: Grupo A incluyó aislamientos de Veracruz (12), Aguascalientes (3) y Guanajuato (1); Grupo B contenía nueve aislamientos de Aguascalientes y 11 desde Guanajuato, y Grupo C incluída aislamientos procedentes del estado de México. Los aná-

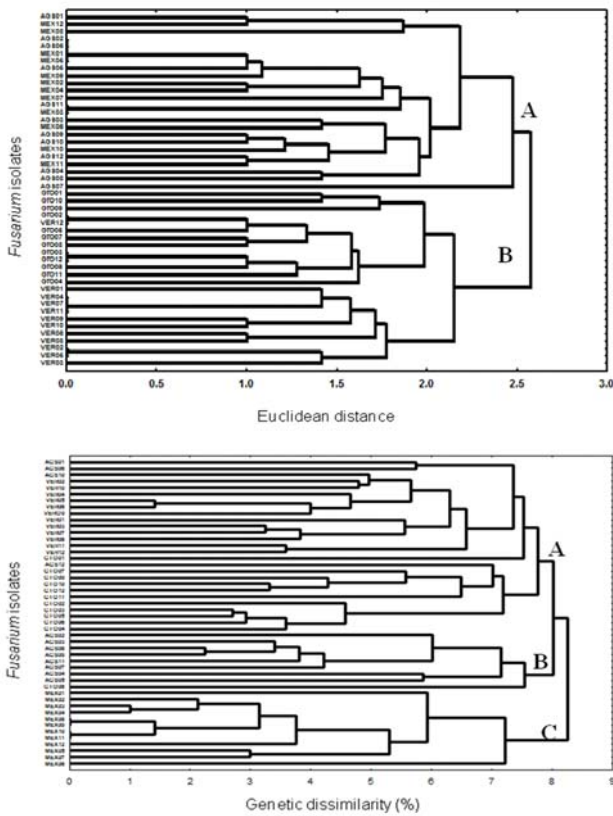


Figure 1. Dendrograms based on pathogenicity in 12 common bean cultivars (a) and AFLP data (b) of 48 *F. solani* f.sp. *phaseoli* isolates from four states of Mexico (AGS= Aguascalientes, GTO= Guanajuato, MEX= México, VER= Veracruz).

Figura 1. Dendrograma basado en la patogenicidad de 12 cultivares de frijol común (a) y la información de AFLP (b) de 48 aislados de *F. solani* f.sp. *phaseoli*, de cuatro estados de México (AGS= Aguascalientes, GTO= Guanajuato, MEX= México, VER= Veracruz).

The overall analysis of data indicated that Mexican *Fusarium* isolates showed high morphologic, pathogenic and genetic variability within populations. High levels of diversity in populations of FSP or other *Fusarium* species or formae

lisis patogénicos y genéticos no mostraron ninguna asociación clara entre las agrupaciones aislantes. Sin embargo, se observa una alta variabilidad genética entre los aislamientos, agrupados basados en el origen geográfico. Los aislamientos de México fueron cla-

specialis have been previously reported in México (Martínez-Garnica *et al.* 2004) and other countries such as USA (Appel and Gordon 1994; Cramer *et al.* 2003); Greece (Vakalounakis and Fragkiadakis 1999); Spain (Álves-Santos *et al.* 1999); Italy (Woo *et al.* 1996), Egypt (Abdel-Satar *et al.* 2003; Khalil *et al.* 2003), Brazil (Brasileiro *et al.*, 2004) and Kenya (Mwang'ombe *et al.* 2008). Gordon *et al.* (1992) and after Zanotti *et al.* (2006) showed that *Fusarium* pathogenic isolates show greater genetic diversity than non-pathogenic populations due to their effective dispersal mechanisms as well as the introduction of new pathotypes (migration) in specific agro-ecosystems rather than VCG population evolution or the change from non-pathogenic to pathogenic phenotype resulting from sexual exchange (Alves-Santos *et al.* 1999). Despite no clear association between pathogenicity and FSP genotype was found, isolates can be clearly differentiated based on pathogenicity patterns, AFLP genotype and geographical origin. Our results are in agreement with Woo *et al.* (1996), Alves-Santos *et al.* (1999), Cramer *et al.* (2003), Khalil *et al.* (2003), Brasileiro *et al.* (2004) and Mwang'ombe *et al.* (2008) who report no relationship between genotype and pathotype in *Fusarium* species and populations but contrast with results reported by Zanotti *et al.* (2006) whose found differentiation between pathogenic and no-pathogenic *F. oxysporum* Schlechtend.: Fr. f.sp. *phaseoli* J.B. Kendrick and W.C. Zinder (FOP) isolates from Brazil. No association between pathotype and genotype could be based on *Fusarium*

ramente diferentes basado en los datos AFLP de aislamientos de todas las demás regiones (figura 1b). Menos del 5% de los productos amplificado de AFLP fueron monomórficos, que demuestran la alta variabilidad genética en aislamientos mexicanos FOP. Además, basado en los datos genéticos, no se encontraron aislados idénticos. Nuestros resultados contrastan con los reportados por Achenbach *et al.* (1997) donde después de la región ITS y el análisis de RAPD en 19 aislamientos de FSP de soja cultivada en Estados Unidos, encontraron muy bajos niveles de variación genética dentro de una especie de forma y sugieren que los aislamientos analizados comprenden una población casi clónica. El análisis de la presente investigación informó diferencias genéticas entre aislamientos oscilando entre 1 y 8%, similar al informe de Abdel-Satar *et al.* (2003). Los autores sugieren que FSP muestra altos niveles de diversidad genética como otros géneros de *Fusarium* como FOP, puesto que el hongo utiliza heterocariosis y para-sexualismo como mecanismos de intercambio genético entre cepas vegetativas compatibles. Los miembros de un grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) están relacionados entre sí de forma genética y clonal (Woo *et al.*, 1996). En este sentido, se sugiere que una mayor identificación de Gvcs de los aislados FSP ayudaría a esclarecer la asociación entre los linajes genéticos FSP.

El análisis de aislados mexicanos de *Fusarium* mostró alta variabilidad morfológica, patógena y genética dentro de las poblaciones. Altos niveles de diversidad en las poblaciones de FSP u otras especies de *Fusarium* se han

non-monophyletic nature which implies no genetic relation between two isolates from the same race (Bodker *et al.* 1993).

Pathogenic evolution and VCGs cause increased genetic variability in fungi. Further studies using traditional and molecular analysis approaches increase the understanding of *Fusarium* biodiversity. Our results verified that AFLP markers can be used to differentiate genetic patterns in FSP. Moreover using EcoRI+2/ MseI+2 AFLP oligonucleotides, we obtained 300% more amplified products and polymorphisms than those reported by Abdel-Satar *et al.* (2003) indicating significant genetic diversity.

Conclusions

We found significant differences among isolates on the basis of *in vitro* morphology, pathogenicity in common bean seeds and AFLP genotypes. The isolates from Veracruz, Guanajuato, and Aguascalientes grew faster *in vitro* and showed the largest conidia as well as were genetically different to those from the state of Mexico, while the most pathogenic isolates were from Aguascalientes and Mexico. On the other hand, black-seeded bean germplasm and cv. Pinto Villa ('pinto' beans) were resistant to most of FSP isolates. Our results emphasize the clear pathogenic and genetic differentiation of FSP populations and consistency on resistance to root rot pathogens in Mesoamerican bean germplasm.

divulgado previamente en México (Garnica-Martínez *et al.*, 2004) y en otros países como Estados Unidos (Appel y Gordon 1994; Cramer *et al.*, 2003). Grecia (Vakalounakis y Fragkiadakis, 1999); España (Álves-Santos *et al.*, 1999); Italia (Woo *et al.*, 1996), Egipto (Abdel-Satar *et al.* 2003; Khalil *et al.*, 2003), Brasil (Brasileiro *et al.*, 2004) y Kenia (Mwang'ombe *et al.*, 2008). Gordon *et al.* (1992) y Zanotti *et al.* (2006) demostraron que los aislamientos patogénicos de *Fusarium* muestran mayor diversidad genética de las poblaciones no patógenas, debido a sus mecanismos de dispersión efectiva, así como la introducción de nuevos patotipos (migración) en agroecosistemas específicos en lugar de VCG, evolución de la población o el cambio de no patógenas al fenotipo patogénico resultante del intercambio sexual (Alves-Santos *et al.*, 1999). No se observa una clara asociación entre la patogenicidad y el genotipo FSP, aunque los aislados pueden ser distinguidos claramente con patrones de patogenicidad, genotipo AFLP y origen geográfico. Los resultados de la presente investigación coinciden con los obtenidos por Woo *et al.* (1996), Alves-Santos *et al.* (1999), Cramer *et al.* (2003), Khalil *et al.* (2003), Brasileiro *et al.* (2004) y Mwang'ombe *et al.* (2008), quienes no reportan ninguna relación entre el genotipo y el patotipo en especies de *Fusarium* y poblaciones, pero contrastan con los resultados registrados por Zanotti *et al.* (2006), quienes encontraron diferencias entre la patogenicidad y no patogenicidad *F. oxysporum* Schlechtend.: F.SP. p. phaseoli J.B. Kendrick y W.C. Zinder (FOP) en los

Acknowledgments

The first author is grateful to COSNET-SEP for M. Sc. program support. Authors are grateful to financial support provided by International Foundation for Science (AC/3201-1), Stockholm, Sweden, COSNET-DGETA-SEP and CONACYT-Ciencia Básica (grants 48457-Z and 176282). Support by Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional and Dr. J. S. Padilla-Ramírez (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México) are also appreciated. N. Mayek-Pérez and S. Hernández-Delgado are S.N.I., EDI-IPN and COFAA scholars.

Literature cited

- Abawi, G.S. y M.A. Pastor-Corrales. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. CIAT. Cali, Colombia.
- Abdel-Satar, M.A., M.S. Khalil, I.N. Mohamed, K.A. Abd-Elsalam y J.A. Verreet. 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. African Journal of Biotechnology 2:51-55.
- Álves-Santos, F.M., E.P. Benito, A.P. Eslava y J.M. Díaz-Mínguez. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Applied and Environmental Microbiology 65:3335-3340.
- Appel, D.J. y T.R. Gordon. 1994. Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* from agricultural field soils. Phytopathology 84:786-791.
- Armstrong, G.M. y J.K. Armstrong. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt

aislados de Brasil. Ninguna asociación entre el patotipo y genotipo podría estar basada en la naturaleza no-monofilética de *Fusarium*, la cual no implica a ninguna relación genética entre dos cepas de la misma raza (Bodker *et al.*, 1993).

La evolución patogenética y VCGs causan aumento de la variabilidad genética en los hongos. Otros estudios llevados a cabo utilizando los enfoques tradicionales y moleculares aumentan la comprensión de la biodiversidad de *Fusarium*. Éstos resultados comprobaron que los marcadores AFLP pueden utilizarse para distinguir patrones genéticos en FSP. Adicionalmente, usando EcoRI 2/MseI 2 oligonucleótidos AFLP, se obtuvieron productos y polimorfismos 300% más amplificado que los reportados por Abdel-Satar *et al.*, (2003), que indica la diversidad genética significativa.

Conclusiones

Se encontraron diferencias significativas entre aislamientos en base a la morfología *in vitro*, y patogenicidad en las semillas de frijol común y los genotipos AFLP. Los aislamientos de Aguascalientes, Guanajuato y Veracruz crecieron más rápido *in vitro* y mostraron conidios más grandes, así como eran genéticamente diferentes a las del estado de México, mientras que los aislados más patógenos eran de Aguascalientes y México. Por otro lado, el germoplasma de frijol negro y cv. Pinto Villa (frijol 'pinto') eran resistentes a la mayoría de los aislamientos FSP. Los resultados de esta investigación acentúan la clara diferenciación patogénica y genética de las poblacio-

diseases. *In*: P. E. Nelson, T. A. Toussoun y R. Cook (eds.). *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA. pp. 391-399.

Assigbetse, K.B., D. Fernández, M.P. Dubois y J.P. Geigern. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84:622-626.

Bodker, L., B.G. Lewis y A. Coddington. 1993. The occurrence of a new genetic variant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Plant Pathology* 42:833-838.

Brasileiro, B.T.R.V., M.R.M. Coimbra M.A. Morais Jr. y N.T. de Oliveira. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology* 5:205-210.

Cramer, R.A., P.F. Byrne, M.A. Brick, L. Panella, E. Wickliffe y H.F. Schwartz. 2003. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and sugar beet using pathogenicity assays and random-amplified polymorphic markers. *Journal of Phytopathology* 151:352-360.

Elias, K.S., D. Zamir, T. Lichtman-Pleban y T. Katan. 1993. Population structure of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: Restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:565-572.

González, M., R. Rodríguez, M.E. Zavala, J.L. Jacobo, F. Hernández, J. Acosta, O. Martínez y J. Simpson. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88:292-299.

Gordon, T.R., D. Okamoto, M.G. Milgroom. 1992. The structure and interrelationship of fungal populations in native and cultivated soils. *Molecular Ecology* 1:241-249.

nes de FSP y la consistencia en la resistencia a patógenos de pudrición de raíz en germoplasma de frijol Mesoamericano.

Agradecimientos

El primer autor agradece a COSNET-SEP por la ayuda a éste programa. Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Fundación Internacional de Ciencia (AC/3201-1), Estocolmo, Suecia, COSNET-DGETA-SEP y CONACYT-Ciencia Básica (subsidió 48457-Z). De igual forma, al Centro de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional and Dr. J.S. Padilla-Ramírez (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México) y por la ayuda de N. Mayek-Pérez y S. Hernández-Delgado, S.N.I., EDI-IPN y a los estudiantes de COFAA.

Fin de la versión español

Jana, T., T.R. Sharma, R.D. Prasad y D.K. Arora. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological Research* 15:249-257.

Kelly, A., A.R. Alcalá-Jiménez, B.W. Bainbridge, J.B. Heale, E. Pérez-Artés y R.M. Jiménez-Díaz. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84:1293-1298.

Khalil, M.S., M.A. Abdel-Satar, I.N. Aly, K.A. Abd-Elsalam y J.A. Verreet. 2003. Genetic affinities of *Fusarium* spp. and their correlation with origin and pathogenicity. *African Journal of Biotechnology* 2:109-113.

- Manicom, B.Q., M. Bar-Joseph, A. Rosner, H. Vigodsky-Haas y J.M. Kotze. 1987. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria*. *Phytopathology* 77:669-672.
- Martínez-Garnica, M., S. Hernández-Delgado, J.S. Padilla-Ramírez y N. Mayek-Pérez. 2004. Diversidad patogénica y genética de aislamientos de *Fusarium* de Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:321-327.
- Mayek-Pérez, N., C. López-Castañeda, M. González-Chavira, R. García-Espinosa, J.A. Acosta-Gallegos, O. Martínez-De la Vega y J. Simpson. 2001. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:257-264.
- Mayek-Pérez, N., C. López-Castañeda, J.A. Acosta-Gallegos. 2002. Reacción de germoplasma de *Phaseolus* sp. a *Macrophomina phaseolina*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25:35-42.
- Mwang'ombe, A.W., P.K. Kipsumbai, E.K. Kiprop, F.M. Olubayo y J.W. Ochieng. 2008. Analysis of Kenyan isolates of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* from common bean using colony characteristics, pathogenicity and microsatellite DNA. *African Journal of Biotechnology* 7:1662-1671.
- Navarrete, R. y J.A. Acosta. 1999. Reacción de variedades de frijol común de *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* en el Altiplano de México. *Agronomía Mesoamericana* 10:37-46.
- O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919-938.
- Raeder, U. y P. Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1:17-20.
- Romero, C.S. 1988. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Salgado, M.O., H.F. Schwartz y M.A. Brick. 1995. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease* 79:279-281.
- Sánchez-García, B.M., F. González-Flores, J.L. Pons-Hernández, J.A. Acosta-Gallegos, M. Cabral-Enciso, S. Fraire-Velázquez, J. Simpson y R. Rodríguez-Guerra. 2006. *Fusarium lateritium*: nuevo patógeno de la raíz del frijol en México. *Agricultura Técnica en México* 32:251-257.
- StatSoft Inc. 1997. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Release 5.1. Tulsa, USA.
- Vakalounakis, D.J. y G.A. Fragkiadakis. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89:161-168.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Woo, S.L., A. Zoina, G. del Sorbo, M. Lorito, B. Nanni, F. Scala y C. Noviello. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* 86:966-973.
- Woo, S.L., C. Noviello y M. Lorito. 1998. Sources of molecular variability and applications in characterization of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. In: P. Bridge, Y. Couteaudier y J. Clarkson (eds.). *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB International. Wallingford Oxon, United Kingdom. pp. 187-208.
- Zanotti, M.G.S., M.V. de Queiroz, J.K. dos Santos, R.B. Rocha, E.G. de Barros y E.F. Araújo. 2006. Analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates, pathogenic and non-pathogenic to common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Phytopathology* 154:545-549.