

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* spp., ASOCIADAS AL CULTIVO DE PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*) EN SARAPIQUÍ Y GUATUSO EN COSTA RICA

Gabriela Chinchilla-Salazar<sup>1/\*</sup>, Mónica Blanco-Meneses<sup>2</sup>, Óscar Castro-Zúñiga<sup>3</sup>

**Palabras clave:** *Fusarium* spp; *Piper nigrum*; pimienta negra; enfermedades de suelo; sintomatología; marcadores moleculares.

**Keywords:** *Fusarium* spp; *Piper nigrum*; black pepper; soil diseases; symptomatology; molecular markers.

**Recibido:** 16/10/2019

**Aceptado:** 18/12/2019

### RESUMEN

**Introducción.** La pimienta es una especie de la familia de la Piperaceae, originaria de la Costa de Malabar, situada en Kerala al sur de la India. En Costa Rica, las principales plantaciones de pimienta se localizan desde Upala hasta Talamanca, e incluye toda la franja costera y la parte baja de Sarapiquí. Según estudios de factibilidad, el país cuenta con el potencial para producir pimienta con altos parámetros de calidad. Sin embargo, las enfermedades vasculares son una de las principales limitantes del cultivo. **Objetivo.** El objetivo de esta investigación fue el aislamiento e identificación molecular y morfológica de las especies de *Fusarium* asociadas al cultivo de la pimienta (*Piper nigrum* L.) en 2 de las principales zonas productoras del país. **Materiales y métodos.** Se recolectaron treinta muestras de plantas enfermas de distintas fincas en las zonas de Sarapiquí y Guatuso, se describieron detalladamente los síntomas observados en el sistema radical y/o la base del tallo para

### ABSTRACT

**Molecular and morphological identification of *Fusarium* spp., associated with black pepper (*Piper nigrum*) cultivation in Sarapiquí and Guatuso in Costa Rica.** **Introduction.** Pepper is one of the Piperaceae family, native to the Malabar Coast, located in Kerala in Southern India. In Costa Rica, main pepper plantations are located from Upala to Talamanca including the entire coastal and lower strip of Sarapiquí. According to feasibility studies, Costa Rica has the potential to produce pepper with high quality parameters; however, vascular diseases are one of the main crop limitations. **Objective.** To isolate, and molecularly and morphologically identify species of *Fusarium* associated with the cultivation of pepper (*Piper nigrum* L.) in 2 of the main productive areas of the country. **Materials and methods.** Thirty samples from diseased plants were collected from different farms located in Sarapiquí and Guatuso, symptoms observed in the radical

\* Autora para correspondencia. Correo electrónico: maria.chinchillasalazar@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Costa Rica.  
 0000-0002-0814-512X.

2 Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Costa Rica.  
 0000-0003-2642-3899.

3 Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Costa Rica.  
 0000-0002-5999-5749.

cada una de las plantas recolectadas. Los veintidós aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos se identificaron molecularmente con la secuencia parcial del gen Factor de Elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) y para la identificación morfológica se utilizaron los medios de cultivo PDA y Carnation Leaf-piece Agar (CLA). **Resultados y conclusiones.** Se confirmó la presencia de *Fusarium oxysporum* en las muestras provenientes de Sarapiquí, así como la presencia de *Fusarium solani* en ambas zonas muestreadas. Se reporta por primera vez, la presencia de las especies *Fusarium concentricum* y *Fusarium proliferatum* asociadas a la marchitez vascular.

## INTRODUCCIÓN

La pimienta es una planta perenne de los trópicos, originaria de la Costa de Malabar, situada en Kerala al sur de la India. Perteneció a la familia Piperaceae y al género *Piper*, el cual abarca más de 100 especies distintas, sin embargo, la variedad económicamente más importante es la pimienta negra (*Piper nigrum* L.) (Maistre 1969, Ahmad *et al.* 2012, Da Luz *et al.* 2017).

Los principales países productores son Brasil, India, Indonesia, Malasia y Sri Lanka (Andújar y Moya 2009). En Costa Rica, las principales plantaciones de pimienta se localizan desde Upala hasta Talamanca, además en toda la franja costera y la parte baja de Sarapiquí (Araya 2014).

En el 2014, según el VI Censo Nacional Agropecuario, se estimaron un total de 316 fincas productoras de pimienta con una extensión total de 665,8 hectáreas, de las cuales el 93,3% se ubica en la provincia de Heredia y Alajuela. Otra característica importante de la producción de pimienta, en este país, es su potencial para la exportación, ya que según un estudio de factibilidad realizado en 2013 destaca que la pimienta producida en Costa Rica presenta altos niveles de piperina, que pueden llegar a superar el 7%,

system and/or the stem base were described in detail for each plant. The twenty one isolates of *Fusarium* spp. obtained were identified with the partial sequence of the molecular marker Elongation Factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) gene and for the morphological identification using the PDA and Carnation Leaf Agar (CLA) culture media were used. **Results and conclusions.** The presence of *Fusarium oxysporum* was confirmed in the samples from Sarapiquí, and the presence of *Fusarium solani* was confirmed in the samples from both areas. The presence of the species *Fusarium concentricum* and *Fusarium proliferatum* associated with vascular wilt is reported for the first time.

mientras que en otros países solamente alcanzan como máximo el 5% (Monge *et al.* 2013).

La piperina es responsable del sabor picante de la pimienta utilizada como condimento. También posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias, las cuales son utilizadas como ingrediente activo de medicamentos orales por su fácil absorción, incluso por sus propiedades antioxidantes, se utiliza como anticancerígeno. También es un compuesto importante para la formulación de repelentes, ovicidas, insecticidas para algunas moscas, escarabajos, gorgojos y larvas (Ravindran 2005).

A pesar de lo anterior, la producción nacional solo es capaz de abastecer el 30% de la demanda del grano para la exportación. Las enfermedades vasculares representan una seria limitante para el cultivo de pimienta, ya que reducen los rendimientos e incluso pueden ocasionar la pérdida total de las plantaciones. En Brasil, por ejemplo, enfermedades producidas por *Fusarium* redujeron en un 32,4% la producción entre el 2006 y 2016 (Da Costa *et al.* 2019).

En los países productores de pimienta como India, Malasia, Indonesia, Brasil y Tailandia, se reporta que uno de los problemas más importantes en las plantaciones de la pimienta negra es la enfermedad del amarillamiento,

también conocida como muerte lenta. En 1988 se identificó como agente causal de esta enfermedad a *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (teleomorfo: *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*) (Salgado *et al.* 2016, Shahnazi *et al.* 2014).

A nivel nacional, Céspedes (1988) y Villalobos *et al.* (2009) indican la presencia de la especie *F. oxysporum* ha causado marchitez y *F. solani* ha afectado el sistema radical, aunque no se indica cuáles fueron las bases que se utilizaron para realizar la identificación de estas especies.

La identificación de las especies de *Fusarium*, desde el punto de vista taxonómico tradicional, se basa en estudios de la morfología de las estructuras reproductivas asexuales del hongo; los macroconidios, los microconidios, las clamidosporas y la célula conidiógena (Šišić *et al.* 2018).

Sin embargo, varios autores coinciden en que la identificación morfológica es compleja, ya que muchas especies no presentan diferencias morfológicas entre sí. La identificación molecular, mediante la extracción de ADN y la secuenciación de genes informativos, permite separar estas especies (Summerell 2019). Por ejemplo, el gen EF-1 $\alpha$  (Factor de Elongación 1 $\alpha$ ) se utiliza para este fin, porque tiende a evolucionar a nivel de esta especie a una velocidad superior en comparación con otros genes de uso común (Choi *et al.* 2018).

Además, según Geiser *et al.* (2004), O'Donnell *et al.* (2008) e Ismail *et al.* (2015) el gen EF-1 $\alpha$  en el genoma de *Fusarium* está presente en una única copia, no se han detectado copias ortólogas, posee una riqueza de regiones intrónicas y un alto nivel de polimorfismo entre las especies estrechamente cercanas. Por estas razones, esta región genómica tiene una alta utilidad filogenética (Choi *et al.* 2018).

Realizar estudios que combinen las técnicas morfológicas y moleculares enfocados a la caracterización a nivel de especie tienen gran importancia, ya que permiten generar información más robusta de las características de los patógenos. Esto permite determinar un problema

fitosanitario, a lo largo del tiempo y en diferentes regiones a nivel mundial.

Mediante esta investigación, se logró determinar el impacto causado por *Fusarium* spp. en las plantaciones muestreadas y el escaso conocimiento que existe de este cultivo en Costa Rica. La producción de pimienta (*Piper nigrum*) es una actividad económica realizada por pequeñas personas productoras, las cuales no cuentan con información técnica actualizada (Monge *et al.* 2013). Por estas razones, el objetivo de esta investigación fue el aislamiento, la identificación morfológica y molecular de las especies de *Fusarium* asociadas al cultivo de la pimienta (*Piper nigrum* L.) en 2 de las principales zonas productoras del país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de las muestras

La recolección de muestras se realizó en 14 fincas localizadas en Sarapiquí y Guatuso. En cada finca se observaron los diferentes síntomas asociados con *Fusarium* spp; el material vegetal fue llevado al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica.

### Descripción de los síntomas

En el laboratorio se realizó una descripción detallada de los síntomas generales e internos de los tejidos afectados, el sistema radical y/o la base del tallo, esto para cada una de las plantas recolectadas.

Se analizaron 30 muestras de plantas enfermas de las distintas fincas; los códigos utilizados para la identificación se conformaron por las iniciales de la zona de procedencia de la planta (PV o PSC) y el número de planta de la cual se obtuvo el tejido enfermo. Sin embargo, en las muestras 19, 22, 26 y 28 en una misma planta se observaron 2 síntomas distintos. Para calificarlos se agregó al código de identificación las iniciales de cada síntoma; RA: Rama aérea, R:

Raíz, T: Tallo, RH: Raíz hilachada, HV: Haces vasculares, RL: Raíz larga y RI: Raíz interna. Por lo tanto, se trabajó con un total de 34 muestras sintomáticas.

### Aislamientos de *Fusarium* spp

A partir del material vegetal, extraído de cada uno de los síntomas, se realizaron los aislamientos. La desinfección del material se realizó con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70% durante un minuto. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con agua destilada.

De cada muestra, se colocaron en un plato Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) 5 fragmentos provenientes de la zona de avance. Se incubaron en una cámara a temperatura ambiente (23 a 26°C) en condiciones de oscuridad durante 15 días.

A partir de los 170 fragmentos procesados, se tuvieron 105 crecimientos de micelio relacionado a *Fusarium* spp. Finalmente, se seleccionaron las colonias según los distintos colores observados en el plato petri de cada muestra. De esta selección, se obtuvieron 21 aislamientos de *Fusarium* spp.

En los restantes 65 fragmentos, 4 correspondieron a *Phytophthora* spp. (muestra PV 3), en 10 se aisló *Trichoderma* spp. en las muestras PV 6 y PV 9, en 5 solamente hubo crecimiento bacteriano (PV 13), 10 fragmentos tuvieron crecimiento de *Lasiodiplodia* spp. (muestras PV 21 y PV 27) y en los restantes 35 fragmentos correspondiente a las muestras PV 4, PV 7, PV 14, PV 15, PV 16, PSC 20 y PV 29, no hubo crecimiento de ningún organismo asociado al síntoma analizado.

### Caracterización molecular

#### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio puro según la metodología de Trout *et al.* (1997).

A una pequeña porción de micelio se le agregó 150 µL del buffer de extracción y

posteriormente se maceró fuertemente. Luego, se agregó 150 µL del buffer de lisis CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide) y se agitó por 15 segundos en vortex. La mezcla se incubó por 60 minutos a 65°C. Luego en cámara de gases se agregó 300 µL de cloroformo isoamyl alcohol (24:1) a cada muestra; se mezcló manual y suavemente (50 veces) y se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos. Seguidamente, se extrajo el supernadante (fase líquida de la suspensión) a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL.

Al nuevo tubo se le agregó 300 µL de cloroformo isoamyl alcohol que se volvió a mezclar manual y suavemente, 50 veces y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se extrajo el supernadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, se agregó 20 µL de acetato de sodio 3M y 300 µL de etanol puro de 95% frío, se mezcló de forma manual y se almacenó por 24 horas a -20°C.

Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 20 minutos, luego se eliminó el acetato y el etanol, se limpió el pellet de ADN con 150 µL de etanol al 70% frío. A continuación, se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos, se decantó cuidadosamente el etanol, se dejó boca abajo cada eppendorf sobre una toalla estéril para eliminar el exceso de etanol y se dejó secar por 30 minutos. Para almacenarlo se disolvió el pellet en 50 µL de buffer TE y se almacenó a -20°C.

Se determinó con un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer Plus, la concentración y pureza del ADN extraído de cada muestra.

### Amplificación por medio de PCR

Para la amplificación (PCR) de la región parcial del gen que codifican para el Factor de Elongación 1α (EF-1α), se utilizaron los siguientes cebadores específicos: EF1 (5'ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC3') y EF2 (5'GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATTT3') (Karlsson *et al.* 2015).

El perfil término utilizado consistió en 3 fases: una desnaturalización inicial a 96°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de

desnaturalización a 96°C durante 1 minuto con una temperatura de anillamiento de 50°C, finalmente una extensión a 72°C por 1 minuto, seguidos de una extensión final, también a 72°C durante 10 minutos (Abd-Elsalm *et al.* 2003).

Los productos del PCR se visualizaron mediante electroforesis, se utilizó un gel de agarosa (0,8%), el buffer de corrida TBE (1X), un marcador de peso molecular de 100 bp y un control negativo (sin ADN). El fragmento a amplificar tuvo un tamaño de 700 pb.

### Secuenciación

El producto de PCR se purificó mediante la endonucleasa Exonuclease I (Fermentas), se llevó a una concentración de 50 ng.µL<sup>-1</sup> y, posteriormente, se envió a secuenciar a la empresa Macrogen Inc, en Corea del Sur.

Se obtuvieron secuencias en ambas direcciones para cada muestra generadas a partir de ciclos fluorescentes utilizando un secuenciador modelo 3730XL (Applied Biosystems).

### Alineamiento de las secuencias

La calidad de las secuencias se confirmó con un alineamiento bidireccional y por comparación con los cromatogramas con el programa BioEdit, además, se cortaron las terminaciones 5' y 3' de las cadenas para facilitar el alineamiento. Se utilizó la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information (NCBI), por sus siglas en inglés) a partir de la cual se comparó la secuencia generada frente a

las secuencias que se encuentran en la base de datos GenBank.

### Caracterización morfológica

Las características morfológicas macroscópicas, como el color y la textura de las colonias, así como las características microscópicas de los microconidios (la forma, el número de septos y la abundancia), se determinaron a partir del crecimiento de los aislamientos en medio de cultivo PDA incubados en una cámara a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante 15 días.

A partir del crecimiento en el medio de cultivo Carnation Leaf-piece Agar (CLA), se determinó la presencia, la forma, la posición y la abundancia de las clamidosporas; la forma de la célula apical y la célula basal; la forma, la abundancia y el número de septos de los macroconidios, así como el tipo de células conidiógenas,

Para identificar y describir estas estructuras se utilizó un microscopio óptico y las claves taxonómicas de Booth (1971) y Leslie y Sumner (2006).

## RESULTADOS

### Caracterización de los síntomas observados a nivel de campo

Los síntomas generales observados en las plantaciones muestreadas fueron una clorosis generalizada de las plantas, en algunos casos también se observó necrosis del follaje en la parte superior (Figura 1).



Figura 1. Síntomas en plantas enfermas de pimienta negra A) Clorosis generalizada en toda la planta y B) Necrosis parcial del follaje.

En la parte interna del tallo, se observaron 2 síntomas diferentes: el primero, consistió en áreas necróticas de color café o negro limitadas al sistema vascular (Figura 2A) y, el segundo, una necrosis general de la base

del tallo y la raíz, en ambos casos las plantas enfermas no producen olores desagradables. A nivel de la base de la planta se da una descomposición del tejido con un aspecto “deshilachado” (Figura 2B).



Figura 2. Síntomas en plantas enfermas de pimienta negra A) Lesiones necróticas de color café o negro limitadas al sistema vascular y B) “Deshilachamiento” necrótico en la raíz.

Los síntomas asociados a *Fusarium oxysporum* fueron lesiones internas, que no tienden a estar limitadas alrededor de los haces vasculares. Se observa en la Figura 3, que la necrosis

del tejido avanza progresivamente en todo el tallo, lo que causa una afectación completa del tejido vascular.



Figura 3. Daño vascular a nivel del tallo observada en plantas enfermas de pimienta negra asociadas a *Fusarium oxysporum*.

En el caso de las muestras con síntomas asociados a *F. solani* (Figura 4A) provenientes de Sarapiquí, se observaron lesiones internas restringidas al sistema vascular (Figura 4B).

En las muestras de Guatuso, además, del síntoma anterior se observó una necrosis generalizada en el tejido vascular (Figura 5).



Figura 4. Sintomatología asociada a *Fusarium solani* observada en muestras de plantas enfermas de pimienta negra de Sarapiquí A) Clorosis aleatoria del follaje y B) Daño vascular localizado a nivel de tallo.

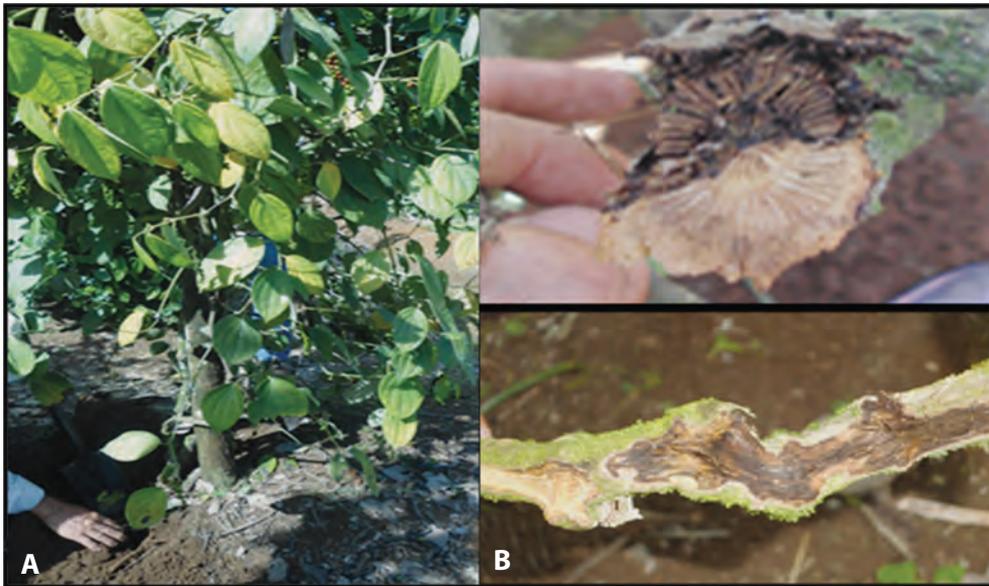


Figura 5. Sintomatología asociada a *Fusarium solani* en muestras de plantas enfermas de pimienta negra de Guatuso  
A) Clorosis aleatoria del follaje y B) Necrosis generalizada en el tallo.

Los síntomas asociados a *Fusarium concentricum* (Figura 6) fueron lesiones necróticas internas localizadas en los haces vasculares, pero no se observó un

“deshilachamiento” necrótico en la raíz o en la base de la planta. El follaje presentó una necrosis sin ninguna distribución clara y un leve amarillamiento de las hojas.



Figura 6. Sintomatología asociada a *Fusarium concentricum* en plantas enfermas de pimienta negra A) Síntomas a nivel de follaje y B) Daño vascular del sistema radical.

Los síntomas asociados a *Fusarium proliferatum* están relacionados a un amarillamiento generalizado de la parte aérea. En la raíz y la base del tallo se observó un deshilachamiento

necrótico del tejido e internamente, en la zona de avance, una necrosis de color café claro generalizada que abarca todo el tejido (Figura 7), además, es importante destacar que no se percibió mal olor.

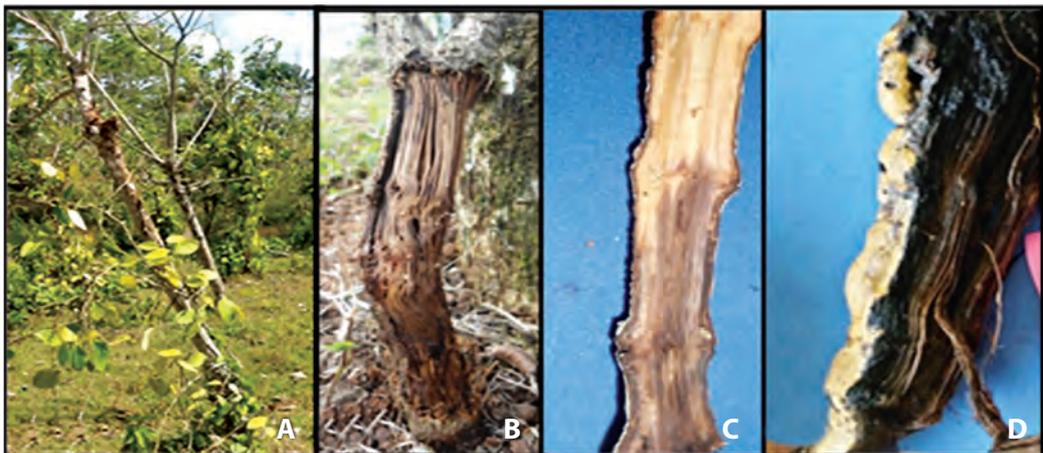


Figura 7. Sintomatología asociada *Fusarium proliferatum* en plantas enfermas de pimienta negra A) Crecimiento vegetativo reducido y clorosis del follaje, B) “Deshilachamiento” necrótico en la base del tallo, C) Daño vascular interno a nivel de tallo y D) “Deshilachamiento” necrótico en la raíz principal.

A partir de este estudio, se analizaron 30 plantas enfermas y 34 síntomas asociados a *Fusarium* spp. localizadas en provenientes de Sarapiquí y Guatuso. A partir de 170 fragmentos de la zona de avance, se tuvieron 105 crecimientos de

micelio relacionado a *Fusarium*. Finalmente, para cada muestra se seleccionaron los aislamientos tomando en cuenta los distintos colores presentes. De esta selección se obtuvieron los 21 aislamientos de *Fusarium* spp (Tabla 1).

Tabla 1. Código de identificación, procedencia, coordenadas geográficas y área afectada de las plantas de pimienta negra (*Piper nigrum*) muestreadas.

Código de identificación	Procedencia	Coordenadas geográficas	Área afectada
PV 1	La Virgen de Sarapiquí	N 10.47268° W 084.10876°	Base del tallo
PV 2	La Virgen de Sarapiquí	N 10.47268° W 084.10876°	Base del tallo
PV 3	La Virgen de Sarapiquí	N 10.54769° W 084.12753°	Base del tallo
PV 4	La Virgen de Sarapiquí	N 10.54769° W 084.12753°	Base del tallo
PV 5	La Virgen de Sarapiquí	N 10.55591° W 084.15514°	Base del tallo
PV 6	La Virgen de Sarapiquí	N 10.46852° W 084.21631°	Raíz
PV 7	La Virgen de Sarapiquí	N 10.46937° W 084.21589°	Base del tallo
PV 8	La Virgen de Sarapiquí	N 10.46450° W 084.20999°	Base del tallo
PV 9	La Virgen de Sarapiquí	N 10.46450° W 084.20999°	Raíz
PV 10	La Virgen de Sarapiquí	N 10.39518° W 083.9607°	Raíz
PV 11	La Virgen de Sarapiquí	N 10.39518° W 083.9607°	Base del tallo
PV 12	La Virgen de Sarapiquí	N 10.40121° W 084.16311°	Base del tallo
PV 13	La Virgen de Sarapiquí	N 10.40121° W 084.16311°	Raíz
PV 14	La Virgen de Sarapiquí	N 10.40237° W 084.15678 °	Base del tallo
PV 15	La Virgen de Sarapiquí	N 10.39996 ° W 084.15465°	Raíz
PV 16	La Virgen de Sarapiquí	N 10.39996 ° W 084.15465°	Base del tallo
PVS 17	La Virgen de Sarapiquí	N 10.39996 ° W 084.15465°	Base del tallo
PV 18	La Virgen de Sarapiquí	N 10.39996 ° W 084.15465°	Base del tallo
PSC 19 RA	Guatuso de San Carlos	N 09.53339° W 083.52349°	Parte aérea
PSC 19 R	Guatuso de San Carlos	N 09.53339° W 083.52349°	Raíz
PSC 20	Guatuso de San Carlos	N 10.4942.2° W 085.0030.3°	Raíz
PSC 21	Guatuso de San Carlos	N 10.4942.2° W 085.0030.3°	Base del tallo
PSC 22 T	Guatuso de San Carlos	N 10.4942.2° W 085.0030.3°	Tallo
PSC 22 R	Guatuso de San Carlos	N 10.4942.2° W 085.0030.3°	Raíz
PSC 23	Guatuso de San Carlos	N 10.4608° W 084.54144°	Raíz
PSC 24	Guatuso de San Carlos	N 10.46089° W 084.54144°	Base del tallo
PSC 25	Guatuso de San Carlos	N 10.46089° W 084.54144°	Base del tallo
PSC 26 RH	Guatuso de San Carlos	N 10.46089° W 084.54144°	Raíz
PSC 26 RI	Guatuso de San Carlos	N 10.46089° W 084.54144°	Raíz
PSC 27	Guatuso de San Carlos	N 10.46089° W 084.54144°	Tallo
PV 28 H	La Virgen de Sarapiquí	N 10.54769° W 084.12753°	Base del tallo
PV 28 RL	La Virgen de Sarapiquí	N 10.54769° W 084.12753°	Raíz
PV 29	La Virgen de Sarapiquí	N 10.46873° W 084.21891°	Base del tallo
PV 30	La Virgen de Sarapiquí	N 10.46852° W 084.21631°	Base del tallo

### Identificación molecular

Mediante la amplificación del ADN de un fragmento del gen del Factor de Elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ) y la comparación entre las secuencias obtenidas para los veintinueve aislamientos con las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank, procesados con la herramienta informática BLAST, que permitió determinar la presencia de 4 especies de *Fusarium* presentes en las plantaciones de pimienta negra de Costa Rica.

Las secuencias de *Fusarium oxysporum* del aislamiento PV 1 tuvo un 99% de similitud con la accesión MK172058.1 (Taylor *et al.* 2019), las secuencias de los aislamientos PV 5 y PV 10 fueron en un 100% y 99% similares, respectivamente, a la accesión MG018805.1 (Maldonado-Bonilla *et al.* 2019) y la secuencia de los aislamientos PSC 26 RH tuvo un porcentaje de 99% similitud con la accesión MG018803.1 (Maldonado-Bonilla *et al.* 2019).

Los aislamientos identificados como *Fusarium solani* PV 2, PV 11, PSC 24 y PSC 25

presentaron un porcentaje de similitud de 99%, 99%, 98% y 98%, respectivamente, con la accesión KF255995 (Wang *et al.* 2014) las secuencias de los aislamientos PV 12, PV 17, PSC 19 R, PV 23 y PSC 26 RI tuvieron un porcentaje de similitud que osciló entre 98 y 100% con la accesión HQ731056 (Jiménez-Fernández *et al.* 2011).

Los aislamientos de *Fusarium proliferatum* PSC 19 RA y PSC 22 R fueron similares en un 99% y 100%, respectivamente, a la accesión JX869017.1 (Hawa *et al.* 2013). Los aislamientos identificados como *Fusarium concentricum* (PV 8, PSC 28 HV, PSC 28 RL y PV 30) fueron 99% similares a la accesión JF740760.1 (O'Donnell *et al.* 2012).

### Identificación morfológica

Las 4 especies de *Fusarium* spp., identificadas a partir de los 21 aislamientos, fueron *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium concentricum* y *Fusarium proliferatum*, las características morfológicas de cada especie se describen en la Tabla 2 y las Figuras 8, 9, 10 y 11.

Tabla 2. Características morfológicas de los macroconidios, los micronidios, las clamidosporas y la coloración de la colonia de las 4 especies de *Fusarium* asociadas a plantas enfermas de pimienta negra, según las claves taxonómicas de Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006).

Especie	Macroconidios				
	Forma	Célula apical	Célula basal	Número de septos	Abundancia
<i>Fusarium oxysporum</i>	PV 1, PV 5, PV 26 RH: Semicurvos. PV 10 casi rectos (Figura 8C)	Forma redondeada, ligeramente encorvada (Figura 8C)	Forma de pie (Figura 8C)	Septados con 3 a 5 septos, pero predominaron con 3 septos	Abundantes
<i>Fusarium solani</i>	Rectos y robustos. PV 2 y PV 12: ligeramente curvos (Figura 9C)	PV 2, PV 12: Aguda. PV 11, PV 17 y PV 18: Ligeramente encorvada (Figura 9C)	Forma de pie (Figura 9C)	Septados con 3 a 7 septos	PV 2, PV 12 y PV 18: Abundantes. PV 11 y PV 17: Escasos
<i>Fusarium concentricum</i>	PSC 28 RL y PV 30 casi rectos PV 8 y PV 28 HV: curvos (Figura 10C)	Forma de pico ligeramente encorvada (Figura 10C)	Forma de pie (Figura 10C)	Septados con 3 a 5 septos	PSC 28 RL y PV 30: Abundantes PV 8 y PSC 28 HV: Escasos
<i>Fusarium proliferatum</i>	Delgados, casi rectos a ligeramente curvos (Figura 11B)	Curvada (Figura 11B)	Ligeramente redonda (Figura 11B)	Septados con 3 a 5 septos	Abundantes

Continuación de la Tabla 2.

Especie	Microconidios			Célula conidiógena
	Forma	Número de septos	Abundancia	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ovalados	Sin septos	Abundantes	PV 10 y PV 5: Monofialides cortas y simples (Figura 8B) PV 1: Esporodocios ramificados (Figura 8D)
<i>Fusarium solani</i>	Ovalados, algunos ovoides truncados (Figura 9B)	Sin septos	Abundantes en todos los aislamientos PV 12: Escasos	Predominaron monofialides simples y cortas (Figura 9B) PV 17 y PV 18: Esporodocios cortos
<i>Fusarium concentricum</i>	Ovalados (Figura 10B)	Sin septos	Abundantes	PV28 RL y PV 28 HV: Monofialides simples y cortas (Figura 10E) PV 8 y PV 30: Esporodocios ramificados y simples (Figura 10D)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Piriformes (Figura 11E)	Sin septos o con un sólo septo	Escasos	Polifialides y monofialides, con menor frecuencia en falsas cabezas (Figura 11C y Figura 11D)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Ningún aislamiento produjo clamidosporas			Micelio aéreo blanco con leves tonalidades rosadas (Figura 11A)
Especie	Clamidosporas			Coloración de la colonia
	Posición	Forma	Abundancia	
<i>Fusarium oxysporum</i>	PV 1 y PV 5: Terminales PV 10: Intercalares (Figura 8D)	Esférica de paredes lisas	Abundantes	Micelio aéreo: Blanco (Figura 8A)
<i>Fusarium solani</i>	PV 12: Intercalares PV 17: Terminales	Esférica de paredes rugosas	Sólo los aislamientos PV 12 y PV 17 (Figura 9E)	Micelio aéreo: PV 2, PV 8, PV 11, PSC 24 y PSC 25 T: Tonalidades beige a café PV 12 y PSC 26 RI: Rojo. PV 17 y PV18: Blanco (Figura 9A)
<i>Fusarium concentricum</i>		Ningún aislamiento produjo clamidosporas		Micelio aéreo blanco posteriormente se torna gris-violeta (Figura 10A)
<i>Fusarium proliferatum</i>		Ningún aislamiento produjo clamidosporas		Micelio aéreo blanco con leves tonalidades rosadas (Figura 11A)

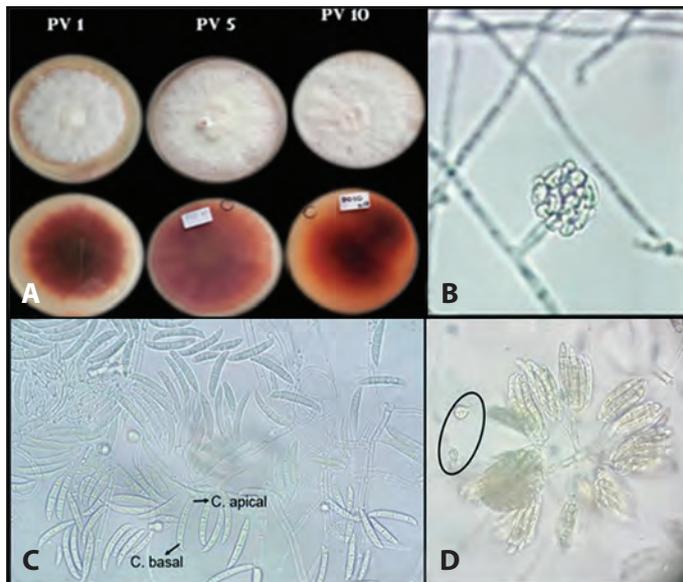


Figura 8. Características morfológicas de los aislamientos *Fusarium oxysporum* A) Color de la colonia en PDA, B) Monofiálide corta, C) Macroconidios, C. apical; célula apical, C. basal; célula basal. D) Esporodocio ramificado y clamidosporas terminales en medio de cultivo CLA. (40X).

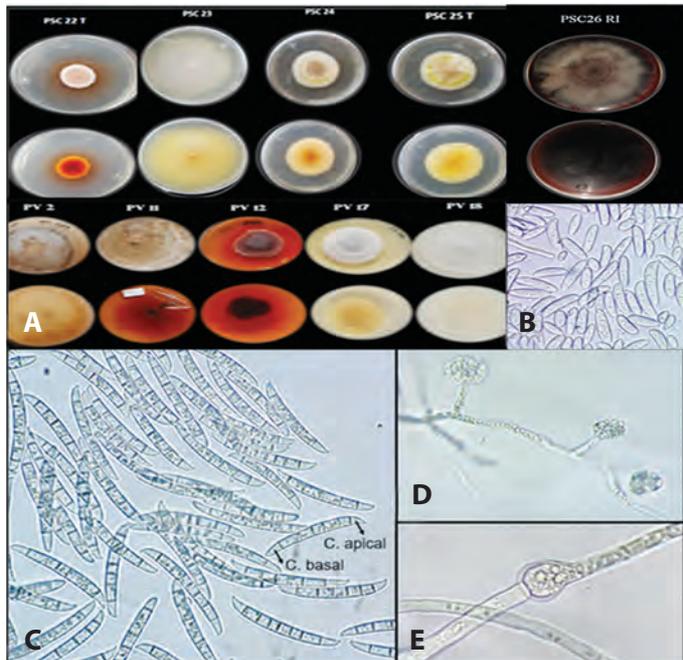


Figura 9. Características morfológicas de los aislamientos de *Fusarium solani* A) Color de la colonia en PDA B) Microconidios, C) Macroconidios C. apical; célula apical, C. basal; célula basal, D) Monofiálide cortas y E) Clamidospora intercalar en medio de cultivo CLA (40X).

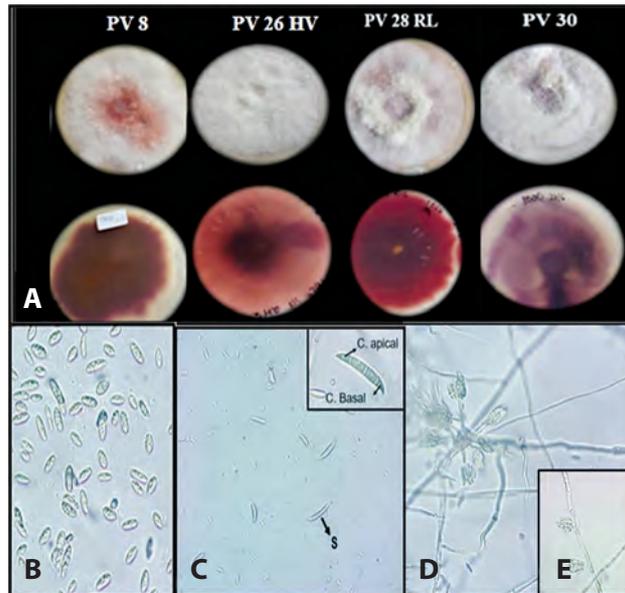


Figura 10. Características morfológicas de los aislamientos de *Fusarium concentricum* A) Color de la colonia en PDA B) Microconidios en el micelio aéreo (en PDA) C) Macroconidios, **C. apical**; célula apical, **C. basal**; célula basal, D) Esporodocio ramificado y E) Conidióforos simples y cortos en medio de cultivo CLA (40X).

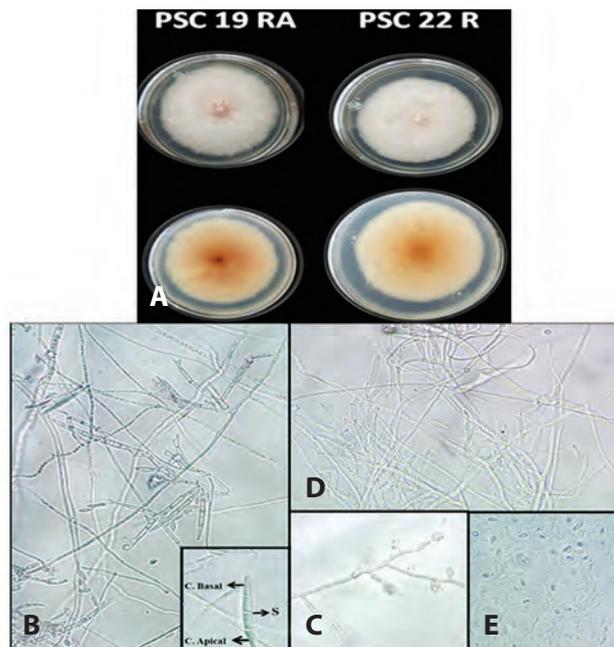


Figura 11. Características morfológicas de los aislamientos de *Fusarium proliferatum* A) Color de la colonia (PDA), B) Macroconidios, **C. apical**; célula apical, **C. basal**; célula basal, **S**: septos, C) Conidióforos simples y cortos D) Conidióforos en falsas cabezas y E) Microconidios en el micelio aéreo en medio de cultivo CLA (40X).

## DISCUSIÓN

El género *Fusarium* comprende especies endófitas, saprófitas y patógenas de plantas, humanas y animales (Leslie y Summerell 2006, Chandra *et al.* 2011). Para definir una especie existen varias clasificaciones, unas basadas en la morfología (especies morfológicas), otras en experimentos cruzados (especies biológicas), y también en marcadores moleculares (especies filogenéticas) (Chandra *et al.* 2011) y según la especificidad del huésped (Coleman 2016).

En la práctica, es difícil distinguir las especies de *Fusarium* que se encuentran dentro de los complejos de especies, porque están estrechamente relacionadas y tienden a tener ninguna o pocas diferencias morfológicas entre sí. Para estos casos la identificación molecular permite distinguir con mayor precisión estas especies (Chandra *et al.* 2011).

La identificación molecular se basa en la extracción de ADN y la secuenciación de genes informativos que permiten separar las especies (Summerell 2019). Las secuencias más comúnmente utilizadas para distinguir especies de *Fusarium* son porciones de las secuencias genómicas que codifican el factor de elongación1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulina (tub2), calmodulina, regiones espaciadoras transcritas internamente en la región de repetición ribosómica (ITS1 e ITS2) y la región espaciadora intergénica (IGS) (Chandra *et al.* 2011).

En esta investigación, se utilizó el gen EF-1 $\alpha$ , el cual es el más aceptado porque tiende a evolucionar a nivel de esta especie a una velocidad superior en comparación con otros genes de uso común (Choi *et al.* 2018). Además, otros marcadores tienen algunas limitantes, por ejemplo, las regiones ITS no funcionan bien dentro de la sección *Liseola* y  $\beta$ -tub2 no funciona bien dentro del complejo de especies *Fusarium solani* (Chandra *et al.* 2011).

Respecto a la identificación molecular y el análisis morfológico, se confirmó la presencia de la especie *Fusarium oxysporum* en los aislamientos provenientes de plantas enfermas de pimienta negra en las 2 localidades muestreadas.

Al observar los síntomas asociados a esta especie en las plantas de pimienta negra analizadas (Figura 3), se identificó que no concuerdan precisamente con lo descrito por Duarte *et al.* 2001 y Sarma *et al.* 2013, quienes indican que este patógeno invade las raíces de las plantas de pimienta a través de heridas o durante la aparición de nuevas raíces. Posteriormente, se da la colonización y la necrosis de los haces vasculares, que evitan así, la absorción de agua y nutrientes. Externamente, las plantas enfermas muestran coloración amarillenta cuando se infectan varias raíces, la planta se colapsa y el follaje se mantiene adherido a las ramas.

Según Rana *et al.* (2017) y Dean *et al.* (2014), *Fusarium oxysporum* es el hongo más abundante y ubicuo del suelo; se han encontrado en diversos ecosistemas, incluidos pastizales, bosques, desiertos, que van desde los trópicos hasta el Ártico. Aunque son comúnmente conocidos como fitopatógenos, también pueden sobrevivir como saprófitos, como colonizadores endófitos de plantas asintomáticas (se han encontrado *Fusarium oxysporum* endófito en casi 100 especies de plantas), incluso como inductores de resistencia. Según estas personas autoras la mayoría de los aislamientos *Fusarium oxysporum* se presume que no son patógenos.

Aunado a lo anterior, la capacidad de degradar la lignina y los hidratos de carbono complejos, asociados con los desechos del suelo, que poseen las especies saprófitas de *Fusarium oxysporum* (Rana *et al.* 2017 y Dean *et al.* 2014), podrían explicar los síntomas asociados a *F. oxysporum* observados en las muestras analizadas (Figura 3).

Además, dada la baja frecuencia de aparición de esta especie en este estudio (4 muestras de un total de 34), podría sugerir que los aislamientos obtenidos *F. oxysporum* corresponden a saprófitos. Otro dato para tomar en cuenta, es que hasta el momento no se ha reportado una forma especial para pimienta negra dentro del complejo *Fusarium oxysporum* (FOSC).

En esta investigación también se confirmó la presencia de la especie *F. solani* en las 2

localidades muestreadas. Además, fue la especie que se presentó en mayor frecuencia. Este resultado coincide con los múltiples reportes nacionales e internacionales que la señalan como uno de los patógenos más importante en el cultivo de la pimienta, específicamente, en la forma especial *piperis* (Sitepu y Mustika 2006, Andújar y Moya 2009, Villalobos *et al.* 2009, Shahnazi *et al.* 2012, Vaz *et al.* 2012, Sarma *et al.* 2013, Shahnazi *et al.* 2014 y Salgado *et al.* (2016).

*Fusarium solani* f. sp. *piperis* (teleomorfo: *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*) causa graves pérdidas en la mayoría de los países productores de pimienta negra, incluidos India, Malasia, Indonesia, Brasil y Tailandia. Se informa que la infección por *Fusarium* en una plantación de pimienta negra reduce la vida económica de la plantación de 20 años a 6 -8 años (Shahnazi *et al.* 2012).

Los daños asociados a *Fusarium solani* observados en las fincas muestreadas fueron 2; lesiones del sistema vascular y el daño necrótico de la base del tallo y la raíz (Figuras 4 y 5). Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas en Brasil, que describen 2 enfermedades causadas por *Fusarium solani*; la primera de ellas se conoce como fusariosis y corresponde a la infección de las raíces de la pimienta negra (*Piper nigrum* L.) y la segunda es un daño conocido como tizón del tallo, que como su nombre lo sugiere, es una enfermedad que afecta los tallos (Da Costa 2019).

La tercera especie presente en cultivo de pimienta, en Costa Rica, es la especie *F. concentricum*; la misma no ha sido reportada en el cultivo de pimienta negra hasta el momento, por lo que este es el primer reporte de esta especie asociada al daño vascular y a la posterior muerte de las plantas de pimienta negra.

Esta especie fue descrita por primera vez por Nirenberg y O'Donnell en 1998, a partir de aislamientos provenientes de *Musa sapientum* (ex T) de Costa Rica y Guatemala. Además, en el 2009 fue identificada en piña de Costa Rica (Waśkiewicz y Stepień 2012). Pero, en términos

generales, se sabe poco de su ecología y biología reproductiva (Leslie y Summerell 2006).

Según Paparu *et al.* (2003) y Barrios (2006), *Fusarium concentricum* puede encontrarse de forma endófito en algunas musáceas, incluso puede presentar una actividad benéfica (inductor de resistencia), ya que según estudios realizados en Uganda en el 2000, se observó un incremento significativo de la biomasa de plantas de banano cultivadas en campo e inoculadas con esta especie de *Fusarium*.

Con base en las investigaciones que reportan la presencia de esta especie en varios cultivos en nuestro país y tomando la necrosis de los haces vasculares observadas en las plantas de pimienta enfermas (Figura 6), es necesario investigar aún más su ecología y biología (capacidad patogénica o actividad benéfica).

La última especie identificada en este estudio fue *Fusarium proliferatum*. Esta se reportó por primera vez en 1387 como una especie de *Cephalosporium* y fue descrita como una especie de *Fusarium* hasta 1566 (Leslie y Summerell 2006). En el cultivo de la pimienta solo se ha reportado aislado de la rizósfera de plantaciones de pimienta en Malasia y, según las pruebas de patogenicidad realizadas, no presentó actividad patogénica (Shahnazi *et al.* 2012). En Costa Rica, no existe registro de su presencia en el cultivo de pimienta negra.

Sin embargo, en otros cultivos como soya y espárragos, se reporta como causante de pudrición de la raíz (Costa *et al.* 2016), también se reporta como patógeno en banano, mango (Campos 2013), arroz, tomate, ajo, piña y cebolla (Stepień *et al.* 2015). Además, produce diferentes micotoxinas, entre ellas están moniliformina, beauvericina, ácido fusárico, fusaroproliferina y fumonisinas (Saha 2002, Fanelli *et al.* 2012, De la Torre *et al.* 2014). También produce enzimas relacionadas con la degradación de lignina y xileno (Saha 2002, Leslie y Summerell 2006).

Las especies *F. concentricum* y *Fusarium proliferatum* también están reportadas como endófitas en cultivos como gramíneas, trigo, orquídeas y arroz (Leslie y Summerell 2006).

La información anterior resulta relevante si se toma en cuenta que se ha demostrado que las plantas de *P. barbatum* y *P. nigrum* son hospedantes de múltiples microorganismos endófitos, como por ejemplo los hongos *Colletotrichum* spp., *Bipolaris* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Phoma* spp., *Phomopsis* spp., (Orlandelli *et al.* 2012), *Alternaria* spp., *Colletotrichum gloeosporioides* (Chithra *et al.* 2014) y bacterias promotoras del crecimiento (Jasim *et al.* 2013).

En Costa Rica, se reportó *Colletotrichum gloeosporioides* como endófito en plantas de *Piper nigrum* (González 2017) y, al considerar que se han logrado aislar *Fusarium* spp. de tejidos asintomáticos de plantas de *Piper* silvestres, es posible que alguna de las especies identificadas en este estudio pueda encontrarse como endófitas en las plantaciones nacionales.

Es importante señalar que en una misma planta fue posible confirmar la presencia de 2 especies distintas de *Fusarium* (muestras PSC 19 y PSC 22), en ambos casos se aisló *F. solani* y *F. proliferatum* en distintos estratos enfermos de la planta (parte aérea y raíz, respectivamente). Debido a que se desconoce la capacidad infectiva de los aislamientos, tampoco se debe descartar que al menos alguna de las especies sea un organismo endófito.

Conocer la biología de las especies de *Fusarium* identificadas, en este estudio, es esencial para comprender la enfermedad que se observa en las plantaciones. En aquellas especies patogénicas es necesario investigar su dinámica epidemiológica, el grado de especialización y los cambios en la capacidad patogénica. Toda esta información podrían ser la base para investigar nuevas estrategias de manejo integrado, incluso como lo sugiere Chandra *et al.* (2011) para iniciar proyectos de mejoramiento genético.

Las medidas de control que recomiendan las personas autoras, para el manejo de las enfermedades vasculares en pimienta, son un diseño adecuado de un drenaje sobre todo en épocas con altas precipitaciones, porque la acumulación de agua promueve las condiciones anaeróbicas, las cuales reducen el nivel de oxígeno y aumentan

la susceptibilidad del huésped, debido a la disminución de la producción de fenol oxidasas, la producción reducida de fitoalexina, la supresión de las micorrizas y la reducción de la fijación de nitrógeno (Ravidra 2005).

La eliminación de plantas infectadas reduce el nivel de inóculo y la propagación del hongo y el manejo de la sombra en la temporada de lluvias es esencial para facilitar la penetración de la luz solar y la reducción de la alta humedad. Agregar materia orgánica para aumentar la diversidad de los suelos, proporcionar una nutrición adecuada y realizar un manejo integrado de *Radopholus similis* y *Meloidogyne incognita* son prácticas que se deben incluir en manejo integrado de la enfermedad (Ravidra 2005, Shahnazi *et al.* 2012).

En futuras investigaciones se realizará el análisis filogenético de los aislamientos descritos en este artículo, esto para contribuir al diseño de los programas manejo integrado de la enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a los Laboratorios de Fitopatología y Técnicas Moleculares del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento para realizar el estudio en el marco del proyecto: Evaluación del complejo de enfermedades de suelo del cultivo de pimienta (*Piper nigrum*) y generación de un paquete de manejo integral del problema, en La Virgen de Sarapiquí, Costa Rica.

Y un especial agradecimiento al Ing. Jairo Araya y a la Agencia de Extensión Agropecuaria de La Virgen de Sarapiquí del Ministerio de Agricultura y Ganadería por su gran colaboración.

## LITERATURA CITADA

- Abd-Elsalm, K; Aly, I; Abdel-Satar, M; Khalil, M; Verreet, J. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosoma DNA sequence data. African Journal of Biotechnology 2(4):82-85.

- Ahmad, N; Hina Fazal, H; Haider Abbasi, B; Farooq, S; Ali, M; Ali Khan, M. 2012. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3):1945-1953.
- Andújar, F; Moya, J. 2009. La pimienta (*Piper nigrum* L.): su cultivo y perspectivas en la República Dominicana. Santo Domingo, República Dominicana, Agencia Internacional de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 136 p.
- Araya, J. 2014. La pimienta una picante realidad en Sarapiquí. *Revista Germinar* 4(14):18-19.
- Barrios, M. 2006. Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaella fijiensis*) en plátano. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 56 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. London, England, Commonwealth Mycological Institute. 237 p.
- Campos, V. 2013. Patogenicidad de *Fusarium proliferatum* y la utilización de fungicidas para el control preventivo en la fase inicial de desarrollo del arroz (*Oryza sativa*). Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 60 p.
- Céspedes, C. 1988. Aspectos agroeconómicos del cultivo de la pimienta (*Piper nigrum* L.) en Costa Rica. Un análisis de casos. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 141 p.
- Chandra, N; Wulff, E; Udayashankar, A; Nandini, P; Niranjana, S; Mortensen, C; Prakash, H. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90:1625-1639.
- Chithra, S; Jasim, B; Sachidanandanb, P; Jyothis, M; Radhakrishnana, E. 2014. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine* 21:534-540.
- Choi, H; Hong, S; Lee, Y; Kim, W; Chun, S. 2018. Taxonomy of *Fusarium fujikuroi* species complex associated with bakanae on rice in Korea. *Australasian Plant Pathology* 47:23-34.
- Coleman, J. 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology* 17(2):146-158.
- Costa, S; Matos, K; Tessmann, D; Seixas, C; Pfenning, L. 2016. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. *Fungal Biology* 120:51-60.
- Da Costa, A; Salgado, G; Canas, P; Barata, G; Amaral, D; Batista de Souza, C. 2019. An endophytic *Pseudomonas* sp., of *Piper tuberculatum* promotes growth on *Piper nigrum* through increase of root biomass production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 108:1-7.
- Da Luz, S; Yamaguchi, L; Kato., M; De Lemos, O; Xavier, L; Maia, J; Ramos. A; Setzer, W; Kelly, J; Da Silva; G. 2017. Secondary metabolic profiles of two cultivars of *Piper nigrum* (Black Pepper) resulting from infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *International Journal of Molecular Sciences* 18:2-17.
- Dean, R; Lichens-Park, A; Chittaranjan, K. 2014. Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens. Londres, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 239 p.
- De La Torre. M; Sánchez, D; Galeana, E; Plascencia, J. 2014. Fumonisin Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 17(1):77-91.
- Duarte, M; Carneiro, F; Yiang, E. 2001. New diseases affecting black pepper crop Brazil (en línea). *International Pepper News Bulletin* 51-57. Consultado 28 feb. 2020. Disponible en <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/403821/3/Newdiseases.pdf>
- Fanelli, F; Schmidt-Heyd, M; Haidukowski, M; Geisen, R; Logrieco, A; Mulé, G. 2012. Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM1 gene expression by *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 153:148-153.
- Geiser, D; Jiménez, N; Kang, S; Makalowska, I; Veeraraghavan, N; Ward, T. 2004. *Fusarium-ID* v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Journal of Plant Pathology* 110:473-479.
- González, J. 2017. Efecto de tratamientos biológicos sobre la microbiología del suelo, el crecimiento vegetal y la sanidad de plantas de pimienta (*Piper nigrum* L. VAR. Balamkota) sometidas a una infección natural de *Collectotrichum gloeosporioides*. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 64 p.
- Hawa, M; Zakaria, L; Salleh, B. 2013. Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* causing stem rot of *Hylocereus polyrhizus* in Malaysia. *Annals of Applied Biology* 163(2):269-280.
- Ismail, M; Abdel-hafez, S; Hussein, N; Abdel-hameed, N. 2015. Contributions to the genus *Fusarium* in Egypt: with dichotomous keys for identification of species. Suchy Las, Poland. Publisher Tomasz M. Karpiński. 178 p.
- Jasim, B; Jimtha John, C; Mathew, J; Radhakrishnan, E. 2013. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation* 71(1):1-11.

- Jiménez-Fernández, D; Navas-Cortés, J; Montes-Borrego, M; Jiménez-Díaz, R; Landa, B. 2011. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. *Plant Disease* 95:860-870.
- Karlsson, I; Edel-Hermann, V; Gautheron, N; Brandström, M; Kolseth, A; Steinberg, C; Persson, P; Friberg, H. 2015. Genus-Specific Primers for Study of *Fusarium* Communities in Field Samples. *Applied Environmental Microbiology* 82:491-501.
- Leslie, J; Summerell, B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, Estados Unidos, Blackwell Publishing. 388 p.
- Maistre, J. 1969. Las plantas de especies. Barcelona, España, Blume. 209 p.
- Maldonado-Bonilla, L; Calderón-Oropeza, M; Villarruel-Ordaz, J; Sánchez-Espinosa, A. 2019. Identification of Novel Potential Causal Agents of *Fusarium* Wilt of *Musa* sp. AAB in Southern México. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 10 (4):1-8.
- Monge, D; Calvo, T; Morales, F. 2013. Factibilidad de la producción de pimienta (*Piper nigrum*) en La Virgen de Sarapiquí, Heredia, Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 26(4):72-84.
- Nirenber, H; O'donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the Gibberella fujikuroi species complex. *Mycologia* 90:434-458.
- O'Donnell, K; Humber, R; Geiser, D; Kang, S; Park, B; Robert, V; Crous, P; Johnston, P; Aoki, T; Rooney, A; Rehner S. 2012. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLST. *Mycologia* 104(2):427-445.
- O'Donnell, K; Sutton, D; Fothergill, A; Mc Carthy, D; Rinaldi, M; Brandt, M. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 46(8):2477-2490.
- Orlandelli, R; Alberto, R; Rubi Filho, C; Pamphile, J. 2012. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. *Genetics and Molecular Research* 11(2):1575-1585.
- Paparu, P; Niere, B; Gold, C; Coyne, D; Adipala, E; Dubois, T. 2003. Colonization of banana by fungal endophytes. *African Crop Science Conference Proceedings* 6:381-384.
- Rana, A; Sahgal, M; Johri, B. 2017. *Fusarium oxysporum*: Genomics, Diversity and Plant–Host Interaction. In Satyanarayana, T; Deshmukh, S; Johri, B (eds.). *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. Singapore, Singapore p. 159-199.
- Ravindran, P. 2005. Black pepper. *Piper nigrum*. Amsterdam, The Netherlands, Harwood Academic Publishers. 563 p.
- Saha, B. 2002. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry* 37(11):1279-1284.
- Salgado, G; Filgueira, O; Tremacoldi, C; Cabral., K; Reis, L; Alves, H. 2016. Susceptibility of in vitro black pepper plant to the filtrate from a *Fusarium solani* f. sp. *piperis* culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 127:263-268.
- Sarma, Y; Manohara, D; Premkumar, T; Eapen, S. 2013. Diseases and insect pests of Black pepper (*Piper nigrum* L.). Indonesia, International Pepper Community. 116 p.
- Shahnazi, S; Meon, S; Vadamalai, G; Ahmad, K; Nejat, N. 2012. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* sp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Gen Plant Pathology* 78:160-170.
- Shahnazi, S; Meon, S; Vadamalai, G; Yazdani, D; Shabanimofrad, M. 2014. Genetic Diversity of *Fusarium solani* isolates from Black Pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia by ISSR marker. *Tropical Agricultural Science* 37(3):363-374.
- Šišić, A; Al-Hatmi, A; Baćanović-Šišić, J. Ahmed, S; Dennenmoser, D; Sybern, G; Finckh, M. 2018. Two new species of the *Fusarium solani* species complex isolated from compost and hibiscus (*Hibiscus* sp.). *Antonie van Leeuwenhoek* 111(10):1785-1805.
- Sitepu, D; Mustika, L. 2006. Diseases of black pepper and their management in Indonesia. In *Black piper; Piper nigrum*. Amsterdam, Holanda, Harwood Academic Publisher p. 305-317.
- Stępień, L; Waškiewicz, A; Wilman, K. 2015. Host extract modulates metabolism and fumonisin biosynthesis by the plant-pathogenic fungus *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 193:74-81.
- Summerell, B. 2019. Resolving *Fusarium*: Current Status of The Genus. *Annual Review of Phytopathology* 57:323-339.
- Taylor, A; Barnes, A; Jackson, A; Clarkson, J. 2019. First report of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium redolens* causing wilting and yellowing of wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) in the United Kingdom. *Plant Disease* 103(6):1428.
- Trout C; Ristaino, J; Madritch, M; Wangsomboondee, T. 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in

- late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant disease* 81(9):1042-1048.
- Vaz, A; Elizei, V; Costa, S; Fenning, L. 2012. First report of sexual reproduction of *Fusarium solani* f.sp. *piperis* in Bahia, Brazil. *Plant Disease* 96(10):1581-1593.
- Villalobos, J; Cárdenas, F; Cordero, J. 2009. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica, 2009. San José, Costa Rica, Ministerio de agricultura y ganadería (MAG) y Servicio fitosanitario del estado (SFE). 118 p.
- Wang, R; Gao, B; Li, X; Ma, J; Chen, S. 2014. First Report of *Fusarium solani* Causing *Fusarium* Root Rot and Stem Canker on Storage Roots of Sweet Potato in China. *Plant Disease* 98(1):160.
- Waškiewicz, A; Stępień, L. 2012. Mycotoxins biosynthesized by plantderived *Fusarium* isolates. *Arh Hig Rada Toksikol* 63:437-446.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a [rac.cia@ucr.ac.cr](mailto:rac.cia@ucr.ac.cr)