



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL
Sede Santo Domingo

FACULTAD CIENCIAS DE LAS INGENIERÍA E INDUSTRIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARÍA

Informe del trabajo experimental para la obtención del título de:
INGENIERO AGROPECUARIO

IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN EL CULTIVO DE
PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*) EN ETAPA DE PRODUCCIÓN

Autor

ANGEL DAVID PEREIRA GUEVARA

Director

Ing. LUIS WILFRIDO GUSQUI VILEMA, MsC.

Santo Domingo de los Tsáchilas – Ecuador

Enero – 2018

IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN EL CULTIVO DE
PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*) EN ETAPA DE PRODUCCIÓN.

Ing. Luis Gusqui Vilema, *MsC.*
DIRECTOR

APROBADO

Dr. Marco Acosta Jácome, *MsC.*
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Wilson Rivas Pacheco, *MsC.*
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Paúl González Dávila, *MsC.*
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Santo Domingo.....de.....del 2018

Autor:	ANGEL DAVID PEREIRA GUEVARA
Institución:	UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL
Título:	IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN EL CULTIVO DE PIMIENTA NEGRA (<i>Piper nigrum</i>) EN ETAPA DE PRODUCCIÓN
Fecha:	ENERO , 2018

El contenido del presente trabajo está bajo la responsabilidad del autor y no ha sido plagiado.



Angel David Pereira Guevara
C.I. 2300307309

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL
Sede Santo Domingo

INFORME DEL DIRECTOR

Santo Domingo, 11 de enero del 2018

Señor Doctor
Marco Acosta
COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA
Presente.

Señor Coordinador:

Mediante la presente tengo a bien informar que el trabajo escrito de titulación realizado por el señor: *ANGEL DAVID PEREIRA GUEVARA*, cuyo título es: *“IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN EL CULTIVO DE PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*) EN ETAPA DE PRODUCCIÓN”*, ha sido elaborado bajo mi supervisión y revisado en todas sus partes, *el mismo que no ha sido plagiado*, por lo cual autorizo su respectiva presentación.

Particular que informo para fines pertinentes.

Cordialmente.



Ing. Luis Wilfrido Gusqui Vilema, MsC.
DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Dedicatoria

Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida y con el conocimiento, el sentido de la maravillosa estructura de la existencia. Con el humilde intento de comprender aunque más no sea una porción diminuta de la Razón que se manifiesta en la naturaleza.

A. Einstein.

No existe razón más irrefutable que la curiosidad acompañada de locura, que engrandece el ego del ser, de la manera más sutil y humilde, que nos permite escudriñar en los secretos que se ocultan en la naturaleza, siendo la sublime expresión del amor que nos rodea. Por ello dedico este trabajo a mis padres Gladys y Angel por su constante esfuerzo, sacrificio y perseverancia en hacer que esto sea posible, además de que son un ejemplo vivo de superación, que creyeron en mi aun cuando yo mismo me perdí en el camino. A mis hermanos Diana y Lincon que son el impulso para llegar cada vez más lejos y poder ser mejor. A tres personas que guardaré siempre en mi alma JHFDI.

Agradecimiento

Cada día sabemos más y entendemos menos.

A. Einstein.

Me gustaría empezar agradeciendo en primer lugar a mi gran amigo y mi director Luis Gusqui Vilema de la Universidad Tecnológica Equinoccial, no solamente por haberme inculcado los principios que se reflejan en el presente trabajo, además de haberme brindado su amistad.

En la vida nos rodeamos y conocemos a varias personas, que en el camino nos enseñan muchas lecciones por más pequeñas que sean, por eso agradezco a todos los que fueron y los que son mis amigos. A mis maestros por ser una guía con sus conocimiento, experiencias y consejos durante todo mi camino universitario. A mis familiares por su apoyo, ánimos y sobre todo porque demostraron que unidos cualquier cosa es posible. Finalmente agradecer al grupo de trabajo de AGROCALIDAD, Jairo, Alex y Hernando que muy amablemente me brindaron su conocimiento, permitiéndome realizar parte del trabajo junto a ellos.

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO
PROYECTO DE TITULACIÓN

DATOS DEL CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	2300307309
APELLIDO Y NOMBRES:	Pereira Guevara Angel David
DIRECCIÓN:	Las Guaduas
EMAIL:	angeldavid-26@hotmail.com
TELÉFONO FIJO:	2763-583
TELÉFONO MOVIL:	0981113218

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO	Identificación de enfermedades fúngicas en el cultivo de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i>) en etapa de producción
AUTOR O AUTORES:	Pereira Guevara Angel David
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Enero 2018
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Ing. Luis Wilfrido Gusqui Vilema, MsC.
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agropecuario
RESUMEN: máximo 250 palabras	La falta de estudios sobre los patógenos específicos que están atacando el cultivo de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i>) en la zona, tiene efecto directo sobre el mecanismo de control de los mismos, generando problemas a futuro como la resistencia a productos químicos. Por lo tanto, esta investigación se realizó para determinar mediante los postulados de Koch, cuales son los patógenos que se encuentran afectando el

	<p>cultivo. Para ello se aisló e identificó siete patógenos específicos; cuatro a nivel de género <i>Fusarium sp</i>, <i>Rhizoctonia sp</i>, <i>Sclerotinia sp</i>, <i>Nectria sp</i> y tres a nivel de especie; por medio de técnicas morfométricas <i>Colletotrichum gloesporioides</i> y todos los aislados de <i>Fusarium</i> fueron enviados a PCR para la identificación, de <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxisporum</i> respectivamente. Todos los hongos aislados e identificados fueron inoculados en plantas sanas, donde se realizó prueba de significación Tukey al 95 % de confiabilidad para el cual se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2016. Los resultados demuestran total significación con un (P valor = 0,0035) para los tratamientos y para comprobar la manifestación de los postulados de Koch. Se realizó la incidencia del patógeno con un 100 % para las más altas, 75 % el valor intermedio y 0 % la más baja o planta sin inóculo, Por lo tanto se volvió aislar y se reconfirmó la presencia de los patógenos quedando así demostrado su especificidad al huésped.</p>
PALABRAS CLAVES:	Agentes fúngicos, Sintomatología, Patogenicidad, Inoculación del agente, Identificación de Hongos
ABSTRACT	The lack of studies on specific pathogens that are attacking the cultivation of black pepper (<i>Piper nigrum</i>) in the area, have direct effect on the mechanism of control of

the same, generating problems in the future like the resistance to chemical products. Therefore, this research was carried out to determine through the postulates of Koch, which are the pathogens that are affecting the crop. To this end, seven specific pathogens were isolated and identified: Four at the level of genus *Fusarium* sp, *Rhizoctonia* sp, *Sclerotinia* sp, *Nectria* sp and three to species level; Through morphometric *Colletotrichum gloesporioides* techniques and all the isolates of *Fusarium* were sent to PCR (polymerase chain reaction) for the identification of *Fusarium Monolani* and *Fusarium oxisporum* respectively. All the isolated and identified fungi were inoculated in healthy plants, where it was performed Tukey significance test at 95% of reliability for which the statistical program was used INFOSTAT version 2016. All the isolated and identified fungi were inoculated in healthy plants, where it was performed the Tukey test at significance of 95% of reliability and to do this the statistical program INFOSTAT version 2016 was used. The results show total significance with a (P value = 0.0035) for the treatments and to check the manifestation of Koch's postulates. The incidence of the pathogen was carried out with a 100% for the highest, 75% the intermediate value and 0% the lowest or plant without inoculum. To

	conclude, it became isolated and reconfirmed the presence of pathogens thus proving its specificity to the host.
KEYWORDS:	Fungal agents, symptomatology, pathogenicity, inoculation of the agent, identification of fungi

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.



PEREIRA GUEVARA ANGEL DAVID
C.I. 2300307309

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **PEREIRA GUEVARA ANGEL DAVID**, CI. **2300307309** autor/a del proyecto titulado: **Identificación de enfermedades fúngicas en el cultivo de Pimienta negra (*Piper nigrum*) en etapa de producción**, previo a la obtención del título de **INGENIERO AGROPECUARIO** en la Universidad Tecnológica Equinoccial.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad Tecnológica Equinoccial a tener una copia del referido trabajo de graduación con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Santo Domingo, 16 de enero del 2017



PEREIRA GUEVARA ANGEL DAVID
C.I. 2300307309

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Pág.
Portada.....	I
Sustentación y aprobación de los integrantes del tribunal.....	II
Responsabilidad del autor.....	III
Aprobación del director.....	IV
Dedicatoria.....	V
Agradecimiento.....	VI
Formulario de biblioteca.....	VII
Declaración y autorización.....	XI
Índice de contenidos.....	XII
Índice de tablas.....	XIII
Índice de figuras.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1 Sitio del estudio.....	5
2.2 Diseño del muestreo.....	5
2.3 Población en estudio.....	5
2.4 Manejo del experimento.....	6
2.5 Medición de las variables.....	6
2.6 Análisis estadístico.....	10
III RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	11
3.1 Aislamiento.....	11
3.2 Cámara húmeda.....	12
3.3 Características macroscópicas y microscópicas.....	13
3.4 Sintomatología.....	21
3.5 Evaluación de los postulados de Koch.....	28
IV CONCLUSIONES.....	31
V REFERENCIAS.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

1	Aislamientos obtenidos en los distintos medios de cultivos de las plantas infectadas.....	12
2	Géneros de hongos observados tomados de improntas por método de cámara húmeda en órganos de varias plantas.....	13
3	Promedio obtenido por la medición de 20 conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	20
4	Conteo de plantas sanas y enfermas inoculadas con los diferentes patógenos.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de <i>Rhizoctonia sp.</i>	15
2	Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de <i>Sclerotinia sp.</i>	16
3	Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de <i>Nectria sp.</i>	17
4	Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de <i>Fusarium sp.</i>	18
5	Características macroscópicas y microscópicas obtenidas del reaslamiento de <i>Fusarium oxisporum.</i>	19
6	Micrografía obtenida de conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides.</i> ...	20
7	Características macroscópicas y microscópicas obtenidas del reaslamiento de <i>Fusarium solani.</i>	21
8	Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (<i>Piper nigrum</i>) ante el inóculo de <i>Rhizoctonia sp.</i>	22
9	Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (<i>Piper nigrum</i>) ante el inóculo de <i>Sclerotinia sp.</i>	23
10	Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (<i>Piper nigrum</i>) ante el inóculo de <i>Colletotrichum gloesporioides.</i>	24
11	Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (<i>Piper nigrum</i>) ante el inóculo de <i>Nectria sp.</i>	25
12	Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (<i>Piper nigrum</i>) ante el inóculo de <i>Fusarium sp.</i>	26
13	Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (<i>Piper nigrum</i>) ante el inóculo de <i>Fusarium solani.</i>	27
14	Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (<i>Piper nigrum</i>) ante el inóculo de <i>Fusarium oxisporum.</i>	28
15	Porcentaje de incidencia (n=4) de diversos hongos patógenos del cultivo de pimienta (<i>Pipper nigrum</i>), inoculados en plantas sanas para comprobar la manifestación de los postulados de Koch. Santo Domingo, Ecuador.....	29

I. INTRODUCCIÓN

La pimienta negra (*Piper nigrum*) es una planta originaria del suroeste de la India, de las Costas de Malabar y hoy en día cultivada en varios países, siendo los mayores productores: India, Indonesia, Malasia y Brasil. La India el principal productor, consumidor y exportador del mundo durante 2013 y 2014, ha dedicado mucho tiempo a la investigación del cultivo de pimienta negra, definiéndola como una planta que se adapta muy bien a zonas tropicales altas en humedad (75-80 %) y pluviosidad de 1 250 - 2 000 mm, que se desarrolla bien hasta los 1 500 msnm y en temperaturas entre 10° y 40° C, puede tolerar sombra y pH de 5,5 (Indian Institute of Spices Research, Kozhikode, Kerala [ICAR, 2015]). La pimienta en el Ecuador se ha desarrollado y adaptado, especialmente en las Provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas, Manabí, Napo, Orellana y Sucumbíos, presentando una vida económica productiva de 15 a 18 años (Mena, 2014).

Los diferentes factores; ambientales, químicos y biológicos para la producción de una especie agrícola se presentan aislados el uno del otro, sin embargo no se los puede considerar de la misma manera (Martín y González, 2014). Ya que los factores antes mencionados ayudan al desarrollo de los hongos, en especial los factores ambientales, como la humedad relativa del aire que les proporciona un mejor crecimiento (Willey, Sherwood, y Woolverton, 2009) y según Ortiz, Alatorre y Valdivia (2011), la humedad relativa es el factor más influyente para la patogenicidad de un hongo, entre ellos, las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Yaisys y Leyva, 2007).

Cuando una planta se aparta de las condiciones óptimas, sufre estrés lo que aumenta la posibilidad de ser afectada por plagas y enfermedades (Martín y González, 2014). Las condiciones en las que crece la pimienta negra, favorecen el desarrollo de la flora fúngica, sumando los factores químicos, nutricionales y las funciones fisiológicas de la planta (Agrios, 2005), más las características únicas del agente patógeno específico que pueden afectar considerablemente su reproducción (Giménez, 1980), influyen en la aparición de una enfermedad (Agrios, 2005). Misma que reducen generalmente los rendimientos y en casos extremos provoca la muerte (Lastres y Soza, 2009). La muerte de las plantas muchas veces se da por otros agentes

considerados agravantes o ejecutores, que atacan la planta ya enferma afectada por el agente causal específico de la enfermedad (Martín y González, 2014). Por lo que es importante el conocimiento del agente causal de la enfermedad y sus síntomas.

En República Dominicana se da mucho énfasis en cuanto a lo relacionado con las enfermedades, especialmente las que producen más pérdidas económicas en el cultivo de pimienta negra, que se encuentran debidamente identificadas siendo sus agentes causales (*Fusarium solani* y *Phytophthora capsici* Leonian), más conocidos como causantes de la pudrición y fusariosis (Adújar y Moya, 2009). En Indonesia la enfermedad más importante de la pimienta es la podredumbre del cuello también conocida como enfermedad de Muller, siendo su agente causal (*Phytophthora palmivora* var. *Piperis*). En la India la podredumbre es causada por (*Rosellinia budones*). En Assam el marchitamiento es atribuido a (*Nectria spp*). En Malasia (*Fomes lignosis*, *Cotidium salmonicolor* y *Ganoderma lucidum*) son considerados los causantes de la pudrición radicular (Maistre, 1969). En Brasil las plantaciones se ven gravemente afectadas por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*; *Nectria haematococca* f. sp. *Piperis*= estado sexual y *Phytophthora capsici*, (Kimati, et al, 1997). Los mismos agentes causales se presentan en la región amazónica para el cultivo de pimienta (Freddy, 1999).

La reacción ante un agente patógeno se concentra en una zona específica de la planta y su proceso químico es invisible, pero una vez que la reacción se difunde, esta produce cambios a nivel celular que se expresan con los síntomas de la enfermedad, afectando su función fisiológica (Agrios, 2005). Actualmente en la India la mayoría de los problemas fúngicos se deben a la infección por *Phytophthora* y se observan sus síntomas en casi toda la planta especialmente en el tallo o cuello e incluso presentándose a nivel radicular produciendo podredumbres, siendo la alternativa más eficiente y rápida el uso de productos químicos junto con biológicos (ICAR, 2015).

Un manejo y uso inadecuado de los productos químicos como método de control frente a las enfermedades causa resistencia (Gepp, et al. 2011). El aumento de los residuos de plaguicidas en los cultivos influye en la aparición de resistencia genética,

como consecuencia del uso excesivo de productos químicos para el control de la enfermedad (Martín y González, 2014).

Al afectarse la función fisiológica de la planta producto del ataque de un patógeno, repercute considerablemente en la salud de la misma, por lo tanto, se ve reflejado en la disminución de la producción y la mortalidad del cultivo. Los procesos específicos que caracterizan las enfermedades, varían considerablemente según el agente causal y a veces según la planta misma (Agrios, 2005). El punto de partida para el manejo o control eficiente de una enfermedad es el diagnóstico o identificación del agente patogénico. Para ello se necesita evaluar la planta afectada y cultivar los patógenos en medios específicos para conocer sus efectos (Scattolini, 2011). Martín y González (2014), afirman que raramente un síntoma sirve por si solo para identificar una enfermedad.

El daño ocasionado por los patógenos en los cultivos incrementa los gastos para su control y su monto que va desde porcentajes mínimos a grandes pérdidas, su mal uso por desconocimiento del agente específico influye en la resistencia, modificación y una mortalidad más alta del cultivo o fruto luego de la cosecha (Agrios, 2005). Duarte (2007), afirma que solo la identificación del agente causal de la enfermedad permite desarrollar estrategias de manejo y control, para evitar la diseminación a otras plantaciones y disminución de pérdidas económicas. La mayoría de las enfermedades de las plantas se diagnostican al observarlas a simple vista o mediante el microscopio, sin embargo, esto no está determinado cuando el patógeno posiblemente se encuentra contaminado con otro al no producir sus cuerpos característicos, lo que amplía la posibilidad de que la enfermedad pueda deberse a varios patógenos morfológicamente iguales o desconocido hasta ese momento, de modo que deben aislarse para llevar a cabo su estudio (Agrios, 2005). Identificar los agentes fúngicos fitopatógenos específicos de un cultivo, ayuda al control de los mismos reduciendo los costos y minimizando las pérdidas que estos ocasionan, además se genera una base sobre los posibles patógenos que existen en una zona. Por lo tanto, el objetivo general de esta investigación es identificar los agentes fúngicos fitopatógenos específicos que afectan el cultivo de pimienta negra en producción. Siendo los objetivos específicos:

- Aislar los agentes fúngicos en cultivos puros de los tejidos infectados.
- Realizar pruebas de patogenicidad *in vivo* en plántulas de vivero.
- Identificar género y especie de los hongos fitopatógenos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitio del estudio.

El experimento se realizó en una propiedad productora de pimienta ubicada en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Parroquia San Jacinto del Bua, Recinto UmpeChico (Centro noreste del Ecuador), con una zona de vida de Bosque Húmedo Tropical (Jiménez, 1980). Las muestras se recolectaron de plantas que presentaron sintomatología, luego todo el material se llevó al laboratorio de fitopatología de UTE-SD para el aislamiento en cultivos puros, de los cuales se identificaron los géneros de los fitopatógenos. La identificación de las especies fúngicas se realizó en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Tecnológica Equinoccial Sede Santo Domingo, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y en los laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) ubicada en la parroquia de Tumbaco, Provincia de Pichincha, Ecuador.

2.2 Diseño del experimento

Se seleccionó material vegetativo de plantas enfermas, tomando diferentes partes de las plantas afectadas, con porciones sanas y enfermas. Para los órganos muestreados se seleccionó mínimo una raíz, dos ramas, un tallo y dos hojas (AGROCALIDAD, 2015). Las muestras fueron empacadas, identificadas y transportadas a una temperatura de 7°C para evitar la aceleración de la descomposición hasta su llegada al laboratorio.

2.3 Población en estudio.

Para el trabajo experimental, se contó con una propiedad de 4 ha de pimienta negra en etapa de producción de 4 años de edad, con una densidad de 2 500 plantas ha⁻¹, con una distancia de siembra de 2 m x 2 m, con tutor vivo de Obo (*Spondias purpurea*). Para el número de plantas se realizó un muestreo no probabilístico por

conveniencia tomando en cuenta únicamente las plantas primordiales en la investigación (Palacios, 2015).

2.4 Manejo del experimento.

Durante la investigación las plantas muestreadas se fertilizaron con 80 g de N, 20 g de P_2O_5 , 80 g de K_2O y 75 g de $MgSO_4$, se realizaron dos podas al tutor como de la planta y aplicaciones foliares con 12-8-16-4-2 y para los controles de malezas se procedió a las aplicaciones de herbicidas: glifosato, paraquat, diuron, además se efectuaron dos coronas de forma manual y dos chapias. Las plantas aparentemente enfermas no fueron rociadas con ningún tipo de agente químico que disminuya las poblaciones de microorganismos patógenos o posibles vectores.

2.5 Medición de variables

Para el trabajo de laboratorio se usaron los métodos de cámara húmeda y aislamiento por tejido enfermo (Agrios, 2005). Se esterilizaron todos los materiales a utilizarse, mismos que estuvieron sellados o cubiertos, incluidos los medios de cultivo ya preparados, para la esterilización se realizó en el autoclave a $121^{\circ}C$ con 15 Psi durante 20 min, (Ownley y Trigiano, 2016)

Se utilizó varios medios de cultivo para asilar un mayor número de posibles fitopatógenos. Los medios que se presentaron muy ácidos o muy alcalinos se reguló su pH con ácido clorhídrico 0,5 N y NaOH al 0,1 N hasta alcanzar su rango óptimo 5,5 - 7,5. Se sembró el tejido enfermo en los distintos medios. Además, se agregó 0.5 g de sulfato de estreptomycinina para evitar el posible crecimiento bacteriano, después de ser esterilizado el medio de cultivo (Curvelo y Rojas, 2010). Los distintos medios se vertieron en las cajas de Petri, se esperó hasta su solidificación y se guardaron a una temperatura de $7^{\circ}C$ invertidos hasta su utilización.

Medio PDA

- PDA 39 g, en 1 000 ml de agua

Medio Nutriente Agar Dextrosa:

- Agar nutriente 23 g, Dextrosa 5 g, en 1 000 ml de agua

Medios Utilizados por Curvelo y Rojas (2010) para la identificación de Hongos.

- Medio Agar Avena: Avena 39 g, Agar 15 g, en 1 000 ml de agua

Medio Agar Extracto de Malta:

- Extracto de malta 20 g, Agar 15 g, en 1 000 ml de agua

Medio Agar Juvo V8:

- Jugo V8 200 ml, Agar 15 g, CaO₃ 3 g, en 100 ml de agua

Medio Agar Miel Peptona:

- Miel 60 g, agua de Peptona 10 g, Agar 25 g, en 1 000 ml de agua

Una vez ingresadas las muestras al laboratorio, se lavaron con agua destilada, se ubicaron en gasa estéril y se trasladó a la cabina de flujo laminar, en donde se procedieron a cortar trozos de material vegetal de 5 mm x 5 mm aproximadamente con 50 % de tejido sano y 50 % de tejido enfermo (Astorga, Zúñiga y Rivera, 2014), las muestras se sumergieron en alcohol al 70 % por un min, y luego en hipoclorito de sodio al 2 % durante un min y se lavaron en agua destilada estéril cuatro veces. Posteriormente se secaron en papel toalla esterilizado y se colocaron cuatro muestras por placa (Folgueras, Herrera y Morales, 2016). Luego se procedió a colocar las cajas en la incubadora a una temperatura de 25 °C en la oscuridad (Almaraz, *et al.* 2016). Todos los hongos replicados y purificados fueron sembrados en medio PDA.

Para las muestras de cámara húmeda, se esterilizó en el auto clave, la cristalería (cajas Petri y vasos precipitados de 250 ml) con una porción de papel seco dentro de cada una y de la misma manera se esterilizó agua destilada, que se colocó luego en cada contenedor, con el objetivo de humedecer el papel estéril. Las muestras de plantas fueron tratadas de la misma manera al proceso anterior a diferencia que estas se colocaron en porciones más grandes de cada órgano en una caja o frasco

independiente y sellado para evitar la contaminación. Las diferentes muestras de plantas colocadas dentro de cada caja Petri o vaso precipitado, fueron acomodadas en el interior de un contenedor plástico grande, a temperatura ambiente y protegido del exterior.

Una vez que las muestras presentaron micelio, tomamos una pequeña porción para la inoculación en los medios de cultivo, hasta obtener cultivos puros de los agentes fúngicos como posibles fitopatógenos. Se realizó la identificación del género mediante claves taxonómicas establecidas por (Barnett y Hunter, 1998) (Alexopoulos, 1996) (Dugan, 2006) (Parmeter, 1970) (Leslie y Summerell, 2006) (Crous, Verkley, Groenewald, y Samson, 2010)

Para la identificación a nivel de especies se enviaron muestras a PCR Convencional para confirmar la presencia de *Fusarium solani* o *Fusarium oxisporum* tanto en su aislamiento como en el reaislamiento, y se realizó morfometría para *Colletotrichum gloesporioides*.

Para la purificación y el reaislamiento se utilizó únicamente el medio PDA que facilitó el crecimiento de los fitopatógenos, mientras que los otros medios fueron utilizados para su aislamiento. Como afirma Leslie y Summerell (2006), las características morfológicas pueden estar ausentes o alteradas cuando un mismo hongo se cultiva en medios diferentes, por lo tanto, un solo medio favorece características iguales para el estudio sin alterar su morfología. Ya que estos determinan la cantidad y calidad de crecimiento del hongo de la misma manera variara debido al tiempo y temperatura ocupado durante la incubación (Dhingra y Sinclair, 2012).

La observación se realizó haciendo improntas de cada aislamiento y de ser el caso directamente de la parte afectada, para lo cual se utilizó azul lacto fenol o ácido láctico, para la observación mediante el microscopio óptico marca Olympus BX43, con 40X. Las improntas para los aislamientos se tomaron de entre los día ocho y diez, para su observación morfológica, algunos hongos que solo presentaron micelio fueron expuestos a la luz, durante ocho horas ya que esta regula muchos aspectos de

los hongos entre ellos germinación de esporas y aparición de cuerpos fructíferos (Corrochano, 2013)

Las pruebas de patogenicidad se realizaron cuando los cultivos puros estuvieron en crecimiento y fueron inoculados en plantas sanas de la misma procedencia, para la inoculación de los cultivos puros que no tuvieron cuerpos de infección o contaron solo con micelio se procedió hacer una laceración en varias partes de la planta y se colocó spots de 8 mm de diámetro del medio de cultivo con el agente fúngico sobre las heridas de la planta. Según Agrios (2005), cuando un agente patógeno ingresa a la planta por medio de una herida invade directamente las células vegetales, además se inyectó una solución cargada con el patógeno que facilite la infección del mismo, ya que este debe primero degradar los compuesto orgánicos como celulosa, para poder ingresar al huésped (Willey, *et al.* 2009) facilitando así la infección por micelio, todo esto bajo vivero en campo.

Para hongos que presentaron cuerpos de infección como conidios, macroconidias y microconidias se realizó un conteo en cámara de Neubauer multiplicando el número de células por 10 000 y dividiendo para el número de cuadrados contados, de donde se obtuvo una solución de agua destilada estéril con el cultivo puro y se contaminó el tejido sano, observando el efecto de los fitopatógenos, se observó una solución con una concentración mínima de 10^5 , la cual se inyectó dentro de la planta o provocando pinchazos superficiales, para la inoculación en la hojas estas se cubrieron con algodón estéril y humedecido con agua destilada estéril para evitar la exposición directa a la luz y favorecer con humedad la infección del patógeno a la planta, de igual manera se colocó el algodón humedecido sobre las heridas con los patógenos y todas las heridas fueron cubiertas con cinta parafilm.

El patógeno *Fusarium oxisporum* o *Fusarium solani* se recolectó en una solución de reactivación que contiene:

- Dextrosa 20 g, Extracto de levadura 5 g, Peptona 5 g.

Se colocó todo el cultivo puro y sumergiendo las plantas previamente lavadas, retirando sus impurezas y cortadas las puntas de sus raíces. Para favorecer la

infección del patógeno, empezar sumergiendo en la solución por un lapso de 24 horas, ya que Baayen y De Maat (1987), encontraron microconidias a las 24 horas, que eran aspiradas por las raíces cortadas. Una vez retirada la planta infectada se sembró en macetas con suelo estéril, tapando la maceta con cinta parafilm evitando así una posible pérdida de humedad, se procedió a observar síntomas y se reisló el patógeno para comprobar los postulados de Koch. Las muestras se volvieron a enviar a PCR para confirmar la especie. Todas las soluciones obtenidas de los patógenos fueron vertidas como el agua de riego en cada planta correspondiente favoreciendo la cantidad de inóculo.

Se registró la incidencia para la evaluación de la patogenicidad de los inóculos en las plantas de pimienta, dividiendo el número de plantas enfermas para el número de plantas totales y multiplicándolo para 100, la incidencia se tomó en cuenta una vez que la plantas comenzaron a presentar la sintomatología, posteriormente se realizó su reislamiento y confirmación del agente causal cumpliendo así los postulados de Koch.

2.6 Análisis estadístico.

Se realizó una prueba de significación Tukey con el 95% de confiabilidad para el cual se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2016 (DiRenzo *et al.*, 2016)

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Aislamiento

Las muestras de cada planta enferma (raíz, tallo, hojas, ramas, frutos) con los síntomas de necrosis, cancro, muerte descendente, secadera, antracnosis, amarillamiento, pudriciones blandas, pudrición basal, decaimiento del cultivo de Pimienta negra (*Piper nigrum*). Aunque se obtuvo muchos aislados de los diferentes órganos, en todos los medios de cultivo dando características diferentes para un mismo hongo, estos denotan un mayor crecimiento y mayor afinidad por un medio de cultivo al momento del aislamiento por tejido enfermo. Para su purificación se tomó en cuenta únicamente los hongos que se repetían más en un mismo medio de cultivo y se pasó al medio PDA.

Los hongos obtenidos por aislamiento de tejido enfermo pertenecientes al género *Fusarium* (Tabla 2), a pesar de ser aislados incluso de la misma planta estos presentaron características macroscópicas como microscopios diferentes, lo que posiblemente se deba a las características del medio de cultivo (Ownley y Trigiano, 2016), sin embargo al momento de su purificación a un medio general (PDA), para todos los hongos obtenidos del género *Fusarium*, estos seguían comportándose de manera diferente uno del otro, por lo cual se tomó en cuenta los tres aislados para su identificación a nivel de especie.

Los géneros *Sclerotinia* y *Rhizoctonia* se aislaron no solamente de partes cercanas al suelo (Tabla 2). También se aislaron de hojas, ramas y frutos, la gran mayoría de los aislamientos presentaban características similares incluso en diferentes medios con la diferencia de su cantidad, forma de crecimiento y algunos aspectos en su coloración.

Para el género *Nectria*, se obtuvo únicamente un aislado de un solo órgano de todas las plantas (Tabla 2). Para *Colletotrichum* se aisló únicamente de las hojas, de donde sus síntomas fueron evidentes, según la sintomatología descrita por Tremacoldi (2010), para *Colletotrichum* en el cultivo de pimienta.

Tabla 1. Aislamientos obtenidos en los distintos medios de cultivos de las plantas infectadas.

Aislado	Órgano	Medios de cultivo						N° PR
		PDA	V8	AA	MPA	NDA	AM	
<i>Fusarium sp</i>	ramas			x				4
<i>Fusarium sp</i>	tallo		x					5
<i>Fusarium sp</i>	raíz				x			4
<i>Colletotrichum sp</i>	hojas	x						3
<i>Rhizoctonia sp</i>	raíz						x	5
<i>Sclerotinia sp</i>	tallo					x		5
<i>Nectria sp</i>	ramas	x						1

3.2 Cámara húmeda

Las muestras sometidas a cámara húmeda presentaron micelio a los cinco días, realizando improntas para observar su estructura e identificarlos. El hongo que más se presentó fue *Fusarium sp*. El cual apareció en casi todos los órganos sometidos a esta técnica, con formación de micelio aéreo blanco y causante de necrosis. En el estudio realizado por Quilambaqui (2005), se reportó que obtuvo un total de 219 aislamientos de *Fusarium spp*, obtenidos de plantas con síntomas como declinamiento, encontrándose en diferentes órganos de la planta extraídos por cámara húmeda.

Además se visualizó varios hongos a nivel de las hojas, pertenecientes a los géneros de *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Capnodium* y *Diplodia* (Tabla 2), sin embargo no se pudo obtener cultivos puros debido a la aparición de *Trichoderma*, posiblemente se deba a los diferentes mecanismos de acción frente a patógenos como micoparasitismo, adhesión y enrollamiento descritos por Infante (2009). Para los agentes antes mencionados no comprobó su especificidad al huésped con los postulados de Koch. Sin embargo, los generos de *Colletotrichum*, *Cylindrocladium* y *Capnodium*, son reportados como patógenos en el cultivo de pimienta.

Para *Colletotrichum* produce la enfermedad conocida como antracnosis en las hojas. Según Tremacoldi (2010), reportan que en Malasia existe la presencia de tres especies de *Colletotrichum* que están atacando el cultivo de pimienta negra. *Cylindrocladium sp* y *Capnodium sp* se presentan como patógenos asociados a enfermedades en pimienta negra en el estado de Acre y Parra en Brasil, causantes de fumagina (*Capnodium sp*) y manchas foliares (*Cylindrocladium variabile*) (Poltronieri, 1997). Aunque no se encontró reportes del ataque de *Diplodia* al cultivo de pimienta, este es considerado como una de las principales enfermedades en el pino, causante de la muerte descendente atacando los brotes y produciendo además canchales en las hojas en el País Vasco, (García, 2011). Guerra, *et al.* (2004), también reporto *Diplodia sp*, en plantas de vivero pertenecientes a pino en Cuba. En la pimienta se observó *Diplodia* de hojas con manchas marrones oscuras que se pueden confundir con *Colletotrichum*.

Tabla 2.- Géneros de hongos observados tomados de improntas por método de cámara húmeda en órganos de varias plantas.

Órganos	Hongo	Fuentes
tallos	<i>Fusarium sp</i>	(Hanlin, 1990)
ramas	<i>Fusarium sp</i>	(Barnett y Hunter, 1998)
hojas	<i>Cylindrocladium sp</i> , <i>Capnodium sp</i> , <i>Diplodia sp</i>	(Leslie y Sumerelle, 2006)
frutos	<i>Fusarium sp</i> , <i>Colletotrichum sp</i>	(Crous, <i>et al.</i> 2009).

3.3 Características macroscópicas y microscópicas

Rhizoctonia

El concepto del género *Rhizoctonia* fue establecido por De Candolle (1815). Es un hongo que pertenece a la división Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Cantharellales, familia Ceratobasidiaceae, género *Rhizoctonia* según la International Mycological Association (IMA, 2017).

En el cultivo de *Rhizoctonia* se observó, micelio vegetativo de color marrón oscuro, formando ramificaciones constreñidas en dirección al crecimiento con poco micelio blanco en la superficie. En el reaislado se presenta micelio voluminoso aéreo algodonoso blanco, con distintas tonalidades de marrón, concordando con Barnett y Hunter (1998) y Parmeter (1970), quienes mencionan que en los aislados de *Rhizoctonia* y sus especies, las características macroscópicas son similares a las detalladas en el primer aislamiento y el reaislado. La variación de las características macroscópicas y microscópicas se debe al cambio de medio de cultivo. Ya que este determina la cantidad y calidad del aislado junto con otros factores (Dhingra y Sinclair, 2012)

Rhizoctonia, presenta redes hifales hialinas y marrones vacuolas, tabiques gruesos color marrón, ramificaciones en ángulo recto, hifas hialinas corredoras que empiezan a cortarse y dan lugar a células moniloides microscópicas. La formación de estas también empieza con una constricción en el septo entre las células moniloides observándose en forma de ramilletes de células cortas, anchas en forma oval, triangular dispersas y escasas. Además, presenta un septo complejo doliporo (Figura 1), características que coinciden con varios autores para la identificación de *Rhizoctonia* (Noval, Oria, Casadesus, y Gómez, 1999) (Mosquera, 2010) (Parmeter, 1970) (Álvarez y Vázquez, 2009) (Ohnkura, 2008) otras características como el diámetro de los septos es muy variable o poco confiable como afirman (Palo, 1926).

No se observó la formación de teleomorfos, pero si una posible anastomosis mas no su forma perfecta o (teleomorfos). Para Parmeter (1970), una mejor identificación requiere conocer su teleomorfo y a su vez un conjunto de complemento como pruebas de anastomosis, pruebas serológicas, análisis de ácidos grasos, electroforesis de proteínas y pruebas morfológicas. Las mismos que recomiendan (Alexopoulos, 1996) (Carling, Baird, Gitaitis, Brainard y Kuninaga, 2002) (Matsumoto y Hirane, 1932) para la identificación a nivel de especie y como un complemento adicional para definir los grupos intraespecíficos. Aunque la identificación a nivel de especie se facilita con pruebas moleculares (Sharon, Kuninaga, Hyakumachi, Naito, y Sneh, 2006) (Gonzales, 2008), estas aún no se realizan en el país, por lo que basado en las características macroscópicas y microscópicas descritas anteriormente se puede

determinar que el fitopatógeno aislado contiene grandes similitudes correspondientes para determinar el aislado como *Rhizoctonia sp.*

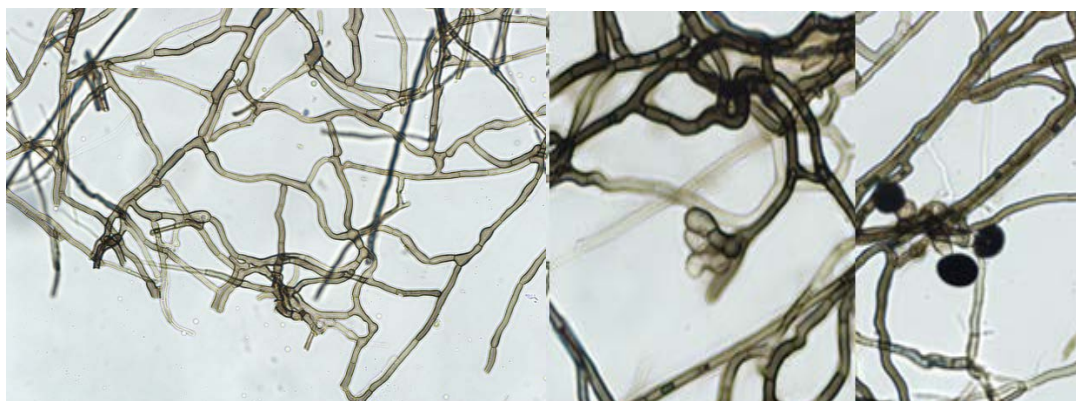


Figura 1. Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de *Rhizoctonia sp.*, Pereira, 2018

Sclerotinia sp.

Esclerotinia es un hongo que pertenece a la división Ascomycota, sub división Pezizomycotina, subclase Leotiomycetidae, orden Helotiales, familia Sclerotiniaceae, genero *Sclerotinia* (IMA, 2017).

El aislado de *Sclerotinia* desarrollo únicamente micelio blanco esponjoso sobre el medio de cultivo formando una capa de micelio blanco espeso, sobre el micelio la formación de gotas (exudado liquido) característica que coincide con (Tourneau, 1979) y que indica que el exudado se forma sobre montículos de micelio, mientras el exudado se oscurece y aumenta para luego desaparecer quedando así el esclerocio. La germinación de los esclerocios a partir del micelio concuerda con Pérez, Gavassoni, Bacchi, y Rodrigues (2011), que esta ocurre cuando los esclerocios germinan micelio-genéticamente, los cuales se presentan en gran número en el reaislado. No se observó la formación de apotecio o germinación carpogénica ya que esta necesita de otras condiciones y mayor tiempo (Tu, 1989) (Sun y Yang, 2000).

En el reaislado se observó la formación de esclerocio de color negro e irregulares, con una capa mucosa de ornamentación rugosa característica que se deben tomar en cuenta según (Stchingel, 2008), la producción de esclerocios solo en el reaislamiento posiblemente se deba algún patrón endógeno que ocurren en algunos asilados según

(Tourneau, 1979) o al tiempo (Tu, 1989). Según Willetts y Wong, (1980) el tamaño de los esclerocios va a depender del tipo de anfitrión. La generación de apotecio y esclerocios es posible que se encuentre en el campo ya que las condiciones adecuadas para su desarrollo concuerdan con las establecidas por Sun y Yang, (2000) para su formación. El desarrollo de los mismos es importante debido a que los apotecios son los responsables de diseminar *Sclerotinia sclerotium* por medio de eyección de ascosporas (Ben-Yephet y Bitton, 1985) que son la fuente primaria de infección (Pérez, 2011).

Las hifas se ven hialinas, septadas y ramificadas sus colores cambiaron de blanco a oscuro (Figura 2), debido a la acumulación de melaninas que se ubican en la corteza periférica (Wang, *et al.* 2000).



Figura 2. Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de *Sclerotinia sp.*, Pereira, 2018

Nectria sp.

Nectria es un hongo que pertenece a la división Ascomycota, sub división Pezizomycotina, orden Hypocreales familia Nectriaceae, genero *Nectria* (UniProt, sf).

El aislado de *Nectria sp* presento únicamente micelio algodonoso blanco-rojizo con exudado color rojo, en forma radial concéntrico, se observa el crecimiento de *Nectria* inclusive entre el medio de cultivo.

Ascosporas bicelulares hialinas ovoides o elipsoides que luego se tornan color marrón rojizo claro, ligeramente constreñidas en la parte central, presencia de ascas

inoperculadas hialinas que contienen ascosporas. Además, la presencia de fialides hialinas con conidióforos y macroconidias con estructura fusiforme con 5 a 7 septos, lo que indica que posiblemente se encuentre la presencia de su teleomorfo (Figura 3).

Las características encontradas en el aislado de *Nectria* coinciden con: (Hirooka, Rossman, Samuels, Lechat, y Chaverri, 2012) (Samuels, 2012), (Melgarejo, et al, 2010). (Guu, Ju y Hsieh, 2006) (Jaklitsch Y Voglmayr, 2011) que morfológicamente describen varias especies de *Nectria*.

Las plantas en las cuales se inoculó *Nectria*, al reaislamiento para su confirmación se identificó *Fusarium* más no el mismo hongo inoculado, sin embargo al tratarse su forma asexual, el aislado obtenido de *Fusarium* se envió para descartar *Fusarium solani* o *Fusarium Oxisporum*, dando negativo para las dos especies. Y ya que en algunos aislados de *Nectria sp* se siguen observando características microscópicas de *Fusarium*, tanto en este estudio como los antes mencionados.

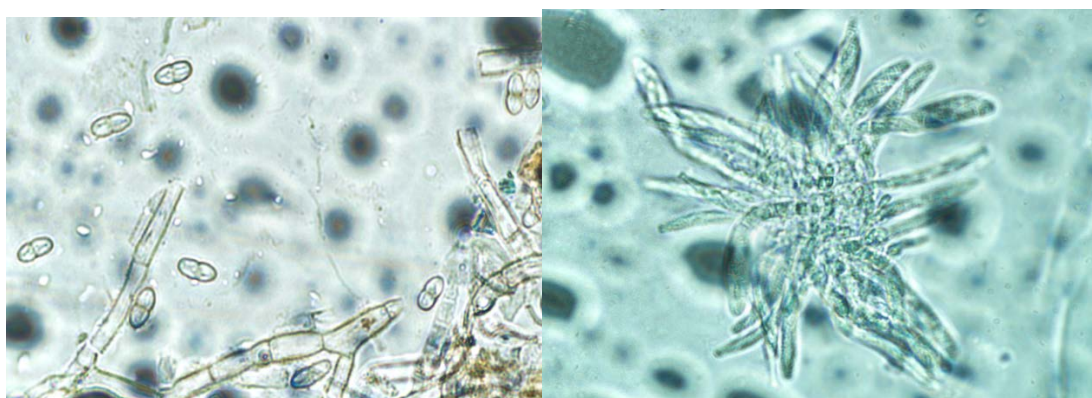


Figura 3. Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de *Nectria sp.*, Pereira, 2018

Fusarium sp.

Es un hongo que pertenece a la división Ascomycota, sub división Pezizomycotina, orden Hypocreales familia Nectriaceae, género *Fusarium* (IMA, 2017).

El aislamiento presentó micelio blanco algodonoso aéreo, sin exudado radial concéntrico, presenta una coloración marrón al octavo día bajo la capa de micelio algodonoso en el centro del aislado

Microconidias; elipsoidales, ovals, subesféricas, se observa una producción basipétala en mono o polifialides, también se observan microconidias agrupadas formando falsas cabezas

Macroconidias; presentan estructura característica fusiforme, semi-curveos con septos transversales, producidas por sucesión basipétala en monofialides y de la misma manera acumuladas en pequeñas masas en la punta de las fialides, Hifas septadas hialinas al igual, esporodoquios ausentes (Figura 4).

Lezcano (2012), también encontró características microscópicas similares en la Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas. La mayoría de las características coinciden con (Tangarife, 2016) en su descripción de *Fusarium sp.*

Para descartar si la especie de *Fusarium sp* descrito pertenece a *Fusarium oxisporum* o *Fusarium solani* se envió al análisis molecular tanto el aislado como el reaislado, en el que se descartó ser positivo a una de las dos especies, por lo tanto se consideró solo como *Fusarium sp.*

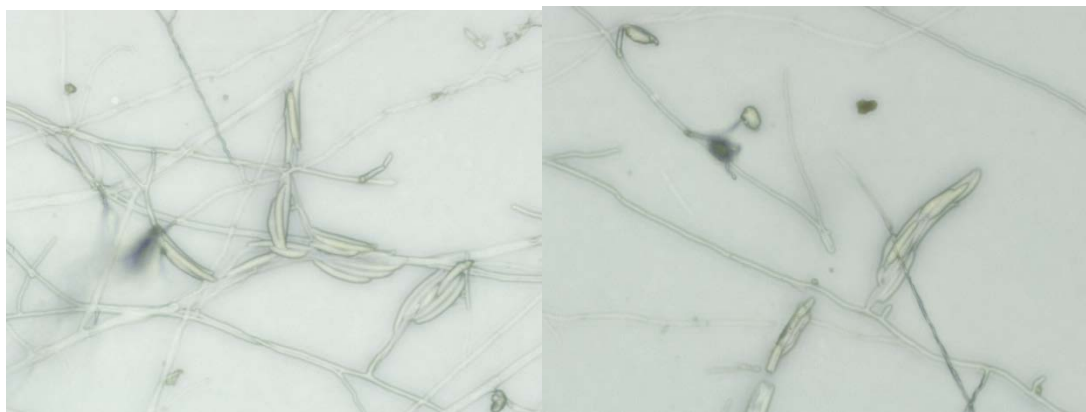


Figura 4. Micrografía obtenida sobre las características microscópicas de la estructura de *Fusarium sp.*, Pereira, 2018

Fusarium oxisporum.

El aislamiento de *Fusarium oxisporum* mostro micelio blanco-rosa, radial concéntrico aéreo. En el reaislamiento poco micelio blanco algodonoso, forma colonial plana húmeda de color amarillo. Según Leslie y Summerell (2006), estas

características son comunes para *Fusarium oxisporum* en PDA debido a que muta fácilmente de la forma micelial a la pionnotal.

Microconidias; elipsoidales, ovaladas, en forma de riñón, algunas septadas, sumergidas y en la superficie de las hifas, dispersas y agrupadas, se evidencia la germinación de microconidias en monofialides escasas y dispersas, similares a las reportadas por Steinkellner, Mammerler y Vierheilig (2010), que analizaron la germinación de microconidias de *Fusarium oxisporum* en exudados de la raíz de tomate.

Macroconidias; largas y cortas ligeramente curvadas, morfología de la célula basal en forma de pie o punta no hay presencia de esporodocios, número de septos variables de tres a siete septos (Figura 5).

Hifas hialinas septadas, no se evidencia la formación de clamidosporas. Las características microscópicas son similares a las descritas por Leslie y Summerell (2006).



Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas obtenidas del reislamiento de *Fusarium oxisporum*., Pereira, 2018

Colletotrichum gloeosporioides

Colletotrichum es un hongo que pertenece a la división Ascomycota, sub división Pezizomycotina, orden Incertae sedis familia Glomerellaceae, genero *Colletotrichum* Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (UnitPro, 2017).

El aislado de *Colletotrichum* presento micelio blanco grisáceo afelpado, concéntrica al centro de la colonia, además masas color naranja tenue (estromas) dispersos, poco frecuentes distribuidos por toda la colonia. Baquero (2013), encontró características similares en color y forma de varios aislados de *Colletotrichum gloesporioides* y *Colletotrichum acutatum* obtenidos a partir de cultivos de Helecho Hoja de Cuero, Limón Criollo, Papaya, Carambola y Mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos).

Presentaron conidios regulares en tamaño y forma con extremo redondeado hialino, se presentó peritecio. Se tomó el promedio de las medidas de largo y ancho de veinte conidias y se sacó el promedio tanto del máximo como del mínimo que fue 14,68 - 10,99 x 5,76 – 4,72 μm (Tabla 4) (Figura 6). Las medidas que se encuentran en el promedio para la determinación de *Colletotrichum gloesporioides* coinciden con las establecidas por Dickman (1993), Buddie y Bridge (2008).



Figura 6. Micrografía obtenida de conidias de *Colletotrichum gloesporioides*., Pereira, 2018

Tabla 3. Promedio obtenido por la medición de 20 conidias de *Colletotrichum gloesporioides*

Unidades de Medición	Largo (μm)	Ancho (μm)
Promedio	12,63	4,96
Máximo	14,68	5,76
Mínimo	10,99	4,52
Promedio (Max; Min)	12,84	5,14

Fusarium solani

Se observa *F. solani* micelio blanco, con un tono crema, aéreo y disperso, en el reislamiento se presenta un tono crema mucho más intenso, micelio aéreo algodonoso abundante, radial concéntrico (Figura 7).

Los macroconidias que se observan son relativamente un poco más anchos, de forma recta a ligeramente curvada, de 3 a 7 septos con extremos redondeados y abundantes de color crema, algunos pueden tener forma de pie o poco desarrollado.

Microconidios ovalados, elipsoidales, reniformes o fusiformes, algunos con 1 septo, se forman en cabezas falsas redondas en monofialidos relativamente largos. Las clamidosporas pocas y agrupadas posiblemente se encuentran en formación de forma globosa y ovalada. Se observa la presencia de abundantes células conidiógenas

Leslie y Sumerrelle (2006), reportaron características similares como, número de septos, forma, color, microconidias y macroconidias en aislados *Fusarium solani*.

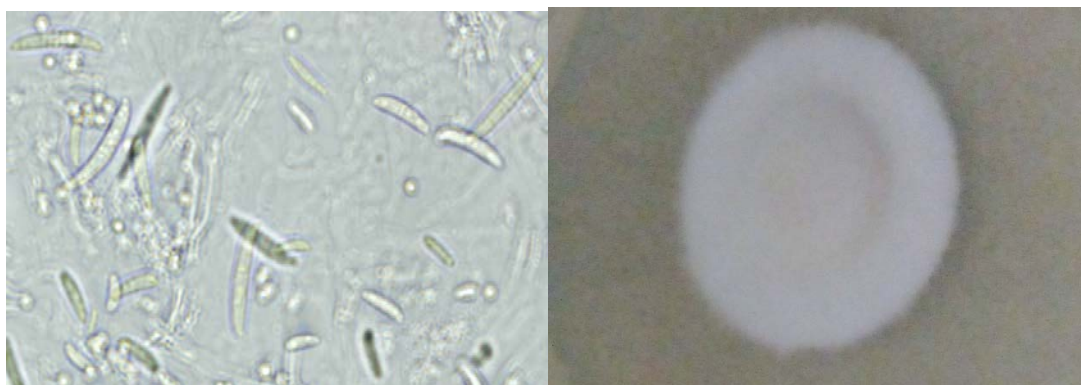


Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas obtenidas del reislamiento de *Fusarium solani*., Pereira, 2018

3.4 Sintomatología

Rhizoctonia sp.

La sintomatología de las plantas donde se obtuvo aislados se presentaban los siguientes síntomas: las plantas se tornan flácidas con un marchitamiento lento acompañado de un pardeamiento total de la planta, al mover las plantas desde su tallo

esta se separa fácilmente de la raíz donde se observa una pudrición a nivel del cuello o cáncer en el tallo. Según Parmeter (1970), Anderson (1982), Sneh *et al* (1991) a *Rhizoctonia sp* se le atribuye enfermedades de la raíz en el cuello, como canchros y pudriciones, también ataca partes aéreas en condiciones de humedad relativa elevada, lo que explica los aislados de *Rhizoctonia* en partes aéreas que mostraron anublos, también encontrados por Ohkura (2008), en plantas de frejol inoculadas con *Rhizoctonia sp.*, sin embargo según Kucharek (2000), esta infección se atribuye normalmente a su estado teleomorfo, el cual no se presentó en ningún aislado de las hojas.

Se observó un ligero amarillamiento en la planta, en cortes verticales y horizontales se determinó el avance de la enfermedad dentro de los canales vasculares con un ligero pardeamiento de los mismos y alejado del punto de inóculo, además del marchitamiento lento y aspecto de flacidez en la planta fueron visibles, algunas plantas presentaron defoliación, acompañado de limitado crecimiento radicular, pudrición a nivel de cuello con canchros en raíz y tallo (Figura 8), reportados también por (Yang y Li, 2012) en cultivo de frejol y cáncer de algunas raíces siendo el cuello de la planta de donde se reaisló el fitopatógeno, no se presentó síntomas visibles en las hojas sino más bien una pérdida de turgencia. En las plantas inoculadas la sintomatología no fue tan notoria al exterior posiblemente a que la infección en la planta depende de varias condiciones hasta que está presente los síntomas (Agrios, 2005).



Figura 8. Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (*Piper nigrum*) ante el inóculo de *Rhizoctonia sp.*, Pereira, 2018

Sclerotinia sp.

En las plantas muestreadas se observó podredumbre radicular y basal del tallo rodeado con micelio blanco, amarillamiento lento de la planta y un limitado crecimiento radicular, además de hojas con manchas húmedas de las cuales también se aisló, los síntomas coinciden con El-Said (2012), de *Sclerotium rolfsii*, que invade la raíz y las semillas produciendo marchitez, amortiguamiento y pudrición blanca en la zona de transición y en las semillas.

Los síntomas observados en las plantas inoculadas fueron un decaimiento de la planta con una pérdida del diámetro basal, ligera pérdida del color en las hojas inferiores con tonalidad verde amarillento, desarrollo anormal de las raíces, acompañado de muerte radicular y pérdida del crecimiento, marchitamiento en la planta, ramas flácidas en la parte aérea, terminando con necrosis y crecimiento de micelio en la zona de transición (Figura 9). Los síntomas coinciden con Eslami *et al* (2015), de *Sclerotium rolfsii* inoculado en plántulas de (maní *Arachis hypogaea*). Reis y Nascimento (2011), comprobaron mediante los postulados de Koch que *Sclerotinia sclerotium* afecta también los cultivos de Zanahoria Peruana y Perejil. Aunque los síntomas generales son podredumbre blanda, marchitamiento estos son muy variables de acuerdo a su huésped (Boland & Hall, 1994). También se encontró *Sclerotinia* en cultivos como Berenjena, Col, Girasol, Lechuga y Tomate (Melgarejo *et al*, 2010) con la sintomatología general antes descrita. Aguaysol, *et al* (2014), reportaron *Sclerotinia sclerotium* en cultivo de chía (*Salvia hispánica*).



Figura 9. Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (*Piper nigrum*) ante el inóculo de *Sclerotinia* sp., Pereira, 2018

Colletotrichum gloeosporioides

Las hojas de las cuales se aisló *Colletotrichum gloeosporioides* presentaron manchas marrón regular desde el ápice que avanza hasta la base de la hoja, en la parte de la lesión más vieja presencia de acérvulos sub-epidermales. Baquero (2013), los síntomas de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* son los mismo incluso en hospederos diferentes. Contreras (2006), *Colletotrichum* se comporta de muchas maneras variando de saprofito a cepas parasíticas especializadas con un gran número de hospederos, pero sus síntomas son similares.

A pesar que la infección de *Colletotrichum* que se da lugar a través de una herida es muy frecuente que cause la muerte en toda la rama, en el inoculo solo se presentó la muerte descendente a nivel de la hoja terminando en la caída de las misma y la contaminación de las hojas a su alrededor, lo que puede indicar la capacidad infectiva de *Colletotrichum gloeosporioides* para una infección cruzada empezando con pequeñas manchas en forma de verruga que avanza con un comportamiento necrotrófico que corresponde a la antracnosis (Figura 10), síntoma que concuerda con estudios realizados por Mendgen y Hahn (2002).



Figura 10. Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (*Piper nigrum*) ante el inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*., Pereira, 2018

Nectria sp.

Se aisló *Nectria* de ramas con la mitad de su tejido seco con desquebrajaduras del cual se observó una pudrición del sistema vascular, incluso se encontró peritecios de color rojo intenso en el exterior de la corteza. Wang (2000), encontró *Nectria caricae* en tallos de Papaya muerta, mientras que Jia-Rong GUU *et al* (2006), encontró especímenes de *Nectria*, *Haematonectria*, *Neonectria*, *Albonectria* y varios

más que se recolectaron de árboles recién muertos. Luo y Zhuang (2010), encontró los apotecios de *Neonectria confusa* sobre sustrato natural.

Las plantas inoculadas mostraron síntomas tanto de muerte ascendente como descendente la misma que iniciaba con un ligero marchitamiento y aparición de canchales, posteriormente la necrosis acompañada de exudado color marrón tanto en ramas como en el cuello de la planta y la formación de micelio blanco en las partes afectadas (Figura 11). (Melgarejo *et al* (2010), reportan síntomas similares como canchales y exudados en ramas especialmente de especies forestales leñosas para varias especies de *Nectria*. Según Agrios (2008) las pérdidas que produce *Nectria* son mayores en árboles jóvenes. Lo que podría explicar el ataque al cultivo de pimienta negra, además de la inoculación efectiva con síntomas comprueba su especificidad al huésped.



Figura 11. Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (*Piper nigrum*) ante el inóculo de *Nectria sp.*, Pereira, 2018

Aunque el aislado final fue *Fusarium sp*, la sintomatología fue correspondiente a *Nectria sp*, por lo que se presume que las plantas de pimienta se encuentran atacadas por el holomorfo

Fusarium sp.

El aislamiento fue más frecuente en plantas con hojas que principalmente tenían marchitamiento con una leve clorosis en la nervadura para luego empezar la necrosis en las hojas y finalmente defoliación, en los tallos se presentaron marchitez y canchales. Ortiz (2012), describió la sintomatología de fusarium en el cultivo de gulupa

(*Passiflora edulis* Sims) en Colombia, los que coinciden con los antes descritos en cultivo de pimienta negra.

El inóculo *Fusarium sp*, en el cuello de la planta, presentó una leve pérdida de turgencia, acompañada de reducción del crecimiento, una marchitez leve, seguido una muerte descendente rápida, cuando la muerte descendente se hizo notoria se evidenció la necrosis ascendente con pudrición radicular, se observó un leve amarillamiento acompañado de una decoloración de los ases vasculares muy limitado, sin embargo la necrosis en hojas desde la nervaduras si fueron evidentes la poca presencia de síntomas se puede deber a que las plantas mueren antes de presentar la sintomatología (Figura 12). Agrios (2005), reporta que los frutos infectados por *Fusarium sp* se pudren y desprenden sin que aparezca ningún tipo de mancha o síntoma en ellos, frecuentemente lo síntomas de fusarium aparecen solo en un lado de la planta infectada y avanzan hasta la parte superior de la planta destruyendo primero el follaje y luego ocasionando la muerte del tallo.



Figura 12. Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (*Piper nigrum*) ante el inóculo de *Fusarium sp.*, Pereira, 2018

***Fusarium solani*.**

Las plantas enfermas de donde se aisló *Fusarium solani* presentaban una tristeza severa con pérdida de turgencia, y necrosis a nivel de tallo, la defoliación ocurría mucho antes de que las hojas tuvieran una necrosis o amarillamiento total es decir una defoliación prematura. Según Albuquerque, Duarte, Silvia y Pereira (1973), *Fusarium solani* produce una amortiguación total de las hojas, causando una muerte repentina, o a su vez las hojas se marchitan y se secan al poco tiempo, permaneciendo presas a las ramas por algunos días, además el ataque parcial en las

raíces, pero esta avanza hasta la base del tallo elevándose hasta los 20 cm del nivel del suelo produciendo la caída prematura de las hojas. En las plantas inoculadas la sintomatología empezó con marchitamiento en las hojas, aparecimiento de canchales a nivel de todo el tallo, oscurecimiento del follaje y la necrosis tanto ascendente como descendente, además la formación de micelio blanco en el cuello de la planta también se evidenció la presencia de pudrición radicular temprana y otras una vez que la planta moría por completo, también se observó la necrosis a nivel foliar para hojas jóvenes y brotes tiernos.

La sintomatología se presentó con una decoloración parduzca en el xilema y necrosis en el floema, terminando con una necrosis total (Figura 13), los mismos síntomas fueron reportados en inoculaciones realizadas a plántulas sanas por Kuroda, Chuma, Kihara y Murakami (2017), en el que la muerte total de la planta se dio después de varios días, superiores a los veintiún días. Resultó ser una de las especies con mayor dominio en Malasia reportado por Chehri, Salleh y Zakaria (2014), donde se encontró en casi todos los sustratos muestreados en melón, calabaza, tabaco, sorgo, césped, pimienta, ají y maíz, produciendo lesiones a nivel de tallo y pudrición radicular, siendo el tallo de donde más presento síntomas en pimienta.



Figura 13. Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (*Piper nigrum*) ante el inóculo de *Fusarium solani*., Pereira, 2018

Fusarium Oxisporum

Los aislamientos tomados de plantas con marchites, ligero amarillamiento pérdida de turgencia en ramas y necrosis en las hojas, al realizar cortes verticales y transversales del tallo se evidencio oscurecimiento del tejido vascular, las raíces no muestran podredumbre sino hasta que la planta muere por completo. Síntomas similares son

reportados por (Melgarejo, *et al.* 2010) en España para cultivos como berenjena, pepino, tomate, guisante, sandía, melón, clavel, albahaca con *Fusarium oxisporum* f. sp. Para cada cultivo.

En las plantas inoculadas con el patógeno la sintomatología fue similar a la establecida para *F. solani* con la diferencia en la cantidad de tejido necrosado que fue menor para *F. oxisporum* (Figura 14). La muerte de las plantas se presentó mucho más rápido en comparación a las otras especies y a las reportadas por otros autores, posiblemente se deba a que al estar sumergidas en una suspensión con microconidios, y las condiciones ambientales favorecen la infección de patógenos mas no permiten el desarrollo normal de la sintomatología que se presenta en campo sino más bien se acelera. La aceleración de los síntomas puede deberse a la translocación de cuerpos fructíferos que se da luego de las veinticuatro horas de sumergir plantas en una solución con el patógeno como reporta Baayen y De Maat (1987), en plántulas de clavel y que puede producir síntomas atípicos.



Figura 14. Sintomatología presentada en plántulas de pimienta (*Piper nigrum*) ante el inóculo de *Fusarium oxisporum*., Pereira, 2018

3.5 Evaluación de los Postulados de Koch

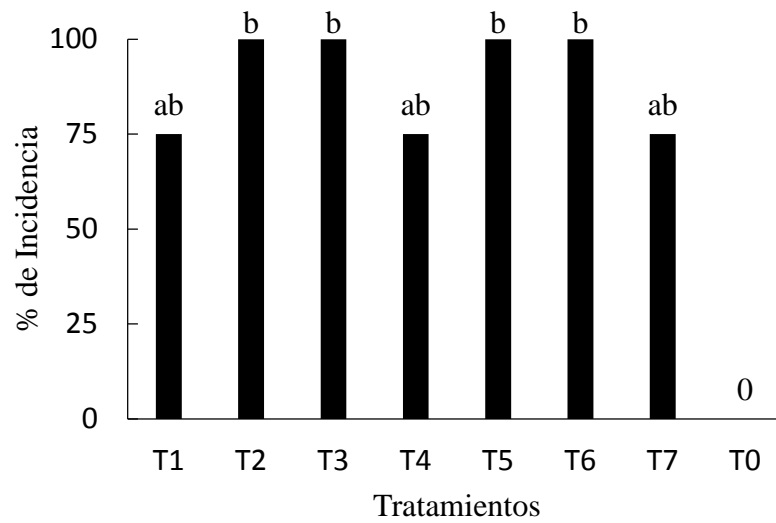
De acuerdo a la metodología antes expuesta para el cálculo de incidencia de patógenos en esta investigación se confirma el conteo de plantas de Pimienta negra (*Pipper nigrum*) sanas y enfermas, se tomó los datos generales a los catorce días después de la inoculación, dando así los resultados que se muestran en la Tabla 4, sin embargo algunos agentes fúngicos se evidencio la aceleración de su proceso infeccioso, tal es el caso de *Colletotrichum gloesporioides* que presentó sintomatología al tercer día del inóculo independientemente de complejidad que lleva

una infección, según Agrios (2008), las conidias de *Colletotrichum* necesitan de doce a veinticuatro horas para germinar y provocar una infección, sin embargo no se tomaron datos sino hasta el día catorce. Para *Fusarium oxisporum* y *Fusarium solani* que presentaron necrosis a los cuatro días del inóculo de los que se tuvo que acelerar la toma de datos y en otros se retrasó como *Rhizoctonia sp* y *Sclerotinia sp*, hasta los veintiún días

Tabla 4. Conteo de plantas sanas y enfermas inoculadas con los diferentes patógenos.

Tratamiento	Hongo	Sanas	Enfermas
T1	<i>Fusarium sp.</i>	1	3
T2	<i>Fusarium solani.</i>	0	4
T3	<i>Fusarium oxisporum.</i>	0	4
T4	<i>Nectria sp.</i>	1	3
T5	<i>Sclerotinia sp.</i>	0	4
T6	<i>Rhizoctonia sp.</i>	0	4
T7	<i>Colletotrichum sp.</i>	1	3
T0	Control	4	0

Una vez realizado el conteo tanto de plantas sanas, como de enfermas de cada patógeno inoculado, podemos decir que existió significancia de cada género de fitopatógeno en cuanto a dichos porcentajes para cada tratamiento (P valor = 0,0035). Clasificándolos de una manera más directa se puede decir que los hongos con más incidencia al huésped fueron *Fusarium solani*, *Fusarium Oxisporum*, *Rhizoctonia sp*, *Sclerotinia sp*, todos estos con un valor del 100 % (Fig. 15), en el rango medio recaen los hongos *Nectria sp*, *Fusarium sp*, *Colletotrichu gloesporioides* con un valor del 75 %. A diferencia del resto de tratamientos, el control presentó la incidencia del 0 % ya que este no fue inoculado con ningún agente patógeno. Todos los tratamientos se regaron con agua destilada estéril y tratando de asegurar una mejor inocuidad para evitar contaminación cruzada.



*Letras iguales no tienen significancia.

*Letras diferentes existe diferencia significativa. (P valor = 0,0035).

Figura 15. Porcentaje de incidencia (n=4) de diversos hongos patógenos del cultivo de pimienta (*Pipper nigrum*), inoculados en plantas sanas para comprobar la manifestación de los postulados de Koch. Santo Domingo, Ecuador.

IV. CONCLUSIONES

Los Fitopatógenos: *Fusarium sp*, *Rhizoctonia sp*, *Sclerotinia sp*, *Nectria sp*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxisporum*, obtenidos mediante la técnica de aislamiento por tejido enfermo, se comprobaron mediante los postulados de Koch.

El órgano de donde se aislaron más patógenos fue las ramas del cual se obtuvieron: *Fusarium sp*, *Rhizoctonia sp*, *Sclerotinia sp*, *Nectria sp*.

El hongo *Colletotrichum gloesporioides* fue identificado mediante morfometría y *Fusarium solani* y *Fusarium oxisporum* mediante PCR convencional.

Fusarium solani y *Fusarium oxisporum*, fueron los hongos que presentaron el mayor porcentaje de incidencia, con el 100 % a los cuatro días de la inoculación.

V. REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005) PLANT PATHOLOGY 5th ed. California, USA. Elsevier Inc.
- AGROCALIDAD. (2016). Laboratorio de Fitopatología. Instructivo toma de muestras para el laboratorio de fitopatología. Recuperado de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/laboratorios/fitopatologia/instructivo-toma-de-muestra-fito-laboratorios-agrocalidad.pdf>
- Aguaysol, N. C., Terán, L. R., González, V., Zavalía, R. L., y Ploper, L. D. (2014). Detección de *Sclerotinia sclerotiorum* en cultivos de chíá (*Salvia hispanica*) en Tucumán durante la campaña 2014. *Avance Agroindustrial* 35(4). 20-24.
- Albuquerque, F. C., Duarte, M., Silvia, H. M. y Pereira., R. H., (1973). Pimenta do reino-Cultura. Brasil. Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte.
- Alexopoulos, C.J.; MIMS, C.W.; Blackwell, M. *Introductory mycology*. 4. ed. New York: J.Wiley, v.1, 1996.
- Almaraz, A., Alvarado, D., Leyva, G., Martínez, A. E., Aranda, S., y Hernández, J, (2016). Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. En *Pseudotsuga mensiezii*. *Fitopatología*, 34(2), 142-157. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1509-2
- Álvarez, B., y Vázquez, C, (2009). Técnicas básicas de Microbiología Observación de hongos filamentosos. *Reduca (Biología) Serie Microbiología*, 2(4). 1-15.
- Anderson, N. A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology* 20. 329-347.
- Andújar, F; Moya, J. 2009. La pimienta: su cultivo y perspectivas en la República Dominicana. Santo Domingo, Republicada Dominicana, DO, JICA.
- Astorga, K., Zúñiga, V., y Rivera, W. (2014). Aislamiento e identificación de patógenos de la estirpe silvestre del ajo (*Allium sativum* L.). *Tecnología en marcha*, 27(1), 77-88.
- Baayen, R. P. y De Maat, A. (1987) Passive transport of microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation after root inoculation. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 93(1). 3–13. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01998138>

- Baquero, M., Peres, N., y Alaus, L. (2013). Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en costa rica y florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense* 37(1), 23-38.
- Barnett, H. y Hunter, B 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition. APS Press, St. Minnesota, United Estates.
- Ben-Yephet, y Bitton, S. (1985) Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica*, 13(1). 33-40, Obtenido de: <[http:// link.springer.com/article/10.1007%2F02994435](http://link.springer.com/article/10.1007%2F02994435)>.
- Blanco, Yaisys; Leyva, Á. (2007). Las arvenses en el agroecosistema y sus beneficios agroecológicos como hospederas de enemigos naturales. *Cultivos Tropicales*, 28(2). 21-28.
- Boland, G. J., y Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16. 93-108. doi.org/10.1080/07060669409500766. Recuperado de: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060669409500766>
- Buddie, P., y Bridge, P. (2008). The typification of *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104: 189-204.
- Carling, D. E., Baird, R. E., Gitaitis, R. D., Brainard, K. A., y S. Kuninaga. (2002). Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92(8). 893-899.
- Chehri, K., Salleh, B. y Zakaria (2014). Morphological and Phylogenetic Analysis of *Fusarium solani* Species Complex in Malaysia. *Microb Ecol* 69. 457-471. DOI 10.1007/s00248-014-0494-2
- Contreras, C. A. (2006). Caracterización y pruebas de patogenicidad de cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* juss), mango (*Mangifera indica* l) y tallos de mora (*Rubus glaucus* benth) con síntomas de antracnosis. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Corrochano. (2013). Regulación por la luz del desarrollo de los hongos. *SEM@foro* (57). 35-36.

- Crous, P. W., Verkley, J. M., Groenewald, Z., y Samson, A. (Ed). (2010). Fungal Biodiversity. The Netherlands, Países bajos.
- Curvelo, L., Rojas, L. A., (2010). Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- De Candolle, A.P., (1815). Mémoire sur les rhizoctones, nouveau genre de champignons qui attaque les racine, des plantes et en particulier celle de la Luzerne cultivée. Mén. Mus. d'Hist. Nat.2. 209-216.
- Dhingra. O. B., y Sinclair. J. B. (2012). 2 Ed. Basic Plant Pathology Methods. FRIST INDIAN REPRINT. EEUU Lewis Plublishers. Boca Ratononk
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, Y. C. (2016). InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Consultado el 12 de enero de 2016, de <http://www.in-fostat.com.ar>.
- Dickman, M. (1993). Colletotrichum Gloesporioides. Departmet of plant pathology. University of Hawaii at hilo.
- Duarte, S. M., (2007). Pruebas de patogenicidad in vitro con microorganismo aislados de plantas afectadas por marchitez letal. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Dugan, F.M. 2006. The identification of Fungi. An illustrated Introduction with Keys, Glossary, and Guide to Literature.
- El-Said, R. M., (2012) Control of root rot of chickpea caused by Sclerotium rolfsii by different agents and gamma radiation. (Tesis de Maestria). Tanta-Egypt. Al-Azhar University
- Eslami, A. A., Khodaparast, S. A., Mousanejad, S., y Padasht, F. (2015). Evaluation of the virulence of Sclerotium rolfsii isolates on Arachis hypogaea and screening for resistant genotypes in greenhouse conditions. Hellenic Plant Protection Journal 8. 1-11.DOI 10.1515/hppj-2015-0001
- Folgueras, M., Herrera, L., y Morales, L. (2016). Microorganismos fitopatógenos y asociados a tubérculos de cultivares de ñame (Dioscorea spp). Agricultura Tropical 2(1), 61-68

- Freddy, L., (1999). Impactos actuales y potenciales de las enfermedades de los cultivos perennes de la amazonia y posibilidades de control para el desarrollo sostenible de la región. Caracas, Venezuela
- García, I. S., (2011). *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx y *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, principales hongos de chancro de las masas forestales de *Pinus radiata* D. Don del País Vasco. (Tesis Doctoral). Universidad de País Vasco. País Vasco
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M., Romero, G., Silvera E, González, P.,... Bentancur, O, (2011), Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 16(1), 97-107.
- Giménez, V. (1980). Enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que constituyen formas imperfectas (Deuteromicetos) de Ascomicetos. *Bol. San. Veg Plagas*, 12. 237-272. Recuperado de: 1986www.mapama.gob.es/ministerio/pags/.../pdf_plagas%2FBSVP-12-02-237-272.pdf
- González, G. M. (2008). Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Fitosanidad*, 12(3). 147-159. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209115572003.pdf>
- Guerra, C., Cruz, H., Vila, I., Duarte, A. y López, M., (2004). Principales hongos que afectan a *Pinus tropicalis* morelet en Cuba. *Fitosanidad*. 8. 2.
- Guu, J. R., Ju, Y. M., y Hsieh, H. J. (2006). Nectriaceous fungi collected from forests in Taiwan. *Botanical Studies* 48, 187-203.
- Hirooka, Y., Rossman A. Y., Samuels G.J., Lechat C., y Chaverri, P. Amonograph of *Allantonectria*, *Nectria*, and *Pleonectria* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and their pycnidial, sporodochial, and synnematosous anamorphs. *Studios in Mycology* 71. 1–210. doi:10.3114/sim0001.
- Hirooka., Lechat., Rossman., y Chaverri, P. (2012). *Nectria berberidicola*. *Stud. Mycol.* 71(48), 1-4
- ICAR. (2015). Black Pepper. Recuperado de: <http://spices.res.in/pdf/package/pepper.pdf>
- IMA. (2017). MYCOBANK Database Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. Obtenido de: <http://www.mycobank.org/>

- Infante D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Veg*, 24(1), 14-21.
- Jaklitsch, W. M., y Voglmayr, H. (2011). *Nectria eustromatica* sp. nov., an exceptional species with a hypocreaceous stroma. *Mycologia*, 103(1), 209–218. DOI: 10.3852/10-178
- Kimati, L., Amorim, A., Bergamin Filho, A., Camargo, L., y Rezende, J. (Ed.). (1997) *Manual de Fitopatología*. São Paulo, Brasil. CERES Ltda.
- Kucharek, T (2000). *Rhizoctonia Diseases in Aboveground Plant Parts of Agronomic and Vegetable Crops*. Plant Pathology Fact Sheet. University of Florida, Gainesville
- Kuroda, K., Chuma, I., Kihara, T., Murakami, T., Takashina, K., Hiraoka, D. y Kameyama, N., (2017). First report of *Fusarium solani* species complex as a causal agent of *Erythrina variegata* decline and death after gall formation by *Quadrastichus erythrinae* on Okinawa Island, Japan. *J Gen Plant Pathol*. 83. 344–357
- Lastres, L. y Soza, Y. (2009) *Manual de Sanidad Vegetal*. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. Recuperado de: https://www.se.gob.hn/media/files/media/Modulo_7_Manual_Sanidad_Vegetal..pdf
- Leslie, J. F., y Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Professional
- Lezcano, J. C., Martínez, B. y Alonso, O. (2012). Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas. *Pastos y Forrajes*, 35(2). 187-196
- Luo, J y Zhuang, W. Y. (2010). Three new species of *Neonectria* (Nectriaceae, Hypocreales) with notes on their phylogenetic positions. *Mycologia*, 102(1), 142–152. DOI: 10.3852/08-224
- Maistre, J. 1969. *Las plantas de especias*. Agricultura Tropical. Ed. Blume, Barcelona. ES. 123-200
- Martín, J.A. y Gonzáles, J. A. (2014) *Fitopatología*. Madrid, España. FORESTA & SECURITY SL

- Matsumoto, T. y Hirane, H. (1932). Physiology and parasitism of the fungi generally referred to as *hypochytrium sasakii* Shirai. Differentiation of strains by means of hyphal fusion and culture in differential media. *Journal Soc, Trop. Agri.* 4. 370-388
- Melgarejo, A. N., García, J., Gutiérrez, J., López, M. M., Yebes, M., y Durá, N. (2010). *Patógenos de plantas descritos en España 2ª edición*. España
- Mena. (2014). *El Cultivo de la Pimienta y el Clima en el Ecuador*
- Mendgen, K., y Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 7. 352–356.
- Mosquera, A. T. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Rhizoctonia* de orquídeas sobre *Rhizoctonia solani* Kühn patógeno del suelo en arroz (*Oryza sativa* L.) (Tesis Doctoral). Colombia. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Noval, B. M., Oria, A., Casadesus, L., y Gómez, M. (1999). Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorrizas orquídeales en especies de orquídeas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5(2), 149-152.
- Onkura, M., (2008). Characterization of *rhizoctonia solani* and *rhizoctonia*-like Fungi infecting vegetables in New York and their Pathogenicity to corn. (Tesis de Maestría). New York-Estados Unidos, Cornell University
- Ortiz, E y Hoyos, L, (2012). Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista colombiana de ciencias hortícolas* 6(1). 110-116.
- Ortiz, M, Alatorre, R, y Valdivia, B. (2011). Efecto de la Temperatura y Humedad Relativa sobre el Desarrollo de los Hongos Entomopatógenos. *Revista Biociencias*, 1(2), 42-53.
- Ownley, B. H., y Trigiano, R. N. (Ed). (2016). *Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises*, Third Edition. Taylor & Francis group.
- Palacios, S. (2015). *Estadística experimental aplicada a ciencia e ingeniería*. Peru. CONCYTEC
- Palo, M. A. (1926). A study of the diseases and of the influence of certain conditions of upon the viability of the sclerotial bodies of the causal fungus. *Philippine Agr.* 15. 361-376

- Parmeter, J. R. Jr. (Ed), (1970) *Biology and Pathology of Rhizoctonia solani*. University of California Press, Berkeley. 255 pp. Recuperado de: <https://www.ucpress.edu/op.php?isbn=9780520014978>
- Pérez, F. M, Gavassoni, W. L, Bacchi, L. M., y Rodrigues, F. (2011). Germinação carpo-gênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. *Summa Phytopathol., Botucatu*, 37(3). 131-136.
- Poltronieri, M.C.; Poltronieri, L.S.; Albuquerque, F.C. (1992) Avaliação de resistência à Fusariose solani f. sp. piperis Alb. em plantas de pimenta-do-reino. *Fitopatologia Brasileira* 17. 170-201
- Quilambaqui J (2005). Aislamiento e Identificación de Especies de *Fusarium* spp Asociadas al Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Cinco Municipios de Guanajuato, México. *Revista Tecnológica ESPOL*. 18(1). 135-140
- Reis, A. y Nascimento, W., M., (2011). New apiaceous hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* in the Cerrado region of Brazil. *Horticultura Brasileira* 29. 122-124
- Richard T. Hanlin (1990). *Illustrated genera of ascomycetes; with drawings by Carol Gubbins Hahn*.
- Samuels, G. J. (2012). Perfect states of *Acremonium* the genera *Nectria*, *Actiniopsis*, *Ijuhya*, *Neohenningsia*, *Ophiodictyon*, and *Peristomialis*. *New Zealand Journal of Botany*, 14. 231-60. DOI: 10.1080/0028825X.1976.10428664.
- Scattolini, A., (2011). Hongos fitopatógenos I. Recuperado de: www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/...2011/Hongos%20I_2011.pdf
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Naito, S., & Sneh B. (2008) Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49, 93–114
- Sneh B., Jabaji S., Neate S., y Dijst, G. (1996). Non pathogenic isolates of *Rhizoctonia* (np-R) spp. and their role in biological control. In: *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 473-483.
- Steinkellner, S., Mammerler, R., y Vierheilig, H. (2010). Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root

- exudates. *Journal of Plant Interactions*, 1(1), 23-30. DOI: 10.1080/17429140500134334
- Sun, P., y Yang, X. B. (2000). Light, Temperature, and Moisture Effects on Apothecium Production of *Sclerotinia sclerotiorum*. Department of Plant Pathology. Iowa- United States.
- Tangarife, V. (2011). *Fusarium spp.* Aprende en línea. Recuperado de: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100813>
- Tourneau, D. L. (1979). Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *The America Phytopathological Society*, 69(8).
- Tremacoldi, C. R., (2010) Principais Doenças Fúngicas da Pimenteira-do-Reino no Estado do Pará e Recomendações de Controle. Embrapa. 367
- Tu, J. C. 1989. Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in navy bean. *Microbios* 57:85-91.
- UnitPro, (2017) Taxonomy *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose fungus) (*Glomerella cingulata*). Obtenido de: <http://www.uniprot.org/taxonomy/474922>
- UnitPro, (2017). Taxonomy *Nectria* sp. Obtenido de: <https://www.uniprot.org/taxonomy/478869>
- Wang, A., Lin, W., Chen, X., Lu, G., Zhou, J., y Wang, Z. (2000). Isolation and identification of *Sclerotinia* stem rot causal pathogen in *Arabidopsis thaliana*. *J Zhejiang Univ Sci B* 9(10). 818-822. doi:10.1631/jzus.B0860010
- Wang, C.L. (2000). New species and new records of ascomycetes in Taiwan. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing Univ. Master thesis. 37-40.
- Willetts, H.J., Wong, J.A.L., 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Bot. Rev.*, 46(2):101-165. [doi:10.1007/BF02860868]
- Wiley, J.M, Sherwood, L.M y Woolverton, C.J. (2009). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*, Séptima edición. Madrid, España. McGraw-Hill-Interamericana De España, S. A. U.
- Yang, G. y Li, C., (2012). General Description of *Rhizoctonia* Species Complex. Yunnan. China. INTECH