







# Inhibición del crecimiento micelial de extractos etanólicos de *Piper* L. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

Micellar growth inhibition by ethanolic extracts of *Piper* L. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

Andrés Del Moral-Hernández<sup>1</sup> , María del Socorro Fernández<sup>1</sup> ,  
Carolina Barrientos-Salcedo<sup>2</sup> , Oscar Carmona-Hernández<sup>1</sup> , Yadeneyro de la Cruz-Elizondo<sup>1</sup> ,  
Mauricio Luna Rodríguez<sup>3</sup> , José Armando Lozada-García<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad Veracruzana (UV), Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, 91097, Xalapa, Veracruz, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis Veracruz, UV, Iturbide s/n, Centro, 91700, Veracruz, Veracruz, México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos, Facultad de Ciencias Agrícolas, UV, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, 91097, Xalapa, Veracruz, México.

\*Autor de correspondencia: alozada@uv.mx

## RESUMEN

Las especies del género *Piper* son plantas con potencial biotecnológico, debido a que sintetizan cerca de 700 compuestos con actividad biológica. En este estudio se evaluó el efecto fungicida de extractos etanólicos obtenidos de seis especies de *Piper* procedentes del estado de Veracruz, México, sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Se estimó la Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>) y Concentración Mínima Fungicida (CMF), además de los perfiles fitoquímicos preliminares y el contenido total de fenoles, flavonoides y alcaloides. Los resultados mostraron que el extracto de *P. aduncum* tuvo el mayor potencial de inhibición con una CE<sub>50</sub> y CMF estimada en 0.64 y 0.4 mg/mL. El extracto de *P. umbellatum* tuvo la mayor concentración de alcaloides (29.51 µgEP/mg), mientras que *P. amalago*, de flavonoides y fenoles (12.82 µgEQ/mg y 8.53 µgEAT/mg). Los extractos de *Piper* tienen efecto fungicida contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, atribuible a metabolitos secundarios, lo cual los convierte en una alternativa en la búsqueda de bioplaguicidas.

## PALABRAS CLAVE

Actividad biológica, metabolitos secundarios, fungicida.

## ABSTRACT

*Piper* genus are plants with biotechnological potential because they synthesize about 700 compounds with biological activity. In this study, we tested the fungicidal effect of ethanolic extracts obtained from six *Piper* species from the state of Veracruz, Mexico, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. The Mean Effective Concentration (EC<sub>50</sub>) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) were estimated, as well as preliminary phytochemical profiles and the total content of phenols, flavonoids, and alkaloids. The results showed that the extract of *P. aduncum* had the major inhibition potential with an estimated EC<sub>50</sub> and CMF of 0.64 and 0.4 mg/mL. The extract of *P. umbellatum* had the highest concentration of alkaloids (29.51 µgEP / mg), while *P. amalago* had the highest concentration of flavonoids and phenols (12.82 µgEQ/mg and 8.53 µgEAT/mg). *Piper* extracts have a fungicidal effect against *F. oxysporum*, attributable to secondary metabolites, which turns them into an alternative in the search for biopesticides.

## KEYWORDS

Biological activity, secondary metabolites, fungicide.

### Fecha de recepción:

20 de junio de 2021

### Fecha de aceptación:

13 de junio de 2022

### Disponible en línea:

9 de octubre de 2023

Este es un artículo en acceso abierto que se distribuye de acuerdo a los términos de la licencia Creative Commons.



### Reconocimiento-

NoComercial-

CompartirIgual 4.0

Internacional

(CC BY-NC-SA 4.0)

## INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades vasculares en plantas, pre y postcosecha. Uno de los más comunes en las plantaciones agrícolas es el perteneciente al género *Fusarium*, responsable de causar la marchitez vascular y muerte regresiva en plantas de importancia económica (Gómez et al. 2011). *Fusarium oxysporum* y sus formas especiales se consideran una de las plagas de mayor distribución e importancia a nivel mundial, que afecta plantaciones de tomate (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), garbanzo (*F. oxysporum* f. sp. *ciceri*), plátano (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*), algodón (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), café (*F. oxysporum* f. sp. *coffae*) y vainilla (*F. oxysporum* f. sp. *vanillae*), entre otras 80 especies de plantas alrededor del mundo (Khan y Akram 2000; Starr 2007; Adame-García et al. 2015; Rocha et al. 2018; Zhu et al. 2020; López-Lima et al. 2020; Poveda 2021). Es responsable de causar entre 12 y 30 por ciento de pérdidas en cosechas, en el mejor escenario (Armstrong y Armstrong 1981; Bajpai et al. 2008).

Como alternativa para el control o erradicación de estos organismos, se ha implementado la aplicación de fungicidas químicos, pero su uso indiscriminado ha provocado la resistencia de estos patógenos (Hellin et al. 2018). La aplicación de dosis elevadas ha ocasionado daños medioambientales e, inclusive, a la salud humana (Nicolopoulou-Stamati et al. 2016; Hassaan y El Nemr 2020). Como alternativa, se ha empleado el control basado en el uso de principios activos de plantas u otros microorganismos (Ardila e Higuera 2005; Choudhury et al. 2018).

Entre las alternativas que se emplean se encuentra la aplicación de extractos naturales a partir de plantas del género *Piper* (Piperaceae), las cuales también han mostrado efectividad biológica contra insectos, nematodos, bacterias y hongos (Scott et al. 2008; Carmona-Hernández et al. 2016). Esta actividad se atribuye principalmente a la presencia de metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentran los terpenos, los alcaloides y los compuestos fenólicos (Parmar et al. 1997; Scott et al. 2008). En el caso específico de los fenoles, se atribuye efecto fungicida y bactericida a la irrupción de la membrana celular (Gamboa et al. 2018).

Es importante mencionar que las especies del género *Piper* pertenecientes al continente americano

han demostrado resistencia a especies de *Fusarium*, específicamente a *F. solani* f. sp. *piperis* (De Souza et al. 2011). Se ha corroborado que éstas tienen la capacidad de activar genes asociados a la síntesis de compuestos fenólicos, los cuales son responsables de la actividad fungicida mencionada (Nascimento et al. 2009; Da Luz et al. 2017). Con base en lo anterior, se planteó como objetivo evaluar el efecto fungicida de extractos etanólicos de especies del género *Piper*, nativas del estado de Veracruz, México, sobre el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de los extractos etanólicos

Se colectaron vástagos de *Piper auritum*, *P. aduncum*, *P. marginatum*, *P. nudum*, *P. umbellatum* y *P. amalago*, en los municipios de Coatepec, Filomeno Mata, Tlalnahuayocan y Xalapa, del estado de Veracruz, México, entre febrero y septiembre de 2018. Los especímenes fueron identificados por comparación en los herbarios XAL y XALU, con ayuda de expertos. Para la obtención de los extractos se colectaron aproximadamente cuatro kilogramos de material vegetal, el cual fue secado en estufa a 50 °C (Carmona-Hernández et al. 2014). Una vez seco, se procedió a triturarlo hasta obtener un polvo fino, el cual fue sometido a extracción continua en equipo soxhlet, con etanol en una proporción de 1:10. Posteriormente, fue concentrado a presión reducida en rotavapor hasta obtener una masa densa y se determinó el rendimiento bruto (Moreno et al. 2000; Soberón et al. 2006).

### Caracterización fitoquímica preliminar

La identificación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en las diferentes especies de *Piper* se realizó mediante pruebas fitoquímicas preliminares por triplicado; para identificar la presencia de alcaloides, se utilizaron las pruebas de Mayer, Dragendorff y Wagner; para flavonoides, las pruebas de Shinoda, cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); para saponinas, la prueba de espuma, y, finalmente, para triterpenos y/o esteroides, la prueba de Lieberman-Bouchard (Domínguez 1979; Carmona-Hernández et al. 2014).

## Cuantificación de alcaloides, fenoles y flavonoides

### Alcaloides totales

A partir de una solución de 1 mg en mL de extracto, se adicionó 1 mL de fosfato de sodio dibásico con pH 4.7 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 1 mL de buffer de verde de bromocresol, 3 ml de cloroformo y se mezcló durante tres minutos. La fase orgánica inferior se extrajo y se transfirió a un tubo nuevo; posteriormente, se leyó la absorbancia 544 nm. La curva estándar se preparó con piperina como estándar y los resultados se expresaron en microgramos de piperina por miligramos de extracto (Shamsa et al. 2008; Ajanal et al. 2012).

### Flavonoides totales

A una solución de 1 mg por mL fue añadido 1 mL de reactivo  $\text{AlCl}_3$  al 2 por ciento; se incubó una hora en oscuridad y 4° C. La absorbancia se leyó a 420 nm. La concentración fue calculada por medio de una curva estándar de quercetina y expresada en microgramos equivalentes de quercetina por 1 mg de extracto (Palomino et al. 2009; Moncada et al. 2012; Blainski et al. 2013).

### Fenoles totales

Se prepararon 10 mg de extracto etanólico en 200  $\mu\text{L}$  de etanol y se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de agua, 200  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu, y 50  $\mu\text{L}$  de cloruro de sodio a 20 por ciento. La reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad total. Después se leyó la absorbancia a 760 nm. La concentración fue calculada por medio de una curva estándar de ácido tánico; los fenoles totales se expresaron como microgramos equivalentes de ácido tánico por 10 mg de extracto (Palomino et al. 2009; Moncada et al. 2012; Blainski et al. 2013).

### Evaluación de la actividad fungicida

Se evaluó el efecto de los extractos sobre la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* H3 (JAGH3: KM005081), por el método de disolución en placa. Se colocó un disco de 5 milímetros del hongo en medio Papa Dextrosa Agar (PDA: 1000 mL de infusión de

papa, 20 gr de dextrosa y 18 gr de agar-agar), mezclado con concentraciones logarítmicas (0, 0001, 001, 0.01, 0.1 1.0, 10 y 100 mg/mL) de los extractos pertenecientes a cada especie. Con ello se determinaron los rangos de actividad inhibitoria; posteriormente, se realizaron los ensayos determinativos y las curvas de inhibición. Para ello se usaron cinco concentraciones y tres repeticiones. Se incubaron a 27 °C, durante 7 días o hasta que el testigo negativo (Etanol: ETOH) cubriera en su totalidad la caja Petri de 90 mm. El diseño utilizado fue completamente al azar (Fernández et al. 2021; Rongai et al. 2015).

El porcentaje de inhibición del micelio se estimó mediante la fórmula: Inhibición en porcentaje (%) =  $[(C-T) / C] \times 100$ , donde: C y T representan el diámetro (mm) de las colonias testigo tratadas, a las cuales se les determinó la Concentración Efectiva Media ( $CE_{50}$ ) y se estimó mediante el modelo de regresión lineal Probit, usando el *software* Biostat 5.5, con un nivel de significancia 0.95. Se estimaron diferencias significativas entre las concentraciones de un mismo extracto mediante la prueba de Kruskal Wallis y una post hoc Dunn Test en el *software* PAST 4.5 y graficadas en el *software* Statistica 10 (Amini y Sidovich 2010; Palchetti et al. 2018).

La Concentración Mínima Fungicida (CMF) se obtuvo a partir de las concentraciones evaluadas en las curvas de inhibición, y se tomó como concentración mínima donde existiera efecto en el crecimiento en relación con el incremento del control (Gakuubi et al. 2017).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las pruebas preliminares mostraron la presencia de alcaloides, flavonoides y terpenos en la mayoría de los extractos estudiados. *Piper auritum* y *P. aduncum* presentaron positividad en las tres pruebas para alcaloides. En el caso de los flavonoides y fenoles, se encontró que *P. auritum*, *P. marginatum* y *P. nudum* fueron positivas. Las saponinas estuvieron ausentes en *P. marginatum* y *P. nudum*. No se encontró presencia de terpenos en los extractos analizados de *P. auritum* y *P. aduncum* (Cuadro 1). Los resultados coinciden con lo ya reportado para *P. pesaresanum*, *P. aduncum*, *P. umbellatum*, *P. amalago*, *P. auritum*, *P. marginatum* y *P. nudum* sobre la presencia de estos

**Cuadro 1. Caracterización fitoquímica de los extractos etanólicos de seis especies de *Piper* colectadas en Veracruz, México, con potencial bioplaguicida.**

Especie	Alcaloides			Fenoles y flavonoides			Saponinas	Triterpenos y esteroides
	M	D	W	A	C	S	E	LB
<i>P. amalago</i>	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>P. auritum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. umbellatum</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>P. marginatum</i>	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. aduncum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. nudum</i>	-	+	-	+	+	+	-	+

M= Mayer, D = Dragendorff, W = Wagner, A = Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), C = Cloruro Férrico (FeCl<sub>3</sub>), S = Shinoda, E = Espuma y LB = Lieberman - Bouchard. Presencia: +, Ausencia: -.

tipos de metabolitos secundarios en los extractos alcohólicos (Carmona-Hernández et al. 2014; Nitola et al. 2016; Carmona-Hernández et al. 2021).

Respecto a los alcaloides totales en los seis extractos, se determinó que *P. umbellatum* tuvo el contenido superior a las demás especies, con 29.51 µg EP/mg, seguido del extracto de *P. nudum* con 22.11 µg EP/mg. La mayor concentración de flavonoides se determinó en *P. amalago* y *P. umbellatum*, con 12.82 y 11.44 µg EQ/mg, respectivamente, y *P. marginatum* fue el que tuvo la menor concentración, con 5.39 µg EQ/mg. *Piper umbellatum* y *P. amalago* tuvieron los extractos con mayor concentración de fenoles, en un rango similar a 8.5 µg EAT/mg; por el contrario, la especie que tuvo menor contenido fue *P. aduncum*, con 0.23 µg EAT/mg (Cuadro 2).

La actividad fungicida fue determinada para cada extracto de las seis especies; *Piper aduncum* fue el de mayor actividad, con 88.17 por ciento de inhibición, con una concentración de 2 mg/mL (Figura 1); le siguió el extracto de *P. amalago*, con 82.35 por ciento; el de menor actividad observada fue *P. umbellatum*, con

49.17 por ciento. Para el resto de las especies, el rango de inhibición osciló entre 59 y 80 por ciento (Figura 2).

La CE<sub>50</sub> se pudo estimar en cuatro de los seis extractos; *Piper aduncum* fue la de mayor actividad, con 0.64 mg/mL; le siguieron *P. marginatum*, con 3.67 mg/mL; 5.12 mg/mL, de *P. auritum*, y 9.89 mg/mL de *P. amalago*. Para *P. umbellatum* y *P. nudum* no fue posible calcular CE<sub>50</sub> mediante el modelo de regresión lineal. Se determinó que la CMF fue de 0.4 mg/mL para el extracto de *P. aduncum*; 1.4 mg/mL, para *P. marginatum*, 2 y 2.4 mg/mL, para *P. umbellatum* y *P. auritum*, respectivamente. La CMF más elevada fue observada en *P. amalago* (Cuadro 3).

La actividad contra este hongo por parte de extractos y aceites de diferentes especies de *Piper* ya se ha reportado anteriormente. Se tienen registros de que el aceite esencial de *P. auritum* es capaz de inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. solani*, mientras que los extractos y aceites de *P. hispidinervum*, *P. nigrum*, y *P. betle* inhiben a *F. oxysporum* (Suprapta y Ohsawa 2007; Zaccaroni et al. 2009; Singha et al. 2011; Duarte et al. 2013; Fernández et al. 2021).

**Cuadro 2. Cuantificación de compuestos secundarios totales de los extractos etanólicos de seis especies de *Piper* colectadas en Veracruz, México, con potencial bioplaguicida.**

	Alcaloides totales	Flavonoides totales	Fenoles totales
<i>P. amalago</i>	13.59 ± 1.38	12.82 ± 0.91	8.58 ± 0.54
<i>P. auritum</i>	10.16 ± 1.15	7.47 ± 0.18	3.68 ± 0.44
<i>P. umbellatum</i>	29.51 ± 2.20	11.44 ± 1.27	8.53 ± 0.67
<i>P. marginatum</i>	8.59 ± 1.30	5.39 ± 0.11	4.91 ± 0.73
<i>P. aduncum</i>	6.92 ± 0.52	7.68 ± 0.19	0.23 ± 0.03
<i>P. nudum</i>	22.11 ± 0.74	8.64 ± 0.09	6.01 ± 0.46

Alcaloides: µg EP/mg. Flavonoides: µg EQ/mg. Fenoles: µg EAT/mg.



Figura 1. Inhibición micelial del extracto de *P. aduncum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Izquierda: testigo, Derecha: tratado).

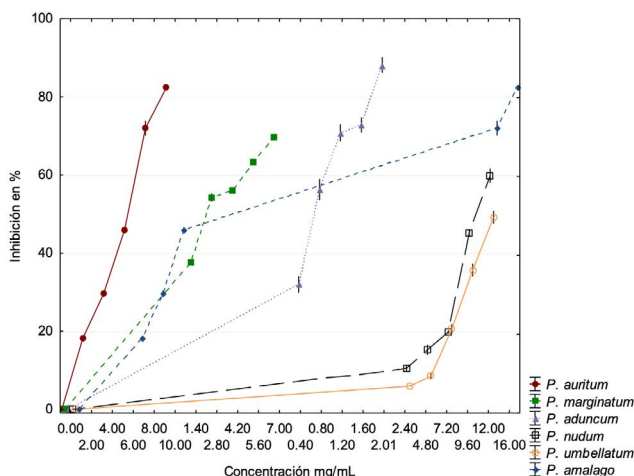


Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones de extractos de *Piper* sobre la inhibición micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 3. Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) de extractos de especies de *Piper* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*.**

	CE <sub>50</sub>	CMF
<i>P. amalago</i>	9.89	6.0
<i>P. auritum</i>	5.12	2.4
<i>P. umbellatum</i>	n/d	2.0
<i>P. marginatum</i>	3.67	1.4
<i>P. aduncum</i>	0.64	0.4
<i>P. nudum</i>	n/d	2.4

CE<sub>50</sub> y CMF expresadas en mg/mL. n/d: no determinadas por el modelo de regresión lineal.

En el caso de *P. nigrum* y *P. betle* (especies consideradas del viejo mundo), han mostrado susceptibilidad a *F. solani* f. sp. *piperis* (Salgado et al. 2016; Duarte y Archer 2003), contrario a las especies americanas, que han manifestado resistencia al mismo patógeno, probablemente debido a la expresión de genes y metabolitos secundarios ligados a la defensa observada. De manera contraria, *P. divaricatum* sobreexpresa fenilpropanoides, probablemente ligados a ciertos genes de resistencia, que también se han visto presentes en *P. tuberculatum* (Nascimento et al. 2009; Da Luz et al. 2017). Esto sugiere que las especies americanas pueden ser capaces de producir compuestos que podrían inhibir el crecimiento de *Fusarium* spp. en la mayoría de sus especies y formas especiales.

Sin embargo, el extracto de *P. umbellatum* presentó mayor contenido de alcaloides, flavonoides y fenoles, pero no actividad prometedora, debido a que su CMF fue de 2 mg/mL, lo que inhibió 5.95 por ciento del micelio de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Piper marginatum*, por su parte, mostró una CMF de 1.4 y una CE<sub>50</sub> de 3.67 mg/mL, e inhibió solamente 66 por ciento del crecimiento del hongo.

Para el caso del extracto de *P. aduncum*, se observó que la mayor actividad inhibió 88 por ciento del crecimiento micelial, lo que indica que es una planta con potencial biocida. Cabe mencionar que el extracto mostró elevada concentración de flavonoides totales,



lo cual sugiere que la presencia de estos compuestos podría ser la responsable de dicha actividad.

En los reportes de perfiles químicos para *P. aduncum*, se menciona al Dilapiol, que normalmente oscila entre 31 y 90 por ciento, como responsable de su actividad insecticida (De Almeida et al. 2009). Sin embargo, para el extracto evaluado no se encontró mayor proporción de fenoles totales. Esto reforzaría la propuesta de que la bioactividad estaría asociada a la presencia de flavonoides, como ha sido en el caso de *P. septuplinervium* (Ávila et al. 2011). Con los resultados obtenidos es posible sugerir que la especie *P. aduncum* presenta actividad fungicida contra *F. Oxysporum* f. sp. *vanillae*, y ésta se podría extrapolar para el combate contra otros hongos del mismo género y llegar a ser comparable con *P. capense*, que ha mostrado efecto sobre 16 especies de *Fusarium* (Matasyoh et al. 2011).

## CONCLUSIÓN

Alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, terpenos y esteroides estuvieron presentes en la mayoría de los extractos de las especies de *Piper* analizadas. La mayor concentración de alcaloides totales se determinó en *P. umbellatum*. *Piper amalago* tuvo concentraciones elevadas de fenoles y flavonoides, mientras que el extracto de *P. aduncum* presentó la menor concentración de fenoles, además de ser la especie con la mejor actividad, considerando las  $CE_{50}$  y CMF observadas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Finalmente, el extracto de *P. aduncum* presentó la mayor inhibición contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, atribuible a sus metabolitos secundarios, por lo que podría ser una alternativa en la búsqueda de nuevos bioplaguicidas.

## LITERATURA CITADA

- Adame-García J, Rodríguez-Guerra R, Iglesias-Andreu LG, Ramos-Prado JM, Luna-Rodríguez M. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93: 669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Ajanal M, Gundkalle MB, Nayak SU. 2012. Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. *Ancient Science of Life* 3: 198-201. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.107361>
- Amini J, Sidovich DF. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with Fusarium wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* 50: 172-178. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0029-x>
- Ardila H, Higuera B. 2005. Inducción diferencial de polifenoloxidasas y  $\beta$ -1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biológica Colombiana* 10: 61-74.
- Armstrong GM, Armstrong JK. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. En: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ, editores. *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. University Park, Pennsylvania State University Press. P. 391-399.
- Ávila MC, Patiño ÓJ, Prieto JA, Delgado WA, Cuca LE. 2011. Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Revista Colombiana de Química* 40: 25-33.
- Bajpai VK, Shukla S, Kan SC. 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology* 99: 8903-8908. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.060>
- Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Carmona-Hernández Ó, Fernández MS, Palmeros-Sánchez B, Lozada-García JA. 2014. Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30: 67-73.
- Carmona-Hernández O, Lozada-García JA, Martínez-Hernández MJ, Fernández MS, Torres-Pelayo VR. 2016. *Piper* L. genus potential as natural biocide. *Wulfenia Journal* 23: 65-95.
- Carmona-Hernández O, Martínez-Hernández MdeJ, Fernández MdelS, Molina-Torres J, Ramírez-Chávez E, Barrientos-Salcedo C, Lozada-García JA. 2021. Actividad nematocida de extractos foliares de cuatro especies de *Piper* contra *Caenorhabditis elegans*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8: e2943. <https://doi.org/10.19136/era.a8n3.2943>

- Choudhury D, Dobhal P, Srivastava S, Saha S, Kundu S. 2018. Role of botanical plant extracts to control plant pathogens-A review. *Indian Journal of Agricultural Research* 52: 341-346. <https://doi.org/10.18805/IJAR.A-5005>
- Da Luz SFM, Yamaguchi LF, Kato MJ, De Lemos OF, Xavier LP, Maia JGS, Ramos AR, Setzet WN, Da Silva JK. 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: 2434. <https://doi.org/10.3390/ijms18122434>
- De Almeida RRP, Souto RNP, Bastos CN, Da Silva MHL, Maia JGS. 2009. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chemistry & Biodiversity* 6: 1427-1434. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800212>
- De Souza CRB, Brígida ABS, Dos Santos RC, Costa CNM, Darnet SH, Harada ML. 2011. Identification of sequences expressed during compatible black pepper-*Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 2553-2560. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0788-7>
- Domínguez AX. 1979. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. Distrito Federal, México.
- Duarte MdeLR, Archer SA. 2003. *In vitro* toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *Fitopatologia Brasileira* 28: 229-235. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000300002>
- Duarte Y, Pino O, Infante D, Sánchez Y, Travieso MdelC, Martínez B. 2013. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Revista de Protección Vegetal* 28: 54-59.
- Fernández MS, Hernández-Ochoa F, Carmona-Hernández O, Luna-Rodríguez M, Barrientos-Salcedo C, Asselin H, Lozada-García JA. 2021. Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39: 198-206. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-6>
- Gakuubi MM, Maina AW, Wagacha JM. 2017. Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against selected *Fusarium* spp. *International Journal of Microbiology* 2017: 8761610. <https://doi.org/10.1155/2017/8761610>
- Gamboa F, Muñoz C-C, Numpaque G, Sequeda-Castañeda LG, Gutierrez SJ, Tellez N. 2018. Antimicrobial activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on microorganisms associated with periodontal disease. *International Journal of Microbiology* 2018: 4147383. <https://doi.org/10.1155/2018/4147383>
- Gómez JR, Hernández FLM, Cossio VLE, López AJG, Sánchez LR. 2011. Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Santiago Ixcuintla, México.
- Hassaan MA, El Nemr A. 2020. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 46: 207-220. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>
- Hellin P, King R, Urban M, Hammond-Kosack KE, Legrève A. 2018. The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (FcABC1). *Frontiers in Microbiology* 9: 1385. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01385>
- Khan MR, Akram M. 2000. Effects of certain antagonistic fungi and rhizobacteria on wilt disease complex of tomato caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Nematologia Mediterranea* 28: 139-144.
- López-Lima D, Carrión G, Sánchez-Nava P, Desgarenes D, Villain L. 2020. Fungal diversity and *Fusarium oxysporum* pathogenicity associated with coffee corky-root disease in Mexico. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 52: 276-292.
- Matasyoh JC, Wathuta EM, Kariuki ST, Chepkorir R. 2011. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14: 26-28. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.11.005>
- Moncada MV, Giraldo AM, Landazuri P. 2012. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de la cáscara y la semilla de *Annona muricata* y de las hojas *Brownea ariza*. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 24: 143-151.
- Moreno ME, González S, Acevedo L, Morales G, Betancur M, López JJ, Peláez CA. 2000. *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida (El Neem- *Azadirachta indica*- un caso particular). *Revista Colombiana de Entomología* 26: 51-55.

- <https://doi.org/10.25100/socolen.v26i1.9709>
- Nascimento SB, De Mattos CJC, De Menezes IC, Reis DMDL, Darnet S, Harada ML, De Souza CRB. 2009. Identifying sequences potentially related to resistance response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by suppression subtractive hybridization. *Protein and Peptide Letters* 16: 1429-1434. <https://doi.org/10.2174/092986609789839368>
- Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L. 2016. Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health* 4: 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Nitola L, Muñoz D, Patiño O, Prieto J. 2016. Caracterización fitoquímica y evaluación de actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa de hojas de *Piper pesaresanum* C. DC. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 21: 1-10.
- Palchetti E, Biricolti S, Gori M, Rota-Nodari G, Gandolfi N, Papini A. 2018. Two new Malagasy species of genus *Piper* L. (Piperaceae), *Piper malgassicum* and *Piper tsarasotrae*, and their phylogenetic position. *Turkish Journal Botany* 42: 1-13. <https://doi.org/10.3906/bot-1712-2>
- Palomino LR, García CM, Gil JH, Rojano BA, Durango DL. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae* 16: 388-395.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2)
- Poveda J. 2021. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Ascochyta rabiei* infecting protected geographical indication Fuentesauco-Chickpea by *Trichoderma* species. *European Journal of Plant Pathology* 160: 825-840. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02286-9>
- Rocha LS, De Santana RF, Soares ACF, Haddad F. 2018. Reaction of banana cultivars to the *Meloidogyne javanica* x *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* complex. *Revista Caatinga* 31: 572-583. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n305rc>
- Rongai D, Pulcini P, Pesce B, Milano F. 2015. Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Science* 10: 409-416. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0040>
- Salgado CGL, De Lemos OF, Tremacoldi CR, Moraes FKC, Dos Santos LRR, Pinheiro HA. 2016. Susceptibility of in vitro black pepper plant to the filtrate from a *Fusarium solani* f. sp. *piperis* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 127: 263-268. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1031-4>
- Scott IM, Jensen HR, Philogène BJR, Arnason JT. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65-75. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9058-5>
- Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 32: 17-20.
- Singha IM, Kakoty Y, Unni BG, Kalita MC, Das J, Naglot A, Wann SB, Singh L. 2011. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: A preliminary study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2583-2589. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0730-6>
- Soberón GV, Rojas C, Saavedra J, Kato MJ, Delgado GE. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *Revista Peruana de Biología* 13: 107-112.
- Starr JL. 2007. Effects of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* on plant mortality and yield of cotton. *Phytopathology* 79: 640. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-640>
- Suprapta DN, Ohsawa K. 2007. Fungicidal activity of *Piper betle* extract against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 13: 40-46.
- Zacaroni LM, Cardoso MG, Souza PE, Pimentel FA, Guimarães LGDL, Salgado APSP. 2009. Potencial fungitoxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Amazônica* 39: 193-197. <https://doi.org/10.1590/s0044-59672009000100020>
- Zhu Y, Lujan PA, Wedegaertner T, Nichols R, Abdelraheem A, Zhang J, Sanogo S. 2020. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 causing *Fusarium* wilt of cotton in New Mexico, U.S.A. *Plant Disease* 104: 588-588. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1170-PDN>