

IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium* EN GRANOS DE FRIJOL NEGRO (*Phaseolus vulgaris* L.) EN COSTA RICA*

Ana Zulay Guido-Mora¹, Mónica Blanco-Meneses²,
María del Milagro Granados-Montero³, María Viñas-Meneses^{4/**}

Palabras clave: Micotoxinas; frijol común; *Phaseolus vulgaris*; Costa Rica.

Keywords: Mycotoxins; common beans; *Phaseolus vulgaris*; Costa Rica.

Recibido: 29/09/2020

Aceptado: 16/12/2020

RESUMEN

Introducción. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa consumida ampliamente en países en vías de desarrollo. En Costa Rica su consumo es alto (10,54 kg.persona⁻¹.año⁻¹) y su producción se localiza principalmente en regiones al sur y al norte del país. Los granos de esta leguminosa podrían estar contaminados con *Fusarium*, un hongo micotoxigénico que coloniza diferentes cultivos. **Objetivo.** Identificar las especies de *Fusarium* que colonizan los granos de frijol negro en Costa Rica. **Materiales y métodos.** Se recolectaron 49 muestras de granos de frijol negro durante 2017, 2018 y 2019 en regiones donde se produce este grano en Costa Rica. Estas se utilizaron para aislar e identificar las especies de *Fusarium* basado en secuencias parciales de los genes *TEF-1a* (factor de elongación de la traducción 1-alfa) y *RPB2* (subunidad de la ARN polimerasa II). **Resultados.** Se obtuvieron 28 aislamientos de *Fusarium*, de los cuales 82% pertenecen al complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti*

ABSTRACT

Identification of *Fusarium* species in black bean grains (*Phaseolus vulgaris* L.) from Costa Rica. Introduction. The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume that is widely consumed in developing countries. In Costa Rica, its consumption is still high (10.54 kg.person⁻¹.year⁻¹), and its production is mainly located in the southern and the northern regions of the country. The grains of this legume could be contaminated with *Fusarium*, a mycotoxigenic fungus that colonizes different crops. **Objective.** Identify *Fusarium* species that colonize the grains of Costa Rican black beans. **Materials and methods.** Forty-nine samples of black bean grains were collected during 2017, 2018 and 2019 in different regions where this grain is produced in Costa Rica. Those were used to isolate and identify the *Fusarium* species based on the partial sequences of *TEF-1a* (translation elongation factor 1-alpha) and *RPB2* genes (RNA polymerase II subunit). **Results.** A total of 28 *Fusarium* isolates were obtained, of which 82% belong to the *Fusarium*

* Esta investigación formó parte de la tesis de licenciatura de la primera autora.

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

1 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica.  0000-0002-9810-9631.

2 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC), Costa Rica.

 0000-0003-2642-3899.

3 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC), Costa Rica.

 0000-0002-0321-7729.

4 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica.

 0000-0003-0644-0579.

(FIESC). La presencia de especies de *Fusarium* varió según el año de recolección; en el 2018 se encontró la menor prevalencia (43%) y el 2019 la mayor (76%). El 71% de las especies de *Fusarium* se aislaron de muestras recolectadas en la región sur del país. *F. equiseti* se aisló solo de una muestra procedente de la región Atlántica, mientras que *F. incarnatum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* se encontraron distribuidos en muestras colectadas en diferentes regiones del país. **Conclusión.** El presente estudio demostró la diversidad de especies de *Fusarium* que colonizan los granos de frijol negro en Costa Rica según la ubicación geográfica y el año de recolección de la muestra. La mayoría de las especies aisladas resultaron productoras de micotoxinas que causan efectos adversos en la salud humana.

incarnatum-equiseti species complex (FIESC). The presence of *Fusarium* species was high and varied according to the year of sample collection; thus 2018 was the year in which the lowest prevalence was found (43%) and 2019 the highest (76%). Seventy-one percent of the *Fusarium* species were isolated from samples collected in the Brunca region in southern Costa Rica. *F. equiseti* was isolated only from one sample obtained from the Huetar Atlántica region, while *F. incarnatum*, *F. oxysporum* and *F. verticillioides* were found distributed in samples collected in different regions of the country. **Conclusion.** The present study demonstrates the diversity of *Fusarium* species colonizing black bean grains in Costa Rica according to the geographical location and the year of collection of the samples. Most of the isolated species are well known producers of mycotoxins that cause adverse effects on human health.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa originaria de América; se extiende desde el norte de México, Centroamérica, hasta el noroeste de Argentina (Blair *et al.* 2010). Actualmente, esta leguminosa, junto con otras 5 especies domesticadas pertenecientes al género *Phaseolus*, son las más consumidas principalmente en África, Asia y América Latina (FAO 2019). El grano contribuye a la seguridad alimentaria en esas regiones, debido a su alto valor nutricional como fuente de proteínas, minerales, vitaminas y antioxidantes (Broughton *et al.* 2003, Oomah *et al.* 2005, Gepts *et al.* 2008, Blair *et al.* 2010, Mensack *et al.* 2010). En Costa Rica, es de alto consumo (10,54 kg.persona⁻¹.año⁻¹) (FAO 2018) y ocupa el segundo lugar en área cosechada y sembrada después del arroz (SEPSA 2018). La producción de frijol durante el período

2018/2019 fue de 9510 toneladas (SEPSA 2019). La mayor producción se obtiene de la Región Brunca (51%), seguido de la Región Huetar Norte (30%), mientras que el resto de la producción se localiza en la Región Chorotega (16%) y otras regiones del país que producen menos del 3% (SEPSA 2019).

Los hongos que colonizan los granos de frijol afectan su calidad e inocuidad, por lo tanto, su identificación reviste importancia. Algunos de estos hongos son micotoxigénicos, los cuales, bajo condiciones de temperatura y humedad óptimas, pueden producir metabolitos secundarios conocidos como micotoxinas que afectan la salud humana y animal (Perrone *et al.* 2020). La contaminación de granos y cereales por micotoxinas es de interés mundial, ya que se estima que el 25% de los productos agrícolas están contaminados con estas toxinas (Eskola *et al.* 2019) y su ingestión puede causar enfermedades en

humanos a mediano y largo plazo como cáncer o inmunodeficiencias (Omotayo *et al.* 2019). Se conocen más de 300 micotoxinas, entre ellas las aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, patulina, tricotecenos y zearalenona las de mayor relevancia pues afectan la seguridad alimentaria (Marín *et al.* 2013, Omotayo *et al.* 2019).

Fusarium Link es un género de hongos ampliamente distribuido y ha sido identificado como agente causal de enfermedades en diferentes cultivos, así como generador de numerosas micotoxinas (Summerell *et al.* 2010). Las principales toxinas producidas por *Fusarium* son fumonisinas, zearalenona y tricotecenos tipo A (HT-2 y toxina T-2) y tipo B (deoxinivalenol y nivalenol) (Munkvold 2017, Jiménez-García *et al.* 2018). Las especies pertenecientes a este género son saprófitas o patógenas (Singleton y Sainsbury 2006) y la mayoría de ellas producen micotoxinas, principalmente las siguientes: *F. acuminatum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. venenatum* (productoras de tricotecenos tipo A), *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. pseudograminearum*, *F. venenatum* (productoras de tricotecenos y zearalenona tipo A), *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (productoras de fumonisinas) (Munkvold 2017). A diferencia de otros hongos, que contaminan los granos durante el secado y almacenamiento, *Fusarium* puede colonizar y producir toxinas tanto en el campo, en la poscosecha como en el almacén (Antonissen *et al.* 2014).

La mayor parte de la investigación relacionada con *Fusarium* y la prevalencia de micotoxinas asociadas a este hongo, se centra en cultivos de alta demanda en todo el mundo, como los cereales (Cinar y Onbaşı 2019). En granos de frijol común, por el contrario, hay poca información. Existen solamente 4 estudios a nivel mundial que reportan la presencia de *Fusarium* en granos de frijol común (Hitokoto *et al.* 1981, Abdel-Hafez 1984, Tseng *et al.* 1995, Castillo *et al.* 2004); sin embargo, el reporte más reciente es del 2004 y otros estudios, no precisan el tipo de frijol analizado. Por un lado, Castillo *et al.*

(2004) reportaron resultados de frijol negro producido en Latinoamérica, mientras que en Canadá, Japón y Taiwán reportaron la presencia de diferentes especies de *Fusarium* en granos de frijol: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides* (Hitokoto *et al.* 1981, Tseng *et al.* 1995). Además, Abdel-Hafez (1984) reportó 3 especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*) en frijoles de Arabia Saudita; entretanto Castillo *et al.* (2004, 2002) reportaron varias especies de *Fusarium* y sus micotoxinas asociadas en granos de frijol negro argentino.

Debido a la necesidad de más información sobre las especies de *Fusarium* presentes en el frijol común cultivado en Latinoamérica, incluida Costa Rica, resulta necesario identificar las especies que colonizan este grano, aspecto que contribuiría a determinar el riesgo de contaminación por micotoxinas en frijol y buscar alternativas futuras para su manejo. El objetivo del presente estudio fue identificar las especies de *Fusarium* que colonizan los granos de frijol negro en Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de los hongos. En 2017, 2018 y 2019, se recolectaron durante la poscosecha 49 muestras de grano, de 500 g cada una, de frijol común (*P. vulgaris* L.) de color negro, en diferentes regiones productoras de esta leguminosa en Costa Rica (Brunca, Central, Chorotega, Huetar Atlántico y Huetar Norte). Los granos se recolectaron en las fincas de personas productoras luego de la cosecha por lo que se encontraban almacenados por un período de no más de 30 días antes de salir a la venta al mercado. El grano de frijol recolectado se almacenó en bolsas plásticas que contenían entre 0,5-1 kg de grano cada una y se colocaron en una cámara fría a 5°C (41°F) y 85% humedad relativa. Se almacenaron en esas condiciones por un período menor a 24 meses hasta el aislamiento fúngico.

Luego, el aislamiento de los hongos de cada muestra se realizó de la siguiente manera:

se lavaron 50 g de frijol 3 veces con agua destilada esterilizada en autoclave (121°C, 1,05 kg.cm⁻², 20 minutos). Después del último lavado, se colocaron 4 granos de frijol en placas Petri de 90 mm que contenían agar extracto de malta con pH de 5,5 [20 g.L⁻¹ de agar bacteriológico (Oxoid®) y 20 g.L⁻¹ de extracto de malta (Difco™)]. Se realizaron 10 repeticiones por muestra, cada una compuesta por una placa de Petri con 4 granos de frijol. Los granos se incubaron a 25°C (77°F) en la oscuridad hasta que se observó el crecimiento de hongos (2-3 días de incubación). Se tomó una sección de aproximadamente 0,5 cm de micelio del margen de la colonia en activo crecimiento y se colocó en placas de Petri de 53 mm con agar extracto de malta. Se incubaron a 25°C por un período de 7 días en oscuridad. Luego de este tiempo, se observaron al microscopio secciones de micelio y esporas de cada cultivo y se eligieron los aislamientos que de acuerdo con Leslie y Summerell (2006), presentaban características distintivas de *Fusarium*, que incluían la forma y longitud de las esporas.

Para la preparación de los cultivos monospóricos, se tomaron esporas asexuales de los aislamientos seleccionados y se prepararon mediante el método de dilución seriada descrito por Leslie y Summerell (2006) con las siguientes modificaciones: se agregaron 500 µl de agua del grifo autoclavada a cada placa que contenía micelio y la solución se mezcló mediante pipeteo para separar las esporas del micelio. La solución de esporas se colectó en un tubo de 2 ml y se utilizó una alícuota para calcular la concentración de esporas con un

hemocitómetro Fuchs-Rosenthal (Thomas Scientific, Horsham, PA, EE. UU.). La solución de esporas se diluyó para obtener 0,6 esporas.µl⁻¹ y se cultivó 50 µl en placas de Petri de 90 mm que contenían Czapek Dox Agar (CDA, 50,01 g.L⁻¹, pH 8,2, PhytoTechnology Laboratories®). Los 50 µl se distribuyeron de forma homogénea sobre el medio de cultivo con ayuda de una espátula de Drigalski. Cada solución de esporas se cultivó de la misma manera por triplicado y se incubó a 25°C en oscuridad hasta que la germinación de cada espora fue visible a simple vista. Luego de 24 horas de incubación, 3 microcolonias de cada aislamiento se transfirieron por separado a un nuevo plato Petri con CDA y se incubaron en las mismas condiciones hasta que se produjo suficiente micelio para la extracción de ADN. Los aislamientos se numeraron consecutivamente de F1 a F79 para facilitar la identificación.

Identificación molecular de los aislamientos de *Fusarium*. El micelio proveniente de 79 cultivos monospóricos se separó cuidadosamente del medio y se liofilizó durante 3 días para eliminar totalmente el agua del material. El ADN se extrajo a partir de 20 mg de micelio macerado según el método de extracción de ADN a gran escala de (Brandfass y Karlovsky 2008). La identificación molecular de los aislamientos se realizó mediante PCR en tiempo real y secuenciación con cebadores específicos diseñados para amplificar una región corta y variable de los genes *TEF-1α* (factor de elongación de la traducción 1-alfa) y *RPB2* (subunidad de la ARN polimerasa II) en *Fusarium* (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para la identificación de los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de granos de frijol común de color negro (*Phaseolus vulgaris* L.). Costa Rica. 2017-2019.

Nombre del cebador (gen)	Secuencia (5'-3')	Longitud del amplicón	Referencia
RPB2-F2 (<i>RPB2</i>)	CAGAGGTATGGAAGTTGTGTA	177 bp	Este estudio
RPB2-R2 (<i>RPB2</i>)	ATnTCACGAACAAGnGAnAC		
EF1_F2 (<i>TEF-1α</i>)	TGTCAATCAGTACTAACCA	257 bp	Este estudio
EF1_R2 (<i>TEF-1α</i>)	TCATGTCTTGATGAAATCAC		

La correcta amplificación de ambos cebadores en *Fusarium* se validó previamente con ADN de los siguientes controles positivos: *F. avenaceum* DSM62161, *F. culmorum* DSM62118, *F. graminearum* NRRL13383, *F. langsethiae* ESIER1400, *F. oxysporum* DSM62338, *F. poae* DSM62376, *F. sporotrichioides* DSM62423, *F. tricinctum* DSM23357 y *F. verticillioides* NRRL20956. El ADN de los controles positivos fue donado por el Prof. Dr. Petr Karlovsky (Molecular Phytopathology and Mycotoxin Research, Universidad de Göttingen, Alemania) y los hongos, a partir de los cuales se obtuvo el ADN fueron adquiridos en la DSMZ (German Collection of Microorganism and Cell Cultures GmbH). La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador Rotor-Gene Thermal Cycler RG-6000 (Corbett Research, Australia) y cada reacción de PCR se compuso de 12,3 μL de mezcla maestra MeltDoctor (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), 0,35 μM de cebadores directos e inversos (Tabla 1) y 2 μL de ADN (17-167 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) en un volumen final de 15 μL . Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR para ambos cebadores: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de: 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Tras el ciclo final de la PCR, se llevó a cabo el análisis de las curvas de temperatura de fusión que se inició a 95° C con una disminución de 0,3°C a 50°C, esto para corroborar la amplificación y la especificidad de los amplicones. Los productos de PCR se enviaron a Macrogen (Corea del Sur) para su secuenciación. Se verificó la calidad de las secuencias y se realizó el alineamiento de las mismas con el empleo de la herramienta de alineación múltiple ClustalW (Thompson *et al.* 1994). Se eliminaron las secciones de secuencias que mostraban cromatogramas irregulares en los extremos 5' y 3' para evitar errores durante la identificación de las especies.

Las especies de *Fusarium* se identificaron mediante la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y se compararon con secuencias de la base de datos del GenBank (Clark *et al.* 2016). El análisis filogenético se realizó mediante el método de máxima verosimilitud con el programa MEGA-X (Análisis genético evolutivo molecular) versión 10.1 (Kumar *et al.* 2018). Los valores de bootstrap se generaron en cada nodo con 1000 réplicas.

RESULTADOS

Prevalencia de *Fusarium* en granos de frijol negro. De las 49 muestras de frijol negro, se obtuvieron 79 aislamientos de hongos que se codificaron consecutivamente de F1 a F79. De esos 79 aislamientos, 28 (35%) fueron categorizados dentro del género *Fusarium* y se identificaron posteriormente a nivel molecular. Los demás hongos fueron descartados. La presencia de diferentes especies de *Fusarium* varió según el año de recolección de la muestra. En el 2017, el 50% de las muestras de frijol negro recolectadas estaban contaminadas con al menos una especie de *Fusarium*, mientras que en el 2018 y el 2019, el 43% y 76% de las muestras estuvieron contaminadas con *Fusarium* respectivamente.

Identificación molecular de los aislamientos de *Fusarium*. Del total de aislamientos de *Fusarium*, 82% fueron identificados dentro del complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) y clado VII según Watanabe *et al.* (2011) (Tabla 2 y Figura 1). Las especies identificadas dentro del FIESC fueron: *F. hainanense*, *F. equiseti* y *F. Incarnatum*; solo el 11% de los aislamientos (3 aislamientos) se identificaron como *F. oxysporum* y el 7% como *F. verticillioides* (2 aislamientos).

Tabla 2. Identificación de las especies de *Fusarium* aisladas de granos de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) Costa Rica.

Código del aislamiento	Identificación basada en <i>TEF-1α</i>			Identificación basada en <i>RPB2</i>			Complejo de especies de <i>Fusarium</i>	Clado ²
	Especie	Identidad (%)	Valor E	Especie	Identidad (%)	Valor E		
F01	<i>F. hainanense</i>	99	1E-62	<i>F. sulawesiense</i>	99	3E-47	FIESC	Clado VII
F03	<i>F. oxysporum</i>	100	3E-64	<i>F. oxysporum</i>	90	1E-27	FOSC	Clado V
F05	<i>F. verticillioides</i>	100	2E-65	<i>F. verticillioides</i>	98	2E-45	FFSC	Clado V
F07	<i>F. verticillioides</i>	100	2E-65	<i>F. verticillioides</i>	98	2E-45	FFSC	Clado VII
F08	<i>F. incarnatum</i>	100	3E-64	<i>F. sulawesiense</i>	98	2E-45	FIESC	Clado VII
F15	<i>Fusarium</i> sp.			<i>F. equiseti</i>	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F16	<i>F. incarnatum</i>	100	3E-64	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	99	3E-47	FIESC	Clado VII
F17	<i>F. oxysporum</i>	100	3E-64	<i>F. oxysporum</i>	99	3E-47	FOSC	Clado V
F22	<i>F. incarnatum</i>	100	4E-67	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F23	<i>F. incarnatum</i>	100	4E-67	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F25	<i>F. incarnatum</i>	99	9E-59	<i>F. sulawesiense</i>	98	2E-45	FIESC	Clado VII
F26	<i>Fusarium</i> sp.	99	3E-90	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F28	<i>F. hainanense</i>	100	3E-90	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F29	<i>F. hainanense</i>	100	1E-93	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F30	<i>F. hainanense</i>	100	2E-91	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	2E-49	FIESC	Clado VII
F34	<i>F. hainanense</i>	99	5E-88	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F38	<i>F. hainanense</i>	100	2E-92	<i>F. sulawesiense</i>	99	3E-47	FIESC	Clado VII
F42	<i>F. hainanense</i>	99	8E-91	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F45	<i>F. hainanense</i>	99	2E-91	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F47	<i>Fusarium</i> sp.			<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F56	<i>F. oxysporum</i>	100	1E-94	<i>F. oxysporum</i>	99	3E-47	FOSC	Clado V
F65	<i>Fusarium</i> spp.	100	1E-93	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F68	<i>Fusarium</i> sp.	100	1E-93	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F69	<i>F. hainanense</i>	100	1E-93	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII
F73	<i>F. hainanense</i>	99	2E-91	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	2E-49	FIESC	Clado VII
F75	<i>Fusarium</i> sp.	100	1E-93	<i>F. sulawesiense</i>	99	3E-47	FIESC	Clado VII
F76	<i>F. hainanense</i>	99	6E-92	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	99	3E-47	FIESC	Clado VII
F79	<i>Fusarium</i> sp.	100	1E-93	<i>Fusarium</i> sp.FIESC	100	7E-49	FIESC	Clado VII

1 Especie más probable basado en el porcentaje de identidad y en el valor E.

2 Separación de clados basada en Watanabe *et al.* (2011).

Secuencias combinadas de las regiones parciales de los genes *RPB2* y *TEF-1α*. FIESC: Complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti*, FFSC: Complejo de especies *Fusarium fujikuroi*, FOSC: Complejo de especies *Fusarium oxysporum*. F# = código del aislamiento de *Fusarium*.

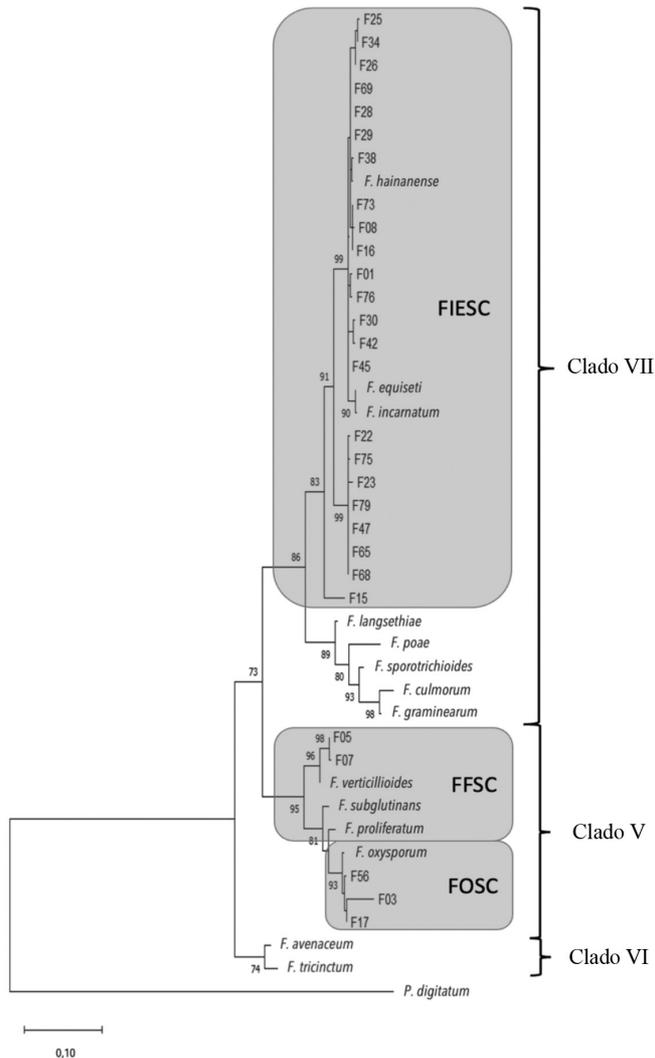


Figura 1. Árbol de máxima verosimilitud de los aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de granos de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) en Costa Rica.

Las similitudes se infirieron a partir de las secuencias parciales combinadas de los genes *RPB2* y *TEF-1 α* . En cada nodo se muestran los valores de Bootstrap superiores al 70% para 1000 réplicas.

FIESC = complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti*, FFSC = complejo de especies *Fusarium fujikuroi*, FOOSC = complejo de especies *Fusarium oxysporum*.

La separación de clados se basó en (Watanabe *et al.* 2011). F# = código del aislamiento de *Fusarium*. Se utilizó *Penicillium digitatum* como grupo externo.

Las especies más abundantes de *Fusarium* en el 2017 y 2019 incluyeron las pertenecientes al complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), mientras que en el 2018 la mayoría de las muestras estaban contaminadas

con *F. incarnatum* (Figura 2). Por otro lado, *F. equiseti*, solo estuvo presente en una muestra del 2018 y *F. oxysporum* estuvo presente en los 3 años evaluados, mientras que *F. verticillioides* solo en muestras del 2017 y 2018 (Figura 2).

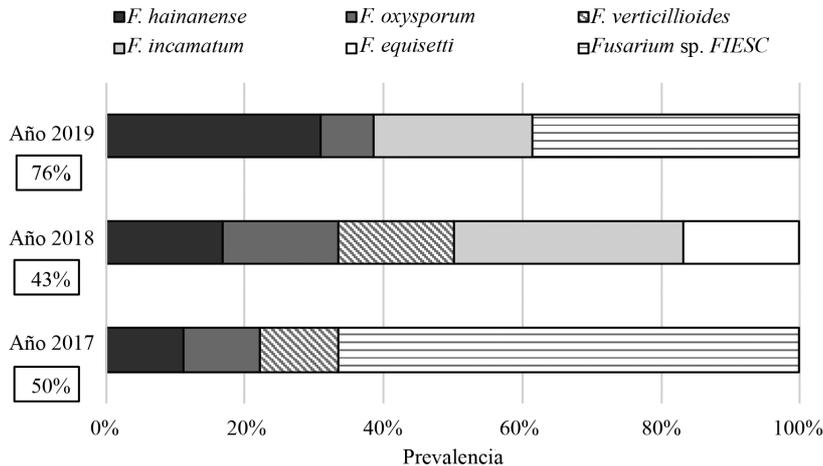


Figura 2. Prevalencia de especies de *Fusarium* aisladas de granos de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) recolectadas en 2017, 2018 y 2019 en Costa Rica. La identificación de las especies se realizó según las secuencias parciales combinadas de los genes RPB2 y TEF-1 α (ver Tabla 2).

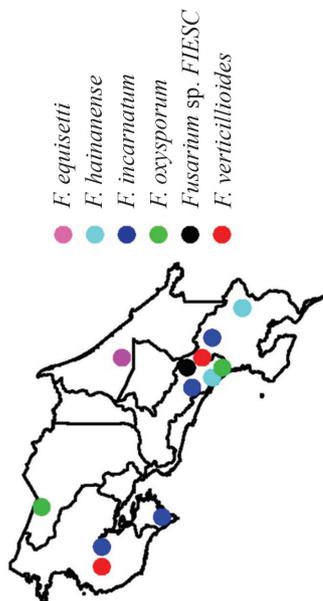
Los porcentajes dentro de cada cuadrado se refieren a la prevalencia de *Fusarium* spp. en cada año.

La mayoría de las muestras fueron recolectadas en Pérez Zeledón, San José (Región Brunca) (Tabla 3), de las cuales se aisló el 71% de las especies de *Fusarium*. De los frijoles de esta Región se recuperaron 4 de las 6 especies identificadas de *Fusarium* en granos de frijol negro: *F. hainanense*, *F. incarnatum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, además, se aislaron especies

que no pudieron ser identificadas pertenecientes al complejo de especies FIESC (*Fusarium sp. FIESC*) (Tabla 3). *F. equiseti* se aisló solo de una muestra proveniente de la Región Hueta Atlántica (Siquirres, Limón), mientras que *F. incarnatum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* se encontraron distribuidos en muestras de frijol de diferentes regiones del país.

Tabla 3. Especies de *Fusarium* aisladas de granos de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) recolectadas en diferentes regiones agroecológicas. Costa Rica durante 2017, 2018 y 2019.

Localización geográfica	Número de muestras colectadas (%)	Especies <i>Fusarium</i>
Región Brunca	28 (57%)	<i>F. incarnatum</i>
		<i>F. hainanense</i>
		<i>F. oxysporum</i>
		<i>F. verticillioides</i>
Región Huetar Norte	8 (16%)	<i>Fusarium</i> sp. <i>FIESC</i> <i>F. oxysporum</i>
Región Chorotega	6 (12%)	<i>F. incarnatum</i>
		<i>F. verticillioides</i>
Región Central	4 (8%)	None
Región Huetar Atlántico	3 (6%)	<i>F. equiseti</i>



DISCUSIÓN

Diversas especies de *Fusarium* han sido previamente aisladas de suelos, raíces, tallos y hojas del cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). La mayoría de estas especies han sido identificadas como *F. oxysporum* o *F. solani* y están relacionadas a enfermedades como fusariosis o podredumbre radicular (Alves-Santos *et al.* 1999, Montiel-González *et al.* 2005, Macedo *et al.* 2017, Cruz *et al.* 2018). Existen pocos estudios que reporten la presencia de especies de *Fusarium* que colonicen granos de frijol común a nivel mundial. Hitokoto *et al.* (1981), reportaron la presencia de *Fusarium* en granos de frijol común colectados en mercados en la ciudad de Tokio, Japón, sin embargo, no identificaron las especies. Abdel-Hafez (1984) aisló *F. oxysporum* y *F. solani* a partir de granos de frijol común en Arabia Saudita; mientras que Tseng *et al.* (1995) identificaron 5 especies de *Fusarium* en granos de frijol canadiense con una incidencia de 18%. En América Latina, (Castillo *et al.* 2002, 2004) reportaron la presencia de algunas especies de *Fusarium* en granos de frijol negro argentino, la mayoría identificadas como *F. semitectum* (prevalencia del 11%) y *F. graminearum* (prevalencia del 4,8%).

La mayoría (82%) de las especies de *Fusarium* aisladas de granos de frijol negro en Costa Rica, en el presente estudio, pertenecían al complejo de especies FIESC (*F. hainanense*, *F. incarnatum*, *F. equiseti* y otras), aunque también se identificaron *F. oxysporum* y *F. verticillioides* (Figura 1 y Tabla 2). Algunas de esas especies ya han sido reportadas en granos de frijol común en otros países (Abdel-Hafez 1984, Tseng *et al.* 1995, Castillo *et al.* 2002, 2004); no obstante, este es el primer reporte de *F. hainanense* y *F. incarnatum* identificados en granos de frijol común. Conocer las especies de *Fusarium* que colonizan los granos es relevante, ya que muchas pueden biosintetizar micotoxinas, metabolitos secundarios que tienen efectos adversos para la salud humana y animal (Wu *et al.* 2014, Ostry *et al.* 2017). Varios miembros del complejo de especies FIESC son saprófitos

y oportunistas; además, algunos de ellos son conocidos por su capacidad para producir micotoxinas como beauvericina (Logrieco *et al.* 1998), diacetoxiscirpenol, fusarenona X, nivalenol (Villani *et al.* 2016), zearalenona y deoxinivalenol (Avila *et al.* 2019).

Las otras 2 especies de *Fusarium* no pertenecientes al FIESC que se identificaron en las muestras de frijol común negro en Costa Rica, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, son importantes patógenos que colonizan las plantas, pero difieren en su potencial micotoxigénico. Por ejemplo, *F. oxysporum* no es un hongo conocido por su capacidad micotoxigénica, aunque se ha reportado que esta especie produce algunas micotoxinas dentro del grupo de los tricotecenos (Lee *et al.* 1986, Mirocha *et al.* 1989, Richard *et al.* 2007, Li *et al.* 2016). Asimismo *F. verticillioides* es una de las especies de *Fusarium* más relevantes por su capacidad para producir micotoxinas. Esta especie produce fumonisinas que son reconocidas por su potencial cancerígeno en humanos y animales (Norred 1993, Covarelli *et al.* 2012, Ostry *et al.* 2017).

Trabajos de investigación previos reportaron prevalencia de *Fusarium* menor al 19% en granos de frijol común (Hitokoto *et al.* 1981, Abdel-Hafez 1984, Tseng *et al.* 1995, Castillo *et al.* 2002, 2004), lo cual contrasta con estos resultados. En el presente trabajo se encontró una prevalencia de *Fusarium* de más del 43% en las muestras de granos de frijol negro colectadas en diferentes años (Figura 2). Estas muestras fueron recolectadas después de la cosecha en condiciones de almacenamiento en campo similares a las de Castillo *et al.* (2002, 2004); sin embargo, esas personas autoras reportaron alrededor de un 19% de prevalencia de *Fusarium* en granos de frijol negro argentino. Las condiciones climáticas pudieran explicar estas diferencias, ya que el frijol argentino proviene de la provincia de Salta, donde la temperatura y precipitación promedio anual son 20°C (68°F) y 500 mm, respectivamente (Portal informativo de Salta 2020). Mientras que en Pérez Zeledón (Región Brunca). En Costa Rica, donde se recolectaron la mayoría

de las muestras en este estudio se presentó una temperatura promedio anual de 23°C (74°F), pero la precipitación promedio anual es mucho más alta, 2944 mm (Climate-data.org 2020). Los patrones de alta precipitación se han relacionado previamente con la infestación por *Fusarium* en cereales y granos (Gamanya y Sibanda 2001, Bernhoft *et al.* 2012, Tsehaye *et al.* 2017) por lo que se esperarían valores elevados de prevalencia de este hongo en zonas de alta precipitación como Pérez Zeledón.

El presente estudio mostró por primera vez la diversidad de especies de *Fusarium* en granos de frijol negro en Costa Rica, donde la ubicación geográfica es considerada región agroecológica así como el año de recolección de la muestra. La prevalencia de especies de *Fusarium* en los granos de frijol negro fue alta, pues llegó a un 76% en muestras recolectadas en el 2019. La mayoría de los aislamientos de *Fusarium* pertenecen al complejo de especies FIESC que tienen varios integrantes con potencial micotoxigénico. Además, se identificaron 2 importantes especies fitopatógenas de *Fusarium*: *F. oxysporum* y *F. verticillioides*; esta última conocida por su potencial toxigénico, ya que produce fumonisina, una de las micotoxinas más relevantes desde el punto de vista de salud humana. Debido a que la capacidad de un hongo como *Fusarium* puede causar enfermedades en una planta o producir micotoxinas depende del sustrato y de las condiciones ambientales, se deberían realizar investigaciones complementarias para determinar el potencial que tienen, las especies identificadas en el presente estudio de causar enfermedades o producir micotoxinas en el frijol negro en Costa Rica.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de esta investigación en el marco del proyecto VI-734-B9-038.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Hafez, SII. 1984. Mycoflora of bean, broad bean, lentil, lupine and pea seeds in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 88(1):45-49.
- Alves-Santos, FM; Benito, EP; Eslava, AP; Díaz-Minguez, J. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3335-3340.
- Antonissen, G; Martel, A; Pasmans, F; Ducatelle, R; Verbrugghe, E; Vandenbroucke, V; Li, S; Haesebrouck, F; Van Immerseel, F; Croubels, S. 2014. The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins* 6(2):430-452.
- Avila, CF; Moreira, GM; Nicolli, CP; Gomes, LB; Abreu, LM; Pfenning, LH; Haidukowski, M; Moretti, A; Logrieco, A; Del Ponte, EM. 2019. *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with Brazilian rice: Phylogeny, morphology and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology* 306:108267.
- Bernhoft, A; Torp, M; Clasen, P-E; Løes, A-K; Kristoffersen, AB. 2012. Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29(7):1129-1140.
- Blair, MW; González, LF; Kimani, PM; Butare, L. 2010. Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. *Theoretical and Applied Genetics* 121(2):237-248.
- Brandfass, C; Karlovsky, P. 2008. Upscaled CTAB-Based DNA Extraction and Real-Time PCR Assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in Plant Material with Reduced Sampling Error. *International Journal of Molecular Sciences* 9(11):2306-2321.
- Broughton, WJ; Hernández, G; Blair, M; Beebe, S; Gepts, P; Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252(1):55-128.
- Castillo, M; Samar, M; Moltó, G; Resnik, S; Pacin, A. 2002. Trichothecenes and zearalenone production by fusarium species isolated from Argentinean black beans. *Mycotoxin Research* 18(1):31-36.
- Castillo, MD; González, HHL; Martínez, EJ; Pacin, AM; Resnik, SL. 2004. Mycoflora and potential for mycotoxin production of freshly harvested black bean from the Argentinean main production area. *Mycopathologia* 158(1):107-112.
- Cinar, A; Onbaşı, E. 2019. *Mycotoxins: The Hidden Danger in Foods*. London, UK., IntechOpen. p. 21.
- Clark, K; Karsch-Mizrachi, I; Lipman, DJ; Ostell, J; Sayers, EW. 2016. GenBank. *Nucleic Acids Research* 44(D1):D67-D72.

- Climate-data.org. 2020. El Clima (en línea). San José, Costa Rica, Municipalidad de Pérez Zeledón. Consultado 6 ago. 2020. Disponible en <https://www.perezzeledon.go.cr/index.php/turismo/informacion-turistica/el-clima.html>
- Covarelli, L; Stifano, S; Beccari, G; Raggi, L; Lattanzio, VMT; Albertini, E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology* 31(1):17-24.
- Cruz, AF; Silva, LF; Sousa, TV; Nicoli, A; de Paula Junior, TJ; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2018. Molecular diversity in *Fusarium oxysporum* isolates from common bean fields in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 152(2):343-354.
- Eskola, M; Kos, G; Elliott, CT; Hajšlová, J; Mayar, S; Krska, R. 2019. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0(0):1-17.
- FAO. 2018. New food balances. Roma, Italia (en línea). Consultado 22 feb. 2021. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>
- FAO. 2019. The global economy of pulses. In Vikas, R; Kalamvrezos Navarro, D. Rome, Italia, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 174 p.
- Gamanya, R; Sibanda, L. 2001. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B1 in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 71(2):145-149.
- Gepts, P; Aragão, FJL; Barros, E de; Blair, MW; Brondani, R; Broughton, W; Galasso, I; Hernández, G; Kami, J; Lariguet, P; McClean, P; Melotto, M; Miklas, P; Pauls, P; Pedrosa-Harand, A; Porch, T; Sánchez, F; Sparvoli, F; Yu, K. 2008. Genomics of Phaseolus beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In Moore, PH; Ming, R (eds.). *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. New York, NY, Springer p. 113-143.
- Hitokoto, H; Morozumi, S; Wauke, T; Sakai, S; Kurata, H. 1981. Fungal contamination and mycotoxin-producing potential of dried beans. *Mycopathologia* 73(1):33-38.
- Jiménez-García, S; García-Mier, L; García-Trejo, JF; Ramírez-Gómez, XS; Guevara-González, RG; Feregrino-Pérez, AA. 2018. *Fusarium mycotoxins and metabolites that modulate their production*. London, UK., IntechOpen, vol. 3. p. 695.
- Kumar, S; Stecher, G; Li, M; Knyaz, C; Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547-1549.
- Lee, US; Jang, HS; Tanaka, T; Toyasaki, N; Sugiura, Y; Oh, YJ; Cho, CM; Ueno, Y. 1986. Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 52(6):1258-1260.
- Leslie, JF; Summerell, BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 5 ed. Iowa, USA, John Wiley & Sons. 402 p.
- Li, ZF; He, CL; Wang, Y; Li, MJ; Dai, YJ; Wang, T; Lin, W. 2016. Enhancement of trichothecene mycotoxins of *Fusarium oxysporum* by ferulic acid aggravates oxidative damage in *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Scientific Reports* 6(1):33962.
- Logrieco, A; Moretti, A; Castella, G; Kostecki, M; Golinski, P; Ritieni, A; Chelkowski, J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8):3084-3088.
- Macedo, R; Sales, LP; Yoshida, F; Silva-Abud, LL; Junior, ML. 2017. Potential worldwide distribution of *Fusarium* dry root rot in common beans based on the optimal environment for disease occurrence. *PLOS ONE* 12(11):e0187770.
- Marin, S; Ramos, AJ; Cano-Sancho, G; Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60:218-237.
- Mensack, MM; Fitzgerald, VK; Ryan, EP; Lewis, MR; Thompson, HJ; Brick, MA. 2010. Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using «omics» technologies. *BMC Genomics* 11(1):686.
- Mirocha, CJ; Abbas, HK; Kommedahl, T; Jarvis, BB. 1989. Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 55(1):254-255.
- Montiel-González, L; González-Flores, F; Sánchez-García, BM; Guzmán-Rivera, S; Gámez-Vázquez, FP; Acosta-Gallegos, JA; Rodríguez-Guerra, R; Simpson-Williamson, J; Cabral-Enciso, M; Mendoza-Elos, M. 2005. *Fusarium* species on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots causing rots, in fives states of Central Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1):1-10.
- Munkvold, GP. 2017. *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins (en línea). In Moretti, A; Susca, A (eds.). *Methods in Molecular Biology*. New York, NY, Springer. p. 51-106. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4.
- Norred, WP. 1993. Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 38(3):309-328.
- Omotayo, OP; Omotayo, AO; Mwanza, M; Babalola, OO. 2019. Prevalence of Mycotoxins and Their Consequences on Human Health. *Toxicological Research* 35(1):1-7.
- Oomah, BD; Cardador-Martínez, A; Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common

- beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(6):935-942.
- Ostry, V; Malir, F; Toman, J; Grosse, Y. 2017. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research* 33(1):65-73.
- Perrone, G; Ferrara, M; Medina, A; Pascale, M; Magan, N. 2020. Toxigenic Fungi and Mycotoxins in a Climate Change Scenario: Ecology, Genomics, Distribution, Prediction and Prevention of the Risk. *Microorganisms* 8(10):1496.
- Portal informativo de Salta. 2020. Clima de la provincia de Salta (en línea). Salta, Argentina, Ministerio de Defensa, Servicio Meteorológico Nacional. Consultado 6 ago. 2020. Disponible en <http://www.portaldesalta.gov.ar/clima.htm>
- Richard, E; Heutte, N; Sage, L; Pottier, D; Bouchart, V; Lebailly, P; Garon, D. 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology* 45(12):2420-2425.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2018. Extensión sembrada y cosechada en hectáreas y producción en toneladas métricas, según cultivo. San José, Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. 1 p.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2019. Área sembrada y producción de frijol según región y subregión, por período agrícola 2016/17-2018/19. San José, Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. 1 p.
- Singleton, P; Sainsbury, D. 2006. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. 3 ed rev. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ, Wiley. 895 p.
- Summerell, BA; Laurence, MH; Liew, EY; Leslie, JF. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity* 44(1):3-13.
- Thompson, JD; Higgins, DG; Gibson, TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Tsehaye, H; Brurberg, MB; Sundheim, L; Assefa, D; Tronsmo, A; Tronsmo, AM. 2017. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin on maize grains in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology* 147(1):141-155.
- Tseng, TC; Tu, JC; Tzean, SS. 1995. Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwan and in Ontario, Canada. *Botanical Bulletin Academia Sinica Taipei* 36:229-234.
- Villani, A; Moretti, A; De Saeger, S; Han, Z; Di Mavungu, JD; Soares, CMG; Proctor, RH; Venâncio, A; Lima, N; Stea, G; Paciolla, C; Logrieco, AF; Susca, A. 2016. A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *International Journal of Food Microbiology* 234:24-35.
- Watanabe, M; Yonezawa, T; Lee, K; Kumagai, S; Sugita-Konishi, Y; Goto, K; Hara-Kudo, Y. 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 11(1):322.
- Wu, F; Groopman, JD; Pestka, JJ. 2014. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology* 5(1):351-372.



