

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



Identificación de *Fo. adpressus* asociado a la producción de vainillas
en Nayarit, México

TESIS

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PRESENTA:

ING. RODOLFO CASILLAS ISORDI

México, D.F., mayo de 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias



Tesis Maestría

“Identificación de *Fusarium* sp. asociado a la pudrición de *Vanilla* sp. en Nayarit, México”

PRESENTA

Ing. Rodolfo Casillas Isiordia

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Comité tutorial:

Dr. Mauricio Luna Rodríguez

Dr. Álvaro Can Chulim

Dra. Leobarda Guadalupe Ramírez Guerrero

Dr. Gregorio Luna Esquivel

M. C. Carlos Rubén Carvajal Cázola

Xalisco, Nayarit, a 26 de octubre de 2015

Dr. JUAN DIEGO GARCIA PAREDES.

COORDINADOR DEL POSGRADO (CBAP).

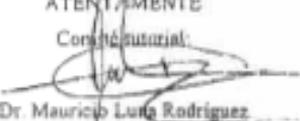
PRESENTE.

Los que suscriben integrantes del comité Tutorial del C. Rodolfo Casillas Isiordia, declaramos haber revisado y corregido la tesis titulada: "Identificación de *Fusarium* sp. asociado a la podrición de *Vanilla* sp. en Nayarit, México", por lo que aprobamos su impresión para que se prosiga con los trámites correspondientes para obtener en grado de Maestría en Ciencias con opción terminal en Ciencias Agrícolas.

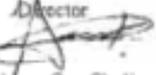
Sin otro asunto que tratar, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

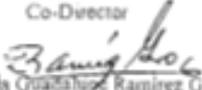
Comité Tutorial:


Dr. Mauricio Luna Rodriguez

Director


Dr. Álvaro Can Chulim

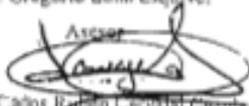
Co-Director


Dra. Leonor Guadalupe Ramirez Guerrero

Asesor


Dr. Gregorio Luna Esquivel

Asesor


M. C. Carlos Roberto Carvajal Cruz

Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/233/15.

Xalisco, Nayarit; 05 de noviembre de 2015.

ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 26 de octubre del presente, enviado por los CC. Dr. Mauricio Luna Rodríguez, Dr. Álvaro Can Chulim, Dra. Leobarda Guadalupe Ramírez Guerrero, Dr. Gregorio Luna Esquivel y M.C. Carlos Rubén Carvajal Cazola, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que solicita el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias; dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza al **C. Rodolfo Casillas Isiordia**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro y lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

&mfm

DEDICATORIA

A dios

Por haberme permitido lograr una más de mis metas.

A mi madre

m. margarita isiodia becerra por su apoyo, paciencia y cariño incondicional durante mi formación.

A mi hermano

Juan Luis González Isiodia por su apoyo y estímulo que me brindo durante todo este tiempo.

A mis familiares

Poe el apoyo brindado que de una u otra manera me impulsaron a seguir hacia delante

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Por el apoyo otorgado durante el periodo de la realización de mi Maestría en Ciencias agrícolas.

A la Universidad Autónoma de Nayarit

Por darme la oportunidad de estudiar y realizar mi formación profesional

A la Unidad Académica de Agricultura

Por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de mi investigación

Al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias y Pesqueras

Por verme brindado la oportunidad de cursar mi maestría

Al Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX)

Por brindarme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones para llevar a cabo mi investigación, así mismo a los compañeros y amigos que ay conocí y fueron un gran apoyo para mi investigación.

Al INIFAT de General Terán

Por recibirme con las puertas abiertas para realizar mi investigación

A mis colaboradores y amigos por ayudarme incondicionalmente

Ing. Aldo Gabriel Tejeda Cervantes

Ing. Felipe Roberto Flores de la Rosa

Dr. Edgar Guevara Avendaño

Estudiante de licenciatura Cesar Humberto Ortiz Campos

Y demás personas que me ayudaron a llevar a cabo esta investigación **MUCHAS GRACIAS.**

ÍNDICE

Oficio de aprobación	ii
Oficio de conformación de comité tutorial	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Índice o contenido	vi
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 Generalidades de vainilla	5
3.1.1 Descripción Taxonómica	5
3.1.2 Descripción botánica	5
3.1.3 Origen	10
3.2 Plagas de vainilla	11
3.2.1 Insectos	11
3.3 Enfermedades de vainilla	11
3.3.1 Virus	11
3.3.2 Hongos	12
3.4. El género <i>Fusarium</i>	13
3.5. Identificación de especies del género <i>Fusarium</i>	14
3.5.1 Técnicas morfológicas para la identificación del género <i>Fusarium</i>	14
3.5.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	18
3.5.1.1.1 Formas especiales de <i>Fusarium oxysporum</i>	18
3.5.1.1.2 Razas	19
3.5.1.2 <i>Fusarium solani</i>	19
3.5.1.2.1 Formas especiales	20
3.5.2 Técnicas moleculares para la identificación del género <i>Fusarium</i>	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Localización geográfica del área de estudio	24
4.2 Material vegetal	25
4.3 Desinfestación y establecimiento de las muestras	25
4.4 Aislamiento y obtención de cultivos fúngicos puros	27
4.5 Identificación morfológica	28
4.6 Extracción de ADN	29
4.7 Amplificación del DNA por PCR	30
4.7.1 Amplificación DNA ribosomal (ITS1, ITS2 y el gen 5.8 S rRNA)	30
4.7.2 Amplificación del gen EF-1 α	30
4.7.3 Secuenciación y análisis de los amplificadores	31
4.8 Pruebas de patogenicidad	32
4.8.1 Prueba de patogenicidad en hojas	33
4.8.2 Pruebas de patogenicidad en tallos enraizados	33

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1 Material colectado	35
5.2 Aislamiento y obtención de cultivos fúngicos puros	38
5.3 Identificación morfológica de <i>Fusarium</i> sp.	42
5.4 Análisis molecular	50
5.5 Pruebas de patogenicidad en hojas.	58
5.6 Pruebas de patogenicidad en tallos.	60
VI. CONCLUSIONES	64
VII. LITERATURA CITADA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversidad morfológica de especies del género <i>Vanilla</i> presente en el continente Americano	7
Figura 2. Diversidad morfológica de especies del Europa, Asia y África:	8
Figura 3. Dibujo de <i>Vanilla pompona</i> Shieder. Fuente: Soto y Dressler, 2010.	9
Figura 4: Características morfológicas de las esporas utilizadas en la identificación de especie de <i>Fusarium</i> .	15
Figura 5. Las clamidosporas de especies de <i>Fusarium</i> .	16
Figura 6: Morfología de las colonias de especies de <i>Fusarium</i> en agar papa dextrosa	17
Figura 7: Localización de los espacios ITS.	22
Figura 8. Plantas de <i>Vanilla</i> sp. localizadas de manera silvestre: A) Municipio de Ruiz, B) Municipio de Xalisco.	35
Figura 9: Aspecto que presentaron la raíz y hoja de <i>Vanilla pompona</i> que se utilizaron para el aislamiento de <i>Fusarium</i> sp.	38
Figura 10. Zona de aislamiento de <i>Fusarium</i> sp. a partir de una raíz de <i>Vanilla pompona</i> con síntomas de pudrición.	41
Figura 11. Zonas de aislamiento de <i>Fusarium</i> sp. a partir de una raíz de <i>Vanilla pompona</i> sin síntomas de pudrición.	41
Figura 12. Crecimiento de <i>Fusarium</i> en los diferentes medios de cultivo	42
Figura 13: Aspecto de las cepas de <i>Fusarium</i> sp. aisladas de <i>V. pompona</i> de acuerdo al crecimiento en PDA a los 10 días a 25 °C.	45
Figura 14: Estructuras microscópicas de <i>Fusarium</i> .	47
Figura 15: Forma de las fialides.	48
Figura 16: Tipo de clamidosporas desarrolladas por <i>Fusarium</i> en medio CLA a 25 °C durante 20 días.	49
Figura 17: Productos de amplificación de las regiones ITS de las cepas de <i>Fusarium</i> sp. aisladas de <i>Vanilla pompona</i> de Nayarit, México.	52
Figura 18: Árbol filogenético basado en secuencias ITS del ADNr de cepas del género <i>Fusarium</i> aislados de vainilla en Nayarit y de cepas del GenBank.	54
Figura 19: Productos de amplificación del gen EF-1 α de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i> .	55
Figura 20: uno de los siete árboles más parsimoniosos (L = 859, IC = 71, IR = 82). El enraizado del árbol se realizó mediante el procedimiento del grupo externo (CBS 125547 <i>Cyanonectria buxi</i>). Valores superiores al 50 % de bootstrap se muestran por debajo de los nodos.	57
Figura 21: Aspecto del daño causado por <i>Fusarium</i> sp. en hojas de <i>Vanilla</i> sp.	59
Figura 22: A) Vainillas inoculadas y B) Siembra de las vainillas.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación geográfica de los predios seleccionados con plantas de vainilla silvestres enfermas en Nayarit.	24
Tabla 2: Número de plantas por predio y tutor donde se desarrollan.	36
Tabla 3. Claves que se utilizaron para identificar cada cepa de hongo aislada según el predio, la raíz y el fragmento.	39
Tabla 4. Zonas de aislamiento de <i>Fusarium</i> a lo largo de las raíces de <i>vanilla pompona</i> .	40
Tabla 5. Agrupación de las cepas de <i>Fusarium</i> de acuerdo a la coloración del micelio desarrollado en medio PDA.	43
Tabla 6. Agrupación de las cepas de <i>Fusarium</i> sp. aisladas de <i>V. pompona</i> de acuerdo al crecimiento en PDA a los 10 días después de la inoculación a 25 °C.	46
Tabla 7. Similitud de cada aislado de <i>Fusarium</i> sp. obtenidos a partir de <i>Vanilla pompona</i> , en relación con secuencias de la región ITS registradas en GenBank.	51
Tabla 8. Porcentaje de similitud e identidad de los aislados fúngicos generados a partir del análisis BLAST con registros del GenBank para EF-1a.	55
Tabla 9. Identificación de los aislados de <i>Fusarium</i> sp. según el periodo (días después de la inoculación) en que se inició el daño en las hojas de <i>Vanilla pompona</i> .	60

Resumen

La vainilla es originaria de América Tropical y la única orquídea que produce una esencia consumible llamada vainillina; pero, su producción es mermada y amenazada debido a los ataques de microorganismos fitopatógenos. *Fusarium oxysporum* por ser considerado el principal hongo causante de enfermedades en el cultivo y por la diversidad de formas especiales que ha evolucionado, es necesario profundizar más en su identificación y el nivel de daño que ocasiona en esta especie. Este estudio tuvo como objetivo determinar la variabilidad morfológica, molecular y patogénica de *Fusarium* sp. asociado a pudrición de *Vanilla* sp. del estado de Nayarit, México. La caracterización morfológica se basó en el color de colonia y velocidad de crecimiento en PDA; las microconidias, macroconidias y clamidosporas se analizaron en medios de cultivos SNA y CLA. Lo molecular consistió en analizar las secuencias de la región ITS1-5.8s-ITS2 (rDNA) mediante BLAST (GenBank) y el algoritmo de máxima verosimilitud y el gen de factor de elongación *ta* el cual se comparó con secuencias de otros hongos para formar un árbol de máxima parsimonia. La prueba de patogenicidad se realizó tanto en hojas sanas inoculadas con micelio del hongo como en tallos enraizados regados con esporas y plantados bajo un diseño experimental de bloques al azar. La mayoría de las colonias aisladas presentaron coloración violeta y blanco y un patrón de crecimiento rápido. En el patrón de crecimiento predominaron las cepas que presentaron rápido crecimiento. Por la variación en la forma de los macroconidios, microconidios y clamidosporas, de las 40 colonias aisladas se identificó que, 38 cepas fueron *Fusarium oxysporum* con una similitud de 98 y 100 % y 2 *F. solani*; aunque, de las dos cepas de *F. solani*, molecularmente una se alineó a *Fusarium* sp y la otra como *F. oxysporum* con un

valor de similitud de 78 y 89 %. De las 40 cepas aisladas 19 fueron patogénicas en follaje desde los 4 días y en tallo a los 90 días después de la inoculación. La mayoría de los hongos que desarrollaron pudrición en las plantas de Nayarit fueron miembros de *F. oxysporum*.

Palabras clave: Hongo fitopatógeno, identificación morfológica y molecular, patogenicidad.

Summary

Vanilla is native to tropical America and the only orchid that produces a consumable essence called vanillin; but its production is undermined and threatened because of the attacks of pathogenic microorganisms. *Fusarium oxysporum* to be considered the main disease-causing fungus in culture and diversity that has evolved special forms, you need to dig deeper in their identification and the level of damage caused in this species. This study aimed to determine the morphological, molecular and pathogenic variability of *Fusarium* sp. rot associated with *Vanilla* sp. the state of Nayarit, Mexico. The morphological characterization was based on colony color and growth rate on PDA; microconidia, macroconidia and chlamydozoospores were analyzed in culture media SNA and CLA. The molecular involved analyzing the sequences of the ITS2 region ITS1-5.8S-(rDNA) by BLAST (GenBank) and the maximum parsimony algorithm and the gene for elongation factor 1 α which was compared with sequences of other fungi to form a maximum parsimony tree. The pathogenicity test was conducted in both healthy leaves inoculated with mushroom mycelium and spores irrigated with stems rooted and planted under an experimental randomized block design. Most of the isolated colonies had white and violet color and a pattern of rapid growth. The growth pattern predominant strains classified dese fast, moderate and slow. By variation in the form of macroconidia, microconidia and chlamydozoospores, of 40 isolated colonies it was identified that were 38 strains *Fusarium oxysporum* with a similarity of 98% and 2 to 100 *F. solani*; although the two strains of *F. solani*, molecularly aligned one to *Fusarium* and other like *F. oxysporum* with a similarity value of 78 and 89%. Of the 40 isolates were pathogenic in foliage 19 from the stem 4 days and 90 days after inoculation. Most fungi that damage plants developed Nayarit were members of *F. oxysporum*.

I. INTRODUCCIÓN

La vainilla pertenece al género *Vanilla* de la familia Orchidaceae, la cual está formada por más de 800 géneros distribuidos en más de 25,000 especies (Bory *et al.*, 2008); el género *Vanilla* posee más de 107 especies donde solo *V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. pompona* son cultivadas (Soto y Dressler, 2010).

Vanilla es la planta de donde se extrae naturalmente la vainillina; aromatizante y saborizante empleado en la industria alimenticia, cosmetológica y farmacéutica, entre otros usos (Ordoñez *et al.*, 2012).

Todas las especies de vainilla son atacadas por diferentes enfermedades fúngicas como son pudriciones basales, marchitamiento vascular, necrosis y antracnosis, esto debido a la gran presencia de hongos asociados a la vainilla dado el nicho ecológico en que se desarrollan. Entre ellos: *Fusarium oxysporum*, *Calospora vanillae*, *Sclerotium* sp., *Colletotrichum vanilla* y *Phytophthora meadii* este último actualmente no es considerado un hongo si no un Oomycete (Pinaría *et al.*, 2010).

Fusarium oxysporum es un patógeno vascular que afecta muchos cultivos (Talubnak y Soyong, 2010), y es la especie más estudiada en vainilla por ser el causante de la pudrición de tallo y raíz, y por presentar una amplia distribución en áreas donde este cultivo está establecido (Bhai y Dhanesh, 2008). *F. oxysporum* forma especial (*f. sp.*) *vanillae* puede ocasionar pérdidas de más del 80 % del cultivo (Pinaría *et al.*, 2010) o llegar a destruir plantaciones enteras, haciendo imposible el crecimiento de cualquier cultivar de vainilla conocido (Xia-Hong, 2007).

La implementación de estrategias para el control de los fitopatógenos requiere de un amplio conocimiento de estos (Gangadhara *et al.*, 2010); debido a que las características morfológicas, en patógenos fúngicos, no son lo suficientemente concluyentes para poder analizar diferencias entre distintas cepas, por lo tanto, se ha recurrido al análisis a nivel molecular del ADN (Riveros *et al.*, 2000).

Las técnicas moleculares pueden usarse para estudiar la estructura de la población mediante el examen de algunos rasgos que revelan información que no se puede obtener por otros métodos. Para analizar la relación taxonómica entre especies, son necesarias las secuencias genéticas de uno o varios genes, como son el gen del factor de elongación 1- α o partes de la región codificante del ADN ribosomal (ITS) (Stewart *et al.*, 2006).

El control de este tipo de patógenos es posible en medida limitada mediante sustancias fungicidas, no obstante, estos productos destruyen tanto a patógenos como a organismos benéficos; además de ser peligrosos para el hombre y el ambiente, de allí que sea necesario conocer más sobre este patógeno, de tal modo que se apoye la búsqueda de otras alternativas que puedan ser empleadas para su control.

Por otro lado, dado que en el estado de Nayarit se encuentran establecidas de forma natural poblaciones pequeñas de *V. pompona*, determinada con base a la morfología de los individuos (Soto y Dressler, 2010), se considera que este recurso podría representar una oportunidad de cultivo alternativo para el Estado, ya que los frutos tienen especial interés en la industria alimenticia y cosmética.

Por lo anterior, y dado que México es el centro de origen del material genético de muchos de

los cultivos de vainilla a nivel mundial, se considera que está abierta la oportunidad para iniciar la formulación de estrategias para el manejo de la enfermedad. Dichas estrategias deberán ser respaldadas en un conocimiento sólido de los aspectos biológicos y ecológicos del patógeno, sin descuidar los aspectos favorables de la vainilla.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Determinar la variabilidad morfológica, genética y patogénica de *Fusarium* sp. asociado a pudrición de *Vanilla* sp. del estado de Nayarit, México.

2.1.1 Objetivo Específicos

- Caracterizar e identificar morfológicamente las cepas de *Fusarium* sp. aisladas a partir de *Vanilla* sp. originaria de Nayarit, México.
- Determinar mediante análisis molecular la especie de las cepas de *Fusarium* sp. aislado de *Vanilla* sp. originaria de Nayarit, México.
- Evaluar la patogenicidad de cepas de *Fusarium* sp. en *vanilla* sp.

2.2 Hipótesis

Fusarium oxysporum es el principal patógeno de *Vanilla* sp. en poblaciones silvestres en Nayarit, México y de igual manera como se ha encontrado en otras formas especiales del patógeno, los ejemplares poseen una amplia diversidad genética, morfológica y patogénica.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades de vainilla

3.1.1 Descripción Taxonómica

La familia *Orchidaceae* posee más de 800 géneros distribuidos en más de 25,000 especies (Bory *et al.*, 2008), dentro de la cual se encuentra la subfamilia *vanilloideae* cuya aparición se estima en 62 millones de años, que contiene 200 especies en 15 géneros tropicales (Cameron, 2011). Estos géneros, se localizan en la mayoría de los continentes, entre 27° de latitud norte y sur (Soto y Dressler, 2010).

Esta subfamilia se divide en dos tribus *pogonieae* y *vainillaeae*, esta última posee nueve géneros, dentro de ellos se encuentra *Vanilla sp.*, el cual posee de 103 a 110 especies siendo el más diverso de la subfamilia (Soto y Cribb, 2010).

La mayoría de las especies se encuentran en América tropical (Cameron, 2011), (Figura 1) seguido por el sudeste de Asia y Nueva Guinea, África (Figura 2), las islas del Océano Índico y del Pacífico (Mino *et al.*, 2007; Bory *et al.*, 2007). No todas las especies son aromáticas, pues solo se reconocen 35 con esta característica, la mayoría de ellas con origen en América (Soto y Cribb, 2010).

3.1.2 Descripción botánica

La descripción del género agrupa especies herbáceas epífitas, hemiepífitas y terrestres. Presentan formación de raíces en los entrenudos, de forma prolongada y cilíndrica, las cuales se encuentran libres o adheridas a un árbol, cuando están en suelo son gruesas y pubescentes.

Los tallos son gruesos y succulentos, de forma prolongada y cilíndrica o cuadrangular. Las hojas no articuladas, coriáceas o carnosas; sésiles o atenuadas en un pseudopociolo. La inflorescencia axilar o terminal, rara vez subterminal, de flores efímeras, generalmente grandes y vistosas; sépalos y pétalos similares, labelo entero o trilobado; columna alargada, la antera ligada a los bordes del clinandro, incúmbete, convexa, semiglobosa o algo cónica, polinios pulverulentos o granulosos. Frutos alargados, carnosos, algunas veces aromáticos (Soto y Dressler, 2003).

De acuerdo con Berger (2007), la vainilla es una planta perenne succulenta, que requiere de un árbol o una ayuda artificial conocida como tutor para producirse. Las raíces adventicias se abrazan al árbol con mucha facilidad. La planta puede alcanzar una altura de 10 a 20 m., aunque algunos sugieren que pueden alcanzar hasta 35 m.; en los cultivares comerciales las plantas se mantienen en porte bajo para hacer más fácil la polinización manual y la cosecha de los frutos.

Para que la planta de vainilla consiga alcanzar la etapa reproductiva, necesita de dos a cuatro años desde su establecimiento hasta empezar con la producción de flores y en consecuencia de frutos; a partir de este proceso, la planta puede producir por un periodo de cinco a seis años. Cada planta produce un promedio de 10 a 20 racimos de flores, de los cuales pueden surgir de 15 a 20 flores por cada uno.



Figura 1. Diversidad morfológica de especies del género *Vanilla* presente en el continente Americano: (a) *Vanilla cribbiana*, (b) *V. dressleri* Soto-Arenas, (c) *V. calyculata*, (d) *V. gulanensis* Splitg., (e) *V. hartii*, (f) *V. phaeantha*, (g, h) *V. planifolia*, (i) *V. insignis*, (j) *V. phaeantha*, (k) *V. odorata*, (l) *V. palmarum*2 (Salzm. ex Lindl.) Lindl., (m) *V. inodora*2, (n) *V. mexicana*. Fuente: Soto y Dressler, 2010.

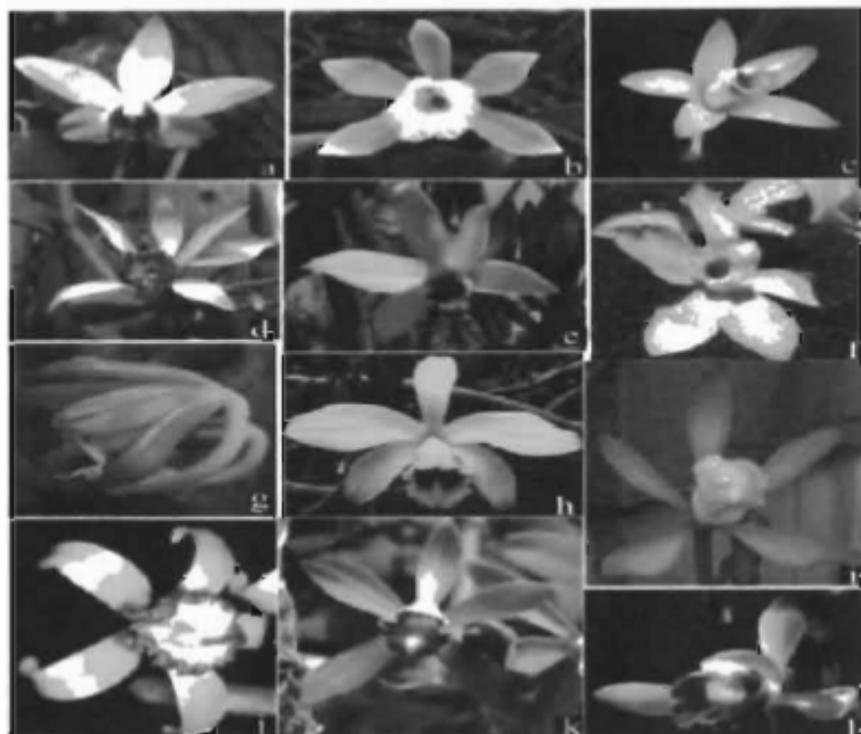


Figura 2. Diversidad morfológica de especies del Europa, Asia y África: (a) *Vanilla africana* Lindl., (b) *V. albida* Blume, (c) *V. aphylla* Blume, (d) *V. imperialis* Kraenzl., (e) *V. humblottii* Rehb.É., (f) *V. madagascariensis* Rolfe, (g) *V. pilifera*2 Holttum, (h) *V. perrieri* Schltr., (i) *V. bahiana* Hoehne, (j) *V. claviculata* Sw., (k) *V. barbellata* Rehb.É., (l) *V. polylepis* Summerh.
Fuente: Bory 2008.

Soto y Dressler (2010) describen la vainilla de Nayarit como *vainilla pompona* con las siguientes características: Hemiepipitas, trepadoras, poco ramificadas, foliosas, hasta de 16 m de altura. Tallos terete, liso, verde tenue, pálido salpicado de color blanquecino, 10-24 mm de grosor; entrenudos 11-14.5 cm de largo. Raíces aéreas libres gruesas; raíces terrestres pilosas, 4 mm de grosor; raíces fijadores notoriamente aplanada en la superficie inferior, blanco-verdoso. Hojas subsésiles; lámina de varias formas, ovadas, ampliamente elípticas, oblongas-falcadas, base ampliamente redondeadas a subcordadas. Inflorescencia en racimos de siete a 20 flores, hasta de 20 cm de largo (Figura 3); fragancia muy fuerte, picante, como menta.



Figura 3. Dibujo de *Vanilla pompona* Shieder. Fuente: Soto y Dressler, 2010.

3.1.3 Origen

En México, la vainilla se cultiva desde tiempos prehispánicos, se le considera como especie agrícola rara. Esta especie se desarrolla en clima tropical como el que predomina en la Huasteca del país (Barrera *et al.*, 2009). Las principales zonas productoras se localizan en Veracruz y Puebla, con clima húmedo tropical (Hernández, 2005).

La fuente principal de la vainilla comercial proviene de *V. planifolia*, especie vegetal que se distribuye desde México hasta el sur de Sudamérica (Grisoni *et al.*, 2007; Mino *et al.*, 2007), también aparece en muchas referencias como *V. fragrans*. Otra especie menos conocida es la vainilla de las Indias Occidentales, *V. pompona*, que también tiene potencial en la extracción de vainilla comercial. En su estado natural *V. planifolia* es una orquídea hemiepífita trepadora cuyos frutos producen la vainillina, segunda especie de precio alto en el mercado mundial, después del azafrán (Divakaran *et al.*, 2011), que es el saborizante y aromatizante de mayor uso en la industria alimenticia (Bucellato, 2011).

En México, en la región Totonacapan (Papantla, Gutiérrez Zamora, y sus alrededores) comprendida entre los estados de Veracruz y Puebla, existen cuatro sistemas de producción de vainilla: en achual (tradicional), bajo sombra de pichoco (*Eritrina* sp.), en naranjo (*Citrus sinensis* L. Osbeck) y en malla (con 50 % de luminosidad); cada uno de ellos muestra un nivel de tecnificación y uso del conocimiento tradicional en el manejo del cultivo (Díaz *et al.*, 2008).

La distribución del género en este país, abarca los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y

Quintana Roo (Salazar-Rojas *et al.*, 2012).

3.2 Plagas de vainilla

Las plagas en la vainilla no causan daños severos, sin embargo, es muy necesario tenerlas en cuenta para evitar las mermas que puedan ocasionar cuando se manifiesten. Entre las principales plagas se encuentran:

3.2.1 Insectos

Piojo colorado de la vainilla: (*Euricipitis vestitus* champ.) se localiza normalmente en el envés de la hoja y en raras ocasiones en el tallo, su presencia no afecta de manera económica, ya que solo aparece en periodos, sin embargo las lesiones que causa ayudan al desarrollo de enfermedades fúngicas. Aunque no son muy frecuentes los ataques hacia las plantas de vainilla, también se consideran plagas: torcedoras (*Clysia* sp.), las orugas suelen comerse las cápsulas, las chinches (*Spinus* sp., *Nezara* sp.). Las plantaciones de vainilla pueden ser atacados por el gusano perro (*Papilio polyxenes*), también por el piojo lanudo (*Eriosoma* sp.) y la escama ostión (*Lepidiasaphes gloverii*). Algunas veces por las condiciones de excesiva humedad, se detectan infestaciones de caracoles y babosas (Vanitha *et al.*, 2011).

3.3 Enfermedades de vainilla

3.3.1 Virus

Una de las causas de enfermedades de la vainilla son los virus entre los cuales se encuentran:

Vanilla Mosaic Virus (VMV), *Cymbidium Mosaic Virus* (CyMV) y *Tomato Ringspot Virus* (TRV). Los cuales son causantes de la distorsión en las hojas y mosaico en la *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitensis*. Una de las formas en que el virus es expandido es a través de los esquejes contaminados que se usan para la propagación de la vainilla (Farreyrol *et al.*, 2006).

3.3.2 Hongos

Este cultivo es atacado por diferentes enfermedades, como son pudriciones basales, necrosis y tizones foliares. Estudios realizados en diferentes países asiáticos y africanos, reportaron la presencia de un gran número de hongos asociados a dichas sintomatologías Bhai y Dhanesh, (2008) y Pinaría *et al.*, (2010) reportan que las principales enfermedades causadas por hongos son las siguientes:

Antracnosis de la vainilla: producida por el hongo *Colletotrichum vainillae*, se presenta como manchas circulares en las hojas, de un color oscuro, que muchas veces llegan a combinarse y forman una mancha más amplia, a medida que se desarrolla la enfermedad, estas manchas se van secando, observándose pequeños puntos negros que son los cuerpos fructíferos del hongo.

Viruela de la vainilla: causada por el hongo *Nectria vainillicola*, se manifiesta como pequeñas manchas irregulares y localizadas indistintamente en los lados de las hojas, tienen una coloración café oscura y pueden alcanzar un diámetro de hasta 5 mm.

Herrumbre de la vainilla: ocasionada por el hongo *Puccinia sinamonea* forma pequeñas manchas o puntos de color amarillo oscuro al reverso de la hoja, de donde sale la fructificación del hongo.

Podredumbre de la raíz: esta enfermedad es causada por hongos de los géneros *Fusarium* y *Phytophthora* mostrándose en los primeros años de vida de la planta. En las raíces jóvenes se presenta como pequeños puntos de color café oscuro, que se oscurecen paulatinamente conforme la enfermedad se desarrolla; ocasiona la muerte de los tejidos afectados que terminan por desprenderse del resto de la planta. De estos dos hongos el perteneciente al género *Fusarium* es el causante del mayor daño a las plantaciones de vainilla.

3.4. El género *Fusarium*

Comúnmente asociado con la aparición de enfermedades en plantas tropicales; el género *Fusarium* ocasiona daños en coronas, yemas y raíces de estas plantas (Leslie y Summerell, 2006) así como en déficits de crecimiento manifestado en la disminución de su porte, vigor y producción baja de flores (Ploetz, 2006).

Este género es responsable de producir pudriciones vasculares o de raíz en muchos cultivos y ornamentales. Las enfermedades vasculares disminuyen la capacidad de la planta para la translocación de agua y nutrientes hasta un 95 %, o que ocasiona marchitez y por siguiente la muerte de la planta (Agris, 2005).

La penetración de *Fusarium* en la planta es a través de heridas naturales dejadas por los pelos radicales o por las raíces secundarias al emerger de las raíces primarias, por heridas ocasionadas por insectos, nematodos y labores culturales. El hongo se desarrolla a una temperatura óptima que va desde 25 a 30 °C, pero se han reportado infecciones a temperaturas menores (Leslie y Summerell, 2006).

El nivel de humedad del suelo es otro factor importante pues cuando hay exceso, las estructuras de reproducción como son macroconidios, microconidios y clamidosporas germinan y penetran rápidamente en la planta. La propagación del patógeno se lleva a cabo a través del uso de plantas infectadas, labores en el suelo de cultivo, material contaminado y en contacto con raíces que crezcan alrededor de la planta y estén bajo contaminación, no obstante el viento y el agua de riego están catalogados como los principales dispersores en áreas cercanas. El hongo es capaz de sobrevivir a través de su fase saprofita en el suelo por tiempo indefinido (Agris, 2005), pero también puede sobrevivir gracias a sus estructuras de resistencia como es el caso de las clamidosporas, las cuales llegan a soportar un tiempo de latencia de 30 años o más.

3.5. Identificación de especies del género *Fusarium*

3.5.1 Técnicas morfológicas para la identificación del género *Fusarium*

En la morfología de *Fusarium* su característica principal es la forma y el tamaño de las esporas, las cuales están dispersas en el micelio aéreo o en masas limosas.

Los macroconidios son pluriseptados, curvados, poseen una célula apical más o menos puntiaguda y en algunas especies con una célula basal en forma de pie, poseen una longitud mayor a los 25 μm , presentan tres septos y una ligera curvatura (Figura 5). Cuando las cepas son cultivadas en medio de papa dextrosa agar (PDA) presentan variabilidad con respecto a la abundancia, aspecto y color del micelio, el cual puede ir desde blanco hasta violeta pálido (Seifert, 2001). Las microconidias de *Fusarium* sp. son comúnmente fusiformes,

claviformes, elipsoidales o subglobosos, sin ningún septo y con una extensión aproximada de 5 μm generadas en monofialides que crecen directamente de las hifas (Figura 4) (Leslie y Summerell, 2006).

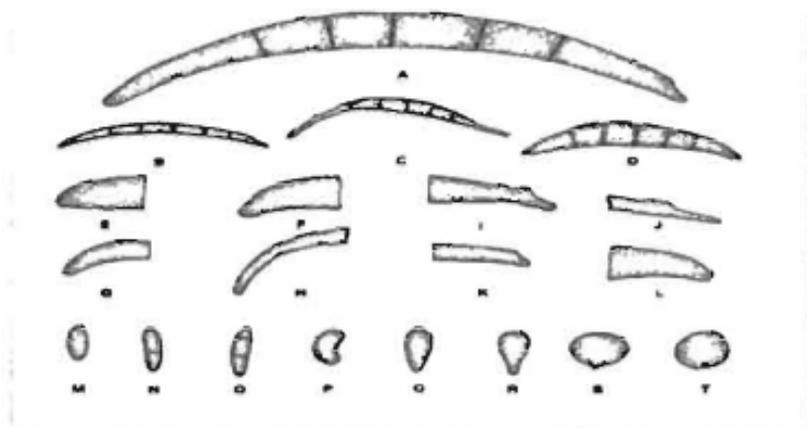


Figura 4: Características morfológicas de las esporas utilizadas en la identificación de especie de *Fusarium*. Los dibujos no necesariamente son a la misma escala. A-D: formas de los Macroconidios. A: macroconidio *Fusarium* típica. Celular apical a la izquierda, a la derecha de células basales. B: Delgado, recta, casi macroconidio como aguja, por ejemplo, *F. avenaceum*. C: Macroconidio con curvatura dorsiventral, por ejemplo, *F. equiseti*. D: Macroconidio con el lado dorsal más curvada que la ventral, por ejemplo, *F. crookwellense*. E-H: Macroconidio formas de células apicales. E: Blunt, por ejemplo, *F. culmorum*. F: papilados, por ejemplo, *F. sambucinum*. G: Hooked, por ejemplo, *F. lateritium*. H: La puesta a punto, por ejemplo, *F. equiseti*. I-L: Macroconidio, formas de células basales. I: en forma de pie., por ejemplo, *F. crookwellense*. J: la forma del pie alargado, por ejemplo, *F. longipes*. K: Claramente muescas, por ejemplo, *F. avenaceum*. L: Apenas muescas, por ejemplo, *F. solani*. M-T: microconidios formas de esporas. M: Oval. N: Dos unicelular oval. O: Tres unicelular oval. P: Reniforme. Q: obovoide con un truncado base. R: piriforme. S: napiforme. T: globoso. Fuente Leslie y Summerell, (2006).

Las clamidosporas pueden ser terminales, laterales e intercalares, las células conidiales algunas veces se transforman en clamidosporas. Ciertas especies presentan zonas concéntricas con distinta morfología macroscópica esta se debe a la secuencia de luz-oscuridad (Samuels *et al.*, 2001). Clamidosporas se forman en CLA por lo regular en un periodo de dos a cuatro semanas después de la inoculación, los cultivos en CLA por lo general se inician normalmente a partir de la germinación de conidios (Figura 5) (Leslie y Summerell, 2006).

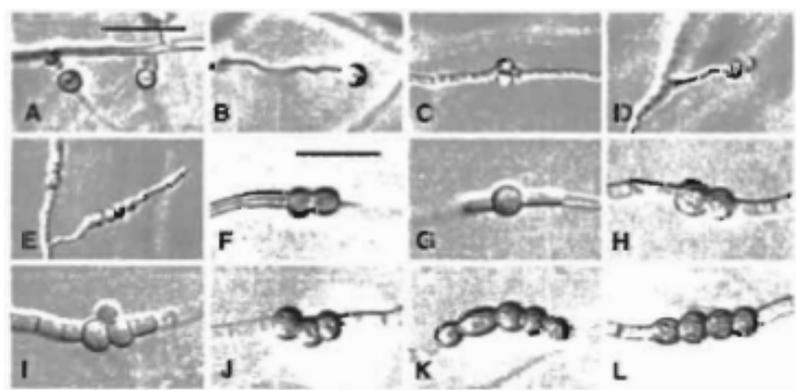


Figura 5. Las clamidosporas de especies de *Fusarium*. A-B: clamidosporas de *F. solani*. C-D: clamidosporas de *F. compactum*. E: Cadena de clamidosporas verrugosa; de *F. compactum*. F: clamidosporas de paredes lisas, de *F. solani*. G: clamidosporas de *F. scirpi*. H: clamidosporas de *F. compactum*. I: clamidosporas de paredes lisas, de *F. scirpi*. J y L: Cadenas de clamidosporas verrugosas de *F. compactum*. K: Cadena de clamidosporas verrugosas de *F. scirpi*. A-E: Barra de escala = 50 m; F-L: Barra de escala = 25 μ . Fuente Leslie y Summerell, (2006).

La morfología de las colonias es muy distinta y presenta dos tipos: una caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, presenta coloración variable puede ser de blanco a un rosado durazno pero por lo regular con un tinte violeta más fuerte en la superficie del agar y pocas microconidias llamadas del tipo miceliar y otro con formación de poco o nada de micelio aéreo y abundantes microconidias denominadas del tipo pionatal (figura 6) (Summeller, 2003).

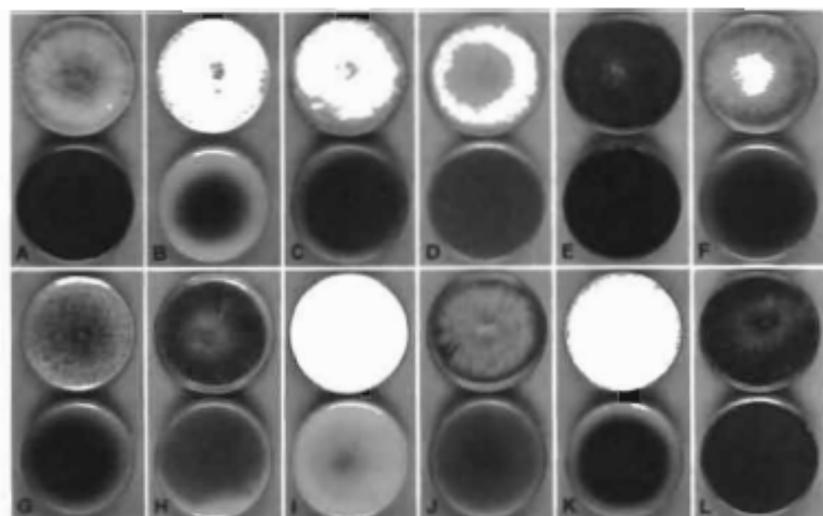


Figura 6: Morfología de las colonias de especies de *Fusarium* en papa dextrosa agar. La placa superior es la superficie superior y la placa inferior es la parte baja. A: *F. poae*. B: *F. oxysporum*. C: *F. acuminado*. D: *F. nelsonii*. E: *F. subglutinans*. F: *F. nygamai*. G: *F. pseudonygamai*. H: *F. lateritium*. I: *F. thapsinum*. J: *F. decemcellulare*. K: *F. verticillioides*. L: *F. culmorum*. Fuente Summeller (2003).

A partir de tejido de *V. planifolia* se han aislado especies de *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* y *F. desencelulare*, de estas, las especie de importancia patogénica son *F. oxysporum* y *F. solani* siendo de mayor relevancia *F. oxysporum* por su presencia a nivel global (Pinaría *et al.*, 2010).

3.5.1.1 *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum es uno de los patógenos cosmopolitas causantes de enfermedades en múltiples cultivos que limita severamente la producción en todo el mundo. Sus formas patogénicas parasitan más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, esto por los distintos mecanismos que tiene el hongo para penetrar las defensas de muchas plantas y que le permiten colonizar los tejidos vasculares de los cultivos y dar lugar a la interrupción de la translocación de agua de los tejidos, que en consecuencia causa los síntomas de marchitamiento (Lin *et al.*, 2010).

F. oxysporum es caracterizado por producir colonias de rápido desarrollo con una tasa de desarrollo diario que se acerca a 1 cm (Leslie y Summerell, 2006).

3.5.1.1.1 Formas especiales de *Fusarium oxysporum*

Este patógeno tiene varias *formas especiales* (*f. sp.*) de acuerdo con los hospedantes que infecta, respectivamente. La *f. sp.* corresponde a cepas cuyas características morfológicas son indistinguibles pero poseen diferentes propiedades fisiológicas para parasitar un hospedero específico. La *f. sp.* se emplea para categorizar aislamientos con el mismo tipo de hospedante, existen reportes de más de 70 *f. sp.* de éste patógeno (Leslie y Summerell, 2006). Para vainilla, la *f. sp.* se denomina *F. oxysporum f. sp. vanillae*.

3.5.1.1.2 Razas

Las f. sp. de *F. oxysporum* a su vez se subdividen en razas fisiológicas, con base a su especificidad patogénica sobre distintas variedades de la misma especie de planta (Garces, 2001).

Las razas se van determinando de acuerdo a los cultivares de la misma especie; una vez que son infectados por el patógeno se le conoce como raza 1, al determinar los cultivares que son resistentes a esta raza, se empiezan a cultivar hasta que son atacados por el patógeno y produzca pérdidas, esta nueva especie se le conoce como raza 2. Los síntomas que presenta la planta también varían de acuerdo a la raza por la que es atacada, puede presentar amarillamiento en hojas y tallo o solo presentar pudrición de raíz. La forma de la colonia también puede ser diferente entre las razas. En algunos casos se presentan razas falsas como es el caso de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* sub. raza tropical 4, la cual no presenta síntomas en zonas de clima templado (Nash, 2007).

3.5.1.2 *Fusarium solani*

Es caracterizado por presentar colonias de color crema a durazno, con leve coloración púrpura, es de crecimiento rápido, llega a ser de 9 cm a los ocho días después de la siembra en PDA. Las microconidias se forman abundantemente sobre microconidioforos largos, en falsas cabezas cilíndricas, de una o dos células. Las macroconidias se forman en conidioforos bien desarrollados, ramificados o no ramificados, monofialides, de cilíndricas a falcadas, es decir que, forman una curvatura semejante a la de una hoz, con células basales y apicales diferentes a las de la conidia. Las clamidosporas pueden ser reñndas u ovaladas,

presentan paredes lisas o rugosas, se presentan por lo general en pares terminales o intercaladas (Sanabria, *et al.*, 2002; Agrios, 2005).

Conforma un grupo con más de 50 especies, los cuales tienen diversas propiedades biológicas entre ellas, son causantes de enfermar a más de 100 especies de plantas (Coleman *et al.*, 2009). *F. solani* son organismos difíciles de diferenciar entre ellos ya que son muy similares morfológica y filogénicamente. *F. solani* es un patógeno que causa daño en la raíz, produce necrosis por la introducción de sus hifas a las partes internas de este órgano e invade los haces vasculares de la planta, lo que conlleva a la pérdida de la raíz causando el marchitamiento y la muerte de la planta (Zhang *et al.*, 2006)

3.5.1.2.1 Formas especiales

Las formas especiales de *Fusarium solani* no son tan específicas como las de *F. oxysporum*, que además de atacar más de un cultivo como *F. solani* f. sp. *glycines* que además de tener como hospedante a la soya también infecta distintos tipos de porotos; *F. solani* f. sp. *phaseoli* el cual ha sido mencionado como causante de la podredumbre radical en diferentes géneros de leguminosas.

3.5.2 Técnicas moleculares para la identificación del género *Fusarium*

Debido a que las características morfológicas no son lo suficientemente concluyentes para poder analizar diferencias entre cepas, se ha recurrido al análisis molecular del DNA (Riveros *et al.*, 2000).

Las técnicas moleculares pueden usarse para estudiar la estructura de la población mediante el examen de algunos rasgos y revelar información que no se puede obtener por otros

métodos. Los marcadores moleculares se utilizan para comparar regiones genéticas en los grupos de hongos. Estudios previos utilizaron técnicas moleculares para diferenciar las formas especiales patógenas de las no patógenas (Stewart *et al.*, 2006).

La técnica molecular usada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés), la cual fue descrita por el grupo de Khorana en 1972 y 1974, aunque sorpresivamente pasó desapercibida durante un tiempo; fue retomada en 1983 por Kary B. Mullis y llegó a ser una revolución en la ciencia de la vida; la técnica se automatizó y popularizó en 1988 mediante el empleo de un ADN polimerasa termoestable (Caballero *et al.*, 2001).

La PCR se realiza mediante la amplificación selectiva y exponencial de una región del ADN molde. Esta reacción es catalizada por una enzima ADN polimerasa termoestable, en presencia de dos iniciadores, denominados iniciadores diseñados para que se adhieran a los extremos de la región a amplificar. Los iniciadores hibridan con ADN desnaturalizado en dos puntos del mismo, para crear dos fragmentos que ceban a la ADN polimerasa y delimitan la región que se amplifica. Por tanto, la ADN polimerasa duplica un fragmento de ADN y, al repetir el ciclo varias veces se consigue una multiplicación del fragmento que dejan una gran cantidad de ADN observable de una sola molécula (Ward, 1994).

Para analizar la relación taxonómica entre especies, son necesarias las secuencias genéticas de uno o varios genes, entre los que comúnmente se utilizan, se encuentran partes de la región codificante del DNA ribosomal (espacios transcritos internos, ITS, por sus siglas en inglés) o el factor de elongación 1- α .

La región ITS contiene dos regiones no codificantes variables que se localizan dentro de las repeticiones altamente conservadas de ADNr, entre la subunidad pequeña, la región para 5.8S y los genes de la subunidad grande (Gardes y Bruns, 1993)

Los ITS son secuencias espaciadoras situadas entre los genes 18S, 5.8S y 28S del ADN ribosomal (Figura 7), no son regiones codificantes particulares y por lo tanto, tienen una gran variabilidad. Las regiones ITS presentan características que los hacen ideales para los estudios de polimorfismo genético entre especies, debido a que una secuencia nucleotídica corta de 300 a 600 pares de bases es fácilmente amplificable con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ciaccio, 2011).



Figura 7: Localización de los espacios ITS.

Por su parte el factor de elongación 1- α (EF-1- α), es una proteína muy conservada implicada en la traducción, que tiene propiedades necesarias para la influencia filogenética y taxonómica.

La traducción o síntesis proteica se divide en tres partes: iniciación, elongación y terminación; la elongación requiere de varias y diferentes proteínas solubles denominadas factores de elongación. En eucariotas, el alargamiento de la cadena polipeptídica requiere la acción orquestada de tres factores, sugiriendo la importancia del EF-1 α en la integridad del citoesqueleto (Pitman *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los genes factores de elongación de los organismos poseen una composición de nucleótidos altamente sesgada, se ha sugerido que en particular el EF-1 α puede aportar una estimación muy sólida de las relaciones entre los principales grupos de eucariotas (Roger *et al.*, 2014).

En la actualidad el EF-1 α se considera como un gen esencial en el análisis multigenético por las razones siguientes: 1) la presencia de una copia única en el genoma de *Fusarium*, 2) la no detección de copias ortólogas, 3) su riqueza de regiones intrónicas y alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente cercanas y 4) la posibilidad de generar cebadores universales (Figura 8) que permiten estudios a través de los límites filogenéticos del género (O'Donnell *et al.*, 2004).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización geográfica del área de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX) de la Universidad Veracruzana ubicada en Xalapa, Veracruz, México y en el Laboratorio de Parasitología situado en la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit

El material vegetal fue vainilla silvestre con síntomas de pudrición y sanas colectadas en predios de los municipios de Xalisco y Ruiz del estado de Nayarit, México. La referencia geográfica de cada predio se presenta en el Tabla 1.

Tabla 1. Ubicación geográfica de los predios seleccionados con plantas de vainilla silvestres enfermas en Nayarit.

Predios de Xalisco	Localización Geográfica	Altitud (msnm)
Malinal A	N:21.37223 W:105.04379	639
Malinal B	N:21.37172 W:105.04180	717
Malinal C	N:21.36900 W:105.03957	716
El Italiano	N:21.37707 W:104.98861	985
Oreja de Ratón	N:21.42811 W:104.88986	1005
Predios de Ruiz, Nayarit	Localización Geográfica	Altitud (msnm)
Cordón del Jilguero A	N:21.9103 W:104.95421	531
Cordón del Jilguero B	N:21.9103 W:104.95421	531

msnm= metros sobre el nivel del mar

4.2 Material vegetal

De cada predio se colectaron tres raíces (dos raíces con pudrición y una sana), una porción de tallo con síntomas de amarillamiento cortado a los 30 cm después del nivel del suelo y ocho hojas con manifestación de necrosis. Este material se recolectó de plantas de *Vanilla* sp. desarrollada de manera silvestre.

Las muestras de raíces, hojas y tallos se cosecharon con tijeras podadoras previamente desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio al 5 %. El material vegetal recolectado se empaquetó en bolsas plásticas con cierre hermético debidamente marcadas y colocadas en neveras de unice para su transporte al LATEX (referido en el punto 4.1).

4.3 Desinfestación y establecimiento de las muestras

En el laboratorio, cada muestra fue procesada de manera diferente en dependencia de su naturaleza: los tallos y hojas se enjuagaron con agua destilada y se cortaron en fragmentos de 3 a 5 mm con apoyo de bisturí, considerando que el fragmento contuviera una parte de tejido sano y una parte dañada. La parte intermedia del fragmento, es decir, parte sana de la muestra (verde) y parte dañada de la misma (oscurecida). Posteriormente, los fragmentos se desinfectaron dentro de la campana de flujo laminar, sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min, este procedimiento se realizó dos veces, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.

Las muestras de tallos y hojas se cortaron en fracciones de 3 a 5 mm en la zona periférica de la lesión y cada fragmento se colocó en cajas Petri con medio PDA (39 g de papa dextrosa agar por 1000 mL de agua destilada) previamente esterilizado en autoclave a

120 °C/15 lb/15 min. Las cajas inoculadas se almacenaron en estufa de incubación a temperatura de 25 °C durante cinco días en condiciones de oscuridad.

Con el fin de determinar la distribución de *Fusarium* a lo largo de las raíces de vainilla, estas se midieron a partir de la parte aérea (20 a 40 cm a partir del suelo) donde se origina del tallo de la vainilla hasta la punta o cofia de la raíz. Solamente se midió la raíz principal descartándose las raíces secundarias y terciarias.

Cada raíz, se seccionó en tres zonas: zona 1) los 10 cm de tejido de raíz cercano al tallo, zona 2) los 10 cm de tejido de raíz de la zona apical y zona 3) el tejido de raíz intermedio entre las zonas 1 y 2. A continuación, el tejido de las zonas 1 y 2 fue seccionado en fragmentos de 1 cm. Para el aislamiento de hongos a partir de tejido de raíz de la zona 3 (zona intermedia) se seccionó 1 cm por cada distancia de 10 cm de tejido de raíz. Los fragmentos de 1 cm se les aplico una desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min, después se sumergieron en alcohol al 70 % durante 2 min y se les aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril; para su establecimiento en las cajas Petri con PDA preparado y esterilizado previamente, a los fragmentos de 1 cm se les retiraron los primeros y últimos 2 mm de raíz y se realizó un corte longitudinal para dividir los fragmentos en dos parte. Las cajas con medio PDA que fueron dispuestas en estufa incubadora a 25 °C hasta observar el desarrollo de micelio.

4.4 Aislamiento y obtención de cultivos fúngicos puros

Una vez que se observó el desarrollo del micelio, se seleccionaron aquellos cuerpos fúngicos que presentaron coloración desde blanco-crema hasta un violeta oscuro. Una muestra de micelio de acuerdo al color se resembró en cajas petri con medio PDA,

Después del desarrollo de la colonia, para garantizar la pureza genética del aislamiento de *Fusarium* sp. se llevó a cabo un aislamiento monospórico; es decir, se estableció una sola espora en una caja de Petri con PDA. La realización de este método se llevó a cabo de la siguiente manera: una porción del micelio se colocó en una caja nueva con PDA, se le adicionaron tres gotas de agua destilada estéril, esparciéndose dentro de la caja con ayuda de una barrilla de metal con forma triangular. Las cajas sembradas se incubaron a una temperatura de 25 °C por 24 h. Cumplido el tiempo, con ayuda del microscopio compuesto colocado en el objetivo 4x, se procedió a extraer una espora germinada con un asa de disección y se colocó en una caja nueva con SNA. Las cajas se sellaron y se colocaron en la estufa de incubación Scorpion Scientific XMT6-808, a temperatura de 26 °C durante cuatro días, posteriormente, se pasaron a diferentes medios de cultivo, papa dextrosa agar (PDA), agar clavel (CLA) y agar sintético nutricional (SNA), los cuales fueron preparados como se indica a continuación.

El medio PDA se preparó pesando 39 g de PDA para 1 L de agua destilada y se esterilizó a 120°C por 20 minutos en una autoclave (Felisa). Este medio se utilizó para observar las características de la colonia,

El medio CLA se preparó pesando 20 g de agar agar para 1 L de agua una vez esterilizado se

vacío a cajas de Petri y se le colocaron fragmentos de hoja de clavel previamente esterilizadas en el centro de la caja. El CLA se utilizó para la producción de clamidosporas así como la obtención de esporocarpios del hongo.

El medio SNA se preparó pesando 1 g de HK_2PO_4 , 1 g de KNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl, 0.2 g de Glucosa, 0.2 g de Sacarosa y 13.2 g de agar, para disolverlos en 1 L de agua destilada estéril. Este medio se utilizó para la producción de microconidias así como para distinguir las distintas formas de hifas.

4.5 Identificación morfológica

La identificación de los aislamientos se llevó a cabo siguiendo la metodología de Leslie y Summerell (2006). Las características de la colonia de hongos crecidos en PDA que se tomaron en cuenta fueron: color de colonia la cual se tomó de acuerdo a la coloración que presentaron las cepas, para ellos se utilizó un criterio de coloración basados en presencia de pigmentación, y crecimiento determinado a los 10 días tomándose como rápido crecimiento las cepas que alcanzaron más de 8 cm en las caja, moderado crecimiento aquellas que su crecimiento fue de 7 a 8 cm y lento las cepas que presentaron <6 cm. Las estructuras microscópicas en los hongos se observaron en colonias crecidas en medios CLA y SNA a los 10 a 15 días, incubados a 26 °C. Cada caja se observó con ayuda de un microscopio compuesto marca ZEISS modelo LCS KF2. Se tomó en cuenta la conformación de las hifas (monofiláides o polifiláides), así como la forma de las macroconidios (tamaño, número de septos, forma apical y basal) y la forma de los microconidios, así como en la forma en la que se producían (falsas cabezas, cadenas cortas y cadenas largas). Del mismo modo,

la formación de *esporas* en el micelio aéreo y la forma en que se presentaban (simples, pares, cadenas o grupos).

4.6 Extracción de ADN

El ADN se extrajo de acuerdo a la técnica de bromuro de hexadeciltrimetilamonio también conocida por sus siglas en inglés (CTAB) (Stewart y Via, 1993). Cada hongo fue desarrollado en PDA durante ocho días. A cada caja de cultivo se adicionó 2 mL de solución amortiguadora STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) para resuspender el micelio.

Se tomaron 40 μ L de la suspensión celular y se colocaron en mortero estéril. A continuación se le agregó 600 μ L de buffer de extracción (CTAB 2 %, NaCl 1.42 M, EDTA 20 mM, Tris HCl 1 M, pH 8, PVP 40 al 2 %, ácido ascórbico) El tejido se homogenizó con un pistilo congelado, el homogenizado se transfirió a un tubo para centrifuga estéril, para adicionar 800 μ L de solución cloroformo-alcohol isomilico (24:1 v/v), la solución se agitó hasta mezclar homogéneamente, centrifugar a 1000 xg durante 5 minutos.

El sobrenadante se transfirió de 500 a 600 μ L a un tubo estéril, se adicionaron 700 μ L de isopropanol, se incubó por cinco min a temperatura ambiente, después se centrifugó a 14000 xg por 20 min; el sobrenadante se vertió y se puso a secar el pellet; para ello, los tubos se invirtieron sobre toallas de papel, el pellet se resuspendió en 100 μ L de agua libre de nucleasas.

El grado de integridad del ADN se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, en una cámara de electroforesis horizontal marca BioRad modelo Powerpac Basic a 90

V. Los geles se tificaron en 100 mL de solución TBE 1x adicionado con 2 μ L de bromuro de metilo (10 mg mL⁻¹) durante 20 min. Estos, se visualizaron en un fotodocumentador bioimagen system macrobis. La cuantificación del ADN se realizó en un biofotómetro BioRad donde se colocaron 999 μ L de agua destilada estéril y 1 μ L del ADN extraído; la calidad del ADN se midió mediante el cálculo de la relación A_{260}/A_{280} .

4.7 Amplificación del DNA por PCR

Para el análisis molecular de los hongos se amplificaron los genes comúnmente usados para *Fusarium*: gen DNA ribosomal (ITS1-5.8S-ITS2) y el factor de elongación 1 α (EF-1 α).

4.7.1 Amplificación DNA ribosomal (ITS1, ITS2 y el gen 5.8 S rRNA)

Las recomendaciones de Batlle-Viera y Pérez-Vicente (2009) se siguieron. La mezcla de reacción contiene 20 pM de cada oligonucleótido ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA GCT GCG G-3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC'3), 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de dNTPs, 1x de tampón Taq DNA pol y 1 U de Taq DNA pol (Promega). El volumen final de reacción fue de 25 μ L.

Se aplicó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 min y posteriormente 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55.5 °C por 2 min, extensión a 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

4.7.2 Amplificación del gen EF-1 α

Las ampliaciones se llevaron a cabo mediante la metodología propuesta por Pinaría *et al.* (2010) con algunas modificaciones. La reacción se realizó en un volumen de 25 μ L, que

contiene 1x de TaqDNA buffer, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.20 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNApol (promega), 20 pM de cada primer EF-1 (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) y EF-2 (GGARGTACCAGTG/CATCATGTT), y -50-100 ng de ADN genómico. La reacción se desarrolló bajo el programa de ciclos térmicos siguiente: una desnaturalización inicial de 2 min a 97 °C, 35 ciclos de desnaturalización a 96 °C por 1 min, alineamiento a 58 °C por 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min, seguido por una extensión final a 72 °C durante 7 min.

4.7.3 Secuenciación y análisis de los amplificadores

Los productos de amplificación se purificaron con el método de gel Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se cuantificaron con un espectrofotómetro sobre la base de que una unidad de absorbancia a A_{260} nm corresponden a 50 ng/ μ L. Se contó con los servicios de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias se editaron con el programa BioEdit. Se utilizará el procedimiento Alineamiento Múltiple (Bootstraps = 1000; Gap Open Penalties= 15; Gap Extend Penalties = 3) del software BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999).

El análisis de la secuencia se hizo por duplicado con cada aislamiento fúngico. Los datos de secuencias se analizaron en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el sistema Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Geiser *et al.*, 2004).

Las secuencias de ITS se alinearon con el programa BioEdit, se determinó el modelo de evolución con el software JModelTest. Se realizó la búsqueda del árbol de máxima

verosimilitud (Maximum Likelihood) con ayuda del software RxxMLgui y se visualizó en el software Figtree. Se incluyeron secuencias reportadas para las especies de *Fusarium* y se realizó el análisis filogenético considerando un bootstrap con 1000 permutaciones.

El modelo de evolución que se obtuvo fue el Jukes and Cantor (JC) (1969), el cual dice que todas las bases nitrogenadas pueden sufrir la misma tasa de mutación (A=0.25, C=0.25, T=0.25 y G=0.25) este es uno de los modelos más sencillos que nos indica un solo tipo de sustitución en nucleótidos y el número de parámetros es el mismo número de longitud de ramas del árbol, Valcárcel obtenido de www.uam.es/docencia/bcw/cursos/valcarcel/filogenia/Texto_2_1.pdf.

La reconstrucción filogenética de la región del factor de elongación *la* se realizó en el software Tree Analysis Using New Technology (T.N.T. 1.0) (Goloboff, 2000). Se realizó una búsqueda heurística (5000 réplicas) utilizando TBR (Tree Bisection Reconnection). Se llevó a cabo un remuestreo (1000 bootstraps) para evaluar el soporte de la topología generada. Se obtuvieron secuencias de diferentes especies del género *Fusarium*, incluidas dos secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* reportadas por Pinaris *et al.* (2010) (n° acceso Genbank KM115183, KM115186). Se utilizó una secuencia de *Cyanonectria buxi* CBS 125547 (n° acceso Genbank HQ728152) al ser el género más cercano a *Fusarium* sp. (Lombard *et al.*, 2015).

4.8 Pruebas de patogenicidad

Una vez realizada la caracterización morfológica y molecular de los hongos, se procedió a evaluar su grado de patogenicidad en *Vainilla pompona*. Para ello, se obtuvo material vegetal de vainilla (hojas y tallo) de la zona de estudio. Para la prueba, de manera previa, se realizó un análisis para asegurar la sanidad del material.

Se emplearon los métodos propuestos por Adame-García *et al.*, (2011) que se describen a continuación.

4.8.1 Prueba de patogenicidad en hojas

Las hojas de vainilla se lavaron con una solución de jabón líquido y se desinfectaron por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 2 % (v/v) durante 2 min. Se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Las hojas se colocaron en cámara húmeda elaborada con platos desechables de unicel, papel absorbente estéril y envoltura de plástico cleanpack. Por cada hoja se colocaron cuatro fragmentos de agar con micelio del hongo (~5 mm de diámetro) crecido en medio PDA durante 10 días de incubación a 25 ± 1 °C. Tomando como referencia la nervadura central, a cada hoja se le hicieron dos incisiones del lado izquierdo al momento de la inoculación. Como testigo se empleó una hoja de vainilla sana con cuatro fragmentos de PDA libre del hongo. Las cámaras húmedas (100 % de humedad relativa) se colocaron a 25 ± 1 °C durante 12 días y se hicieron monitoreos diarios para detectar las cepas que generaron daño al tejido. Como prueba confirmativa se re-aisló el hongo en cuestión a partir de aquellas muestras donde se observó daño.

4.8.2 Pruebas de patogenicidad en tallos enraizados

Para esta prueba los tratamientos se establecieron en bolsas negras (10x15 cm) con 500 g de suelo inoculado con 10 mL de suspensión de esporas (10^6 esporas mL⁻¹) de *Fusarium* sp. de 12 días de crecimiento en PDA a 26 ± 1 °C. La suspensión de conidios inicial se preparó añadiendo 2 mL de solución de Tween 20 (20 %) a la caja Petri que contiene el micelio.

Cada suspensión de conidios se vació en tubos de ensayo con 8 mL de agua destilada estéril y se mezcló con ayuda de un vortex. A partir de éstas se realizó de manera individual, suspensiones de esporas a una concentración de 10^6 .mL⁻¹ determinadas por conteo en cámara de Neubauer. Se preparó además una solución testigo sin inóculo fúngico, conteniendo 2 mL de Tween 20 (20 %) y 8 mL de agua destilada estéril.

Tallos enraizados de ~30 cm longitud con dos nudos se utilizaron. Los brotes se sembraron dos días después de la inoculación del hongo al suelo. Momentos antes de la siembra, con una navaja estéril se realizó una incisión de 1 cm de longitud a la raíz y a la porción del esqueje que estaría en contacto con el suelo. Los tallos se regaron tres veces por semana. El ensayo se estableció bajo un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Se evaluó el nivel de daño a los 60 días después de la siembra de los tallos. Se determinó si el esqueje presentaba daño o no. Los postulados de Koch se aplicaron para confirmar la presencia del hongo inoculado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Material colectado

Las muestras empleadas para este estudio se colectaron en los predios del Cordón del Jilguero del municipio de Ruiz y el predio Italiano, Oreja de Ratón y El Malinal del municipio de Xalisco del estado de Nayarit (Cuadro 1). Se reconoce que estos materiales pueden estar emparentados con *Vanilla pompona* de acuerdo a las características propuestas por Soto y Cribb (2010), quienes encontraron poblaciones de esta especie en el municipio de Ruiz. Sin embargo, para los materiales del municipio de Xalisco, no se puede indicar lo mismo ya que no se encuentran antecedentes sobre la presencia de individuos de esta especie en esta comunidad, por lo tanto, hacen falta estudios morfológicos y moleculares para determinar si estas vainillas también corresponden a la especie *pompona*. Debido a lo anterior, estas vainillas aún se pueden considerar como *genosipos silvestres* (Figura 8).



Figura 8. Plantas de *Vanilla* sp. localizadas de manera silvestre: A) Municipio de Ruiz, B) Municipio de Xalisco.

La vainilla se encuentra sobre árboles nativos del lugar entre plantaciones de café o en medio de la zona de bosque tropical donde no existe un cultivo establecido (Tabla 2). algunas de ellas se localizan en lugares muy poco accesibles, por lo regular se localizan en zonas con un cuerpo de agua ya sea un arroyo o un nacimiento de agua.

Tabla 2: Número de plantas por predio y tutor donde se desarrollan.

Predio	Número de plantas	Tutor
Malinal A	1	Roble (<i>Quercus</i> sp.)
Malinal B	1	Jicarillo
Malinal C	1	Encino (<i>Quercus</i> sp.)
El Italiano	3	Levadura y Encino (<i>Quercus</i> sp.)
Oreja de Ratón	1	Jicarillo
Cordón del Jilguero A	3	Café y Trompeta (<i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol)
Cordón del Jilguero B	2	Amayansillo y Tepeguacate

Las vainillas están adaptadas a esos lugares, pues se observa que sin la intervención humana para llevar a cabo un proceso de fecundación, estas son capaces de producir sus flores y en consecuencia frutos, característica que se ha perdido casi en su totalidad en plantaciones comerciales extensivas de *V. planifolia* (Hernández, 1997). Este fenómeno podría explicarse por la presencia de los polinizadores naturales de la vainilla en las zonas de estudio, sin embargo hace falta profundizar en este punto pues muestra una gran relevancia, debido a que con estas condiciones favorables la vainilla puede convertirse en un cultivo relevante para Nayarit, por la gran demanda comercial que tiene y por ser el segundo lugar en especies aromáticas después del azafrán, lo que ayudaría a reducir los costos de producción pues se ahorraría el gasto en la mano de obra para realizar la polinización.

La vainilla en Nayarit no cuenta con ningún mantenimiento por parte de los propietarios de los predios, en ciertos casos es considerada como una especie parásita o maleza hacia su cultivo, lo que ocasiona que los productores las eliminen de su plantación.

Todas las plantas de vainilla mostraron una coloración amarillenta en la parte baja del tallo, la cual está en contacto con el suelo y manchas necróticas en las hojas. Gran parte de las raíces presentaron pudriciones a lo largo de ellas (Figura 9), en algunos casos, la raíz principal se encontró cortada con presencia de podredumbre en la parte terminal, esto se tomó en cuenta para denominarla como raíz enferma por *Fusarium*. La raíz sana fue aquella que no presentó daño que concordara con los daños causados por *Fusarium*.

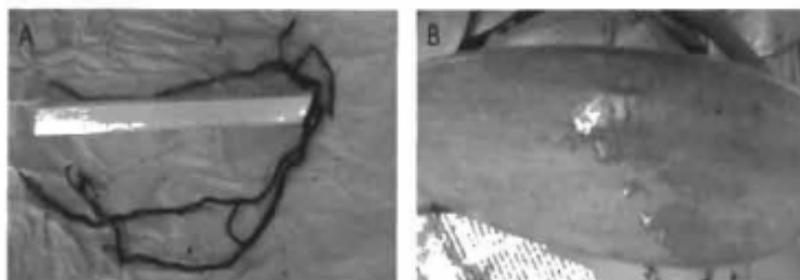


Figura 9: Aspecto que presentaron la raíz y hoja de *Vanilla pompona* que se utilizaron para el aislamiento de *Fusarium sp.*

5.2 Aislamiento y obtención de cultivos fúngicos puros

De cada localidad se obtuvieron diferente número de cepas, a las cuales se les asignó una clave (Tabla 3) compuesta de letras y números; la letra indica su lugar de procedencia y el número el fragmento de la raíz del que fue extraído. En total se obtuvieron 40 cepas de *Fusarium sp.*

En hojas no se obtuvieron cepas de *Fusarium* de ningún predio, posiblemente porque este hongo afecta hojas jóvenes como lo indica USAID-RED (2005). En tallo, por cuestiones técnicas únicamente se aislaron dos cepas de este tipo de hongo, estas fueron las cepas BCA1 y BCBI del municipio de Ruiz. Para el aislamiento de *Fusarium* a partir de tejido de raíz se usaron en total 21 raíces, de las cuales 7 fueron sanas o con daño leve y 14 enfermas. De las raíces enfermas, dos presentaron deterioro avanzado ya que el daño comprendía entre en 30-50 % de la longitud de la raíz, cinco se mostraron moderadamente enfermas (15-30 %) y siete poco enfermas (<10 % de daño).

Tabla 3. Claves que se utilizaron para identificar los hongos cada cepa de hongo aislada según el predio, la raíz y el fragmento.

Predio	Número de fragmentos	Clave de hongo
Malinal A	10	A1, A2, A3, A4, A7, A8, A9, A10
Malinal B	10	B1, B2, B3, B3 ₂ , B7, B10
Malinal C	16	C10, C16
El Italiano	29	R1-3, R1-5, R1-7, R1-9, R1-10, R1-15, R1-20, R1-24, R1-25, R1-26, R1-28, R1-28b
Oreja de Ratón	26	R2-1, R2-7, R2-9, R2-10, R2-11, R2-12, R2-16, R2-21, R2-25, R2-26
Cordón del Jilguero A	10	BCA1
Cordón del Jilguero B	10	BCB1

En los tres predios muestreados, las plantas presentaron daños parecidos a los provocados por *Fusarium*: alteración que pudo ser ocasionado por el propio productor al pasar sobre ellas sin cuidado o al hecho de hacerles heridas al cortarlas por ser consideradas plantas saprófitas para el cultivo de café. En este tipo de lesiones es por donde *Fusarium* penetra al tejido del vegetal pues se conoce que este hongo sobrevive en el suelo hasta que encuentra un huésped, donde las hifas penetran por las magulladuras causando necrosis en la parte de la planta que infecta (Abawi, 1989; Abawi y Pastor-Corrales, 1990). Las matas con mayor lesión se localizaron en Malinal, específicamente, las raíces más enfermas pertenecieron a los predios de Malinal A y C (Tabla 4)

Tabla 4. Zonas de aislamiento de *Fusarium* a lo largo de las raíces de *vanilla pompona*.

	en I					en II					en III				
	ENFERMA					ENFERMA					SANA				
	10cm					10cm					7cm				
Mácula A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	10cm					10cm					7cm				
Mácula B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	4cm					8cm					7cm				
Mácula C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	16cm					22cm					15cm				
El Salino	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	4cm					9cm					6cm				
Orca de Rapa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	15cm					13cm					9cm				
Castro del Zorro A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	20cm					6cm					18cm				
Castro del Zorro B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

En 10 de las 14 raíces enfermas fue posible aislar cepas de *Fusarium* a partir de los primeros y últimos 10 cm de su longitud (Figura 10), del total de segmentos de tejido intermedio establecido solo se encontró crecimiento de hongo en dos trozos de 1 cm, lo que indica que en un tejido considerado por su apariencia enfermo no solo puede ser afectado por la presencia de este hongo sino que también es posible sea por la influencia de otro factor biótico o abiótico existente en su entorno y que no fueron identificados en este estudio. Las raíces sanas solo presentaron crecimiento de hongos en la zona apical que está en contacto con el suelo (Figura 11). En muchos casos la parte apical (cofia) de las raíces enfermas estuvo ausente, lo cual está descrito como una sintomatología típica de infecciones ocasionadas por los hongos del género *Fusarium*, ya que sus hifas al invadir los haces vasculares en las plantas crean un taponamiento, lo que provoca una pudrición y por consiguiente la separación de esta de la zona no funcional (Ploetz, 2007).

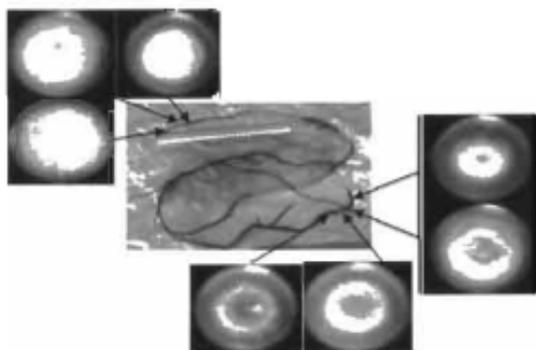


Figura 10. Zona de aislamiento de *Fusarium* sp. a partir de una raíz de *Vanilla pompona* con síntomas de pudrición.

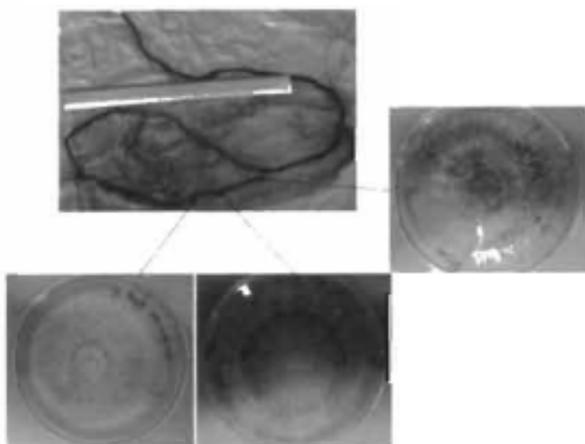


Figura 11. Zonas de aislamiento de *Fusarium* sp. a partir de una raíz de *Vanilla pompona* sin síntomas de pudrición.

5.3 Identificación morfológica de *Fusarium* sp.

Pigmentación de cepas. Las colonias presentaron diferencias de pigmentación únicamente en medio PDA (Figura 12), de acuerdo al cromatitmo, las cepas se separaron para su identificación en cuatro grupos. En coloración blanco-café, de tonalidad blanco, en rosa-blanco y las de color violeta, donde estas últimas fueron las más abundantes (Tabla 5).

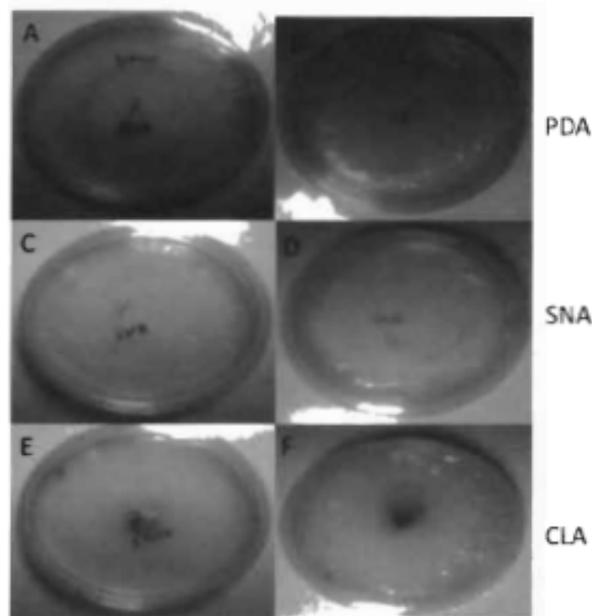
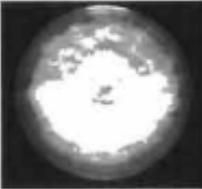
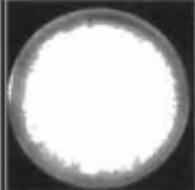
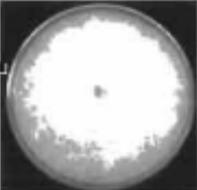
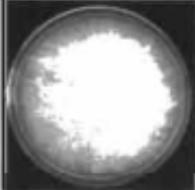


Figura 12. Crecimiento de *Fusarium* en los diferentes medios de cultivo. A) y B) medio PDA, C) y D) medio SNA, E) y F) medio CLA.

Tabla 5. Agrupación de las cepas de *Fusarium* de acuerdo a la coloración del micelio desarrollado en medio PDA.

Grupo	Color	Número de aislados fúngicos.	Clave de la cepa	Fotografía del cultivo
1	Violeta	22	R1-5, R1-9, R1-10, R1-26, R1-25, A-1, R2-10, A-2, B-1, B-1, 7, A-9, B-10, R2-12, R2-16, A-7, R2-21, C- 16, R1-3, R2-25, B- 10, C-16, BCA1	
2	Blanco	15	R1-11, BCB1, R1-26, R2-26, R2-9, R1-28, A-4, R2-11, R1-28, R1-28, A-3, A-8, B-1	
3	Blanco café	1	R1-2	
4	Rosa blanco	2	R2-7, R2	

En *Fusarium*, las condiciones del medio de cultivo son un factor importante para la producción de pigmentos; algunas especies son fotosensibles, lo que puede ocasionar que varíen ampliamente en sus coloraciones (Leslie y Summerell, 2006). Los aislamientos obtenidos presentaron una coloración en varias tonalidades púrpuras; este tipo de coloración es característico de *Fusarium* (Britz *et al.*, 2002) y se debe a que algunos metabolitos secundarios están presentes en el hongo; entre los compuestos químicos naturales que presenta este hongo se encuentra a bikeverin, beauvericin, fumonisinas, ácido fusárico y fusarin C (Brown *et al.*, 2012). El pigmento rojizo del micelio es conocido con el nombre de bikeverin, esta coloración puede ser afectada por la fuente de nitrógeno o la acidez del medio tomándose desde un color violeta oscuro a unas tonalidades blanco a blanco durazno (Wiemann *et al.*, 2009). Para el caso de *F. oxysporum*, se presentaron colonias con micelio aéreo inicialmente blanco y con cambios en el tiempo a color rosa pálido o violeta, resultando que en cierta forma coinciden con lo reportado por Díaz *et al.*, (2007) al mencionar que las colonias de *Fusarium* inicialmente son incoloras pero conforme maduran adquieren coloración crema o amarillo pálido, pero que bajo ciertas condiciones pueden adquirir coloraciones que van de un rosa pálido a un violeta oscuro.

Crecimiento. El crecimiento de *Fusarium* es determinado por factores abióticos como son la temperatura, el pH y la luz, aunque también depende de los nutrientes que contenga el medio de cultivo como son nitrógeno y carbono (Kavanagh, 2005). En PDA, las cepas produjeron abundante y denso micelio en la superficie del medio, de acuerdo Leslie y Summerell (2006), esto es debido a que este sustrato es rico en carbohidratos que permite el desarrollo de esas estructuras fúngicas.

En este estudio, las cepas presentaron diferencias en sus patrones de crecimiento, de modo que estos se clasificaron en tres grupos: 1) crecimiento rápido, 2) moderado y 3) lento (Figura 13); los resultados indican que de las 40 cepas obtenidas más del 50 % de las colonias mostraron rápido crecimiento (Tabla 6). De esta manera Santa *et al.*, (2012) encontraron en tallos de vainilla, colonias de *F. oxysporum* de rápido crecimiento con micelio aéreo inicialmente blanco y con cambios en el tiempo a color púrpura, por lo que se considera que este hongo es el agente causal de la pudrición de la parte basal del tallo y raíz de esta especie (Pinaría *et al.*, 2010) y tanto en cultivares de ajo como en otros cultivos *Fusarium* es el fitopatógeno más común (Ochoa *et al.*, 2012). Esta información es un punto de partida para realizar recomendaciones de manejo fitosanitario para minimizar o evitar pérdidas en este cultivo.

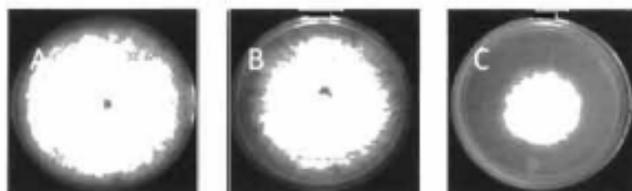


Figura 13: Aspecto de las cepas de *Fusarium* sp. aisladas de *V. pompona* de acuerdo al crecimiento en PDA a los 10 días a 25°C: A) rápido, B) moderado y C) lento.

Tabla 6. Agrupación de las cepas de *Fusarium* sp. aisladas de *V. pompona* de acuerdo al crecimiento en PDA a los 10 días después de la inoculación a 25 °C.

Velocidad de crecimiento	Número de Cepas	Clave de cepas de <i>Fusarium</i> sp.
Crecimiento lento	6	R2-10, R1-28, R2-25, B-7, R1-16, BCA1
Crecimiento moderado	11	R1-9, R1-26, R2-9, R1-7, B-10, A-7, C-16, R1-24, A-3, A-8, B-1,
Crecimiento rápido	23	R1-15, BCB1, R1-5, R1-10, R1-20, R1-25, A-1, A-4, A-2, R2-11, A-9, R2-12, R2-21, R1-3, R2-1, R2-7, A-10, B-2, B-3, C-10

Estructuras microscópicas. En medio SNA las 40 cepas presentaron macroconidios de tres a cinco septos; en 38 colonias, estas estructuras se observaron ligeramente delgados, curvos, con una célula basal en forma de pie, coincidiendo con *Fusarium oxysporum*. También se encontraron dos cepas con estructuras más gruesas y con célula basal en forma cilíndrica concordando con *Fusarium solani* (Figura 14). Los macroconidios son una estructura muy importante en la identificación de especies del género *Fusarium*, la morfología de esta estructura en algunos casos es suficiente para identificar hasta la especie (Agrios, 2005). De este modo se encontró que de las cepas aisladas, 38 se identificaron como *Fusarium oxysporum* y dos cepas como *Fusarium solani*.



Figura 14: Estructuras microscópicas de *Fusarium*. A) esporocarpio B) masa de macroconidios C) macroconidios de *F. oxysporum* D) macroconidios de *F. solani*.

En todos los aislados de *Fusarium*, los microconidios se observaron de manera abundante, dispuestos en monofialides con falsas cabezas, lo que concuerda con 12 especies de *Fusarium* de acuerdo a las características reportadas por Leslie y Summerell (2006), pero solo *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* son especies asociados con vainilla que pueden infectar y colonizar como un hongo patógeno (Pinaria *et al.*, 2010). Para distinguir estas dos especies se utilizó como referencia lo largo de la fialide con lo cual se encontraron 38 cepas con fialide corta corroborando que es *F. oxysporum* y 2 con fialide larga coincidiendo con *F. solani*.

Los microconidios se mostraron de forma oval sin septos (Figura 15). Leslie y Summerell (2006), describen las microconidias de *F. oxysporum*, de forma oval, elíptica o en forma de riñón, sin presencia de septos, se presentan en el micelio aéreo en falsas cabezas, en monofialides cortas. Mientras para *F. solani* de forma oval, elipsoide, en forma de riñón y fusiforme, por lo general sin septos aunque ocasionalmente presentan 1 o 2 septos, se presentan en falsas cabezas al final de monofialides largas.



Figura 15: Forma de las fialides. A y B) monofialides con falsas cabezas de *F. oxysporum* y C) monofialíde falsa cabeza de *F. solani*.

En medio CLA, a los 17 días se observaron las clamidosporas, las cuales se presentaron en la mayoría de los aislados de manera abundante, con forma esférica y de forma terminal e intercalada en las hifas, presentándose de forma simple, en pares y solo en dos aislados se mostraron clamidosporas en cadena cortas de tres a cuatro, los cuales son B-7 y R2-1 (Figura 16). Las clamidosporas son importantes para la descripción de varias especies de *Fusarium*, ya que con base a su presencia o ausencia se puede determinar la especie de este género, pero también la disposición y la forma en que se presentan puede tomarse como una característica para su identificación (Leslie y Summerell, 2006). Estas estructuras poseen la capacidad de sobrevivir inactivas en el suelo durante varios años en condiciones desfavorables e incluso en ausencia de plantas huésped (Freeman y Maymon 2000; Hennessy *et al.*, 2005) y permanecen latentes hasta que encuentran las condiciones apropiadas para germinar (Morse *et al.*, 2000)



Figura 16: Tipo de clamidosporas desarrolladas por *Fusarium* en medio CLA a 25 °C durante 20 días. A) Clamidospora en cadena, B) clamidosporas simples y en pares.

De las muestras obtenidas se lograron identificar morfológicamente dos especies de *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. solani*) cuyas características coinciden con las reportadas por Ochoa *et al.* (2012) también reconocidos como hongos causales de la pudrición basal en cultivares de ajo y en cereales (Strausbaugh *et al.*, 2005); con estos resultados se corrobora, que estos géneros son patógenos comunes en plantas o semillas distintas.

Aun cuando se han logrado avances en la identificación de muchos hongos, aún existe dificultad para el adecuado reconocimiento de ciertos géneros y especies de este grupo de organismos. La identificación basada en la morfología presenta en ocasiones un importante grado de dificultad, sobre todo para distinguir especies cercanas, con características fenotípicas muy similares (Ochoa *et al.*, 2012). La identificación por métodos moleculares es una opción para confirmar las identidad de estos hongos y resolver dudas sobre su taxonomía (Unda *et al.*, 2011; Chandra *et al.*, 2011); por ello, en este estudio se procedió a amplificar la región ITS del gen RNA ribosomal y del gen factor de elongación 1- α para corroborar la identidad morfológica de los hongos de *Fusarium* aislados de *Vainilla* sp de Nayarit.

5.4 Análisis molecular

El ADN extraído se observó en geles de agarosa (0.8 %) para determinar su integridad y se cuantificó en el Biofotómetro, dando valores de 200 a 3000 ng/ μ L, con una relación de 260/280 entre 1 a 2.20.

Los amplificadores de ITS generaron un producto de 400-500 pb, lo que concuerda con lo obtenido por Fraire (2010), Ochoa (2007) y Ochoa *et al.*, (2012) para hongos del género *Fusarium* (Figura 17). El análisis BLAST dio una similitud de 98 % a 100 % con secuencias de *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* y *F. oxysporum*, pero las secuencias de B7 y R2-1 reportadas morfológicamente como *F. solani* dieron valores de similitud de 78% y 89% con *Fusarium* sp. y a *F. oxysporum* respectivamente. Además de 3 cepas que aliniaron con *F. oxysporum* f. sp. *Ciceris* y 9 con *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (Tabla 7). Las secuencias se compararon con las secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* obtenidas por Adame-García, *et al.* (2015), a partir de muestras de Veracruz, México.

La identificación morfológica determinó que se encontraron dos cepas de *F. solani*, pero molecularmente una cepa se alinea con *F. oxysporum*, y la otra solo se reporta como *Fusarium* sp. esto se debe a la alta variabilidad morfológica que presenta *F. oxysporum* en los medios de cultivo, por consiguiente varía en sus características morfológicas, por esto es necesario recurrir a los análisis de ADN (Chandra *et al.*, 2011). Riveros *et al.*, (2001) encontraron que en base al análisis de ITS una cepa que se identificó morfológicamente como *F. solani*, se agrupó genéticamente dentro del grupo de *F. oxysporum*, lo que concuerda con el resultado obtenido en este trabajo.

Tabla 7. Similitud de cada aislados de *Fusarium* sp. obtenidos a partir de *Vanilla pompona*, en relación con secuencias de la región ITS registradas en GenBank.

Clave del aislado fúngico	Identidad de la cepa similar	Clave de secuencia en Genbank	Índice de Similitud
R1-2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	DQ906172.1	95%
R1-3	<i>Fusarium oxysporum</i>	KJ494176.1	97%
R1-5	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM979995.1	100%
R1-7	<i>Fusarium oxysporum</i>	XJ51980005.1	100%
R1-9	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM979515.1	98%
R1-10	<i>Fusarium oxysporum</i>	KP276620.1	100%
R1-20	<i>Fusarium oxysporum</i>	LC026138.1	99%
R1-24	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM979515.1	100%
R1-25	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM979585.1	100%
R1-26	<i>Fusarium oxysporum</i>	XJ51980005.1	100%
R1-28	<i>Fusarium oxysporum</i>	KP276620.1	99%
R2-1	<i>Fusarium</i> sp.	EU091028.1	89%
R2-7	<i>Fusarium oxysporum</i>	HQ695889.1	97%
R2-9	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005088.1	100%
R2-10	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005087.1	100%
R2-11	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005086.1	100%
R2-12	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM980004.1	100%
R2-16	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM979996.1	99%
R2-21	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM979990.1	100%
R2-25	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005084.1	100%
R2-26	<i>Fusarium oxysporum</i>	LC026138.1	100%
A1	<i>Fusarium oxysporum</i>	KP068826.1	100%
A2	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM980004.1	100%
A-3	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF495238.1	100%
A4	<i>Fusarium oxysporum</i>	EU819371.1	100%
A7	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005086.1	99%
A-8	<i>Fusarium oxysporum</i>	JX519537.1	99%
A9	<i>Fusarium oxysporum</i>	KJ528881.1	100%
A-10	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005087.1	96%
B-1	<i>Fusarium oxysporum</i>	XK519577.1	100%
B-2	<i>Fusarium oxysporum</i>	KP687807.1	100%
B-3	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005086.1	100%
B3 ₂	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005087.1	100%
B-6	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	KM005080.1	99%
B-7	<i>Fusarium oxysporum</i>	JQ516465.1	78%
B-8	<i>Fusarium oxysporum</i>	KP276620.1	100%
B10	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM980005.1	99%
C-10	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	DQ906172.1	99%
C16	<i>Fusarium oxysporum</i>	KM203588.1	99%
BCA-2	<i>Fusarium oxysporum</i>	LC049406.1	100%
BCB-1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	DQ906172.1	98%

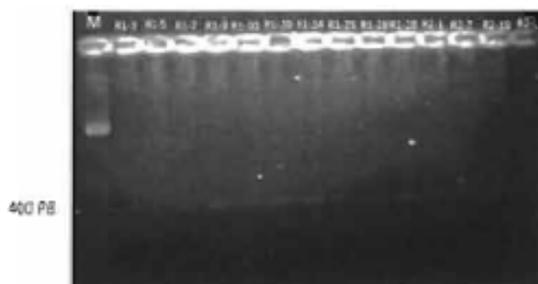


Figura 17: Productos de amplificación de las regiones ITS de las cepas de *Fusarium* sp. aisladas de *Vanilla pompona* de Nayarit, México.

El árbol resultante del análisis de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) fue enraizado con la secuencia FvX94166 de la región ITS del hongo *F. verticillioides* obtenida de la base de datos del GenBank. La especie *F. verticillioides* es la más cercana a *F. oxysporum* (Figura 18) (Ma *et al.*, 2010).

Adicionalmente, para este análisis se incluyeron dos cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*: la cepa AY387698 (Fof.sp.v.a) originaria de Colombia (Wang *et al.*, 2010) y la cepa KM005088 (Fof.sp.v.k) originaria de Veracruz (Adame-García *et al.*, 2015).

Las secuencias obtenidas a partir de cepas de *F. solani*, se agruparon aparte en un solo clado, mientras que las secuencias de *F. oxysporum*, se ubicaron en dos grandes clados, uno donde se localizan las cepas obtenidas de GenBank junto con cepas de Nayarit y otro donde solo se agrupan cepas de Nayarit, ambos clados no tienen cepas de un solo lugar, se encuentran cepas de todos los sitios.

Fusarium proviene de un ancestro en común, por lo que ha evolucionado de forma diferente dependiendo del huésped al que infecta, de esta manera, se llegan a crear las formas especiales de este género, esto se debe a que las secuencias de algunos genes no presenta cambios en cepas reportadas como patógenicas y cepas no patógenicas, en este estudio, esto se confirmó al hacer el árbol filogenético donde los clados arrojados muestran cepas patógenicas y no patógenicas, pero no manifiestan un solo clado donde solo se agrupen únicamente patógenicas, si no que los clados en base a las secuencias son muy similares entre las patógenicas y las no patógenicas. Inami *et al.*, (2014) describen que este resultado se puede deber a la transferencia horizontal de genes que se lleva a cabo de una cepa patógena a una no patógena, donde ésta comparte los genes que causan la enfermedad, también conocidos como genes SIX (Bastos *et al.*, 2015).

Los amplificadores del gen factor de elongación 1- α generaron un fragmento de 600-700 pb, lo que concuerda con lo obtenido por Pinaría *et al.*, (2015) y Adame-García *et al.*, (2015) (en prensa) (Figura 19). El análisis BLAST alineó con cepas reportadas para *Fusarium* sp. y *F. oxysporum* (Tabla 8). Pinaría *et al.*, (2010) identificaron mediante este gen, cepas de *Fusarium* relacionados con la pudrición de la vainilla en Indonesia donde encontraron que la mayoría de aislados fueron *F. oxysporum* y en menor incidencia hallaron *F. solani* y *F. semitectum* aunque estos dos últimos no resultaron patógenicos para vainilla.

Este gen forma parte de la maquinaria de las proteínas y posee una gran importancia filogenética debido a que es altamente informativo en las especies del género *Fusarium* (Baayen *et al.*, 2000).

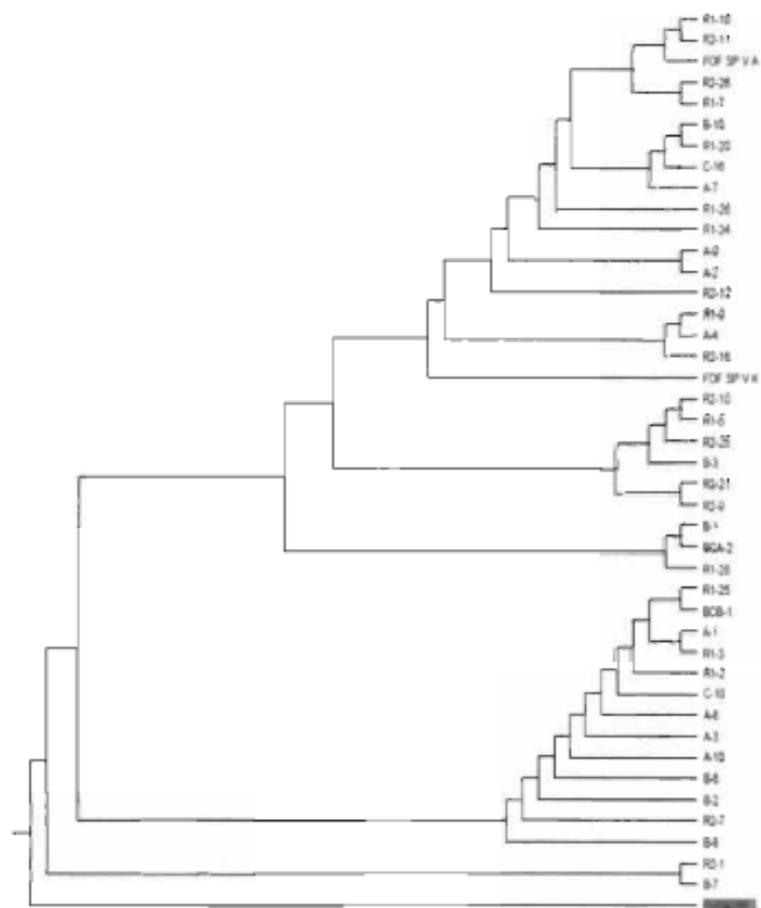


Figura 18: Árbol filogenético basado en secuencias ITS del ADN_r de cepas del género *Fusarium* aislados de vainilla en Nayarit y de cepas del GenBank.

para la amplificación de este gen se utilizaron oligonucleótidos desarrollados por O'Donnell *et al.* (1998), los cuales amplificaron una región de 700 pb (Figura 29) con una disposición de tres intrones; este gen ha sido utilizado para *Fusarium* en vainilla por Pinaría *et al.*, (2010) y Adame-García *et al.*, (2015).



Figura 19: Productos de amplificación del gen EF-1α de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Tabla 8. Porcentaje de similitud e identidad de los aislados fúngico generados a partir del análisis BLAST con registros del GenBank para EF-1α.

Clave del aislado fúngico	Descripción	Clave de secuencia en genbank	Índice de similitud
R1-5	<i>Fusarium oxysporum</i>	84%	DQ435355.1
R1-7	<i>Fusarium oxysporum</i>	98%	DQ435355.1
R1-9	<i>Fusarium oxysporum</i>	78%	NRRL38286
R1-20	<i>Fusarium oxysporum</i>	97%	KP710623.1
R1-24	<i>Fusarium</i> sp.	96%	EU091055.1
R1-26	<i>Fusarium</i> sp.	99%	KC113012.1
R1-28	<i>Fusarium</i> sp.	99%	EU091045.1
R2-10	<i>Fusarium oxysporum</i>	98%	FJ895276.1
R2-16	<i>Fusarium oxysporum</i>	99%	KM025417.1
R2-21	<i>Fusarium oxysporum</i>	98%	KP400686.1
A7	<i>Fusarium oxysporum</i>	96%	KP710623.1
B3	<i>Fusarium oxysporum</i>	97%	DQ465930.1
B-10	<i>Fusarium oxysporum</i>	98%	DQ465930.1

El análisis de las cepas patógenas a *Vanilla pompona* generó 7 árboles igualmente parsimoniosos (L = 859, IC = 71, IR = 82), en ellos se observa que las cepas se agrupan en un clado separado junto con las secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, dicho clado se subdivide a la vez en dos clados (Figura 20).

En este árbol se utilizó la secuencia de *Cyanonectria huxi* para enraizar el árbol por ser genéticamente la más cercana al género *Fusarium*, de este género se utilizaron secuencias de las especies *F. dencemcelulare*, *F. solani*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. mangifera*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, para compararlas con secuencias obtenidas de algunos hongos de este estudio, además se incluyeron secuencias *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (Pinaría et al., 2010).

Las secuencias obtenidas en este estudio se agruparon dentro de un clado junto con las secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (Pinaría et al., 2010). Pinaría et al., (2015) plantean la hipótesis de que los hongos que causan la enfermedad en la vainilla de indonesia, fue distribuida con la planta al momento de transportarla a este país, debido a que existen reportes de que el centro de origen de la vainilla es Centroamérica (FAO, 2011), pudiera ser que el hongo haya sido desplazado junto con el hospedero de esta región y como las secuencias de esta investigación se agrupan con las de indonesia, se podría considerar esta hipótesis como cierta.

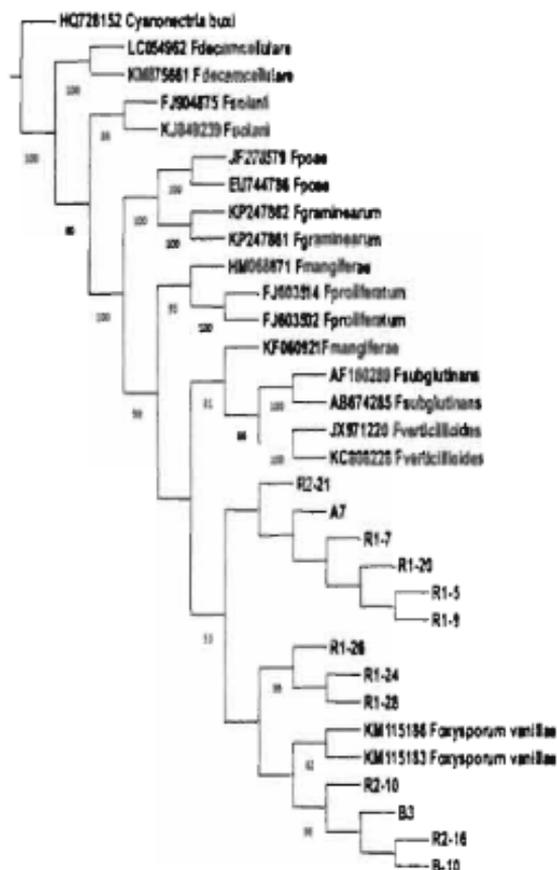


Figura 20: uno de los siete árboles más parsimoniosos ($L = 859$, $IC = 71$, $IR = 82$). El enraizado del árbol se realizó mediante el procedimiento del grupo externo (CBS 125547 *Cyanonectria busi*). Valores superiores al 50 % de bootstrap se muestran por debajo de los nodos.

5.5 Pruebas de patogenicidad en hojas.

Las pruebas de patogenicidad en las hojas de vainilla mostraron que de 40 cepas aisladas de la *Vanilla sp.* silvestre del estado de Nayarit, 19 mostraron ser patogénicas en esta parte de la planta (Tabla 9). El desarrollo de infección se evidenció a los 4 días después de la inoculación en el tejido y está varió conforme el tiempo. Las infecciones se caracterizan por la presencia de lesiones necróticas de aspecto acuoso con micelio blanquecino en la superficie foliar. Cabe destacar que la mayoría de los hongos identificados como patógenos son de rápido crecimiento (Tabla 5) y provienen del municipio de Xalisco, específicamente de los predios El Italiano y Oreja de Ratón ubicados a una altitud de 985 y 1005 m. respectivamente (Tabla 1). Las 21 cepas restantes no mostraron daño a la hoja, por lo que se consideraron cepas no patogénicas (Figura 21).

De las cepas que presentaron patogenicidad a los cuatro días a partir de la inoculación fueron: A7, C16, R2-1 y C10, por lo que se consideran colonias aparentemente más agresivas a *Vanilla pompona*. En el cuadro 10 se observa que dentro de los cultivos fúngicos más frecuentes en este periodo se identificó a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, aunque también se presentaron en igualdad de circunstancias *Fusarium sp* y *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*; en tanto que a los cinco días predominaron las cepas registradas como R2-9, R2-10, R2-11, B3 y B3₂, todas correspondientes a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, de los 6 a los 11 días, las cepas que evidenciaron actividad patogénica pertenecieron a *F. oxysporum*. En términos generales se puede mencionar que la mayoría de los microorganismos fúngicos que desarrollaron lesiones en las plantas de vainilla de Nayarit fueron miembros de *Fusarium oxysporum*.

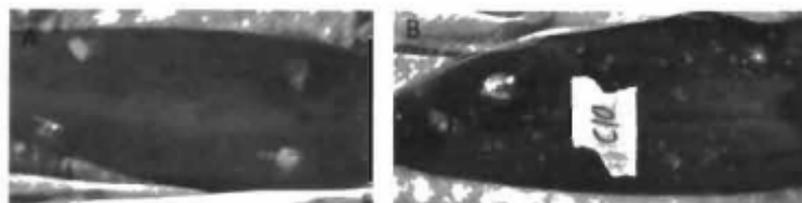


Figura 21: Aspecto del daño causado por *Fusarium* sp. en hojas de *Vanilla* sp. A) Cepa no patogénica y B) Cepa patogénica.

Adame-García *et al.* (2011) señalan que 12 días es suficiente para determinar si una cepa es patogénica o no; en este estudio se comprueba que mediante la prueba de patogenicidad de cepas en las hojas de vainilla existe la presencia de cepas patógenas y no patógenas lo que indica que en estas plantas se encuentra una diversidad de hongos tanto endófitos como patogénicos. Algunas veces el ambiente es muy favorable para el crecimiento de los hongos, y tal solo el hecho de que el suelo sea su receptáculo natural, su capacidad de sobrevivir en latencia y su fácil y pronta dispersión conidial (Agris 2005); son razones que pueden explicar su presencia en hojas como habitante y no como patógeno de las mismas.

Pinaria *et al.* (2010) señalan que la pudrición de tallos y afecciones severas en hojas y raíces de la vainilla en Indonesia se debe a *F. oxysporum*, lo que trae como consecuencia la pérdida significativa de vainilla por este patógeno (Ashoka, 2005, He, 2007, Pinaria *et al.*, 2010). En pruebas de patogenicidad se encontró que *F. oxysporum* es el hongo patogénico (causa síntomas de enfermedad) en vainilla y *F. solani* está reportado como endófito es decir que se internan en el tejido de la planta sin originar ningún síntoma (Pinaria *et al.*, 2010).



Tabla 9. Identificación de los aislados de *Fusarium* sp. según el periodo (días después de la inoculación) en que se inició el daño en las hojas de *Vanilla pompona*.

Días	Hongos patogénicos	Identificación morfológica
4	R2-1,	<i>F. solani</i>
	A7,	<i>F. oxysporum</i>
	C10,	<i>F. oxysporum</i>
	C16	<i>F. oxysporum</i>
5	R1-15,	<i>F. oxysporum</i>
	R1-20,	<i>F. oxysporum</i>
	R2-9,	<i>F. oxysporum</i>
	R2-10,	<i>F. oxysporum</i>
	R2-11,	<i>F. oxysporum</i>
	B3,	<i>F. oxysporum</i>
	B3-2	<i>F. oxysporum</i>
6	R1-26,	<i>F. oxysporum</i>
	R1-28	<i>F. oxysporum</i>
8	R1-24,	<i>F. oxysporum</i>
	A1,	<i>F. oxysporum</i>
	B2,	<i>F. oxysporum</i>
	B7	<i>F. solani</i>
11	A3	<i>F. oxysporum</i>

aunque este puede ser inducido cuando las plantas son sujetas a sequía o a otro factor de estrés; los resultados de este estudio al igual a lo obtenido por Adame-García *et al.* (2015) (en prensa) muestran que no solo *F. oxysporum* es patogénico en vainilla, sino que también la especie *F. solani*, aunque en este último tanto la frecuencia con que se aísla y la agresividad es menor a *F. oxysporum*.

5.6 Pruebas de patogenicidad en tallos.

Los tallos de vainilla enraizados e inoculados con la solución de esporas de hongo, mostraron síntomas de infección leves a los tres meses, posteriores a la vacunación; el primer síntoma de daño apreciado por *Fusarium* fue una pequeña clorosis en la base de esta estructura

morfológica de la planta. Similarmente, Santa *et al.* (2012) encontraron a los 30 días después de la inoculación, que solamente los hongos identificados como miembros de la especie *F. oxysporum* (MA136_18 y MA140_22) indujeron desarrollo de lesiones necróticas en los tallos de las plantas de *Vainilla planifolia*; estas lesiones necróticas presentaron un aspecto acuoso con halos cloróticos y desarrollo con tendencias descendentes lo que provoca la marchites de la planta y por consiguiente la muerte de la misma.

Coincidentemente las cepas que presentaron patogenicidad en hojas fueron las mismas que presentaron daño en tallos, lo que demuestra que estas cepas son patógenos de mata de vainilla, resultados que concuerdan con lo obtenidos por Adame-García *et al.* (2011), quienes encontraron cepas altamente patogénicas, así como cepas moderadamente patogénicas y cepas no patogénicas. Como parte de los postulados de Koch, se obtuvieron crecimientos característicos de *Fusarium* en todos los tejidos de vainilla donde se inoculó este microorganismo fitopatógeno (Figura 22).



Figura 22: A) Vainillas inoculadas y B) Siembra de las vainillas.